

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ ПРИ ИХ СОВМЕСТИМ ОМ ПРИМЕНЕНИИ С АЗИТРОМИЦИНОМ ИЛИ ТЕОФИЛЛИНОМ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ НК И НКТ-ПОДОБНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ

А.Г. Кадушкин^{1}, А.Д. Таганович¹, Л.В. Мовчан², Т.С. Колесникова¹, Е.В. Ходосовская¹, Т.В. Шман²*

¹Белорусский государственный медицинский университет,

220116, Республика Беларусь, Минск, пр. Дзержинского, 83; *эл. почта: kadushkyn@gmail.com

²Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, 223053, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) характеризуется сниженной чувствительностью клеток к противовоспалительным эффектам глюкокортикостероидов (ГКС). Известно, что теофиллин в низкой концентрации и азитромицин могут влиять на молекулярные механизмы развития стероидорезистентности. Целью настоящего исследования была оценка способности азитромицина и теофиллина усиливать противовоспалительное действие ГКС на продукцию цитокинов НК и НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ. Клетки цельной крови пациентов с ХОБЛ (n=21) инкубировали в присутствии будесонида (10 нМ), азитромицина (10 мкг/мл), теофиллина (1 мкМ) или их комбинаций и стимулировали форбол-миристан-ацетатом (50 нг/мл). Внутриклеточную продукцию провоспалительных цитокинов в НК (CD3-CD56+) и НКТ-подобных (CD3+CD56+) клетках крови анализировали методом проточной цитометрии. Будесонид снижал синтез интерлейкина 4 (ИЛ-4), CXCL8, фактора некроза опухоли α (ФНО α) НК и НКТ-подобными клетками, а также продукцию интерферона γ (ИФН γ) НК клетками. Азитромицин подавлял синтез ИЛ-4 и CXCL8 НК и НКТ-подобными клетками, а теофиллин ингибировал продукцию ИЛ-4 этими лимфоцитами. Сочетание азитромицина и будесонида оказывало более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 и CXCL8 НК и НКТ-подобными клетками, чем действие любого из этих препаратов. Комбинация теофиллина и будесонида супрессировала синтез ИЛ-4 и CXCL8 НК и НКТ-подобными клетками, а также продукцию ФНО α и ИФН γ НК клетками более значительно, чем один будесонид. Полученные данные демонстрируют преимущества комбинированного использования ГКС совместно с теофиллином в низкой концентрации либо азитромицином для подавления воспалительного процесса у пациентов с ХОБЛ.

Ключевые слова: азитромицин; глюкокортикостероиды; теофиллин; хроническая обструктивная болезнь лёгких; НК клетки; НКТ-подобные клетки

DOI: 10.18097/PBMC20216704352

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всём мире. В ближайшие десятилетия ожидается рост бремени ХОБЛ, связанный с продолжающимся воздействием факторов риска и старением населения [1].

Глюкокортикостероиды (ГКС) продемонстрировали высокую эффективность при лечении ряда хронических заболеваний, в частности бронхиальной астмы, однако оказались умеренно полезны в улучшении функции лёгких и подавлении воспалительного процесса у пациентов с ХОБЛ [2, 3]. Клинические испытания также не выявили преимуществ этих препаратов в отношении снижения смертности пациентов с ХОБЛ [3]. Полагают, что причинами сниженной чувствительности к ГКС являются повышение экспрессии глюкокортикоидного рецептора β и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, а также снижение экспрессии ферментов гистондеацетилазы 2 (ГДА2) и фосфатазы 1 митоген-активируемой протеинкиназы в ответ на воздействие окислительного стресса [4]. Развитие

последнего провоцируют активные формы кислорода, присутствующие в сигаретном дыме, производственной пыли, продуктах сжигания биоорганического топлива. Как следствие, ГКС лишь частично подавляют синтез провоспалительных белков.

Естественные киллеры (НК, англ. natural killer cells) и естественные киллерные Т-клетки (НКТ, англ. natural killer T cells) пациентов с ХОБЛ оказались устойчивыми к ГКС [5]. Относительное количество этих клеток повышено в бронхоальвеолярной лаважной жидкости пациентов с ХОБЛ [5]. НК и НКТ клетки являются существенным источником цитокинов (интерферона γ (ИФН γ), фактора некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкина 4 (ИЛ-4), CXCL8 и других) в периферической крови и дыхательных путях пациентов с ХОБЛ и, более того, проявляют цитотоксичность в отношении собственных эпителиальных клеток лёгких пациента, которая возрастает с усилением тяжести ХОБЛ, что свидетельствует об их вовлечённости в прогрессирование заболевания [6].

В настоящее время предпринимаются попытки поиска лекарственных средств, способных потенцировать действие ГКС. Среди препаратов,

оказавшихся в поле зрения учёных, — азитромицин и теофиллин. Макролидный антибиотик азитромицин проявляет бактериостатическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также атипичных возбудителей инфекций. Он снижает вирулентность бактерий за счёт ингибирования образования биоплёнок, синтеза белка бактериями и продукции патоген-ассоциированных молекулярных паттернов бактериями, а также путём усиления фагоцитоза и внутриклеточного разрушения бактерий моноцитами [7]. Азитромицин также проявляет иммуномодулирующие свойства путём ингибирования продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, ослабляя миграцию иммунокомпетентных клеток в дыхательные пути [7, 8]. Сообщается о способности макролидов, включая азитромицин, ингибировать фосфорилирование киназы Akt [9], означая их способность модулировать механизмы развития стероидорезистентности. Появились данные о способности азитромицина потенцировать противовоспалительные эффекты ГКС [8], которые оспариваются другими учёными [10].

Теофиллин на протяжении долгих лет используется в качестве бронходилататора для лечения ХОБЛ, однако с появлением лекарственных средств с лучшей переносимостью и эффективностью утратил свою значимость [11]. Согласно современному руководству по лечению ХОБЛ, теофиллин рекомендуется использовать для достижения эффекта бронходилатации только в случаях, когда другие длительнодействующие бронходилататоры (β_2 -агонисты и М-холиноблокаторы) недоступны пациенту [1]. Вместе с тем установлена способность теофиллина проявлять противовоспалительные эффекты в дозах ниже тех, что требуются для расширения бронхов. Так, теофиллин в концентрации близкой к 5 мг/л селективно ингибирует фосфотидилинозитол-3-киназу δ (ФИЗК δ), что в дальнейшем приводит к активации ГДА2 и угнетению экспрессии провоспалительных медиаторов [11]. Однако накопленные на сегодняшний день сведения о способности теофиллина усиливать противовоспалительные свойства ГКС неоднозначны и разноречивы [12, 13].

Целью настоящего исследования была оценка способности азитромицина и теофиллина усиливать противовоспалительное действие ГКС на продукцию цитокинов NK и NKT-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ.

МЕТОДИКА

Характеристика пациентов

В соответствии с критериями Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни лёгких (GOLD) в исследование был включён 21 пациент с ХОБЛ (характеристика пациентов представлена в таблице). Критериями исключения из исследования явились наличие у пациентов других заболеваний лёгких, включая бронхиальную астму, аллергических и онкологических заболеваний, декомпенсации сахарного диабета, нарушений

Таблица. Характеристика участников исследования

	Пациенты с ХОБЛ
Пациенты	21
Пол, м/ж	17/4
Возраст (годы)	65,1 \pm 1,5
ИМТ, кг·м ⁻²	26,7 \pm 1,2
Статус курения	
Курильщики	10
Экс-курильщики	11
Индекс курящего человека	32,5 \pm 2,4
ОФВ ₁ , % от должного	52,4 \pm 4,1
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	57,0 \pm 2,5

Примечание. Данные представлены как абсолютное количество или среднее \pm стандартная ошибка среднего. ИМТ: индекс массы тела; ОФВ₁: объём форсированного выдоха за 1 с; ФЖЕЛ: форсированная жизненная ёмкость лёгких.

свёртывающей системы крови, а также приём системных ГКС или обострение ХОБЛ в течение 6 недель до начала исследования.

Проточная цитометрия

Внутриклеточную продукцию цитокинов NK (CD3-CD56+) и NKT-подобными (CD3+CD56+) клетками крови оценивали методом проточной цитометрии. Окрашивание клеток проводили с использованием моноклональных антител (мАт), конъюгированных со следующими флуорохромами: флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), фикоцитритрином (PE), PE-DyLight 594, PE-Cy7, аллофикоцианином (APC) и APC-Alexa Fluor 750. Эти мАт включали антитела, специфичные к антигенам CD45, CD3, CD56, ИЛ-4, CXCL8, ИФН γ и ФНО α , а также изотипические антитела, которые были произведены “Beckman Coulter” (Франция), “Exbio” (Чешская Республика) и “R&D systems Europe” (Великобритания).

Гепаринизированную цельную кровь смешивали 1:1 с культуральной средой RPMI 1640, содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (“Capricorn Scientific”, Германия), и инкубировали в присутствии или отсутствии будесонида (10 нМ), азитромицина (10 мкг/мл), теофиллина (1 мкМ) (все три лекарственных средства произведены компанией “Glentham Life Sciences Ltd”, Великобритания) при 37°C, 5% CO₂ в течение 1 ч (рис. 1). Далее к клеточным культурам вносили форбол-миристат-ацетат (ФМА, 50 нг/мл) (“Cayman Chemical”, США) и иономицин (Ион, 1 мкг/мл) (“Cayman Chemical”, Израиль). ФМА использовали для активации протеинкиназы C — центрального участника многих внутриклеточных сигнальных путей. Реализация эффектов протеинкиназы C требует наличия ионов Ca²⁺, в связи с чем ФМА применяли в комбинации с ионофором кальция (иономицином), который способен транспортировать ионы Ca²⁺ через клеточную мембрану. Сочетание ФМА и иономицина, использованное в настоящем эксперименте, позволяет значительно активировать

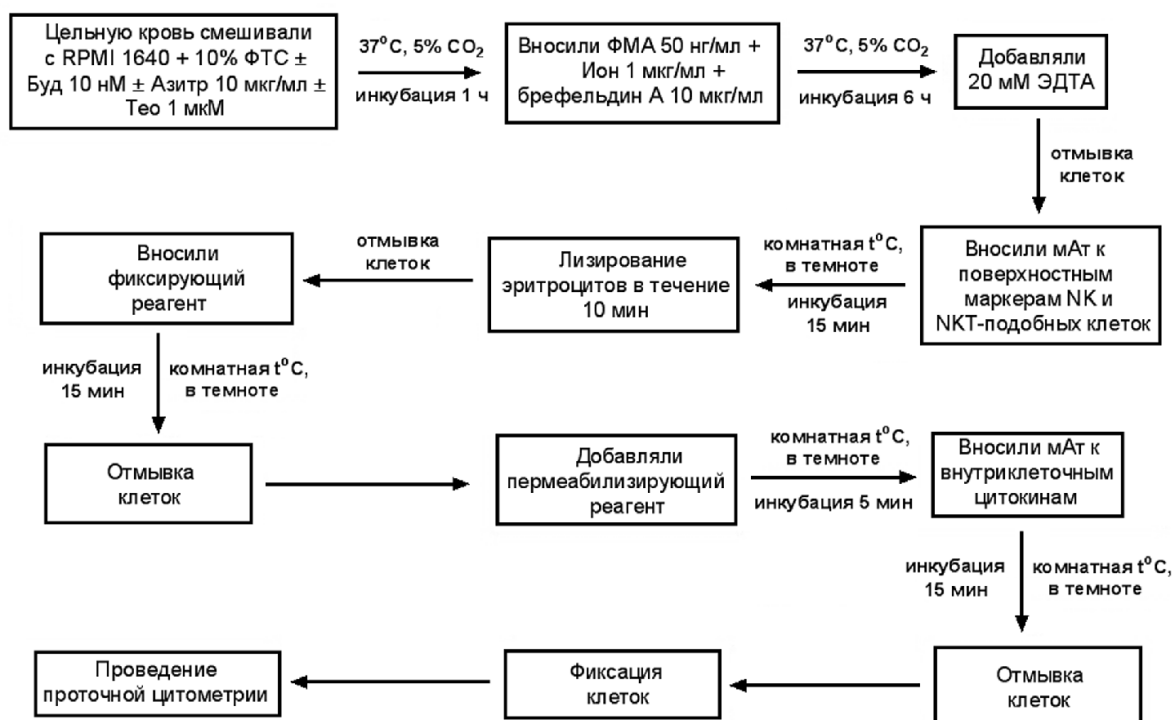


Рисунок 1. Дизайн эксперимента. Примечание: Азитр — азитромицин; Буд — будесонид; Ион — иономицин; мАт — моноклональные антитела; Тео — теofilлин; ФМА — форбол-миристан-ацетат; ФТС — фетальная телячья сыворотка; ЭДТА — динатрия этилендиаминтетраацетат дигидрат.

синтез провоспалительных цитокинов лейкоцитами крови. Для накопления цитокинов внутри клетки (предотвращения их секреции за пределы клетки) вносили 10 мкг/мл брефельдина А (“Сауман Chemical”, Израиль) и пробирки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ со слегка прикрытыми крышками, не препятствующими доступу CO₂-содержащего воздуха. После 6 ч инкубации в пробирки вносили 100 мкл 20 мМ динатрия этилендиаминтетраацетата дигидрата в фосфатно-солевом буфере для прекращения активации и удаления адгезированных клеток.

После отмывки клеток в пробирки вносили мАт к поверхностным маркерам на 15 мин при комнатной температуре. Эритроциты лизировали с помощью лизирующего раствора VersaLyse (“Beckman Coulter”). По истечении 10 мин пробирки центрифугировали при 500 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, а лейкоциты фиксировали и пермеабилizировали с использованием IntraPrep Permeabilization Reagent (“Beckman Coulter”). В дальнейшем в пробирки вносили мАт к внутриклеточным цитокинам на 15 мин при комнатной температуре. В своих экспериментах мы также использовали нестимулированный и изотипический контроли для обеспечения правильной компенсации флуоресценции и подтверждения специфичности антител. После отмывки клеток в отмывочном буфере, центрифугирования и удаления супернатанта, клетки фиксировали при помощи фиксирующего раствора (“Beckman Coulter”) до проведения цитометрического исследования. Образцы анализировали на проточном цитометре Navios при помощи программного обеспечения Kaluza (“Beckman Coulter”).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа данных GraphPad Prism версия 7.00 (“GraphPad Software”, США). Результаты исследования представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего от общего числа наблюдений с нормальным распределением данных, что подтверждалось построением гистограмм распределения и определением критерия Шапиро-Уилка. Оценку результатов исследования проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. При всех видах статистического анализа различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы продемонстрировали способность глюкокортикоида будесонида, макролидного антибиотика азитромицина и метилксантина теofilлина ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов NK и NKT-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ. Комбинирование будесонида с теofilлином или азитромицином приводило к усилению противовоспалительных свойств ГКС. Полученные данные убедительно доказывают целесообразность комбинации лекарственных средств (ГКС/теofilлин, ГКС/азитромицин) для супрессии воспалительного процесса у пациентов с ХОБЛ.

НКТ клетки являются уникальной субпопуляцией лимфоцитов, поскольку на своей поверхности одновременно несут маркеры Т и НК клеток — CD3 и CD56. НКТ клетки распознают лиганды, презентруемые дендритными клетками в комплексе с молекулой CD1d. Эти клетки находятся на стыке врожденного и приобретенного иммунитета и оказывают влияние на другие иммунокомпетентные клетки путём продукции цитокинов и межклеточного взаимодействия, что приводит к усилению или ослаблению иммунного ответа [14]. В частности, активированные НКТ клетки продуцируют ИФН γ , ФНО α , ИЛ-4 и CXCL8.

При описании результатов нашего исследования мы обозначали CD3+CD56+ клетки как НКТ-подобные клетки. Такое общепринятое обозначение обусловлено тем, что Т-лимфоциты также могут экспрессировать маркеры НК клеток, включая CD56 [14]. При этом взаимодействие CD3+CD56+ клеток с CD1d, что требуется для отнесения этих клеток к популяции истинных НКТ клеток, нами не оценивалось.

НК лимфоциты относят к клеткам врождённого иммунитета. Они лишены Т-клеточного рецептора и связанного с ним комплекса полипептидных цепей CD3, но экспрессируют Fc-рецепторы, CD16 и CD56. НК клетки управляют ходом воспалительного процесса путём секреции цитокинов (в том числе ИЛ-4, CXCL8, ИФН γ и ФНО α) и проявления цитотоксичности [15].

Интерлейкин 4 способствует пролиферации Т-клеток и дифференцировке антиген-стимулированных наивных Т-хелперов в Т-хелперы 2-го типа. Он индуцирует синтез антител В-лимфоцитами, стимулирует пролиферацию, дифференцировку и активацию фибробластов, эндотелиальных и эпителиальных клеток, продукцию коллагена фибробластами и усиливает привлечение клеток воспаления в лёгкие [16]. В настоящем исследовании культивация клеток периферической крови только с будесонидом или азитромицином приводила к снижению продукции ИЛ-4 НК и НКТ-подобными клетками. Теофиллин также проявлял способность подавлять синтез этого цитокина НК и НКТ-подобными клетками (рис. 2). Комбинация будесонида и азитромицина оказывала более выраженное ингибирующее воздействие на синтез ИЛ-4 НК и НКТ-подобными клетками, чем действие этих лекарственных средств по отдельности. Аналогичные данные были получены при совместном использовании теофиллина и будесонида. Полученные результаты свидетельствуют о способности азитромицина и теофиллина усиливать противовоспалительные свойства будесонида в отношении продукции ИЛ-4 НК и НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ.

ИФН γ представляет собой провоспалительный цитокин, который опосредует иммунологический ответ на вирусы, микроорганизмы и опухолевый рост путём активации иммунокомпетентных клеток и усиления презентации антигена. Он повышает экспрессию молекулы клеточной адгезии 1, связанной с раковым эмбриональным антигеном,

в эпителиальных клетках дыхательных путей, способствуя пролиферации и миграции эпителиальных клеток, а также продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и CXCL8) [17]. ИФН γ индуцирует экспрессию CXCL9, CXCL10 и CXCL11 эпителиальными клетками бронхов и макрофагами, которые служат лигандами для хемокинового рецептора CXCR3. Этот рецептор располагается на поверхности лимфоцитов и принимает участие в их перемещении в лёгкие пациентов с ХОБЛ [2]. В нашей работе будесонид снижал процент НК клеток пациентов с ХОБЛ, продуцирующих ИФН γ , но не был способен изменить синтез этого цитокина НКТ-подобными клетками, тогда как азитромицин и теофиллин не влияли на продукцию этого цитокина ни НК, ни НКТ-подобными клетками. Другими авторами не было выявлено изменений продукции ИФН γ НК клетками здоровых доноров под влиянием азитромицина [18]. В нашей лаборатории комбинация азитромицина и будесонида подавляла синтез ИФН γ НК и НКТ-подобными клетками, демонстрируя преимущества перед будесонидом в отношении снижения продукции ИФН γ НКТ-подобными клетками. Сочетание теофиллина и будесонида оказалось более эффективным в ингибировании образования ИФН γ НК клетками, чем каждый из препаратов по отдельности.

Хроническая гипоксемия и системный воспалительный процесс, наблюдающиеся у пациентов с ХОБЛ, приводят к активации ФНО α [19]. Этот цитокин стимулирует образование активных форм кислорода в клетках лёгочной и внелёгочных тканей, а также снижает количество внутриклеточного антиоксиданта глутатиона в лёгочной ткани. Это приводит к развитию окислительного стресса и последующей активации факторов транскрипции NF- κ B и AP-1, которые способствуют синтезу провоспалительных медиаторов [20]. Так, ФНО α повышает экспрессию ИЛ-8 нейтрофилами и эпителиальными клетками воздухоносных путей, а также продукцию матриксных металлопротеиназ макрофагами [21]. Его концентрация повышена в индуцированной мокроте и периферической крови пациентов с ХОБЛ [21, 22]. В настоящем исследовании будесонид, в отличие от азитромицина и теофиллина, подавлял синтез ФНО α НК и НКТ-подобными клетками пациентов с ХОБЛ (рис. 3). Добавление одновременно азитромицина и будесонида к клеткам крови приводило к более значительному снижению процента НК и НКТ-подобных клеток, экспрессирующих ФНО α , чем при инкубации клеток только в присутствии азитромицина. Однако статистической разницы при сравнении ингибирующих свойств будесонида с комбинацией будесонида/азитромицин в отношении продукции этого цитокина НК и НКТ-подобными клетками не наблюдалось. Сочетание будесонида и теофиллина подавляло образование ФНО α НК и НКТ-подобными клетками крови по сравнению с клетками, находившимися в культуральной среде в отсутствие этих лекарственных средств. При этом снижение процента НК клеток, синтезирующих ФНО α , было более значимым при совместном

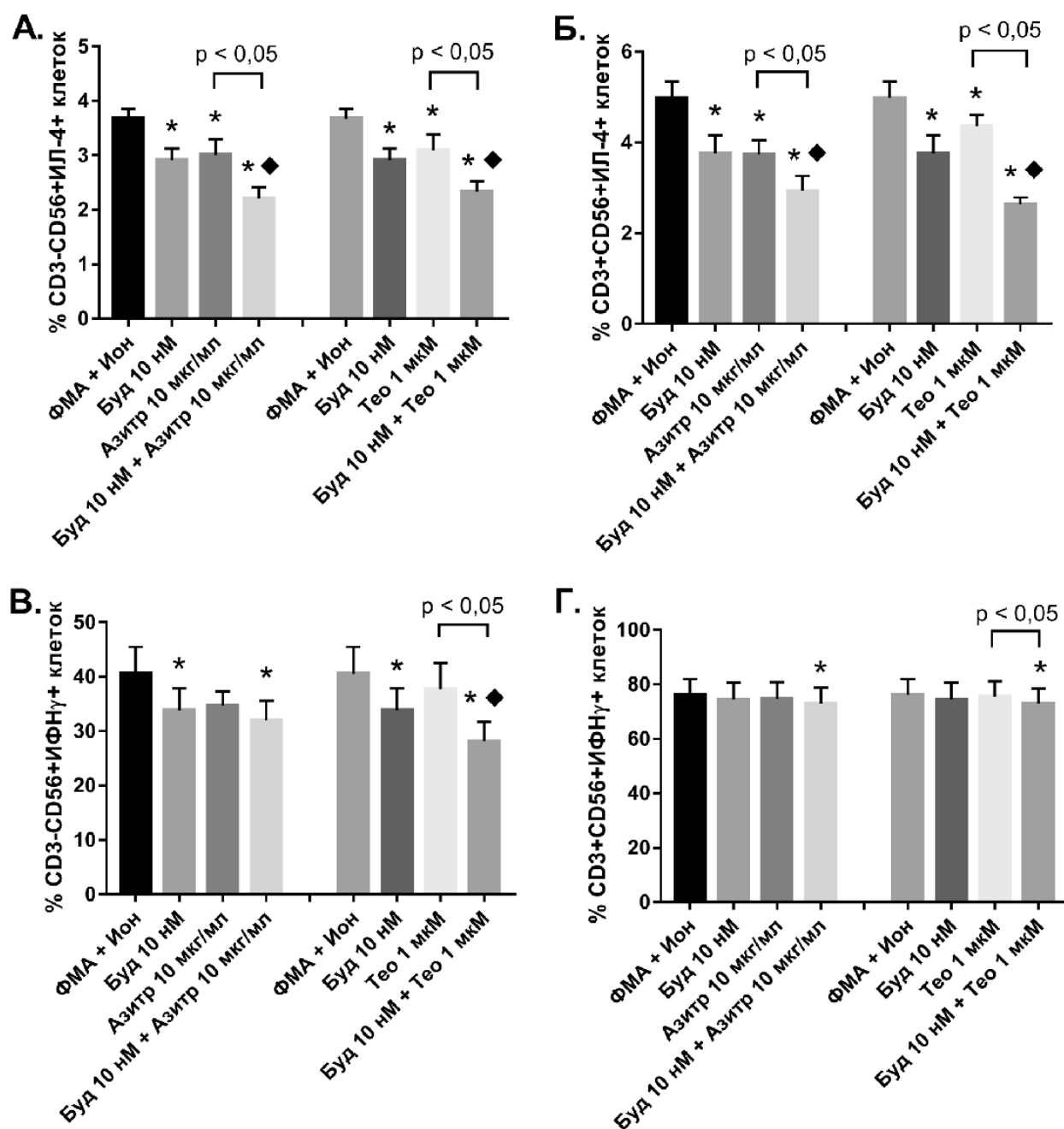


Рисунок 2. Влияние будесонида, азитромицина, теофиллина и их комбинаций на продукцию интерлейкина 4 (ИЛ-4) и интерферона γ (ИФН γ) НК (А, В) и НКТ-подобными (Б, Г) клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких. Клетки периферической крови инкубировали с будесонидом (Буд, 10 нМ), азитромицином (Азитр, 10 мкг/мл), теофиллином (Тео, 1 мкМ) или их комбинациями в течение 1 ч, после чего стимулировали форбол-миристинат-ацетатом (ФМА, 50 нг/мл) и иономицином (Ион, 1 мкг/мл). Экспрессию ИЛ-4 и ИФН γ НК и НКТ-подобными клетками крови определяли методом проточной цитометрии. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; $n=6$. * — $p<0,05$ по сравнению с ФМА+Ион; ◆ — $p<0,05$ по сравнению с Буд 10 нМ.

использовании будесонида и теофиллина, чем при раздельном применении этих препаратов. Суммируя, ГКС в сочетании с теофиллином или азитромицином существенно угнетают продукцию ИФН γ и ФНО α НК и НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ, чем препятствуют реализации провоспалительных эффектов этих цитокинов, описанных нами выше.

CXCL8 является ключевым медиатором, обуславливающим перемещение нейтрофилов в лёгкие пациентов с ХОБЛ. Он синтезируется в ответ на различные факторы, включая провоспалительные цитокины, микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, а также при патологических процессах, сопровождающихся развитием гипоксии, реперфузии или гипероксии [20].

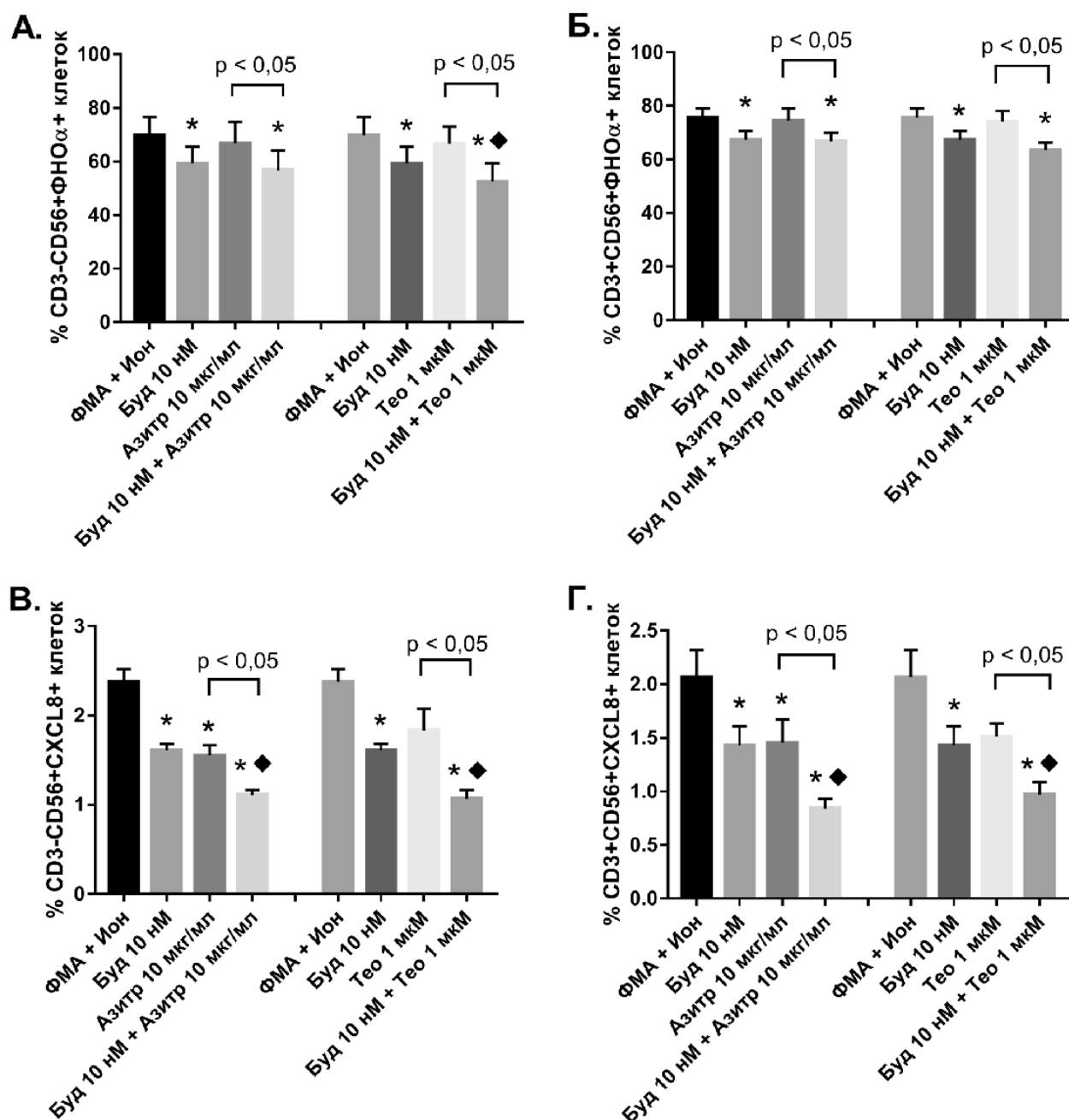


Рисунок 3. Влияние будесонида, азитромицина, теофиллина и их комбинаций на продукцию фактора некроза опухоли α (ФНО α) и CXCL8 NK (А, В) и NKT-подобными (Б, Г) клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких. Клетки периферической крови инкубировали с будесонидом (Буд, 10 нМ), азитромицином (Азитр, 10 мкг/мл), теофиллином (Тео, 1 мкМ) или их комбинациями в течение 1 ч, после чего стимулировали форбол-миристал-ацетатом (ФМА, 50 нг/мл) и иономицином (Ион, 1 мкг/мл). Экспрессию ФНО α и CXCL8 NK и NKT-подобными клетками крови определяли методом проточной цитометрии. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; $n=5-6$. * — $p<0,05$ по сравнению с ФМА+Ион; ♦ — $p<0,05$ по сравнению с Буд 10 нМ.

В нашей работе будесонид и азитромицин снижали синтез CXCL8 NK и NKT-подобными клетками пациентов с ХОБЛ, в то время как теофиллин не оказывал влияния на продукцию этого хемокина. При совместном применении будесонида и азитромицина наблюдалось синергичное ингибирующее действие этих препаратов на продукцию CXCL8 NK и NKT-подобными клетками. Сочетание теофиллина и будесонида

также оказалось более эффективным в супрессии синтеза этого хемокина, чем каждое лекарственное средство по отдельности. Такие находки свидетельствуют о способности азитромицина и теофиллина в комбинации с ГКС преодолевать развитие стероидорезистентности у пациентов с ХОБЛ, в том числе за счёт более значимого угнетения образования CXCL8 NK и NKT-подобными клетками.

К настоящему времени описаны несколько механизмов, позволяющих азитромицину и теофиллину модулировать стероидорезистентность. Азитромицин способен восстанавливать чувствительность к ГКС путём повышения экспрессии фермента ГДА2 и глюкокортикоидного рецептора α , ингибирования сигнального пути, опосредованного ФИЗК8/Akt [8]. Азитромицин также угнетает активность киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK-киназы), и c-Jun N-терминальной киназы (JNK-киназы) [23]. Эти ферменты могут фосфорилировать глюкокортикоидный рецептор α , препятствуя его транслокации в ядро клетки, что ведёт к снижению чувствительности к ГКС [4]. Сообщается о способности азитромицина подавлять активность факторов транскрипции NF- κ B и AP-1 [23], которые индуцируют экспрессию генов, кодирующих провоспалительные белки (цитокины, хемокины, ферменты, молекулы адгезии).

Теофиллин в низкой концентрации повышает активность ГДА2 в клетках пациентов с ХОБЛ за счёт угнетения активности ФИЗК8 [13]. Известно, что фермент ГДА2 способен индуцировать деацетилирование глюкокортикоидного рецептора, давая ему возможность связываться с субъединицей p65 NF- κ B и в последующем ингибировать экспрессию генов, кодирующих провоспалительные белки [24]. У пациентов с ХОБЛ выявлена сниженная экспрессия ГДА2 в мононуклеарных клетках периферической крови [25]. Снижение экспрессии и активности ГДА2, во-первых, приводит к гиперацилированию гистонов, а во-вторых, препятствует взаимодействию глюкокортикоидного рецептора с NF- κ B и, таким образом, не останавливает синтез провоспалительных цитокинов [24].

Теофиллин также снижает уровень пероксинитрита (ONOO⁻), образующегося в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ в результате окислительного и нитрозативного стресса [11]. Пероксинитрит при взаимодействии с ГДА2 приводит к нитрозилированию остатков тирозина этого фермента. Модифицированный фермент утрачивает свою активность и, более того, подвергается убиквитинилированию и последующей протеасомной деградации, что влечёт за собой снижение его экспрессии [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Будесонид, теофиллин и азитромицин самостоятельно демонстрируют противовоспалительные эффекты в отношении продукции цитокинов НК и НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ. Так, будесонид снижает синтез ИЛ-4, CXCL8, ФНО α НК и НКТ-подобными клетками, а также ИФН γ НК клетками. Азитромицин подавляет продукцию ИЛ-4 и CXCL8 НК и НКТ-подобными клетками, а теофиллин ингибирует лишь синтез ИЛ-4 этими лимфоцитами. Сочетание азитромицина и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию

ИЛ-4 и CXCL8 НК и НКТ-подобными клетками, чем действие любого из этих препаратов. Комбинация теофиллина и будесонида подавляет синтез ИЛ-4 и CXCL8 НК и НКТ-подобными клетками, а также продукцию ФНО α и ИФН γ НК клетками более значительно, чем один будесонид. Полученные данные демонстрируют преимущества комбинированного использования ГКС совместно с теофиллином в низкой концентрации либо азитромицином для лечения ХОБЛ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность врачам-пульмонологам Минского клинического консультативно-диагностического центра Э.И. Талабаевой и А.В. Пластининой за оказанную помощь при проведении данного исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке государственной программы научных исследований “Фундаментальные и прикладные науки — медицине” в рамках задания № 2.56 (Республика Беларусь).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведение исследования было одобрено комитетом по биомедицинской этике Белорусского государственного медицинского университета (протокол № 8 от 21.01.2019). Все пациенты были информированы о целях, задачах, методике исследования и дали письменное добровольное согласие на участие в нём.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vogelmeier C.F., Criner G.J., Martinez F.J., Anzueto A., Barnes P.J., Bourbeau J., Celli B.R., Chen R., Decramer M., Fabbri L.M., Frith P., Halpin D.M., López Varela M.V., Nishimura M., Roche N., Rodriguez-Roisin R., Sin D.D., Singh D., Stockley R., Vestbo J., Wedzicha J.A., Agustí A. (2017) Am. J. Respir. Crit. Care Med., **195**(5), 557-582.
2. Barnes P.J. (2018) Nat. Rev. Immunol., **18**(7), 454-466.
3. Yang I.A., Clarke M.S., Sim E.H., Fong K.M. (2012) Cochrane Database Syst. Rev., **7**, CD002991. DOI: 10.1002/14651858.CD002991.pub3
4. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д. (2016) Пульмонология, **26**(6), 736-747. [Kadushkin A.G., Taganovich A.D. (2016) Pulmonologiya, **26**(6), 736-747].
5. Hodge G., Hodge S. (2019) Int. J. Mol. Sci., **20**(6), 1511. DOI:10.3390/ijms20061511
6. Freeman C.M., Stolberg V.R., Crudginton S., Martinez F.J., Han M.K., Chensue S.W., Arenberg D.A., Meldrum C.A., McCloskey L., Curtis J.L. (2014) PLoS One, **9**(7), e103840. DOI: 10.1371/journal.pone.0103840
7. Reijnders T.D.Y., Saris A., Schultz M., van der Poll T. (2020) Lancet Respir. Med., **8**(6), 619-630.

8. Sun X.J., Li Z.H., Zhang Y., Zhou G., Zhang J.Q., Deng J.M., Bai J., Liu G.N., Li M.H., MacNee W., Zhong X.N., He Z.Y. (2015) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **309**(2), L139-L146.
9. Kobayashi Y., Wada H., Rossios C., Takagi D., Charron C., Barnes P.J., Ito K. (2013) *Br. J. Pharmacol.*, **169**(5), 1024-1034.
10. Ceccato A., Cilloniz C., Ranzani O.T., Menendez R., Agusti C., Gabarrus A., Ferrer M., Sibila O., Niederman M.S., Torres A. (2017) *PLoS One*, **12**(6), e0178022. DOI: 10.1371/journal.pone.0178022
11. Barnes P.J. (2013) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **188**(8), 901-906.
12. Devereux G., Cotton S., Fielding S., McMeekin N., Barnes P.J., Briggs A., Burns G., Chaudhuri R., Chrystyn H., Davies L., de Soyza A., Gompertz S., Haughney J., Innes K., Kaniewska J., Lee A., Morice A., Norrie J., Sullivan A., Wilson A., Price D. (2018) *JAMA*, **320**(15), 1548-1559.
13. To Y., Ito K., Kizawa Y., Failla M., Ito M., Kusama T., Elliott W.M., Hogg J.C., Adcock I.M., Barnes P.J. (2010) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **182**(7), 897-904.
14. Krijgsman D., Hokland M., Kuppen P.J.K. (2018) *Front. Immunol.*, **9**, 367. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00367
15. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. (2018) *Front. Immunol.*, **9**, 1869. DOI:10.3389/fimmu.2018.01869
16. Luzina I.G., Lockatell V., Todd N.W., Highsmith K., Keegan A.D., Hasday J.D., Atamas S.P. (2011) *J. Leukoc. Biol.*, **89**(5), 763-770.
17. Zhu Y., Song D., Song Y., Wang X. (2019) *J. Transl. Med.*, **17**(1), 147. DOI: 10.1186/s12967-019-1894-3
18. Lin S.J., Yan D.C., Lee W.I., Kuo M.L., Hsiao H.S., Lee P.Y. (2012) *Int. Immunopharmacol.*, **13**(1), 8-14.
19. Webster J.M., Kempen L.J.A.P., Hardy R.S., Langen R.C.J. (2020) *Front. Physiol.*, **11**, 597675. DOI: 10.3389/fphys.2020.597675
20. Barnes P.J. (2016) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**(1), 16-27.
21. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Таганович Н.Д. (2013) Пульмонология, №5, 61-69. [Kadushkin A.G., Taganovich A.D., Taganovich N.D. (2013) *Pulmonologiya*, no. 5, 61-69.]
22. Yao Y., Zhou J., Diao X., Wang S. (2019) *Ther. Adv. Respir. Dis.*, **13**, 1753466619866096. DOI:10.1177/1753466619866096
23. Yang J. (2020) *J. Int. Med. Res.*, **48**(6), 300060520932104. DOI: 10.1177/0300060520932104
24. Ito K., Yamamura S., Essilfie-Quaye S., Cosio B., Ito M., Barnes P.J., Adcock I.M. (2006) *J. Exp. Med.*, **203**(1), 7-13.
25. Tan C., Xuan L., Cao S., Yu G., Hou Q., Wang H. (2016) *PLoS One*, **11**(1), e0147380. DOI: 10.1371/journal.pone.0147380

Поступила в редакцию: 04. 05. 2021.
После доработки: 30. 06. 2021.
Принята к печати: 08. 07. 2021.

THE EFFECT OF GLUCOCORTICOIDS IN COMBINATION WITH AZITHROMYCIN OR THEOPHYLLINE ON CYTOKINE PRODUCTION BY NK AND NKT-LIKE BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

A.G. Kadushkin^{1*}, A.D. Tahanovich¹, L.V. Movchan², T.S. Kolesnikova¹, A.V. Khadasouskaya¹, T.V. Shman²

¹Belarusian State Medical University,

83 Dzerzhinski ave., Minsk, 220116 Belarus; *e-mail: kadushkyn@gmail.com

²Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzenskaya str., Borovlyani, Minsk region, 223053 Belarus

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by reduced sensitivity of cells to the anti-inflammatory effects of glucocorticoids (GCs). Azithromycin and a low dose theophylline have a significant impact on molecular mechanisms leading to corticosteroid resistance. The aim of this study was to evaluate the ability of azithromycin and theophylline to enhance the anti-inflammatory effects of GCs on the production of cytokines by NK and NKT-like blood cells of COPD patients. Whole blood cells from COPD patients (n=21) were incubated in the presence of budesonide (10 nM), azithromycin (10 µg/mL), theophylline (1 µM), or their combinations and stimulated with phorbol myristate acetate (50 ng/mL). Intracellular production of proinflammatory cytokines in NK (CD3-CD56+) and NKT-like (CD3+CD56+) blood cells was analyzed by flow cytometry. Budesonide reduced synthesis of interleukin 4 (IL-4), CXCL8, tumor necrosis factor α (TNFα) by NK and NKT-like cells, as well as production of interferon γ (IFNγ) by NK cells. Azithromycin suppressed production of IL-4 and CXCL8 by NK and NKT-like cells, and theophylline inhibited IL-4 synthesis by these lymphocytes. The combination of azithromycin and budesonide had a more pronounced inhibitory effect on the production of IL-4 and CXCL8 by NK and NKT-like cells than the effect of these drugs alone. The combination of theophylline and budesonide suppressed synthesis of IL-4 and CXCL8 by NK and NKT-like cells, as well as the production of TNFα and IFNγ by NK cells stronger than budesonide alone. The obtained results demonstrate the benefits for the combined use of GCs with theophylline at a low dose or azithromycin to suppress the inflammatory process in patients with COPD.

Key words: azithromycin; glucocorticoids; theophylline; chronic obstructive pulmonary disease; NK cells; NKT-like cells

Funding. This study was supported by the Belarusian State Scientific Program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” (task 2.56).

Received: 04.05.2021, revised: 30.06.2021, accepted: 08.07.2021.