

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Объект авторского права

УДК [616.24-02:616.233-002.2-007.272]-074-036-085:616.633.96:577.1

**КАДУШКИН**  
**Алексей Геннадьевич**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ  
И ОБОСНОВАНИЕ ПУТЕЙ КОРРЕКЦИИ  
СТЕРОИДРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ  
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск 2023

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Научный консультант:** **Таганович Анатолий Дмитриевич,**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Доценко Эдуард Анатольевич,**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Ищенко Оксана Владимировна,**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

**Чиркин Александр Александрович,**  
доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры химии и естественнонаучного образования учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

**Оппонирующая организация:** учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 25 января 2024 года в 13.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.02 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, тел. (+375 17) 302 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан \_\_\_\_ декабря 2023 года.

И.о. ученого секретаря совета  
по защите диссертаций Д 03.18.02,  
доктор биологических наук, доцент



В.В. Хрусталёв

## ВВЕДЕНИЕ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является социально значимым заболеванием, что обусловлено ее высокой распространенностью, значительной инвалидностью и смертностью пациентов. Глобальная распространенность ХОБЛ среди лиц старше 40 лет составляет 13,1% [Blanco I. et al., 2019]. Характерной особенностью ХОБЛ является прогрессирующая воспалительная реакция в легочной ткани, которая плохо поддается лечению [Guo P. et al., 2022].

Глюкокортикостероиды (ГКС), лекарственные средства с противовоспалительным механизмом действия с успехом используются у пациентов с ХОБЛ, особенно при неблагоприятном агрессивном течении заболевания (имеют место среднетяжелые и тяжелые обострения – основа его прогрессирования) и в период самого обострения [Agusti A. et al., 2023]. Однако около трети пациентов с ХОБЛ оказались малочувствительными к этим препаратам [Ratcliffe M. J., Dougall I. G., 2012; Higham A. et al., 2015; Quint J. K. et al., 2023]. К настоящему времени не установлены критерии назначения системных форм ГКС таким пациентам в период обострения заболевания [Agusti A. et al., 2023]. Вместе с тем от решения данного вопроса зависит стратегия и тактика проводимого лечения у этой категории пациентов, качество их жизни.

Наращение воспалительного процесса у пациентов с ХОБЛ вовлекает моноциты/альвеолярные макрофаги (АМ), лимфоциты и нейтрофилы. Эти клетки играют определяющую роль в регуляции легочного и системного воспаления путем секреции хемокинов, цитокинов, факторов роста и протеаз [Wang Y. et al., 2018]. В поиске прогностических маркеров резистентности к стероидам перспективной представляется количественная оценка клеточного состава периферической крови и концентрации цитокинов, вовлеченных в функционирование клеток крови [Lewis B. W. et al., 2021]. Однако исследования в этом направлении не проводились.

Причинами сниженной чувствительности к ГКС могут быть повышение экспрессии глюкокортикоидного рецептора (ГР)  $\beta$  и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), а также снижение активности и экспрессии фермента гистон деацетилазы 2 (ГДА2) в ответ на воздействие окислительного стресса [Zwinderman M. R. H. et al., 2019; Wang C. et al., 2020; Cazzola M. et al., 2023]. Появились данные о способности теофиллина, азитромицина и N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ) потенцировать противовоспалительные эффекты ГКС [Ansari S. F. et al., 2019; Sun X. J. et al., 2020; Lu Y., Wang X., Zhao J., 2021], которые оспариваются другими учеными [Ceccato A. et al., 2017; Devereux G. et al., 2018; Papi A. et al., 2019].

При лечении тревожных и депрессивных проявлений, встречающихся у значительного количества (до 80%) пациентов с ХОБЛ, нередко используется трициклический антидепрессант нортриптилин либо амитриптилин, основным активным метаболитом которого является нортриптилин [Pollok J. et al., 2018; Martínez-Gestoso S. et al., 2022; Rahi M. S. et al., 2023]. Продемонстрирован синергизм между ГКС и нортриптилином в снижении секреции провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови здоровых людей и клетками моноцитарной линии человека U937 [Lehár J. et al., 2009; Mercado N. et al., 2011]. Однако влияние этого лекарственного препарата на продукцию провоспалительных медиаторов клетками пациентов с ХОБЛ ранее не изучалось, а молекулярный механизм его действия в клетках, подвергнутых воздействию ГКС, остается непонятным [Zwinderman M. R. H. et al., 2019].

Вышеизложенное позволяет прийти к заключению о целесообразности привлечения результатов оценки клеточного состава периферической крови и концентрации цитокинов к прогнозированию эффективности системных ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ, чтобы, основываясь на полученных данных, не только предсказывать устойчивость к стероидной терапии у пациентов с ХОБЛ в период обострения, но и обосновать путь повышения чувствительности клеток к ГКС.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с крупными научными программами и темами**

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2021-2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156 «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021-2025 годы» (Раздел 2 – Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: подраздел – диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи).

Диссертационное исследование соответствует национальной стратегии устойчивого развития Республики Беларусь на период до 2035 года в части «укрепления здоровья граждан и повышения качества медицинской помощи» и направлено на повышение доступа населения к качественным отечественным медицинским услугам.

Диссертация выполнялась в рамках инициативной научно-исследовательской работы кафедры биологической химии учреждения

образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ) «Молекулярные механизмы развития, мониторинга течения и лечения заболеваний, сопровождающихся склерозированием легочной ткани» (срок выполнения 2018–2022 гг., № государственной регистрации (№ ГР) 20181624), задания 1.2.94 «Изучить популяции лимфоцитов и их белковых лигандов в периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и изыскать маркеры прогнозирования характера течения этого заболевания» (Государственная программа научных исследований (ГПНИ) «Медицина и фармацевтика», подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина», срок выполнения 2014–2016 гг., № ГР 20142201), задания 2.56 «Изучить молекулярно-клеточные механизмы развития стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких для оптимизации их лечения» (ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний», срок выполнения 2017–2019 гг., № ГР 20170252), задания № М17М-102 «Использование полиморфизма генов лимфоцитов периферической крови для разработки подходов к определению риска развития хронической обструктивной болезни легких и прогнозированию течения заболевания» (договор с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, срок выполнения 2017–2019 гг., № ГР 20171158).

#### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования:** установить особенности продукции биологически активных белков иммунокомпетентными клетками периферической крови и легких пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) с тем, чтобы на основе полученных данных разработать критерии прогнозирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии и предложить способы повышения чувствительности к препаратам стероидных гормонов.

Для решения поставленной цели были определены *следующие задачи*:

1. Определить продукцию интерлейкина 6 (ИЛ-6), ИЛ-8 и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) альвеолярными макрофагами (АМ) пациентов с обострением ХОБЛ в присутствии глюкокортикостероидов (ГКС) и оценить возможность их использования в качестве критерия для выявления пациентов, чувствительных и нечувствительных к ГКС.

2. Выяснить диагностическую информативность параметров клеток крови для прогнозирования устойчивости к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ.

3. Оценить связывание ГКС лимфоцитами и моноцитами периферической крови пациентов с ХОБЛ.

4. Оценить выработку провоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, тимического стромального лимфопоэтина (ТСЛП), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ),

интерферона  $\gamma$  (ИФН $\gamma$ ), ФНО $\alpha$ ) клетками крови пациентов с ХОБЛ под влиянием теофиллина, азитромицина, нортриптилина, N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ) в комбинации с будесонидом.

5. Выяснить направленность и выраженность количественных изменений субпопуляций лимфоцитов, снабженных хемокиновыми рецепторами, в периферической крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) пациентов с ХОБЛ.

6. Оценить миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ к лигандам хемокиновых рецепторов CCL5 и CXCL10 под воздействием комбинаций азитромицина и будесонида, нортриптилина и будесонида.

7. Определить направленность и выраженность изменений синтеза фосфорилированного фактора транскрипции p65 NF- $\kappa$ B и молекулярных маркеров стероидорезистентности (глюкокортикоидного рецептора (ГР)  $\beta$ , фосфорилированной p38 митоген-активируемой протеинкиназы (p38 МАПК), гистон деацетилазы 2 (ГДА2), ацетилированного лизина в составе гистона H4) в субпопуляциях лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ под влиянием комбинации нортриптилина и будесонида.

#### **Объект и предмет исследования**

Объектом исследования явились пациенты с ХОБЛ, здоровые курящие и некурящие люди, а также образцы периферической крови и БАЛЖ, отобранные у них.

Предметом исследования были результаты опроса пациентов с ХОБЛ, определения у них функции внешнего дыхания; значения параметров общего анализа крови, результаты фенотипирования лимфоцитов крови, концентрация цитокинов, иммуноглобулинов и гормонов в периферической крови пациентов с ХОБЛ; концентрация ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$  в супернатантах, полученных при инкубации АМ пациентов, страдающих ХОБЛ, с дексаметазоном; интенсивность флуоресценции дексаметазона, меченого флуоресцеин изотиоцианатом, в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах периферической крови пациентов с ХОБЛ и здоровых людей; концентрация цитокинов в супернатантах, полученных при инкубации мононуклеарных клеток крови пациентов, страдающих ХОБЛ, с лекарственными средствами; процентное содержание субпопуляций лимфоцитов крови, экспрессирующих цитокины, молекулярные маркеры стероидорезистентности и фосфорилированный фактор транскрипции p65 NF- $\kappa$ B, у пациентов с ХОБЛ после инкубации цельной крови с лекарственными средствами; количественные изменения лимфоцитов, содержащих хемокиновые рецепторы, в крови и БАЛЖ пациентов с ХОБЛ и здоровых людей; относительное количество лимфоцитов и моноцитов

периферической крови пациентов с ХОБЛ, мигрировавших к хемокинам CCL5 и CXCL10, под влиянием лекарственных средств.

### **Научная новизна**

Впервые установлена взаимосвязь отношения абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ) и тромбоцитов к лимфоцитам (ОТЛ) в периферической крови, уровня ФИММ в плазме крови с устойчивостью клеток к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ.

Впервые разработана и проверена на пригодность использования математическая модель оценки клеточной чувствительности к кортикостероидам при обострении ХОБЛ, которая включает параметры общего анализа крови и результаты определения уровня ФИММ в плазме крови. Диагностическая эффективность данной модели составила 86,7%, что позволило решить значимую проблему стероидной резистентности – прогнозирование эффективности ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ.

Получены новые данные об интенсивности связывания ГКС в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови пациентов с ХОБЛ. Она оказалась ниже у пациентов с ХОБЛ, чем у здоровых курящих и некурящих людей.

Новыми являются данные о сочетанном влиянии азитромицина и будесонида на выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови пациентов с ХОБЛ. Особенность заключается в более сильном ингибирующем воздействии комбинации азитромицина и будесонида по сравнению с одним будесонидом на секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-17А, ТСЛП мононуклеарными клетками крови, а также синтез ИЛ-4, ИЛ-8 Т-хелперами, цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК и НКТ-подобными клетками крови.

Впервые проведена комплексная оценка процентного содержания основных субпопуляций лимфоцитов, снабженных хемокиновыми рецепторами, в периферической крови и легких пациентов с ХОБЛ. Отличительной чертой является повышение доли лимфоцитарных субпопуляций крови и БАЛЖ, несущих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми.

Впервые установлена способность комбинации азитромицина и будесонида снижать миграцию основных субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ к CCL5 и CXCL10 (лигандам хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR5).

Концептуально новыми являются данные, позволившие обосновать новое направление в лечении ХОБЛ, основанное на совместном применении

нортриптилина и ГКС, повышающее чувствительность клеток к стероидам. К этим данным относится:

– способность нортриптилина (10 нМ) в комбинации с ГКС будесонидом более эффективно, чем один будесонид, подавлять продукцию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ТСЛП мононуклеарными клетками периферической крови, а также ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО $\alpha$ , ИФН $\gamma$  субпопуляциями лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ;

– снижение миграции основных субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ к хемокинам CCL5 и CXCL10 под влиянием комбинации нортриптилина и ГКС;

– усиление эффектов ГКС в лимфоцитах крови пациентов с ХОБЛ при их сочетанном использовании с нортриптилином за счет изменения синтеза ГР $\beta$ , ФИММ, ГДА2, ацетилированного лизина в составе гистона H4, фосфорилированной p38 МАПК и фосфорилированного фактора транскрипции p65 NF- $\kappa$ B.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. В периферической крови резистентных к глюкокортикоидной терапии и стероидочувствительных пациентов с обострением ХОБЛ имеется значительная разница абсолютного и относительного количества нейтрофилов и эозинофилов, относительного количества лимфоцитов, абсолютного количества тромбоцитов, отношения абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ) и тромбоцитов к лимфоцитам (ОТЛ), а также уровня фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), в плазме крови.

2. Одновременное определение относительного количества эозинофилов крови, ОТЛ и уровня ФИММ в плазме крови позволяет прогнозировать у пациентов с обострением ХОБЛ устойчивость к глюкокортикоидной терапии.

3. У пациентов с ХОБЛ характерной особенностью является более низкая степень связывания глюкокортикостероидов (ГКС) со своими рецепторами в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови.

4. Теофиллин, азитромицин, нортриптилин, N-ацетил-L-цистеин снижают продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови пациентов с ХОБЛ. В комбинации с будесонидом они оказывают более выраженное ингибирующее воздействие на выработку отдельных цитокинов, чем один будесонид.

5. Процентное содержание Т- и В-лимфоцитов крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости, несущих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, а также относительное количество НК и НКТ-подобных клеток крови, снабженных этими рецепторами, выше у пациентов с ХОБЛ, чем у здоровых людей.



6. Комбинации лекарственных средств азитромицин/будесонид и нортриптилин/будесонид оказывают более выраженное супрессирующее воздействие на миграцию Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК клеток и В-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ к хемокинам CCL5 и CXCL10, чем один будесонид.

7. Нортриптилин потенцирует эффекты ГКС в лимфоцитах крови пациентов с ХОБЛ за счет повышения продукции гистон деацетилазы 2 и снижения синтеза ацетилированного лизина в составе гистона H4, глюкокортикоидного рецептора  $\beta$ , фосфорилированной p38 митоген-активируемой протеинкиназы, фосфорилированного фактора транскрипции p65 NF- $\kappa$ B, ФИММ.

#### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Соискателем совместно с научным консультантом, доктором медицинских наук, профессором А.Д. Тагановичем выбрана тема диссертации, поставлены цель и задачи исследования, определен объем исследований, подготовлены печатные работы, инструкции по применению, документы заявки на выдачу патента на изобретение. Автором лично проведена компьютерная графическая и статистическая обработка полученных данных, дана интерпретация результатам исследования, сформулированы выносимые на защиту положения, основные научные результаты диссертации, практические рекомендации и выводы.

Отбор пациентов для проведения бронхоскопии и их обследование проводились в УЗ «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница» (МОКБ) при участии заведующего отделением пульмонологии Л.В. Алешкевич и в ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии» (РНПЦ ПиФ) при участии заведующего пульмонологическим отделением Г.К. Новской. Процедура бронхоскопии с получением БАЛЖ осуществлялась при участии врача-эндоскописта отделения эндоскопических исследований А.П. Любецкой (в МОКБ) и заведующего эндоскопическим отделением В.К. Панасюка (в РНПЦ ПиФ), что отражено в совместных публикациях [4-А – 6-А, 13-А, 21-А, 22-А, 25-А, 29-А – 33-А]. Вклад автора – 60%.

Выделение и культивирование АМ, а также иммуноферментный анализ концентрации цитокинов в супернатантах, полученных после инкубации АМ, выполнялись на базе лаборатории биохимических методов исследования научно-исследовательской части (ЛБМИ НИЧ) БГМУ при участии научного сотрудника А.А. Арабей [4-А – 6-А, 21-А, 29-А – 33-А]. Вклад автора – 80%.

Имуноферментный анализ концентрации цитокинов, иммуноглобулинов, гормонов в плазме крови пациентов с ХОБЛ проводился в Республиканской молекулярно-генетической лаборатории канцерогенеза

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова» при участии ведущего научного сотрудника Л.М. Шишло. Определение параметров общего анализа крови выполнялось автором в этой же лаборатории самостоятельно [4-А – 6-А, 21-А, 29-А, 31-А – 33-А]. Вклад автора – 80%.

Отбор пациентов с ХОБЛ для оценки чувствительности клеток крови к лекарственным средствам и определения доли лимфоцитов крови, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, осуществлялся в консультационном отделении УЗ «Минский клинический консультативно-диагностический центр» при участии врачей-пульмонологов Э.И. Талабаевой и А.В. Пластининой [7-А – 14-А, 16-А – 20-А, 22-А, 24-А – 28-А, 34-А – 42-А]. Вклад автора – 85%.

Инкубация клеток крови с лекарственными средствами, а также иммуноферментный анализ концентрации цитокинов в супернатантах, полученных после культивирования клеток крови, проводились на базе ЛБМИ НИЧ БГМУ при участии старших научных сотрудников Е.В. Ходосовской и Т.С. Колесниковой [7-А – 12-А, 16-А, 18-А – 20-А, 22-А, 24-А, 34-А – 42-А]. Вклад автора – 80%.

Пробоподготовка образцов для иммунофенотипирования лимфоцитов крови и БАЛЖ и последующий анализ образцов на проточном цитометре выполнялись автором самостоятельно в лаборатории иммунологических исследований и клинико-диагностической лаборатории ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Оценка данных, полученных при цитометрическом исследовании, проводилась автором при участии врача лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории, к.б.н. Л.В. Мовчан и заведующего лабораторией иммунологических исследований, к.б.н. Т.В. Шман [4-А, 5-А, 7-А – 14-А, 16-А – 20-А, 22-А, 24-А – 29-А, 31-А, 36-А – 38-А, 40-А – 42-А]. Вклад автора – 90%.

### **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на Международных конгрессах Европейского респираторного общества (Милан, Италия, 2017; Мадрид, Испания, 2019; виртуальный конгресс, 2020, 2021); Легочной научной конференции Европейского респираторного общества (Эшторил, Португалия, 2019), ежегодном конгрессе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (Мюнхен, Германия, 2018; гибридный конгресс, 2022); II и III Белорусских биохимических конгрессах «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 2018, 2022), V Международной научно-практической конференции

«Актуальные вопросы первичных иммунодефицитов» (Минск, 2018), Республиканских школах-семинарах «Диагностика иммунопатологических состояний» (Боровляны, 2017, 2019), Сателлитной конференции «Актуальные вопросы современной медицины» в рамках международной научно-практической конференции «Современные технологии в медицинском образовании», посвященной 100-летию БГМУ (Минск, 2021), ежегодной Международной научной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2019, 2022), научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы биохимии», посвященной 60-летию кафедры биологической химии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (Гродно, 2019), ежегодных научных сессиях БГМУ (Минск, 2017–2023).

Разработаны 2 инструкции по применению (от 30.11.2018 № 135-1118 и от 15.05.2023 № 022-0323), которые утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь и используются в РНПЦ ПиФ, ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь, ГУЗ «Минский областной клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны имени П.М. Машерова», УЗ «6-я городская клиническая больница», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», УЗ «Брестская центральная городская больница», УЗ «Брестская городская больница № 1», УЗ «Гродненская университетская клиника», ГУЗ «Гродненская областная клиническая больница медицинской реабилитации», УЗ «Городская клиническая больница № 2 г. Гродно», ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 3» (13 актов о внедрении).

Материалы исследования внедрены в учебный процесс всех медицинских университетов Республики Беларусь (6 актов о внедрении).

### **Опубликованность результатов диссертации**

По теме диссертации опубликованы 45 научных работ, в том числе 23 статьи в рецензируемых научных журналах (из них в зарубежных изданиях – 16; в журналах, индексируемых в базе данных Scopus – 20 (включая издания, представленные в русскоязычной и англоязычной версиях); в журналах, индексируемых в Pubmed/Medline – 6), 1 статья в сборнике научных трудов, 18 тезисов докладов и материалов конференций (из них 12 – за рубежом). Общий объем опубликованного материала составил 30,1 авторского листа. По результатам диссертации в Евразийской патентной организации получен патент на изобретение. Подготовлены 2 инструкции по применению.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы (глава 1), описания методов исследования

(глава 2), изложения и обсуждения результатов собственных исследований (главы 3–7), заключения, списка использованных источников, включающего 625 источников в подразделе «Библиографический список» (из которых 608 – на английском языке, 17 – на русском языке), 45 публикаций соискателя ученой степени. Диссертация изложена на 309 страницах, содержит 161 страницу текста, 31 таблицу (18 страниц), 49 рисунков (44 страницы), 20 приложений (30 страниц).

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Материал и методы исследования

В общей сложности участниками исследования стали 196 пациентов с ХОБЛ, 48 здоровых курильщиков и 40 здоровых некурящих людей.

**Выявление резистентных к глюкокортикоидной терапии пациентов с обострением ХОБЛ.** В исследовании приняли участие 45 пациентов (основная группа), госпитализированных в связи с обострением ХОБЛ, которым выполнялась бронхоскопия. Для апробации разработанных математических моделей прогнозирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии при ХОБЛ дополнительно были обследованы 28 человек (экзаменационная группа).

Бронхоскопию со сбором БАЛЖ проводили по стандартной методике. АМ выделяли из БАЛЖ путем адгезии к пластику, используя культуральный планшет (Corning Costar), в течение 2 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. К суспензии АМ, содержащей 100 тысяч живых клеток, добавляли дексаметазон (Sigma-Aldrich) в концентрации от 0,01 нМ до 1000 нМ на 1 ч и далее липополисахарид (ЛПС, 1 мкг/мл, Escherichia Coli B6-026, Sigma-Aldrich). По истечении суток супернатанты собирали и хранили при –20°C. В них определяли концентрацию ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$  методом иммуноферментного анализа (АО «Вектор Бест»).

У обследуемых пациентов до проведения бронхоскопии забирали венозную кровь. Получали плазму и в ней определяли концентрацию ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17А, ФНО $\alpha$ , ФИММ, GCP-2, иммуноглобулина (Ig) E, прогестерона, кортизола (АО «Вектор Бест»; ООО «Хема»; Elabscience) методом иммуноферментного анализа.

К 100 мкл крови добавляли 2 коктейля моноклональных антител (мАт): (1) CD25-PE / CD3-ECD / CD4-PC5.5 / CD127-PC7 / CD45-APC Alexa Fluor 750; (2) CD19-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 / CD56-PC7 / CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter). Клетки инкубировали 20 мин при комнатной температуре (Kt). Эритроциты лизировали путем добавления 1 мл раствора Versalyse (Beckman Coulter). Анализ субпопуляций лимфоцитов проводили на

проточном цитометре Navios с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter).

Формулу крови и концентрацию лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и тромбоцитов подсчитывали с помощью автоматического гематологического анализатора Sysmex 5000i (Sysmex Corporation).

Сравнение показателей ингибирования синтеза цитокинов в АМ под влиянием дексаметазона осуществляли на основе однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим проведением теста Бонферрони. Различия показателей крови у чувствительных и резистентных к глюкокортикоидной терапии пациентов выявляли, используя U-критерий Манна–Уитни. Оценку интегральной диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью ROC-анализа. О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической эффективности (ДЭ), чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) теста, прогностической ценности положительного и отрицательного результата (ПЦПР и ПЦОР). При всех видах статистического анализа различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Продукция цитокинов и белков, вовлеченных в развитие стероидорезистентности, в клетках крови под влиянием лекарственных средств.** Для оценки связывания дексаметазона с ГР в лимфоцитах и моноцитах крови обследованы 24 пациента с ХОБЛ, 20 здоровых курильщиков и 20 здоровых некурящих человек. В пробирки помещали 100 мкл крови и дексаметазон, меченый FITC (Life Technologies), в концентрации 10 нМ. Пробы инкубировали 60 мин при 37°C. Клетки дважды отмывали и к ним добавляли 2 коктейля мАт: (1) CD25-PE / CD3-ECD / CD4-PC5.5 / CD127-PC7 / CD14-APC / CD45-APC Alexa Fluor 750; (2) CD19-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 / CD56-PC7 / CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter). Затем клетки инкубировали 20 мин при 4°C. Эритроциты лизировали путем добавления 1 мл раствора Versalyse. Анализ интенсивности флуоресценции FITC-меченого дексаметазона в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови проводили на проточном цитометре Navios.

Влияние ГКС и других лекарственных средств на продукцию цитокинов и синтез белков, вовлеченных в развитие стероидорезистентности, в мононуклеарных клетках периферической крови (МПК-клетках) проводили, используя кровь 30 пациентов с ХОБЛ. МПК-клетки выделяли из периферической крови пациентов с ХОБЛ путем центрифугирования в градиенте плотности 1,077 г/мл с использованием раствора Lymphopure (Biolegend). Клетки ресуспендировали в концентрации  $10^6$ /мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco), обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Capricorn Scientific), 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина

и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich). Суспензию ( $2 \times 10^5$ ) МПК-клеток помещали в лунки 96-луночного планшета и культивировали в присутствии или отсутствии будесонида (10 нМ), азитромицина (10 мкг/мл), теofilлина (1 мкМ) (Glentham Life Sciences Ltd), нортриптилина (1 и 10 мкМ), АЦЦ (1 мМ) (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч. В последующем клетки активировали путем добавления фитогемагглютинина (ФГА, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). По истечении суток супернатанты собирали и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . В них определяли концентрацию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ТСП, ФИММ методом иммуноферментного анализа (АО «Вектор Бест»; Bioassay Technology Laboratory).

Для оценки внутриклеточной продукции цитокинов и доли лимфоцитов крови, экспрессирующих ГДА2, в пробирках смешивали 7 мл крови и 7 мл культуральной среды RPMI 1640, содержащей 10% ФТС, и инкубировали 1 ч в присутствии или отсутствии будесонида (10 нМ), азитромицина (10 мкг/мл), теofilлина (1 мкМ), нортриптилина (1 и 10 мкМ), АЦЦ (1 мМ) при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Далее к клеточным культурам вносили форбол-миристан-ацетат (ФМА, 50 нг/мл), иономицин (Ион, 1 мкг/мл), брeфельдин А (10 мкг/мл) (все Cayman Chemical) и пробирки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . После стимуляции в течение 6 ч в пробирки вносили 100 мкл 20 мМ раствора этилендиаминтетраацетата динатрия дигидрата в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, BD Biosciences). Клетки отмывали и добавляли коктейль мАт к поверхностным антигенам (CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, Beckman Coulter; Exbio), после чего клетки инкубировали 15 мин. Эритроциты лизировали путем добавления раствора Versalyse. Спустя 15 мин клетки отмывали с помощью ФСБ, содержащего 1% ФТС. После фиксации лейкоцитов клетки пермеабилizировали с использованием IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter) и добавляли мАт к ИЛ-4 PE, ИФН $\gamma$  APC, ФНО $\alpha$  PE (все Beckman Coulter), ИЛ-8 FITC (R&D systems Europe) или ГДА2 Alexa Fluor 488 (Abcam) на 15 мин при 4 $^\circ\text{C}$ . Клетки отмывали и анализировали на проточном цитометре Navios. Т-хелперы (Тх) идентифицировали как CD45 $^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$  события, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) – CD45 $^+$ CD3 $^+$ CD8 $^+$ , НК клетки – CD45 $^+$ CD3 $^-$ CD56 $^+$ , НКТ-подобные клетки – CD45 $^+$ CD3 $^+$ CD56 $^+$ .

На следующем этапе исследования оценивали влияние лекарственных средств на синтез фосфорилированных белков в лимфоцитах крови. С этой целью после инкубации клеток цельной крови с будесонидом (10 нМ) и нортриптилином (1 и 10 мкМ) при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  в течение 1 ч в пробирки добавляли мАт к поверхностным антигенам CD4 FITC, CD3 PE-DyLight 594, CD8 PE-Cy5, CD56 PE-Cy7 и CD45 APC-Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, Exbio) и клетки культивировали 15 мин при 4 $^\circ\text{C}$ . Далее клеточные культуры стимулировали путем добавления ФМА (250 нг/мл) и Ион (1 мкг/мл) в течение

15 мин при 37°C. С целью лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов 200 мкл крови смешивали с 4 мл подогретого до 37°C буфера BD Phosflow Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences) и пробирки инкубировали 10 мин в водяной бане при 37°C. Лейкоциты однократно отмывали с помощью ФСБ, пермеабилizировали с использованием охлажденного до -20°C 1 мл буфера BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки с буфером BD Pharmingen Stain Buffer (BD Biosciences) клетки окрашивали с использованием антител к фосфорилированной p38 МАПК PE и фосфорилированному фактору транскрипции p65 NF-κB PE (BD Biosciences) в течение 1 ч при 4°C. После окончательной отмывки клетки ресуспендировали в 500 мкл охлажденного до 4°C буфера BD Pharmingen Stain Buffer и анализировали на проточном цитометре Navios.

Для определения продукции ГРβ и ацетилированного лизина в 8-й позиции в составе гистона H4 в субпопуляциях лимфоцитов клетки крови стимулировали и фиксировали, а их цитоплазматическую мембрану пермеабилizировали в соответствии с методикой, описанной выше. В пробирки помещали поликлональные антитела к ГРβ (GeneTex) и мАт к гистону H4 (ацетил K8) (Abcam). Затем клетки инкубировали с антителами 15 мин при 4°C, отмывали и окрашивали с помощью вторичных козых против кроличьих антител IgG H&L Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) в течение 15 мин при 4°C.

Для оценки синтеза ГР клетки инкубировали с мАт к этому рецептору (Abcam). После отмывки к клеткам добавляли вторичные козьи против мышинных антител IgG H&L Alexa Fluor 488 (Abcam), пробирки инкубировали 15 мин при 4°C. После окончательной отмывки клетки ресуспендировали в 1% растворе параформальдегида и анализировали методом проточной цитометрии.

Оценка результатов исследования проводилась методом ANOVA с последующим попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки.

**Миграция лимфоцитов и моноцитов крови под влиянием лекарственных средств.** Определение процентного содержания лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, проводилось в периферической крови 54 курящих пациентов с ХОБЛ, 21 курящего здорового человека и 20 здоровых некурящих лиц. В пробирки вносили 100 мкл крови и мАт (R&D Systems; Exbio) к поверхностным молекулам (таблица 1). Образцы инкубировали 20 мин при 4°C. Эритроциты лизировали путем добавления 1 мл раствора Versalyse. Клетки анализировали на проточном цитометре Navios.

Для анализа доли Т- и В-лимфоцитов БАЛЖ, содержащих хемокиновые рецепторы, 7 курящим пациентам с ХОБЛ и 7 здоровым курильщикам выполняли бронхоскопию со сбором БАЛЖ. Количество жизнеспособных клеток доводили до  $1 \times 10^6$ /мл в обогащенной среде RPMI 1640. Далее

в пробирки вносили 400 мкл клеточной суспензии и мАт в различных сочетаниях (CD45 APC-Cy7, CD3 PE-DyLight 594, CD19 PE-DyLight 594, CD27 PE-Cy7, Exbio; CXCR3 FITC, CXCR4 FITC, CXCR5 PE, CXCR6 PE, CCR5 PE, CCR6 APC, CCR7 PE, R&D systems). Пробирки инкубировали на льду 45 мин. Эритроциты лизировали путем добавления раствора Versalyse. По истечении 15 мин клетки отмывали, фиксировали и анализировали на проточном цитометре Navios.

Таблица 1 – Сочетания моноклональных антител, использованные для анализа доли лимфоцитов крови, снабженных хемокиновыми рецепторами

Номер пробирки	FITC	PE	PE-DyLight 594	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CXCR3	CCR5	CD3	–	CD56	CCR6	CD45
2	CXCR4	CCR7	CD3	–	CD56	–	CD45
3	–	CXCR6	CD3	–	CD56	–	CD45
4	CXCR3	CCR7	CD19	CD5	CD27	–	CD45
5	CXCR4	CXCR5	CD19	CD5	CD27	–	CD45
6	–	CCR5	CD19	–	CD27	CCR6	CD45

Для оценки миграции лимфоцитов и моноцитов крови МПК-клетки 8 пациентов с ХОБЛ ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в культуральной среде RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС. В пробирки помещали 1 мл клеточной суспензии и инкубировали с будесонидом (10 нМ), нортриптилином (1 и 10 мкМ), азитромицином (10 мкг/мл) или их комбинацией при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Спустя 1 ч 100 мкл клеточной суспензии переносили в верхние камеры 24-луночного миграционного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм (Corning Costar). В нижние камеры миграционного планшета помещали 600 мкл буфера, состоящего из культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС и хемокинами CCL5 (10 нМ, R&D systems) или CXCL10 (10 нМ, Gibco). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По окончании 2 ч клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали, отмывали и ресуспендировали в ФСБ. Добавляли коктейль мАт, состоящий из CD3-FITC / CD14-PE / CD19-ECD / CD4-PerCP-Cy5.5 / CD56-PC7 / CD8-APC / CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, Exbio, BD Biosciences), после чего клетки инкубировали 20 мин при 4°C. Далее клетки отмывали, фиксировали и, используя проточный цитометр Navios, настроенный на среднюю скорость потока клеток, подсчитывали их количество в течение 100 секунд. Их идентифицировали как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клетки, ЦТЛ – CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, НК клетки – CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, В-лимфоциты – CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, моноциты – CD14<sup>+</sup>.

При анализе доли лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, сравнение трех независимых выборок проводили с помощью непараметрического теста Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением показателей путем определения критерия Данна. Для сравнения



показателей между двумя независимыми группами применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Оценку результатов хемотаксиса лимфоцитов и моноцитов крови проводили методом ANOVA с последующим попарным сравнением показателей на основе критерия Тьюки.

## **Результаты исследования**

### **Гетерогенная чувствительность альвеолярных макрофагов пациентов с обострением ХОБЛ к ГКС**

Инкубация АМ, стимулированных ЛПС, с дексаметазоном сопровождалась снижением секреции ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$  этими клетками. Оно прослеживалось при всех из исследованных концентраций дексаметазона, но в наибольшей степени, когда она составляла 100 нМ. При данной концентрации дексаметазона максимальное значение ингибирования продукции ИЛ-8 (среднее значение 55,2%) было существенно ниже по сравнению с таковым для ИЛ-6 (70,5%) и ФНО $\alpha$  (74,5%).

Построение индивидуальных графических кривых зависимости ингибирования стимулированной секреции провоспалительных цитокинов от концентрации дексаметазона позволило установить, что в АМ 8,9% (4 из 45) пациентов с обострением ХОБЛ дексаметазон в самой действенной концентрации (100 нМ) не способен ингибировать на 50% и более продукцию ФНО $\alpha$ . Супрессии индуцированной продукции ИЛ-6 более чем на 50% под влиянием дексаметазона не достигли клетки 11,1% (5 из 45) пациентов, а в случае ИЛ-8 – 40% (18 из 45) пациентов.

### **Стероидочувствительные и стероидорезистентные пациенты с обострением ХОБЛ**

На основании способности дексаметазона подавлять стимулированную секрецию ИЛ-8 в АМ на 50% все пациенты с ХОБЛ были разделены на стероидочувствительных (СЧ) и стероидорезистентных (СР). Результаты клинического обследования пациентов, показатели общего анализа крови, результаты измерения уровня цитокинов, гормонов, IgE, относительного количества субпопуляций лимфоцитов в периферической крови были проанализированы в зависимости от чувствительности клеток к ГКС. Показатели, которые различались у СЧ и СР пациентов, представлены в таблице 2. Результаты корреляционного анализа показали умеренную корреляционную связь этих показателей с устойчивостью клеток к ГКС (таблица 2).

Обнаруженная взаимосвязь дала основание включить эти параметры в ROC-анализ. Однако ни один из анализируемых показателей не обладал в отдельности достаточно высокой диагностической чувствительностью и специфичностью одновременно (таблица 3).

Таблица 2 – Уровень лабораторных показателей периферической крови, различающихся у резистентных и чувствительных к стероидам пациентов с обострением ХОБЛ, и их связь с устойчивостью клеток к ГКС

Показатель	Резистентные пациенты (n = 18)	Чувствительные пациенты (n = 27)	Связь с устойчивостью к ГКС
Лимфоциты, %	20,0 (15,0–24,4)*	26,9 (20,0–36,0)	R= 0,383, p=0,009
Нейтрофилы, ×10 <sup>9</sup> /л	7,7 (5,7–8,6)*	5,2 (3,4–6,2)	R= -0,548, p<0,001
Нейтрофилы, %	69,0 (62,9–82,0)*	62,0 (54,0–66,0)	R= -0,427, p=0,003
Эозинофилы, ×10 <sup>9</sup> /л	0,042 (0,000–0,125)*	0,154 (0,059–0,258)	R= 0,306, p=0,041
Эозинофилы, %	0,5 (0,0–1,0)*	2,0 (1,0–3,0)	R= 0,436, p=0,003
Тромбоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	236 (218–278)*	185 (176–230)	R= -0,370, p=0,012
ОНЛ	3,6 (2,4–5,5)*	2,4 (1,5–3,6)	R= -0,393, p=0,008
ОТЛ	123,5 (91,0–146,0)*	92,0 (72,0–116,0)	R= -0,302, p=0,044
ФИММ, нг/мл	4,3 (1,9–8,4)*	0,8 (0,0–2,7)	R= -0,409, p=0,005

Примечание – \* p<0,05 по сравнению с чувствительными к стероидам пациентам. Здесь и в таблице 3: ОНЛ – отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов; ОТЛ – отношение абсолютного количества тромбоцитов к абсолютному количеству лимфоцитов; ФИММ – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов.

Таблица 3 – Параметры диагностической информативности определения концентрации клеток крови и уровня ФИММ в плазме крови при оценке резистентности к глюкокортикоидной терапии у пациентов с обострением ХОБЛ

Показатель	Пороговое значение	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %
Лимфоциты, %	≤ 24,4	77,8	63,0	68,9
Нейтрофилы, ×10 <sup>9</sup> /л	> 7,24	61,1	92,6	80
Нейтрофилы, %	> 68	61,1	85,2	75,6
Эозинофилы, ×10 <sup>9</sup> /л	≤ 0,126	83,3	55,6	66,7
Эозинофилы, %	≤ 1,2	83,3	63,0	71,1
Тромбоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	> 205	77,8	70,4	73,3
ОНЛ	> 2,75	66,7	74,1	71,1
ОТЛ	> 116	61,1	77,8	71,1
ФИММ, нг/мл	> 2,24	72,2	70,4	71,1

Примечание – здесь и в таблице 4: ДЧ – диагностическая чувствительность; ДС – диагностическая специфичность; ДЭ – диагностическая эффективность.

Для повышения эффективности прогнозирования отобранные лабораторные показатели анализировались методом бинарной регрессии. Пошаговое включение параметров общего анализа крови в статистическую модель привело к составлению регрессионного уравнения Y1, позволяющего прогнозировать устойчивость к глюкокортикоидной терапии у пациентов с обострением ХОБЛ с ДЧ 83,3%, ДС 77,8%, ДЭ 80,0%, ПЦПР 71,4%, ПЦОР 87,5% и площадью под ROC-кривой 0,805 (формула 1).

$$Y1 = \frac{\exp(-1,5113-0,4384 \times X1+0,4192 \times X2+0,0043 \times X3)}{1+\exp(-1,5113-0,4384 \times X1+0,4192 \times X2+0,0043 \times X3)} \quad (1)$$

где Y1 – устойчивость к глюкокортикоидной терапии у пациентов с обострением ХОБЛ;

X1 – относительное количество эозинофилов крови;

X2 – ОНЛ;

X3 – ОТЛ;

$\exp (\approx 2,718)$  – основание натурального логарифма;

-1,5113 – константа регрессионного уравнения;

-0,4384, 0,4192, 0,0043 – коэффициенты регрессии.

Оптимальное пороговое значение вероятности для чувствительности и специфичности данной модели составляет 0,3774. Это значит, что если  $Y1 > 0,3774$ , то существует высокая вероятность устойчивости к глюкокортикоидной терапии, а если  $Y1 \leq 0,3774$ , то имеется высокая вероятность чувствительности к стероидам.

Введение в анализ бинарной логистической регрессии уровня ФИММ с пошаговым включением других определяемых показателей, существенно влияющих на результирующую переменную, позволило составить регрессионное уравнение Y2 (формула 2). В него вошли относительное количество эозинофилов, ОТЛ и концентрация ФИММ в плазме крови. ДС метода составила 88,9%, ДЧ – 83,3%, ДЭ – 86,7%, ПЦПР – 83,3%, ПЦОР – 88,9%, площадь под ROC-кривой – 0,889.

$$Y2 = \frac{\exp(-2,5863-0,7922 \times X1+0,0187 \times X2+0,4227 \times X3)}{1+\exp(-2,5863-0,7922 \times X1+0,0187 \times X2+0,4227 \times X3)} \quad (2)$$

где Y2 – устойчивость к глюкокортикоидной терапии у пациентов с обострением ХОБЛ;

X1 – относительное количество эозинофилов крови;

X2 – ОТЛ;

X3 – концентрация ФИММ в плазме крови;

$\exp (\approx 2,718)$  – основание натурального логарифма;

-2,5863 – константа регрессионного уравнения;

-0,7922, 0,0187, 0,4227 – коэффициенты регрессии.

Оптимальное пороговое значение вероятности для чувствительности и специфичности модели Y2 составляет 0,4629. Это значит, что если  $Y2 > 0,4629$ , то вероятность сниженного ответа на ГКС высокая, а если  $Y2 \leq 0,4629$ , то вероятность сниженного ответа на ГКС низкая.

Проверка на пригодность двух математических моделей, позволяющих прогнозировать устойчивость к стероидам, проводилась на экзаменационной группе пациентов, госпитализированных в связи с обострением ХОБЛ (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты проверки эффективности регрессионных моделей Y1 и Y2 на экзаменационной выборке пациентов с обострением ХОБЛ

Количество пациентов с ХОБЛ			ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	ДЭ
Фактическая эффективность ГКС	Прогнозируемая эффективность ГКС на основе формулы						
	Высокая	Низкая					
Уравнение Y1							
Высокая (n=17)	13	4	81,8%	76,5%	69,2%	86,7%	78,6%
Низкая (n=11)	2	9					
Уравнение Y2							
Высокая (n=17)	15	2	81,8%	88,2%	81,8%	88,2%	85,7%
Низкая (n=11)	2	9					

Примечание – ГКС – глюкокортикостероиды, ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата.

### **Интенсивность связывания ГКС в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови**

По результатам настоящего исследования интенсивность флуоресценции FITC-меченого дексаметазона в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови оказалась существенно ниже у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими и некурящими здоровыми людьми (таблица 5).

Таблица 5 – Средняя интенсивность флуоресценции дексаметазона, меченого флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), в различных субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах периферической крови

Клетки	Пациенты с ХОБЛ (n=24)	Здоровые курильщики (n=20)	Здоровые некурящие люди (n=20)
CD3 <sup>+</sup> (Т-лимфоциты)	2,5 (2,2–2,8) <sup>*#</sup>	3,2 (3,0–3,8) <sup>#</sup>	4,0 (3,6–4,4)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (Т-хелперы)	2,8 (2,4–3,4) <sup>*#</sup>	3,3 (3,1–3,8) <sup>#</sup>	4,0 (3,7–4,3)
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты)	2,7 (2,4–3,1) <sup>*#</sup>	3,4 (3,3–4,0) <sup>#</sup>	4,3 (3,7–4,7)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> (регуляторные Т-лимфоциты)	2,8 (2,6–3,3) <sup>*#</sup>	3,4 (3,0–3,8) <sup>#</sup>	4,1 (3,6–4,5)
CD19 <sup>+</sup> (В-лимфоциты)	2,4 (2,2–2,7) <sup>*#</sup>	3,3 (3,1–3,9) <sup>#</sup>	4,1 (3,6–4,5)
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (NK клетки)	2,9 (2,6–3,7) <sup>*#</sup>	4,0 (3,6–4,5) <sup>#</sup>	4,8 (4,0–5,3)
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (NKT-подобные клетки)	3,4 (3,1–3,9) <sup>*#</sup>	4,5 (4,2–5,1) <sup>#</sup>	5,5 (4,8–6,0)
CD14 <sup>+</sup> (моноциты)	6,1 (5,4–7,5) <sup>*#</sup>	8,2 (7,1–9,8) <sup>#</sup>	9,9 (8,4–10,8)

Примечание – Данные представлены как медиана (25-й – 75-й процентиля); \* p<0,05 по сравнению со здоровыми курящими людьми; # p<0,05 по сравнению со здоровыми некурящими людьми.

## Секреция цитокинов мононуклеарными клетками крови пациентов с ХОБЛ под влиянием лекарственных средств

Преинкубация МПК-клеток с будесонидом ингибировала ФГА-индуцированную секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8 и ИЛ-13, но не влияла на синтез ИЛ-17А, ИЛ-33, ФИММ и ТСЛП (таблица 6).

Таблица 6 – Изменение концентрации цитокинов, секретированных мононуклеарными клетками крови пациентов с ХОБЛ, в присутствии лекарственных средств

Цитокин	Контроль	ФГА	ФГА + Буд	ФГА + Тео	ФГА + Буд + Тео
ИЛ-4, пг/мл	1,4±0,1	7,2±1,2*	1,7±0,1 <sup>#</sup>	4,0±0,9 <sup>#</sup>	1,4±0,1 <sup>#♦</sup>
ИЛ-5, пг/мл	31,6±3,7	42,3±1,8*	35,8±2,0 <sup>#</sup>	33,8±3,0	26,3±2,5 <sup>#α</sup>
ИЛ-8, пг/мл	37452±10404	129941±8186*	55039±10312 <sup>#</sup>	126858±9453* <sup>♦</sup>	44254±10032 <sup>#♦α</sup>
ИЛ-13, пг/мл	3,2±0,6	79,7±6,3*	59,8±3,1* <sup>#</sup>	66,2±1,8*	45,6±5,2* <sup>#</sup>
ИЛ-17А, пг/мл	17,2±1,0	23,0±1,4*	23,5±1,2*	16,2±1,0 <sup>#</sup>	19,6±1,1* <sup>#α</sup>
ИЛ-33, пг/мл	52,3±5,2	75,1±4,6*	62,1±5,8	69,5±4,7	59,7±4,0 <sup>#</sup>
ТСЛП, пг/мл	29,1±4,6	82,8±6,0*	74,3±5,9*	66,7±9,2	52,9±6,5 <sup>#</sup>
ФИММ, нг/мл	1,3±0,1	1,6±0,2	1,4±0,2	1,5±0,2	1,2±0,2 <sup>#</sup>

Продолжение таблицы 6

Цитокин	ФГА + АЦЦ	ФГА + Буд + АЦЦ	ФГА + Аз	ФГА + Буд + Аз
ИЛ-4, пг/мл	4,3±0,8* <sup>#</sup>	1,4±0,1 <sup>#♦β</sup>	5,1±1,0* <sup>#</sup>	1,3±0,1 <sup>#♦γ</sup>
ИЛ-5, пг/мл	32,8±3,3 <sup>#</sup>	31,7±1,9 <sup>#</sup>	29,2±2,6* <sup>♦</sup>	28,0±2,7* <sup>♦</sup>
ИЛ-8, пг/мл	125539±8593* <sup>♦</sup>	37149±7493 <sup>#β</sup>	134229±6445* <sup>♦</sup>	38135±7844 <sup>#♦γ</sup>
ИЛ-13, пг/мл	53,9±5,4*	50,3±3,6* <sup>#</sup>	54,5±5,8* <sup>#</sup>	50,9±5,2* <sup>#</sup>
ИЛ-17А, пг/мл	21,1±2,2	21,2±2,6	19,1±1,7 <sup>#</sup>	17,0±1,8* <sup>♦</sup>
ИЛ-33, пг/мл	50,0±7,3 <sup>#</sup>	54,0±6,1 <sup>#</sup>	65,8±5,5	54,5±5,4 <sup>#</sup>
ТСЛП, пг/мл	66,3±9,1*	44,9±6,3 <sup>#</sup>	71,6±6,8*	54,8±5,1* <sup>♦γ</sup>
ФИММ, нг/мл	1,4±0,2	1,3±0,2 <sup>#</sup>	1,3±0,1	1,1±0,1 <sup>#</sup>

Продолжение таблицы 6

Цитокин	ФГА + Нт 1 мкМ	ФГА + Буд + Нт 1 мкМ	ФГА + Нт 10 мкМ	ФГА + Буд + Нт 10 мкМ
ИЛ-4, пг/мл	4,9±0,9* <sup>#♦</sup>	1,6±0,1 <sup>#δ</sup>	2,1±0,3 <sup>#</sup>	1,3±0,1 <sup>#♦ε</sup>
ИЛ-5, пг/мл	35,9±2,2	26,3±2,3 <sup>#♦δ</sup>	27,8±1,4* <sup>♦</sup>	20,7±1,6* <sup>#♦ε</sup>
ИЛ-8, пг/мл	133678±7774* <sup>♦</sup>	50363±10191 <sup>#δ</sup>	122485±11371* <sup>♦</sup>	38961±8898 <sup>#♦ε</sup>
ИЛ-13, пг/мл	73,0±6,9*	51,6±4,6* <sup>#δ</sup>	59,8±3,1* <sup>#</sup>	40,9±4,6* <sup>#♦ε</sup>
ИЛ-17А, пг/мл	19,3±1,5 <sup>#</sup>	20,7±1,3* <sup>#</sup>	15,4±1,2* <sup>#♦</sup>	18,3±1,1* <sup>#♦ε</sup>
ИЛ-33, пг/мл	70,0±6,3	56,6±3,2 <sup>#</sup>	58,9±5,4 <sup>#</sup>	44,5±4,6 <sup>#ε</sup>
ТСЛП, пг/мл	78,2±7,0*	63,1±5,7* <sup>#δ</sup>	64,3±6,1* <sup>#</sup>	44,9±5,2* <sup>#♦ε</sup>
ФИММ, нг/мл	1,6±0,2	1,2±0,2 <sup>#δ</sup>	1,4±0,2 <sup>#</sup>	1,1±0,1 <sup>#ε</sup>

Примечание – Аз – азитромицин (10 мкг/мл), АЦЦ – N-ацетил-L-цистеин (1 мМ), Буд – будесонид (10 нМ), Нт – нортриптилин, Тео – теофиллин (1 мкМ), ФГА – фитогемагглютинин (10 мкг/мл). Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=6. Сравнение полученных данных осуществлялось между 5 группами результатов, куда входили «Контроль», «ФГА», «ФГА + Буд» + 2 группы данных с лекарственным препаратом (Тео, АЦЦ, Аз, Нт 1 мкМ или Нт 10 мкМ). \* p<0,05 по сравнению с контролем (мононуклеарными клетками крови без ФГА и лекарственных средств);

<sup>#</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА; <sup>♦</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА + Буд; <sup>α</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА + Тео; <sup>β</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА + АЦЦ; <sup>γ</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА + Аз; <sup>δ</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА + Нт 1 мкМ; <sup>ε</sup> p<0,05 по сравнению с ФГА + Нт 10 мкМ.

В свою очередь теofilлин подавлял ФГА-индуцированную продукцию ИЛ-4 и ИЛ-17А, АЦЦ – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-33, азитромицин – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-17А, нортриптилин (1 мкМ) – ИЛ-4 и ИЛ-17А, нортриптилин (10 мкМ) – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ФИММ и ТСЛП.

Внесение в культуру МПК-клеток комбинации теofilлина/будесонида либо азитромицина/будесонида, либо нортриптилина (1 или 10 мкМ)/будесонида приводило к угнетению синтеза ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ФИММ и ТСЛП. Вместе с тем инкубация МПК-клеток с комбинацией будесонида и АЦЦ сопровождалась снижением продукции каждого из исследованных цитокинов, за исключением ИЛ-17А.

Сочетание теofilлин/будесонид оказалось более эффективным, чем использование одного будесонида, в супрессии выработки МПК-клетками ИЛ-4 и ИЛ-8; АЦЦ/будесонид – ИЛ-4; азитромицин/будесонид – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-17А, ТСЛП; нортриптилин (1 мкМ)/будесонид – ИЛ-5; нортриптилин (10 мкМ)/будесонид – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ТСЛП.

### **Внутриклеточная продукция цитокинов лимфоцитами крови пациентов с ХОБЛ под воздействием лекарственных средств**

Будесонид подавлял продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 в Тх, ЦТЛ, НК и НКТ-подобных клетках крови (таблица 7). Он также ингибировал синтез ИФН $\gamma$  ЦТЛ и НК клетками, продукцию ФНО $\alpha$  Тх, НК и НКТ-подобными клетками, но не влиял на выработку ИФН $\gamma$  в Тх, НКТ-подобных клетках и ФНО $\alpha$  в ЦТЛ.

АЦЦ снижал продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх, ЦТЛ, НК и НКТ-подобными клетками. Комбинация АЦЦ и будесонида оказывала более выраженное ингибирующее воздействие на синтез ИЛ-4 Тх, ЦТЛ, НК и НКТ-подобными клетками, чем один будесонид.

Теofilлин подавлял продукцию ИЛ-4 НК и НКТ-подобными клетками пациентов с ХОБЛ. Сочетание теofilлина и будесонида оказывало более сильное супрессирующее воздействие на синтез ИЛ-4 Тх, НК, НКТ-подобными клетками, ИЛ-8 ЦТЛ, НК, НКТ-подобными клетками, ФНО $\alpha$  и ИФН $\gamma$  НК клетками, чем один будесонид.

Азитромицин снижал продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх, ЦТЛ, НК, НКТ-подобными клетками и синтез ФНО $\alpha$  в Тх. Сочетание азитромицина и будесонида превосходило один будесонид по силе ингибирующего воздействия на выработку ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх, ЦТЛ, НК и НКТ-подобными клетками.

Таблица 7 – Изменение доли субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ, продуцирующих цитокины, под влиянием лекарственных средств

Клетки	ФМА + Ион	ФМА + Ион + Буд	ФМА + Ион + Тео	ФМА + Ион + Буд + Тео	ФМА + Ион + АЦЦ	ФМА + Ион + Буд + АЦЦ
% клеток, продуцирующих ИЛ-4						
Тх	3,4±0,4	2,3±0,2*	3,0±0,4 <sup>♦</sup>	1,8±0,2** <sup>α</sup>	2,6±0,3*	1,8±0,2** <sup>β</sup>
ЦТЛ	4,4±0,6	3,1±0,5*	3,6±0,6	2,8±0,5*	3,1±0,6*	2,2±0,3** <sup>♦</sup>
НК	3,7±0,2	2,9±0,2*	3,1±0,3*	2,3±0,2** <sup>α</sup>	3,0±0,1*	2,3±0,1** <sup>β</sup>
НКТ <sub>под</sub>	5,0±0,4	3,8±0,4*	4,4±0,2*	2,7±0,1** <sup>α</sup>	3,5±0,4*	2,3±0,2** <sup>β</sup>
% клеток, продуцирующих ИЛ-8						
Тх	1,9±0,2	1,4±0,2*	1,5±0,2	1,0±0,2*	1,4±0,2*	1,1±0,1*
ЦТЛ	1,8±0,2	1,3±0,2*	1,5±0,2	0,9±0,1** <sup>♦</sup>	1,3±0,2*	1,0±0,2*
НК	2,4±0,1	1,6±0,1*	1,8±0,2	1,1±0,1** <sup>α</sup>	1,5±0,2*	1,1±0,2*
НКТ <sub>под</sub>	2,1±0,3	1,4±0,2*	1,5±0,1	1,0±0,1** <sup>α</sup>	1,3±0,1*	1,2±0,1*
% клеток, продуцирующих ФНОα						
Тх	61,4±3,6	50,8±4,5*	58,3±4,1 <sup>♦</sup>	50,0±5,5*	58,4±4,8 <sup>♦</sup>	48,5±4,5*
ЦТЛ	77,4±6,7	69,9±6,5	73,6±7,1	68,7±5,9*	74,2±8,4	65,7±7,0*
НК	69,9±6,7	59,3±6,2*	66,7±6,4	52,5±6,8** <sup>α</sup>	67,4±7,7	52,8±4,7*
НКТ <sub>под</sub>	75,5±3,7	67,4±3,3*	74,2±3,9	63,5±2,9** <sup>α</sup>	76,7±4,3	62,8±2,7*
% клеток, продуцирующих интерферон γ						
Тх	25,7±3,4	24,5±3,4	23,6±3,3	22,2±3,5*	25,2±3,5	23,2±3,7
ЦТЛ	75,4±5,7	72,1±5,7*	76,2±5,8	72,3±5,8*	71,0±4,5	67,9±5,1*
НК	40,5±5,0	33,8±4,1*	37,7±4,8	28,5±3,6** <sup>α</sup>	37,7±5,4	33,0±5,6*
НКТ <sub>под</sub>	76,2±5,8	74,5±6,2	75,6±5,7	72,8±5,6** <sup>α</sup>	74,7±5,5	73,1±5,8*

Продолжение таблицы 7

Клетки	ФМА + Ион + Аз	ФМА + Ион + Буд + Аз	ФМА + Ион + Нт 1 мкМ	ФМА + Ион + Нт 10 мкМ	ФМА + Ион + Буд + Нт 1 мкМ	ФМА + Ион + Буд + Нт 10 мкМ
% клеток, продуцирующих ИЛ-4						
Тх	2,8±0,4*	2,1±0,2** <sup>♦</sup>	3,0±0,4** <sup>δε</sup>	2,7±0,4*	1,8±0,3** <sup>♦</sup>	1,5±0,2** <sup>δε</sup>
ЦТЛ	3,6±0,6*	2,4±0,4** <sup>γ</sup>	4,0±0,6 <sup>δ</sup>	3,2±0,5*	2,7±0,4*	2,1±0,3** <sup>ε</sup>
НК	3,0±0,3*	2,2±0,2** <sup>γ</sup>	3,1±0,2** <sup>δε</sup>	2,7±0,2*	2,4±0,2** <sup>♦</sup>	2,0±0,2** <sup>δε</sup>
НКТ <sub>под</sub>	3,7±0,3*	2,9±0,3** <sup>γ</sup>	4,1±0,3** <sup>δε</sup>	3,3±0,2*	3,0±0,2** <sup>♦</sup>	2,3±0,2** <sup>δε</sup>
% клеток, продуцирующих ИЛ-8						
Тх	1,6±0,2*	1,0±0,1** <sup>γ</sup>	1,6±0,3	1,2±0,2*	1,1±0,1** <sup>♦</sup>	0,9±0,1** <sup>♦</sup>
ЦТЛ	1,3±0,1*	0,9±0,1** <sup>γ</sup>	1,6±0,2** <sup>δε</sup>	1,1±0,2*	1,1±0,2*	0,8±0,1** <sup>♦</sup>
НК	1,6±0,1*	1,1±0,1** <sup>γ</sup>	1,9±0,1 <sup>δ</sup>	1,5±0,1*	1,1±0,1** <sup>♦</sup>	1,0±0,1** <sup>ε</sup>
НКТ <sub>под</sub>	1,5±0,2*	0,8±0,1** <sup>γ</sup>	1,6±0,2 <sup>δ</sup>	1,3±0,1*	1,1±0,2** <sup>♦</sup>	0,9±0,1** <sup>ε</sup>
% клеток, продуцирующих ФНОα						
Тх	56,1±2,6*	50,4±4,1*	59,0±4,2 <sup>♦</sup>	56,9±4,8	51,2±5,1*	47,8±5,4*
ЦТЛ	73,2±6,9	67,7±7,2*	74,4±6,7	72,9±7,5	68,2±6,9	64,4±6,9*
НК	66,8±7,9	56,8±7,4** <sup>γ</sup>	66,6±7,5	66,1±7,3	56,1±6,7*	51,7±5,8** <sup>ε</sup>
НКТ <sub>под</sub>	74,4±4,6	66,8±3,2** <sup>γ</sup>	72,8±4,6	71,3±3,8	65,6±3,0*	62,0±2,8** <sup>ε</sup>
% клеток, продуцирующих интерферон γ						
Тх	25,6±4,0	22,5±3,8*	23,9±3,4	23,1±3,6*	22,6±3,4*	21,4±3,5** <sup>♦</sup>
ЦТЛ	75,3±5,9	71,6±5,7** <sup>γ</sup>	75,3±5,4	73,6±5,8	71,6±5,4*	67,9±5,3** <sup>δε</sup>
НК	34,7±2,6	32,0±3,6*	40,2±5,3	34,1±4,1*	31,0±3,5*	26,8±3,3** <sup>δε</sup>
НКТ <sub>под</sub>	74,7±6,2	72,9±5,9*	75,4±5,8	74,0±5,8*	73,5±5,8*	71,1±6,2** <sup>♦</sup>

Примечание – Аз – азитромицин (10 мкг/мл), АЦЦ – N-ацетил-L-цистеин (1 мМ), Буд – будесонид (10 нМ), ИЛ – интерлейкин, Ион – иономицин (1 мкг/мл), Нт –

нортриптилин, Тео – теофиллин (1 мкМ), Тх – Т-хелперы, ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты, ФМА – форбол-миристат-ацетат (50 нг/мл), ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ , НКТ<sub>под</sub> – НКТ-подобные клетки. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n=6. Сравнение полученных данных осуществлялось между 4 (или 6) группами результатов, куда входили «ФМА + Ион», «ФМА + Ион + Буд» и 2 группы данных с лекарственным препаратом (Тео, АЦЦ или Аз) либо 4 группы данных (в случае с Нт); \* p<0,05 по сравнению с контролем (ФМА + Ион);  $\diamond$  p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Буд;  $^a$  p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Тео;  $^b$  p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион + АЦЦ;  $^c$  p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Аз;  $^d$  p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Буд + Нт 1 мкМ;  $^e$  p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион + Нт 10 мкМ.

Нортриптилин в концентрации 1 мкМ подавлял синтез ИЛ-4 Тх, НК и НКТ-подобными клетками. В концентрации 10 мкМ этот препарат снижал выработку ИЛ-4, ИЛ-8 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, НК, НКТ-подобными клетками, продукцию ИФН $\gamma$  Тх, НК, НКТ-подобными клетками. Сочетание будесонида с нортриптилином (1 мкМ) превосходило способность одного будесонида в снижении выработки ИЛ-4, ИЛ-8 Тх, НК и НКТ-подобными клетками. Комбинация будесонида с нортриптилином (10 мкМ) более значительно, чем один будесонид, подавляла выработку ИЛ-4, ИЛ-8, ИФН $\gamma$  Тх, ЦТЛ, НК, НКТ-подобными клетками и ФНО $\alpha$  НК, НКТ-подобными клетками.

### Количественная оценка субпопуляций лимфоцитов, содержащих хемокиновые рецепторы, в крови и БАЛЖ пациентов с ХОБЛ

Относительное количество Т- и В-лимфоцитов, НК и НКТ-подобных клеток, содержащих рецепторы CXCR3 и CCR5, было увеличено в крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми (таблица 8).

Таблица 8 – Процентное содержание субпопуляций лимфоцитов, снабженных хемокиновыми рецепторами CCR5 и CXCR3 (относительно данных субпопуляций), в периферической крови пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Хемокиновый рецептор	Субпопуляция лимфоцитов	Курящие пациенты с ХОБЛ	Курящие здоровые люди	Некурящие здоровые люди
CCR5 <sup>+</sup>	Т-лимфоциты	16,1 (14,0–20,6)* <sup>#</sup>	9,7 (8,4–11,2)	9,9 (7,6–13,6)
	В-лимфоциты	5,7 (4,4–6,8)* <sup>#</sup>	2,3 (1,6–3,3)	2,3 (1,8–2,9)
	НК клетки	17,0 (14,0–21,6)* <sup>#</sup>	10,1 (9,2–13,3)	9,5 (8,6–13,2)
	НКТ <sub>под</sub>	41,4 (36,8–49,9)* <sup>#</sup>	28,1 (24,8–29,1)	26,4 (20,0–32,4)
CXCR3 <sup>+</sup>	Т-лимфоциты	40,1 (35,0–44,5)* <sup>#</sup>	29,9 (26,8–36,9)	31,0 (27,1–34,0)
	НК клетки	35,7 (28,8–41,9)* <sup>#</sup>	29,3 (24,4–33,3)	25,1 (21,0–30,5)
	НКТ <sub>под</sub>	42,2 (33,2–48,1)* <sup>#</sup>	32,2 (27,9–35,4)	29,2 (26,7–38,3)
CXCR3 <sup>high</sup>	В-лимфоциты	9,0 (7,4–11,8)* <sup>#</sup>	5,2 (4,5–7,6)	3,9 (2,7–4,7)

Примечание – НКТ<sub>под</sub> – НКТ-подобные клетки. Данные представлены как медиана (25-й – 75-й перцентили); \* p<0,05 по сравнению со здоровыми курящими людьми; <sup>#</sup> p<0,05 по сравнению со здоровыми некурящими людьми.



Отсутствовали значимые различия доли Т-клеток, NK и NKT-подобных клеток, несущих рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6 и CCR7, и относительного количества В-лимфоцитов, имеющих рецепторы CXCR4, CXCR5, CCR6 и CCR7, в периферической крови обследованных лиц.

Доля Т- и В-лимфоцитов, обладающих рецепторами CCR5 и CXCR3, также была повышена в БАЛЖ курящих пациентов с ХОБЛ (медиана CD3<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> клеток – 79,8%, CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> – 83,2%, CD19<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> – 7,7%, CD19<sup>+</sup>CXCR3<sup>high</sup> – 10,0%) по сравнению со здоровыми курильщиками (69,3%, 76,9%, 4,2%, 4,8% соответственно). Вместе с тем процентное содержание Т-лимфоцитов, снабженных рецепторами CCR6, CCR7, CXCR4, CXCR6, и В-клеток, несущих рецепторы CCR6, CCR7, CXCR4, CXCR5, не различалось в БАЛЖ курильщиков с ХОБЛ и курящих здоровых людей.

### **Хемотаксис лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с ХОБЛ под влиянием нортриптилина и азитромицина**

Будесонид подавлял миграцию к CCL5 ЦТЛ, NK и В-лимфоцитов, а к CXCL10 – NK и В-лимфоцитов, но не влиял на перемещение ЦТЛ к CXCL10 и Тх к CCL5 и CXCL10 (таблица 9). Будесонид также активировал движение моноцитов к CCL5 и CXCL10.

В концентрации 1 мкМ нортриптилин снижал хемотаксис к CXCL10 Тх, NK и В-лимфоцитов, к CCL5 – Тх, ЦТЛ, NK и В-лимфоцитов, но не изменял перемещение ЦТЛ к CXCL10 и моноцитов к обоим хемокинам. Комбинация этого препарата (1 мкМ) с будесонидом индуцировала хемотаксис моноцитов к CCL5 и CXCL10 и более существенно, чем один будесонид, супрессировала миграцию к CXCL10 субпопуляций лимфоцитов. В концентрации 10 мкМ нортриптилин, самостоятельно и в сочетании с будесонидом, ингибировал миграцию к CCL5 и CXCL10 Тх, ЦТЛ, NK и В-лимфоцитов, а также ускорял перемещение к этим хемокинам моноцитов. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида обладала более выраженным действием на миграцию клеток крови к CCL5 и CXCL10 (ингибирующим – на субпопуляции лимфоцитов и активирующим – на моноциты), чем один будесонид.

Азитромицин, один и в сочетании с будесонидом, ингибировал миграцию в направлении CCL5 и CXCL10 Тх, ЦТЛ, NK, В-лимфоцитов и индуцировал перемещение к этим хемокинам моноцитов. При этом способность азитромицина супрессировать миграцию субпопуляций лимфоцитов, в комбинации с будесонидом и без него, превосходила эффективность одного будесонида.

Таблица 9 – Изменение миграции моноцитов и субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ к CCL5 и CXCL10 в присутствии лекарственных средств

Клетки	Контроль	Буд	Нт 1 мкМ	Нт 10 мкМ	Буд + Нт 1 мкМ	Буд + Нт 10 мкМ	Аз	Буд + Аз
% клеток, мигрировавших к CCL5								
Тх	100,0±0,0	81,6±7,0	76,5±5,4* <sup>#</sup>	38,4±6,6* <sup>♦</sup>	64,7±8,1*	35,4±6,1* <sup>♦</sup>	52,9±7,1* <sup>♦</sup>	54,1±7,2* <sup>♦</sup>
ЦТЛ	100,0±0,0	76,6±5,8*	80,7±3,4* <sup>#</sup>	34,4±3,7* <sup>♦</sup>	72,0±6,6* <sup>α</sup>	27,4±3,5* <sup>♦#</sup>	55,6±5,2* <sup>♦</sup>	52,9±7,8* <sup>♦</sup>
NK	100,0±0,0	70,3±5,9*	73,0±6,7* <sup>#</sup>	21,5±1,5* <sup>♦</sup>	50,4±7,0* <sup>α</sup>	12,1±1,0* <sup>♦#</sup>	45,5±6,0* <sup>♦</sup>	39,8±6,3* <sup>♦β</sup>
В-клетки	100,0±0,0	67,4±5,9*	53,5±6,2*	37,5±4,2* <sup>♦</sup>	45,0±6,1*	25,7±4,3* <sup>♦</sup>	48,3±4,4* <sup>♦</sup>	45,5±6,8* <sup>♦</sup>
Моноциты	100,0±0,0	238,6±35,4*	125,8±15,6	296,3±49,7*	340,8±53,6* <sup>§</sup>	526,8±84,6* <sup>♦#</sup>	257,9±31,1*	251,9±45,3*
% клеток, мигрировавших к CXCL10								
Тх	100,0±0,0	96,9±10,4	70,1±4,9* <sup>#</sup>	35,7±4,2* <sup>♦</sup>	58,8±5,4* <sup>α</sup>	35,2±5,7* <sup>♦</sup>	53,5±6,9* <sup>♦</sup>	48,0±5,5* <sup>♦</sup>
ЦТЛ	100,0±0,0	87,3±8,7	80,5±6,7* <sup>#</sup>	24,5±6,0* <sup>♦</sup>	49,5±4,7* <sup>§α</sup>	24,2±5,0* <sup>♦</sup>	52,8±9,6* <sup>♦</sup>	44,8±6,4* <sup>♦</sup>
NK	100,0±0,0	81,8±4,5*	80,2±3,5* <sup>#</sup>	20,4±1,4* <sup>♦</sup>	62,2±3,5* <sup>§α</sup>	13,3±1,6* <sup>♦#</sup>	51,8±4,7* <sup>♦</sup>	39,0±3,0* <sup>♦β</sup>
В-клетки	100,0±0,0	76,1±6,0*	64,2±6,5* <sup>#</sup>	26,2±5,6* <sup>♦</sup>	34,9±3,7* <sup>§</sup>	17,9±3,0* <sup>♦</sup>	37,5±10,1* <sup>♦</sup>	37,0±9,4* <sup>♦</sup>
Моноциты	100,0±0,0	304,1±45,6*	129,5±21,8* <sup>#</sup>	436,7±77,7*	402,2±64,2* <sup>§</sup>	642,7±118,3* <sup>♦#</sup>	331,4±68,9*	317,6±62,6*

Примечание – Аз – азитромицин (10 мг/мл), Буд – будесонид (10 нМ), Нт – норритигилин, Тх – Т-хелперы, ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=8. Сравнение полученных данных осуществлялось между 6 (либо 4) группами результатов, куда входили «Контроль», «Буд» + 4 группы данных с Нт (либо 2 группы данных с Аз); \* p<0,05 по сравнению с контролем (клетками крови с хемокином, но без лекарственных средств); <sup>♦</sup> p<0,05 по сравнению с Буд; <sup>#</sup> p<0,05 по сравнению с Нт 10 мкМ; <sup>α</sup> p<0,05 по сравнению с Нт 1 мкМ; <sup>§</sup> p<0,05 по сравнению с Буд + Нт 10 мкМ; <sup>β</sup> p<0,05 по сравнению с Аз.

## Корректирующее влияние нортриптилина на формирование пула белков, вовлеченных в развитие стероидорезистентности

Будесонид и нортриптилин (1 мкМ) не влияли на фосфорилирование р38 МАПК и р65 NF-κB, синтез ГР, ГРβ, ГДА2 и ацетилирование лизина гистона H4 в Тх, ЦТЛ, НК и НКТ-подобных клетках крови пациентов с ХОБЛ (таблица 10).

Таблица 10 – Изменение доли субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ, продуцирующих белки, вовлеченные в развитие стероидорезистентности, под влиянием нортриптилина и будесонида

Клетки	ФМА + Ион	ФМА + Ион + Буд	ФМА + Ион + Нт 1 мкМ	ФМА + Ион + Нт 10 мкМ	ФМА + Ион + Буд + Нт 1 мкМ	ФМА + Ион + Буд + Нт 10 мкМ
СИФ глюкокортикоидного рецептора						
Тх	28,16±3,67	26,06±4,16	28,60±3,56	28,03±3,61	27,99±4,37	28,12±4,86
ЦТЛ	42,03±6,07	38,63±6,67	42,32±5,60	42,13±6,23	41,44±5,97	41,57±7,26
НК	30,87±2,26	27,73±2,30	33,43±1,14	32,92±1,34	32,40±1,05	31,80±1,91
НКТ <sub>под</sub>	40,12±6,97	36,00±7,50	40,42±6,27	39,75±6,95	38,96±6,63	40,01±8,59
СИФ глюкокортикоидного рецептора β						
Тх	3,22±0,19	2,92±0,17	2,88±0,19	2,76±0,19*♦	2,69±0,19*♦	2,60±0,16*♦
ЦТЛ	3,38±0,20	3,13±0,18	3,11±0,19	2,91±0,19*♦§	2,92±0,21*♦	2,78±0,18*♦
НК	3,56±0,25	3,43±2,24	3,30±0,25	3,17±0,23*♦	3,16±0,23*♦	2,99±0,19*♦
НКТ <sub>под</sub>	3,34±0,18	3,13±0,18	3,12±0,19	2,94±0,20*♦§	2,91±0,20*♦§	2,78±0,19*♦
СИФ ф-р38 МАПК						
Тх	3,71±0,39	3,59±0,43	3,77±0,39	3,33±0,36*	3,41±0,34*	3,23±0,31*
ЦТЛ	3,90±0,34	3,76±0,36	3,71±0,32	3,64±0,31*	3,56±0,34*♦	3,54±0,35*♦
НК	2,56±0,23	2,50±0,26	2,47±0,22	2,37±0,24*	2,28±0,25*♦	2,24±0,22*♦
НКТ <sub>под</sub>	3,97±0,35	3,82±0,37	3,79±0,33	3,72±0,34*	3,64±0,36*♦	3,61±0,36*♦
СИФ ф-р65 NF-κB						
Тх	3,24±0,39	3,06±0,34	3,08±0,38	2,60±0,30*	2,88±0,42*	2,50±0,26*♦
ЦТЛ	3,29±0,42	3,16±0,40	3,12±0,40	2,90±0,38*	2,87±0,38*♦	2,79±0,38*♦
НК	1,78±0,20	1,73±0,19	1,69±0,16	1,58±0,17*	1,60±0,21*	1,57±0,21*♦
НКТ <sub>под</sub>	3,32±0,43	3,20±0,41	3,14±0,40	2,93±0,40*	2,92±0,41*♦	2,81±0,41*♦
% клеток, экспрессирующих гистон деацетилазу 2						
Тх	63,9±5,9	70,2±7,8	68,7±6,5	72,5±7,0	75,5±6,7*§	78,6±6,5*
ЦТЛ	67,8±4,5	76,5±5,7	74,3±4,5	77,9±5,5	80,2±5,2*§	83,6±5,0*
НК	54,9±2,4	67,4±6,4	65,5±5,0	66,6±5,6	74,8±5,3*§#	76,7±5,1*♦#
НКТ <sub>под</sub>	70,2±4,4	77,7±5,6	77,0±4,3	79,7±5,2	80,3±5,3*	83,0±4,9*♦
% клеток, экспрессирующих ацетилированный лизин гистона H4						
Тх	24,3±3,7	20,9±3,4	21,6±3,9	17,6±2,9*	17,7±2,7*	14,2±2,0*
ЦТЛ	34,6±7,5	32,1±8,0	32,4±8,0	26,6±6,5*	26,8±6,0*	23,3±6,1*
НК	35,1±3,6	29,7±4,2	31,5±4,9 <sup>#</sup>	25,9±3,6*	25,2±4,4*♦§	18,9±4,2*♦#α
НКТ <sub>под</sub>	38,7±6,4	35,6±6,9	36,6±7,1	31,5±6,3*	30,6±5,8*	26,7±5,3*

Примечание – Результаты 6 экспериментов представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Буд – будесонид (10 нМ); Ион – иономицин; Нт – нортриптилин; СИФ – средняя интенсивность флуоресценции; ФМА – форбол-миристат-ацетат; ф-р38 МАПК – фосфорилированная р38 митоген-активируемая протеинкиназа; ф-р65 NF-κB – фосфорилированный р65 ядерный фактор κB; Тх – Т-хелперы;

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты;  $NKT_{\text{под}}$  –  $NKT$ -подобные клетки; \*  $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион;  $\spadesuit$   $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Буд;  $\S$   $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Нт 1 мкМ;  $\#$   $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Нт 10 мкМ;  $\alpha$   $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Буд + Нт 1 мкМ.

Вместе с тем сочетание будесонида и норттриптилина (1 мкМ) подавляло выработку ГР $\beta$ , фосфорилирование p38 МАПК и p65 NF- $\kappa$ B, ацетилирование лизина гистона H4 и индуцировало синтез ГДА2 в вышеперечисленных клетках крови.

Внесение в культуральную среду с МПК-клетками норттриптилина в концентрации 10 мкМ приводило к снижению выработки ГР $\beta$ , фосфорилирования p38 МАПК и p65 NF- $\kappa$ B, ацетилирования лизина гистона H4 в CD4 $^+$  и CD8 $^+$  Т-лимфоцитах, НК и  $NKT$ -подобных клетках крови пациентов с ХОБЛ, но не оказывало влияния на синтез в этих клетках ГР и ГДА2.

Комбинация норттриптилина (10 мкМ) с будесонидом ингибировала образование ГР $\beta$ , фосфорилирование p38 МАПК и p65 NF- $\kappa$ B, ацетилирование лизина гистона H4 и повышала синтез ГДА2 в CD4 $^+$  и CD8 $^+$  Т-лимфоцитах, НК и  $NKT$ -подобных клетках крови пациентов с ХОБЛ. Такое сочетание лекарственных средств по сравнению с одним будесонидом обладало более сильным ингибирующим воздействием на выработку ГР $\beta$  и фосфорилирование p65 NF- $\kappa$ B в обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов, НК и  $NKT$ -подобных клетках, фосфорилирование p38 МАПК в ЦТЛ, НК,  $NKT$ -подобных клетках и ацетилирование лизина гистона H4 в НК клетках, а также более значительным активирующим эффектом на образование ГДА2 в НК и  $NKT$ -подобных клетках.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Глюкокортикостероид (ГКС) дексаметазон в самой действенной концентрации (100 нМ) не способен ингибировать на  $\geq 50\%$  стимулированную липополисахаридом продукцию фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) в альвеолярных макрофагах (АМ) у 8,9% пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), интерлейкина 6 (ИЛ-6) – у 11,1% пациентов, ИЛ-8 – у 40% пациентов. Для резистентных к глюкокортикоидной терапии пациентов с обострением ХОБЛ (у них секреция ИЛ-8 в АМ под влиянием ГКС снижалась менее, чем на 50%) по сравнению со стероидочувствительными пациентами (у них продукция ИЛ-8 в АМ в присутствии ГКС снижалась на  $\geq 50\%$ ) характерно повышение в крови абсолютного и относительного количества нейтрофилов, абсолютного количества тромбоцитов, отношения абсолютных количеств

нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ) и тромбоцитов к лимфоцитам (ОТЛ), уровня фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), снижение в крови абсолютного и относительного количества эозинофилов, относительного количества лимфоцитов. Для значений этих параметров установлена умеренная корреляционная связь с устойчивостью к ГКС ( $R = -0,548; -0,427; -0,370; -0,393; -0,302; -0,409; 0,306; 0,436; 0,383$  соответственно) [4-А – 6-А, 29-А – 33-А].

2. Результаты определения в периферической крови абсолютного и относительного количества эозинофилов (пороговые значения  $\leq 0,126 \times 10^9/\text{л}$  и  $\leq 1,2\%$ , диагностическая чувствительность (ДЧ) – 83,3% и 83,3%, диагностическая специфичность (ДС) – 55,6% и 63,0% соответственно), относительного количества лимфоцитов (пороговое значение  $\leq 24,4\%$ , ДЧ – 77,8%, ДС – 63,0%), абсолютного и относительного количества нейтрофилов (пороговые значения  $> 7,24 \times 10^9/\text{л}$  и  $> 68\%$ , ДЧ – 61,1% и 61,1%, ДС – 92,6% и 85,2% соответственно), абсолютного количества тромбоцитов (пороговое значение  $> 205 \times 10^9/\text{л}$ , ДЧ – 77,8%, ДС – 70,4%), ОНЛ (пороговое значение  $> 2,75$ , ДЧ – 66,7%, ДС – 74,1%), ОТЛ (пороговое значение  $> 116$ , ДЧ – 61,1%, ДС – 77,8%), уровня ФИММ (пороговое значение  $> 2,24$  нг/мл, ДЧ – 72,2%, ДС – 70,4%) имеют диагностическую ценность при прогнозировании устойчивости к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ. Диагностическая эффективность (ДЭ) этих тестов составляет от 66,7% до 80,0% [5-А, 6-А, 29-А, 31-А – 33-А].

3. Предложенная математическая модель прогнозирования эффективности ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ с использованием параметров общего анализа крови включает результаты одновременного определения относительного количества эозинофилов, ОНЛ и ОТЛ. Созданная модель имеет ДЭ 80,0%, ДЧ 83,3%, ДС 77,8%, прогностическую ценность положительного результата (ПЦПР) 71,4%, прогностическую ценность отрицательного результата (ПЦОР) 87,5%, площадь под ROC-кривой (AUC) 0,805.

Использование результатов определения уровня ФИММ в плазме крови повышает точность оценки эффективности ГКС. Разработана математическая модель, которая включает результаты измерения относительного количества эозинофилов, ОТЛ и уровня ФИММ в плазме крови. Она позволяет прогнозировать резистентность к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ с ДЭ 86,7%, ДЧ 83,3%, ДС 88,9%, ПЦПР 83,3%, ПЦОР 88,9%, AUC 0,889 [5-А, 6-А, 21-А].

4. У курящих пациентов с ХОБЛ степень связывания ГКС со своими рецепторами в Т-хелперах ( $CD3^+CD4^+$ ), цитотоксических Т-лимфоцитах (ЦТЛ,  $CD3^+CD8^+$ ), регуляторных Т-лимфоцитах ( $CD4^+CD25^+CD127^-$ ),

В-лимфоцитах (CD19<sup>+</sup>), НК клетках (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), НКТ-подобных клетках (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и моноцитах (CD14<sup>+</sup>) крови ниже, чем у здоровых курильщиков (в 1,18, 1,26, 1,21, 1,38, 1,38, 1,32 и 1,34 раза соответственно) и здоровых некурящих людей (в 1,43, 1,59, 1,46, 1,71, 1,66, 1,62 и 1,62 раза). Связывание ГКС с глюкокортикоидными рецепторами (ГР), расположенными в перечисленных субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови, снижено у здоровых курящих людей по сравнению со здоровыми некурящими людьми (в 1,20–1,26 раза) [4-А, 28-А].

5. Инкубация мононуклеарных клеток крови (МПК-клеток) пациентов с ХОБЛ с ГКС будесонидом (10 нМ) приводит к снижению секреции ИЛ-4 (в 4,24 раза), ИЛ-5 (в 1,18 раза), ИЛ-8 (в 2,36 раза) и ИЛ-13 (в 1,33 раза), индуцированной фитогемагглютинином (ФГА), но не влияет на синтез ИЛ-17А, ИЛ-33, ФИММ и тимического стромального лимфопоэтина (ТСЛП). Будесонид подавляет продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8, стимулированную форболмирикат-ацетатом (ФМА) и иономицином, в Т-хелперах (в 1,48 и 1,36 раза), ЦТЛ (в 1,42 и 1,38 раза), НК клетках (в 1,28 и 1,50 раза) и НКТ-подобных клетках (в 1,32 и 1,50 раза) крови. Он также ингибирует синтез интерферона  $\gamma$  (ИФН $\gamma$ ) ЦТЛ (в 1,05 раза), НК клетками (в 1,20 раза), продукцию ФНО $\alpha$  Т-хелперами (в 1,21 раза), НК клетками (в 1,18 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,12 раза), но не влияет на выработку ИФН $\gamma$  в Т-хелперах, НКТ-подобных клетках и ФНО $\alpha$  в ЦТЛ.

Н-ацетил-L-цистеин (АЦЦ, 1 мМ) подавляет секрецию ИЛ-4 (в 1,67 раза), ИЛ-5 (в 1,29 раза) и ИЛ-33 (в 1,50 раза) МПК-клетками пациентов с ХОБЛ, стимулированными ФГА, продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 Т-хелперами (в 1,31 и 1,36 раза), ЦТЛ (в 1,42 и 1,38 раза), НК клетками (в 1,23 и 1,60 раза) и НКТ-подобными клетками крови (в 1,43 и 1,62 раза), активированными ФМА и иономицином. АЦЦ в сочетании с будесонидом супрессирует секрецию ИЛ-4 (в 5,14 раза), ИЛ-5 (в 1,33 раза), ИЛ-8 (в 3,50 раза), ИЛ-13 (в 1,58 раза), ИЛ-33 (в 1,39 раза), ТСЛП (в 1,84 раза) и ФИММ (в 1,23 раза) МПК-клетками, продукцию ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  Т-хелперами (в 1,89, 1,73 и 1,27 раза), ЦТЛ (в 2,00, 1,80 и 1,18 раза), НК клетками (в 1,61, 2,18 и 1,32 раза) и НКТ-подобными клетками (в 2,17, 1,75 и 1,20 раза), синтез ИФН $\gamma$  ЦТЛ (в 1,11 раза), НК клетками (в 1,23 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,04 раза). Комбинация АЦЦ и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на синтез ИЛ-4 МПК-клетками (в 1,21 раза), Т-хелперами (1,28 раза), ЦТЛ (в 1,41 раза), НК клетками (в 1,26 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,65 раза), чем один будесонид [7-А – 12-А, 19-А, 24-А, 34-А, 36-А, 39-А, 40-А].

6. Теофиллин (1 мкМ) снижает индуцированную ФГА секрецию ИЛ-4 (в 1,80 раза) и ИЛ-17А (в 1,42 раза) МПК-клетками, а также стимулированную

ФМА и иономицином выработку ИЛ-4 НК клетками (в 1,19 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,14 раза) пациентов с ХОБЛ. Комбинация теофиллина и будесонида подавляет секрецию ИЛ-4 (в 5,14 раза), ИЛ-5 (в 1,61 раза), ИЛ-8 (в 2,94 раза), ИЛ-13 (в 1,75 раза), ИЛ-17А (в 1,17 раза), ИЛ-33 (в 1,26 раза), ТСЛП (в 1,57 раза) и ФИММ (в 1,33 раза) МПК-клетками, продукцию ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  и ИФН $\gamma$  Т-хелперами (в 1,89, 1,90, 1,23 и 1,16 раза), ЦТЛ (в 1,57, 2,00, 1,13 и 1,04 раза), НК клетками (в 1,61, 2,18, 1,33 и 1,42 раза) и НКТ-подобными клетками (1,85, 2,10, 1,19 и 1,05 раза) крови пациентов с ХОБЛ. Сочетание теофиллина и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 (в 1,21 раза) и ИЛ-8 (в 1,24 раза) МПК-клетками, а также на синтез ИЛ-4 Т-хелперами (в 1,28 раза), НК клетками (в 1,26 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,41 раза), ИЛ-8 ЦТЛ (в 1,44 раза), НК клетками (в 1,45 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,40 раза), ФНО $\alpha$  (в 1,13 раза) и ИФН $\gamma$  (в 1,19 раза) НК клетками, чем один будесонид [7-А, 9-А, 34-А, 35-А, 37-А, 39-А].

7. Азитромицин (10 мкг/мл) самостоятельно подавляет секрецию ИЛ-4 (в 1,41 раза), ИЛ-5 (в 1,45 раза), ИЛ-13 (в 1,46 раза) и ИЛ-17А (в 1,20 раза) МПК-клетками, продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 Т-хелперами (в 1,21 и 1,19 раза), ЦТЛ (в 1,22 и 1,38 раза), НК клетками (в 1,23 и 1,50 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,35 и 1,40 раза) и синтез ФНО $\alpha$  Т-хелперами (в 1,09 раза) крови. Комбинация азитромицина и будесонида супрессирует образование ИЛ-4 (в 5,54 раза), ИЛ-5 (в 1,51 раза), ИЛ-8 (в 3,41 раза), ИЛ-13 (в 1,57 раза), ИЛ-17А (в 1,35 раза), ИЛ-33 (в 1,38 раза), ТСЛП (в 1,51 раза), ФИММ (в 1,45 раза) МПК-клетками, снижает выработку ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  и ИФН $\gamma$  CD4<sup>+</sup> (в 1,62, 1,90, 1,22 и 1,14 раза) и CD8<sup>+</sup> (в 1,83, 2,00, 1,14 и 1,05 раза) Т-клетками, НК клетками (в 1,68, 2,18, 1,23 и 1,27 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,72, 2,63, 1,13 и 1,05 раза). Сочетание азитромицина и будесонида превосходит один будесонид по силе ингибирующего воздействия на продукцию ИЛ-4 (в 1,31 раза), ИЛ-5 (в 1,28 раза), ИЛ-8 (в 1,44 раза), ИЛ-17А (в 1,38 раза), ТСЛП (в 1,36 раза) МПК-клетками, а также выработку ИЛ-4 и ИЛ-8 Т-хелперами (в 1,10 и 1,40 раза), ЦТЛ (в 1,29 и 1,44 раза), НК клетками (в 1,32 и 1,45 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,31 и 1,75 раза) [7-А, 11-А, 34-А, 35-А, 39-А].

8. Нортриптилин в концентрации 1 мкМ подавляет индуцированную ФГА продукцию ИЛ-4 (в 1,47 раза) и ИЛ-17А (в 1,19 раза) МПК-клетками пациентов с ХОБЛ, а также синтез ИЛ-4 Т-хелперами (в 1,13 раза), НК клетками (в 1,19 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,22 раза) крови, стимулированными ФМА и иономицином. В концентрации 10 мкМ этот препарат снижает секрецию ИЛ-4 (в 3,43 раза), ИЛ-5 (в 1,52 раза), ИЛ-13 (в 1,33 раза), ИЛ-17А (в 1,49 раза), ИЛ-33 (в 1,28 раза), ФИММ (в 1,14 раза)

и ТСПП (в 1,29 раза) МПК-клетками, выработку ИЛ-4, ИЛ-8 CD4<sup>+</sup> (в 1,26 и 1,58 раза) и CD8<sup>+</sup> (в 1,38 и 1,64 раза) Т-клетками, НК клетками (в 1,37 и 1,60 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,52 и 1,62 раза), продукцию ИФН $\gamma$  Т-хелперами (в 1,11 раза), НК клетками (в 1,19 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,03 раза).

В отличие от одного будесонида, его сочетание с нортриптилином (1 мкМ) угнетает секрецию ИЛ-17А (в 1,11 раза), ИЛ-33 (в 1,33 раза), ТСПП (в 1,31 раза) и ФИММ (в 1,33 раза) МПК-клетками и продукцию ИФН $\gamma$  Т-хелперами (в 1,14 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,04 раза) крови. Такое сочетание лекарственных средств превосходит способность одного будесонида в снижении секреции ИЛ-5 МПК-клетками (в 1,36 раза) и выработки ИЛ-4, ИЛ-8 Т-хелперами (в 1,28 и 1,27 раза), НК клетками (в 1,21 и 1,45 раза) и НКТ-подобными клетками (в 1,27 и 1,27 раза). Комбинация будесонида с нортриптилином в концентрации 10 мкМ более значительно, чем один будесонид, супрессирует секрецию ИЛ-4 (в 1,31 раза), ИЛ-5 (в 1,73 раза), ИЛ-8 (в 1,41 раза), ИЛ-13 (в 1,46 раза), ИЛ-17А (в 1,28 раза), ТСПП (в 1,65 раза) МПК-клетками, выработку ИЛ-4, ИЛ-8, ИФН $\gamma$  Т-хелперами (в 1,53, 1,56, 1,14 раза), ЦТЛ (в 1,48, 1,63 и 1,06 раза), НК клетками (в 1,45, 1,60 и 1,26 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,65, 1,56 и 1,05 раза) и ФНО $\alpha$  НК клетками (в 1,15 раза), НКТ-подобными клетками (в 1,09 раза) [10-А, 12-А, 19-А, 38-А, 39-А, 42-А].

9. Относительное количество Т- и В-лимфоцитов, содержащих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, увеличено в периферической крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими (CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> – в 1,34 раза; CD19<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> – в 1,73 раза; CD3<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> – в 1,66 раза; CD19<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> – в 2,48 раза) и некурящими людьми (в 1,29, 2,31, 1,63 и 2,48 раза соответственно), а также в БАЛЖ курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками (в 1,08, 2,08, 1,15 и 1,83 раза). Отсутствуют значимые различия доли Т-клеток, несущих хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6 и CCR7, и относительного количества В-лимфоцитов, имеющих рецепторы CXCR4, CXCR5, CCR6 и CCR7, в периферической крови и БАЛЖ обследованных лиц.

В периферической крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми также повышено процентное содержание НК клеток и НКТ-подобных клеток, обладающих хемокиновыми рецепторами CXCR3 (% НК клеток – в 1,22 и 1,42 раза; % НКТ-подобных клеток – в 1,31 и 1,45 раза) и CCR5 (% НК клеток – в 1,68 и 1,79 раза; % НКТ-подобных клеток – в 1,47 и 1,57 раза), и не отличается доля НК клеток и НКТ-подобных клеток, снабженных рецепторами CXCR4, CXCR6, CCR6 и CCR7 [13-А, 14-А, 17-А, 20-А, 22-А, 25-А – 27-А].



10. Будесонид не влияет на перемещение ЦТЛ крови к CXCL10 (лиганду хемокинового рецептора CXCR3) и Т-хелперов крови к CCL5 (лиганду хемокинового рецептора CCR5) и CXCL10. Нортриптилин (10 мкМ), самостоятельно и в сочетании с будесонидом, подавляет миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов (самостоятельно – в 2,60 и 2,80 раза; с будесонидом – в 2,82 и 2,84 раза), ЦТЛ (в 2,91, 4,08, 3,65, 4,13 раза соответственно), НК клеток (в 4,65, 4,90, 8,26, 7,52 раза) и В-лимфоцитов (в 2,67, 3,82, 3,89, 5,59 раза) крови пациентов с ХОБЛ, а также ускоряет перемещение к этим хемокинам моноцитов крови (в 2,96, 4,37, 5,27, 6,43 раза). Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида обладает более выраженным, чем один будесонид, ингибирующим действием на миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов (в 2,31 и 2,75 раза), ЦТЛ (в 2,80 и 3,61 раза), НК клеток (в 5,81 и 6,15 раза), В-лимфоцитов (в 2,62 и 4,25 раза) крови пациентов с ХОБЛ и активирующим – на перемещение к этим хемокинам моноцитов (в 2,21 и 2,11 раза).

Азитромицин, один и в сочетании с будесонидом, ингибирует миграцию в направлении CCL5 и CXCL10 Т-хелперов (самостоятельно – в 1,89 и 1,87 раза; с будесонидом – в 1,85 и 2,08 раза), ЦТЛ (в 1,80, 1,89, 1,89 и 2,23 раза соответственно), НК клеток (в 2,20, 1,93, 2,51 и 2,56 раза), В-лимфоцитов крови (в 2,07, 2,67, 2,20 и 2,70 раза) и индуцирует перемещение к этим хемокинам моноцитов крови (в 2,58, 3,31, 2,52, 3,18 раза). При этом способность азитромицина супрессировать миграцию субпопуляций лимфоцитов, в комбинации с будесонидом и без него, превосходит эффективность одного будесонида (миграция Т-хелперов в присутствии только азитромицина снижается в 1,54 и 1,81 раза, сочетания азитромицина и будесонида – в 1,51 и 2,02 раза; ЦТЛ – в 1,38, 1,65, 1,45 и 1,95 раза соответственно; НК клеток – в 1,55, 1,58, 1,77 и 2,10 раза; В-лимфоцитов – в 1,40, 2,03, 1,48 и 2,06 раза) [16-А, 18-А, 20-А, 22-А, 41-А].

11. Будесонид (в концентрации 10 нМ) и нортриптилин (в концентрации 1 мкМ) не влияют на синтез ГР, его изоформы ГРβ, фосфорилированной р38 митоген-активируемой протеинкиназы (ф-р38 МАПК), фосфорилированного белка р65 фактора транскрипции NF-κВ (ф-р65 NF-κВ), гистон деацетилазы 2 (ГДА2) и ацетилованного лизина гистона H4 в Т-хелперах, ЦТЛ, НК клетках и НКТ-подобных клетках крови пациентов с ХОБЛ, стимулированных ФМА и иономицином. В отличие от будесонида (10 нМ) и нортриптилина (1 мкМ), действующих по отдельности, их сочетание подавляет образование ГРβ, ф-р38 МАПК, ф-р65 NF-κВ, ацетилованного лизина гистона H4 и активирует продукцию ГДА2 в CD4<sup>+</sup> (в 1,20, 1,09, 1,13, 1,37 и 1,18 раза) и CD8<sup>+</sup> (в 1,16, 1,10, 1,15, 1,29 и 1,18 раза) Т-лимфоцитах,

НК (в 1,13, 1,12, 1,11, 1,39 и 1,36 раза) и НКТ-подобных клетках (1,15, 1,09, 1,14, 1,26 и 1,14 раза) крови пациентов с ХОБЛ.

Внесение в культуральную среду с МПК-клетками, активированными ФМА и иономицином, нортриптилина в концентрации 10 мкМ приводит к снижению синтеза ГРβ, ф-р38 МАПК, ф-р65 NF-κB, ацетилизованного лизина гистона H4 в CD4<sup>+</sup> (в 1,17, 1,11, 1,25 и 1,38 раза) и CD8<sup>+</sup> (1,16, 1,07, 1,13 и 1,30 раза) Т-лимфоцитах, НК клетках (в 1,12, 1,08, 1,13 и 1,36 раза) и НКТ-подобных клетках (в 1,14, 1,07, 1,13 и 1,23 раза) крови пациентов с ХОБЛ, но не оказывает влияния на выработку в этих клетках ГР и ГДА2. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) с будесонидом (10 нМ) ингибирует синтез ГРβ, ф-р38 МАПК, ф-р65 NF-κB, ацетилизованного лизина гистона H4 и повышает образование ГДА2 в CD4<sup>+</sup> (в 1,24, 1,15, 1,30, 1,71 и 1,23 раза) и CD8<sup>+</sup> (в 1,22, 1,10, 1,18, 1,48 и 1,23 раза) Т-лимфоцитах, НК клетках (в 1,19, 1,14, 1,13, 1,86 и 1,40 раза) и НКТ-подобных клетках (в 1,20, 1,10, 1,18, 1,45 и 1,18 раза) крови пациентов с ХОБЛ. Такое сочетание лекарственных средств по сравнению с одним будесонидом обладает более сильным ингибирующим воздействием на синтез ГРβ и ф-р65 NF-κB в CD4<sup>+</sup> (в 1,12 и 1,22 раза) и CD8<sup>+</sup> (в 1,13 и 1,13 раза) Т-лимфоцитах, НК клетках (в 1,15 и 1,10 раза), НКТ-подобных клетках (в 1,13 и 1,14 раза), образование ф-р38 МАПК в ЦТЛ (в 1,06 раза), НК клетках (в 1,12 раза), НКТ-подобных клетках (в 1,06 раза) и продукцию ацетилизованного лизина гистона H4 в НК клетках (в 1,57 раза), а также более значительным активирующим эффектом на выработку ГДА2 в НК клетках (в 1,14 раза) и НКТ-подобных клетках (в 1,07 раза) [10-А, 12-А, 19-А, 38-А, 42-А].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Разработанные математические модели для пациентов с обострением ХОБЛ являются дополнительным критерием определения вероятности эффективности ГКС и рекомендуются к использованию в стационарных условиях в учреждениях здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим ХОБЛ, для формирования в дальнейшем стратегии индивидуального лечения. По результатам исследования составлены и утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь две инструкции по применению. Модель, построенная на показателях общего анализа крови и изложенная в инструкции по применению [43-А], может быть рассчитана после первичного осмотра лечащим врачом. Модель, приведенную в инструкции по применению [44-А] и требующую определения уровня ФИММ в плазме крови, целесообразно использовать после повторного осмотра лечащим врачом.

2. Обнаруженные различия клеточного состава периферической крови, уровня ФИММ и их взаимосвязь с устойчивостью к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ, результаты совместной инкубации МПК-клеток пациентов с ХОБЛ с ГКС, нортриптилином, азитромицином, теофиллином, АЦЦ используются в учебном процессе при преподавании биологической химии, клинической фармакологии и внутренних болезней в БГМУ (акты о практическом использовании результатов исследования в учебном процессе от 21.09.2023, 30.08.2023 и 31.08.2023 соответственно), а также биологической химии в учреждениях образования «Гомельский государственный медицинский университет», «Гродненский государственный медицинский университет», «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (акты о практическом использовании результатов исследования в учебном процессе от 31.08.2023, 06.09.2023 и 07.09.2023 соответственно). Эти сведения рекомендуются к более широкому использованию в учебном процессе учреждений образования Министерства здравоохранения Республики Беларусь и при проведении научных исследований [5-А – 12-А, 19-А, 21-А, 24-А, 31-А, 32-А, 38-А, 43-А, 44-А].

3. Полученные данные о способности азитромицина усиливать противовоспалительные эффекты стероидов служат дополнительным обоснованием целесообразности использования азитромицина совместно с ГКС для лечения обострений ХОБЛ бактериальной этиологии [7-А, 11-А, 18-А, 20-А, 22-А].

4. Раскрытая в рамках диссертационного (доклинического) исследования способность нортриптилина потенцировать противовоспалительные свойства ГКС (изложена в Евразийском патенте на изобретение № 044546, выдан 31.08.2023) обосновывает целесообразность проведения клинического исследования (испытания) с применением нортриптилина (либо амитриптилина, основным активным метаболитом которого является нортриптин) у пациентов с ХОБЛ с последующим внесением нового показания в инструкцию по медицинскому применению лекарственного средства и (или) листок-вкладыш [10-А, 12-А, 16-А, 19-А, 45-А].

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

### Статьи в научных журналах

1-А. Кадушкин, А. Г. Молекулярные механизмы формирования стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (обзор) / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович // Пульмонология. – 2016. – Т. 26, № 6. – С. 736–747.

2-А. Таганович, А. Д. Низкая чувствительность к глюкокортикоидам – будущая мишень для терапии хронической обструктивной болезни легких (обзор) / А. Д. Таганович, А. Г. Кадушкин, Н. Д. Таганович // Лечеб. дело. – 2018. – № 1 (59). – С. 24–32.

3-А. Таганович, А. Д. Современные фармацевтические подходы к лечению хронической обструктивной болезни легких (обзор) / А. Д. Таганович, А. Г. Кадушкин, Н. Д. Таганович // Здравоохранение. – 2018. – № 5. – С. 40–51.

4-А. Чувствительность к глюкокортикостероидам и гетерогенность ответа клеток *in vitro* у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, А. А. Арабей, Л. М. Шишло, А. П. Любецкая, Л. В. Алешкевич // Пульмонология. – 2018. – Т. 28, № 5. – С. 558–566.

5-А. Использование рутинных тестов общего анализа крови для прогнозирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, Т. В. Шман, В. К. Панасюк, Г. К. Новская // Пульмонология. – 2018. – Т. 28, № 6. – С. 681–692.

6-А. Значимость лабораторных показателей клеточного состава периферической крови для оценки стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, А. А. Арабей, О. В. Левандовская, М. В. Ступень // Лаб. диагностика. – 2018. – Т. 7, № 4. – С. 462–476.

7-А. Влияние глюкокортикостероидов при их совместном применении с азитромицином или теофиллином на продукцию цитокинов НК и НКТ-подобными клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Т. В. Шман // Биомед. химия. – 2021. – Т. 67, № 4. – С. 352–359.

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, A. D. Tahanovich, L. V. Movchan, T. S. Kolesnikova, A. V. Khadasouskaya,

T. V. Shman // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* – 2021. – Vol. 15, № 4. – P. 337–344.

8-А. Влияние ацетилцистеина и будесонида на продукцию цитокинов клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, О. В. Левандовская // *Эксперим. и клин. фармакология.* – 2021. – Т. 84, № 9. – С. 13–19.

9-А. Влияние комбинации теофиллина и будесонида на выработку провоспалительных цитокинов клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, Э. И. Талабаева, А. В. Пластинина, Т. В. Шман // *Туберкулез и болезни легких.* – 2021. – Т. 99, № 10. – С. 14–22.

10-А. Nortriptyline enhances corticosteroid sensitivity of blood T cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Kadushkin, A. Tahanovich, L. Movchan, O. Levandovskaya, T. Shman // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 72, № 5. – P. 793–805.

11-А. Azithromycin modulates release of steroid-insensitive cytokines from peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Kadushkin, A. Tahanovich, L. Movchan, E. Talabayeva, A. Platinina, T. Shman // *Adv. Respir. Med.* – 2022. – Vol. 90, № 1. – P. 17–27.

12-А. Nortriptyline overcomes corticosteroid resistance in NK and NKT-like cells from peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. G. Kadushkin, A. D. Tahanovich, L. V. Movchan, V. V. Dziadzichkina, O. V. Levandovskaya, T. V. Shman // *Research Results in Pharmacology.* – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. 59–70.

13-А. Популяционная перестройка В-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, М. М. Зафранская, О. В. Дядичкина, Т. В. Шман // *Биомед. химия.* – 2022. – Т. 68, № 2. – С. 134–143.

Population Rearrangement of B Lymphocytes Expressing Chemokine Receptors in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease / A. G. Kadushkin, A. D. Tahanovich, L. V. Movchan, M. M. Zafranskaya, V. V. Dziadzichkina, T. V. Shman // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* – 2022. – Vol. 16, № 3. – P. 216–224.

14-А. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови, коэкспрессирующих CD5 и хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, М. М. Зафранская, О. В. Дядичкина, Т. В. Шман // *Иммунология.* – 2022. – Т. 43, № 2. – С. 197–207.

15-A. Coronas of micro/nano plastics: a key determinant in their risk assessments (обзор) / J. Cao, Q. Yang, J. Jiang, T. Dalu, A. Kadushkin, J. Singh, R. Fakhrullin, F. Wang, X. Cai, R. Li // Part. Fibre Toxicol. – 2022. – Vol. 19, № 55. – P. 1–25.

16-A. Нортриптилин модулирует миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Т. В. Шман // Докл. Рос. акад. наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 507, № 1. – С. 536–541.

Nortriptyline Modulates the Migration of Peripheral Blood Lymphocytes and Monocytes in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease / A. G. Kadushkin, A. D. Tahanovich, L. V. Movchan, T. S. Kolesnikova, E. V. Khadasouskaya, T. V. Shman // Dokl. Biochem. Biophys. – 2022. – Vol. 507. – P. 307–311.

17-A. Экспрессия хемокиновых рецепторов на поверхности НКТ-подобных клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, М. М. Зафранская, Т. В. Шман // Новости медико-биол. наук. – 2022. – Т. 22, № 4. – С. 48–53.

18-A. Изменение хемотаксиса моноцитов и лимфоцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких под влиянием будесонида и азитромицина / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская // Проблемы здоровья и экологии. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 103–110.

19-A. Подавление продукции провоспалительных цитокинов в естественных киллерах крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких под влиянием нортриптилина / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Е. В. Ходосовская, Т. С. Колесникова // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2023. – Т. 21, № 1. – С. 32–39.

20-A. Влияние азитромицина на миграцию НК-клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, М. М. Зафранская, Т. В. Шман // Мед. иммунология. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 309–318.

21-A. Диагностическая ценность определения цитокина MIF в комбинации с параметрами общего анализа крови для оценки стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Е. И. Давидовская, Г. К. Новская, Л. В. Алешкевич // Мед. журн. – 2023. – № 3. – С. 108–114.

22-A. Миграция Т-лимфоцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких к хемокинам RANTES и IP-10 под влиянием азитромицина / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан,

М. М. Зафранская, Т. В. Шман // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 191–204.

23-А. Роль ИЛ-25, ИЛ-33 и TSLP в развитии кортикостероидной резистентности (обзор) / А. С. Порошина, Н. Н. Шершакова, И. П. Шиловский, А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Г. О. Гудима, М. Р. Хаитов // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 4. – С. 500–510.

### **Статьи в сборниках научных трудов**

24-А. Изменение синтеза провоспалительных цитокинов НК и NKT-подобными клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких под влиянием N-ацетилцистеина и глюкокортикоидов / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Э. И. Талабаева, А. В. Пластинина, О. В. Левандовская // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : рец. ежегод. сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск, 2021. – Вып. 11. – С. 401–407.

### **Тезисы докладов и материалы научных конференций**

25-А. Kadushkin, A. B1 and B2 lymphocytes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid of patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich // Eur. Respir. J. – 2017. – Vol. 50, suppl. 61 [ERS International Congress, Milan, Italy, September 09–13, 2017 : abstr.]. – P. PA3914.

26-А. Kadushkin, A. Chemokine receptor CXCR3 expression on naive and memory B-lymphocytes of patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich // Eur. Respir. J. – 2017. – Vol. 50, suppl. 61 [ERS International Congress, Milan, Italy, September 09–13, 2017 : abstr.]. – P. PA2025.

27-А. Expression of chemokine receptors CXCR3 and CCR5 is up-regulated on NK and NKT cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. G. Kadushkin, A. D. Tahanovich, L. V. Movchan, T. V. Shman, V. V. Levandovskaya // Allergy. – 2018. – Vol. 73, suppl. 105 [EAACI Congress, Munich, Germany, May 26–30, 2018 : abstr.]. – P. 774.

28-А. Reduced glucocorticoid receptor binding affinity in blood lymphocytes and monocytes of COPD patients / A. Tahanovich, A. Kadushkin, L. Movchan, T. Shman, V. Levandovskaya // Eur. Respir. J. – 2018. – Vol. 52, suppl. 62 [ERS International Congress, Paris, France, September 15–19, 2018 : abstr.]. – P. PA2922.

29-А. Использование фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, для оценки чувствительности альвеолярных макрофагов к глюкокортикоидам у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. А. Арабей, Л. М. Шишло, А. Д. Таганович // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Респ. конф.

с междунар. участием, посвящ. 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина, Минск, 24 мая 2019 г. : в 2 ч. / под ред. В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2019. – Ч. 1. – С. 123–124.

30-А. Вариабельность ответа альвеолярных макрофагов на глюкокортикоиды у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [Электронный ресурс] / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, А. А. Арабей, Л. М. Шишло // Актуальные проблемы биохимии : сб. материалов науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 60-летию создания каф. биолог. химии ГрГМУ, Гродно, 31 мая 2019 г. / отв. ред. В. В. Лелевич. – Гродно, 2019. – С. 125–129. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

31-А. Prognosis of glucocorticoid response in patients with acute exacerbation of COPD using macrophage migration inhibitory factor / A. Kadushkin, A. Tahanovich, A. Arabey, L. Shishlo, A. Savchanka, L. Movchan // ERJ Open Research. – 2019. – Vol. 5, suppl. 2 [ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal, March 07–10, 2019 : abstr.]. – P. PP105.

32-А. Assessment of platelet to lymphocyte ratio and neutrophil to lymphocyte ratio as biomarkers of steroid resistance in patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich, A. Arabey, L. Shishlo, A. Savchanka, L. Movchan // ERJ Open Research. – 2019. – Vol. 5, suppl. 2 [ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal, March 07–10, 2019 : abstr.]. – P. PP216.

33-А. LSC – 2019 – Assessment of platelet to lymphocyte ratio and neutrophil to lymphocyte ratio as biomarkers of steroid resistance in patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich, A. Arabey, L. Shishlo, A. Savchanka, L. Movchan // Eur. Respir. J. – 2019. – Vol. 54, suppl. 63 [ERS International Congress, Madrid, Spain, September 28–October 02, 2019 : abstr.]. – P. OA1600.

34-А. Супрессия провоспалительных цитокинов с использованием азитромицина и теофиллина у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Э. И. Талабаева, А. В. Пластинина // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тез. докл. участников Респ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной, Минск, 29 мая 2020 г. / под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2020. – С. 66–67.

35-А. Comparison of the effectiveness of azithromycin and budesonide versus theophylline and budesonide in the suppression of pro-inflammatory cytokines in patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich, T. Kolesnikova, E. Hodosovskaya // Eur. Respir. J. – 2020. – Vol. 56, suppl. 64 [ERS International Congress, Virtual, September 07–09, 2020 : abstr.]. – P. 2704.



36-A. The effectiveness of N-acetylcysteine in the suppression of pro-inflammatory cytokines in patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich, T. Kolesnikova, E. Hodosovskaya, E. Talabayeva, A. Plastinina // Eur. Respir. J. – 2021. – Vol. 58, suppl. 65 [ERS International Congress, Virtual, September 05–08, 2021 : abstr.]. – P. PA685.

37-A. Theophylline and budesonide downregulate production of cytokines by blood T lymphocytes of patients with COPD / A. Kadushkin, A. Tahanovich, V. Dziadzichkina, L. Movchan, T. Shman // Eur. Respir. J. – 2021. – Vol. 58, suppl. 65 [ERS International Congress, Virtual, September 05–08, 2021 : abstr.]. – P. PA687.

38-A. Влияние нортриптилина на чувствительность клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких к глюкокортикоидам / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Э. И. Талабаева, А. В. Пластинина // XXXI Национальный конгресс по болезням органов дыхания, Москва, 26-29 октября 2021 г. : сб. тр. конгр. / под. ред. акад. А. Г. Чучалина. – М., 2021. – С. 88.

39-A. Кадушкин, А. Г. Медикаментозная коррекция стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [Электронный ресурс] / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович // Современные технологии в медицинском образовании : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Белорус. гос. мед. ун-та, Минск, 1-5 нояб. 2021 г. / под ред. С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск, 2021. – С. 274–276. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

40-A. Влияние N-ацетилцистеина на выработку провоспалительных медиаторов естественными киллерами крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [Электронный ресурс] / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Э. И. Талабаева, А. В. Пластинина, О. В. Левандовская // Современные проблемы медицинской биохимии : сб. материалов Междунар. науч. конф., посвящ. 85-летию со дня рождения проф. В. К. Кухты, Минск, 25 янв. 2022 г. / под ред. А. Д. Тагановича, Н. Н. Ковганко, В. В. Хрусталева. – Минск, 2022. – С. 106–111. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

41-A. Изменение хемотаксиса В-лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких под влиянием азитромицина / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Л. В. Мовчан, М. М. Зафранская, Т. В. Шман // Физико-химическая биология как основа современной медицины : материалы докл. участников Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 28 окт. 2022 г. / под ред. В. В. Хрусталёва, А. Д. Тагановича, Т. А. Хрусталёвой. – Минск, 2022. – С. 84–89.

42-A. Влияние нортриптилина на продукцию провоспалительных цитокинов НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ /

А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Э. И. Талабаева, А. В. Пластинина, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская // XXXII Национальный конгресс по болезням органов дыхания, Москва, 18–21 октября 2022 г. : сб. тр. конгр. / под. ред. акад. А. Г. Чучалина. – М., 2022. – С. 118.

### **Инструкции по применению**

43-А. Метод определения вероятности эффективности глюкокортикоидов у пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких : инструкция по применению № 135-1118 : утв. 30.11.2018 / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, А. А. Арабей, В. К. Панасюк, Г. К. Новская, А. П. Любецкая, Л. В. Алешкевич ; УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», УЗ «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница». – Минск, 2018. – 4 с.

44-А. Метод прогнозирования эффективности глюкокортикоидов у пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких : инструкция по применению № 022-0323 : утв. 15.05.2023 / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович, Е. И. Давидовская, Г. К. Новская, Л. В. Алешкевич ; УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», ГУЗ «Минский областной клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны имени П.М. Машерова». – Минск, 2023. – 6 с.

### **Патенты на изобретение**

45-А. Способ лабораторного определения возможности повышения чувствительности мононуклеарных клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких к глюкокортикоидам : Евраз. пат. 044546 / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович. – Опубл. 31.08.2023.

## РЭЗІЮМЭ

**Кадушкін Аляксей Генадзьевіч**

### **Малекулярныя механізмы, прагназаванне і абгрунтаванне шляхоў карэкцыі стэроідарэзістэнтнасці пры хранічнай абструктыўнай хваробе лёгкіх**

**Ключавыя словы:** хранічная абструктыўная хвароба лёгкіх (ХАХЛ), стэроідарэзістэнтнасць, глюкокортыкастэроіды (ГКС), нортрыптылін, азітраміцын, тэафілін, N-ацэтыл-L-цыстэін, альвеалярныя макрафагі, лімфацыты, цытакіны, хематаксіс

**Мэта даследавання:** устанавіць асаблівасці прадукцыі біялагічна актыўных бялкоў імунакампетэнтнымі клеткамі перыферычнай крыві і лёгкіх пацыентаў з ХАХЛ з тым, каб на аснове атрыманых даных распрацаваць крытэрыі прагназавання ўстойлівасці да глюкокортыкоіднай тэрапіі і прапанаваць спосабы павышэння адчувальнасці да прэпаратаў стэроідных гармонаў.

**Метады даследавання і выкарыстаная апаратура:** культуральныя, імунферментныя, цытаметрычныя, статыстычныя; праточны цытометр Navios (Beckman Coulter, ЗША), гематалагічны аналізатар Sysmex 5000i (Sysmex Corporation, Японія), спектрафатометр Stat Fax 3200 (Awareness Technology, ЗША).

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** упершыню распрацаваны і валідызаваны матэматычныя мадэлі прагназавання ўстойлівасці да глюкокортыкоіднай тэрапіі пры абвастрэнні ХАХЛ. Атрыманы новыя даныя аб здольнасці азітраміцыну і нортрыптыліну ў камбінацыі з будэсанідам інгібіраваць прадукцыю празапаленчых цытакінаў монануклеарнымі клеткамі крыві і зніжаць міграцыю лімфацытаў крыві пацыентаў з ХАХЛ. Новымі з'яўляюцца даныя аб здольнасці нортрыптыліну патэнцыраваць эфекты ГКС у лімфацытах крыві пацыентаў з ХАХЛ за кошт змены сінтэзу бялкоў, уцягнутых у развіццё стэроідарэзістэнтнасці.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** распрацаваныя метады прагназавання эфектыўнасці ГКС рэкамендуюцца да выкарыстання для фарміравання стратэгіі індывідуальнага лячэння пацыентаў з абвастрэннем ХАХЛ; раскрытая здольнасць нортрыптыліну патэнцыраваць супрацьзапаленчыя ўласцівасці ГКС абгрунтоўвае мэтазгоднасць правядзення клінічнага выпрабавання з ужываннем нортрыптыліну ў пацыентаў з ХАХЛ.

**Галіна прымянення:** пульманалогія, клетачная біялогія, лабараторная дыягностыка.

## РЕЗЮМЕ

**Кадушкин Алексей Геннадьевич**

### **Молекулярные механизмы, прогнозирование и обоснование путей коррекции стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких**

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), стероидорезистентность, глюкокортикостероиды (ГКС), нортриптилин, азитромицин, теофиллин, N-ацетил-L-цистеин, альвеолярные макрофаги, лимфоциты, цитокины, хемотаксис

**Цель исследования:** установить особенности продукции биологически активных белков иммунокомпетентными клетками периферической крови и легких пациентов с ХОБЛ с тем, чтобы на основе полученных данных разработать критерии прогнозирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии и предложить способы повышения чувствительности к препаратам стероидных гормонов.

**Методы исследования и использованная аппаратура:** культуральные, иммуноферментные, цитометрические, статистические; проточный цитометр Navios (Beckman Coulter, США), гематологический анализатор Sysmex 5000i (Sysmex Corporation, Япония), спектрофотометр Stat Fax 3200 (Awareness Technology, США).

**Полученные результаты и их новизна:** впервые разработаны и валидизированы математические модели прогнозирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии при обострении ХОБЛ. Получены новые данные о способности азитромицина и нортриптилина в комбинации с будесонидом ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками крови и снижать миграцию лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ. Новыми являются данные о способности нортриптилина потенцировать эффекты ГКС в лимфоцитах крови пациентов с ХОБЛ за счет изменения синтеза белков, вовлеченных в развитие стероидорезистентности.

**Рекомендации по использованию:** разработанные методы прогнозирования эффективности ГКС рекомендуются к использованию для формирования стратегии индивидуального лечения пациентов с обострением ХОБЛ; раскрытая способность нортриптилина потенцировать противовоспалительные свойства ГКС обосновывает целесообразность проведения клинического испытания с применением нортриптилина у пациентов с ХОБЛ.

**Область применения:** пульмонология, клеточная биология, лабораторная диагностика.

## SUMMARY

**Kadushkin Aliaksei Gennadevich**

### **Molecular mechanisms, prediction and justification of ways to correct steroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease**

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease (COPD), steroid resistance, glucocorticosteroids (GCs), nortriptyline, azithromycin, theophylline, N-acetyl-L-cysteine, alveolar macrophages, lymphocytes, cytokines, chemotaxis

**Aim of the study:** to establish the features of biologically active proteins production by immune cells of the peripheral blood and lungs from patients with COPD in order to develop criteria for predicting resistance to glucocorticoid therapy and propose approaches aimed at increasing sensitivity to steroid hormones.

**Research methods and equipment used:** cultural, immunoassay, cytometric, statistical; Navios flow cytometer (Beckman Coulter, USA), Sysmex 5000i hematology analyzer (Sysmex Corporation, Japan), Stat Fax 3200 spectrophotometer (Awareness Technology, USA).

**The results obtained and their novelty:** for the first time, a mathematical model for predicting resistance to glucocorticoid therapy in patients with acute exacerbation of COPD was developed and validated. New data have been obtained on the ability of azithromycin and nortriptyline in combination with budesonide to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells and to reduce the migration of blood lymphocytes in patients with COPD. New data on the ability of nortriptyline to potentiate the effects of GCs in the blood lymphocytes of patients with COPD by altering the synthesis of proteins involved in the steroid resistance have been shown.

**Recommendations for the use:** the methods developed for predicting GC effectiveness are recommended for the use in order to choose an individual treatment strategy for patients with exacerbation of COPD; the revealed ability of nortriptyline to potentiate the anti-inflammatory properties of GCs justifies the feasibility of conducting a clinical trial using nortriptyline in patients with COPD.

**Area of application:** pulmonology, cell biology, laboratory diagnostics.

Подписано в печать 19.12.23. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».  
Ризография. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,64. Тираж 60 экз. Заказ 685.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.