

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В МОНОЦИТАХ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Таганович А. Д.¹, Кадушкин А. Г.¹, Мовчан Л. В.^{1,2}, Шман Т. В.²

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», п. Боровляны, Республика Беларусь

Реферат. Изучена степень связывания глюкокортикоида дексаметазона со своим рецептором в цитоплазме моноцитов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (далее — ХОБЛ). Выделена группа пациентов с ХОБЛ, глюкокортикоидные рецепторы клеток которых связываются со своим лигандом с низким сродством. Показано, что для пациентов с ХОБЛ, у которых наблюдается высокая степень связывания глюкокортикоидного гормона со своим рецептором, по сравнению с пациентами с низкой степенью связывания характерно повышение в крови относительного количества Т-хелперов ($p = 0,006$). Выявлена положительная корреляционная связь умеренной силы процентного содержания Т-хелперов и интенсивности флюоресценции дексаметазона, конъюгированного с флюоресцеинизотиоцианатом, в моноцитах крови ($R = 0,615$, $p = 0,007$). Существенные различия относительного количества Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток, НКТ-клеток, регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с различной степенью связывания глюкокортикоидного гормона с рецептором отсутствуют. У пациентов, страдающих ХОБЛ, с высокой степенью взаимодействия между глюкокортикоидным рецептором и его лигандом выше абсолютное ($p = 0,020$) и относительное ($p = 0,028$) количество эозинофилов периферической крови, чем у пациентов с низкой степенью связывания гормона и рецептора.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, моноциты, глюкокортикоиды, рецепторы, стероидорезистентность.

Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности в мире. Считается, что в течение жизни 27,6 % людей подвержены риску развития ХОБЛ [1]. Это заболевание наносит существенный экономический и социальный ущерб обществу. Во всем мире насчитывается более 600 млн пациентов с ХОБЛ, причем ежегодно от этого заболевания умирает около 3 млн человек [2].

Лечение ХОБЛ существенно затруднено. Ни один из препаратов, применяемых для лечения этого заболевания, в долговременной перспективе не позволяет предупредить прогрессирующее снижение функции легких. В настоящее время для терапии ХОБЛ широко применяются ингаляционные глюкокортикостероиды (далее — ИГКС), поскольку они способны оказывать противовоспалительное действие [3]. Однако их эффективность при ХОБЛ значительно ограничена [4]. Так, ИГКС не влияют на прогрессиру-

вание заболевания и смертность, лишь в малой степени улучшают качество жизни пациентов [5]. Имеются данные о снижении количества обострений ХОБЛ при применении ИГКС, которые оспариваются другими исследователями [5]. ИГКС не влияют на количество нейтрофилов, макрофагов, Т-лимфоцитов и эозинофилов, а также на уровень провоспалительных цитокинов, ферментов и активных форм кислорода в мокроте и дыхательных путях пациентов с ХОБЛ [3]. В исследованиях *in vitro* ИГКС также были не способны ингибировать секрецию цитокинов альвеолярными макрофагами [6].

В настоящее время сформировалось две точки зрения относительно резистентности к глюкокортикостероидам (далее — ГКС) у пациентов с ХОБЛ. Одна из них предусматривает то, что все пациенты с ХОБЛ имеют сниженный ответ на ГКС и, следовательно, всем пациентам необходимо корректировать лечение [4]. Другое мнение основано на том, что только некоторые пациенты с ХОБЛ имеют патологический ответ на ГКС и соответственно только они нуждаются в изменении режима применяемой терапии [6].

Сейчас уже совершенно очевидно, что ключ к пониманию механизмов формирования стероидорезистентности при ХОБЛ находится в раскрытии закономерностей функционирования глюкокортикоидного рецептора и путей передачи гормонального сигнала.

Цель исследования — оценка степени связывания глюкокортикоидного гормона со своим рецептором в моноцитах и определение сопутствующих изменений со стороны эозинофилов и субпопуляций лимфоцитов в крови пациентов, страдающих ХОБЛ.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 25 пациентов с ХОБЛ (23 мужчины и 2 женщины). Все пациенты имели индекс курения более 10 пачек/лет. Критериями исключения являлись острые инфекционные заболевания, туберкулез, заболевания соединительной ткани с изменениями функции дыхательной системы, острый коронарный синдром, онкологические заболевания, бронхоэктатическая болезнь, нарушения свертывающей системы крови, неспособность правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

Диагностика ХОБЛ, включая оценку ее степени тяжести, осуществлялась в соответствии с классификацией GOLD и основывалась на результатах клинического обследования и данных спирометрии. Преобладали пациенты со среднетяжелой и тяжелой степенью ХОБЛ. Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Венозную кровь у обследуемых пациентов забирали рано утром натощак в объеме 3–5 мл в пробирку, содержащую этилендиаминтетраацетат калия в качестве антикоагулянта. В пробирки для точной цитометрии помещали 100 мкл крови и дексаметазон, меченый флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) («Life Technologies», США), в концентрации 2×10^{-8} М. В контрольную пробирку предварительно на 10 мин добавляли несвязанный дексаметазон («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10^{-5} М, а затем дексаметазон, конъюгированный с FITC, в концентрации 2×10^{-8} М. Пробы инкубировали в течение 60 мин в темноте при 37 °С, тщательно перемешивая каждые 10 мин. Добавляли 3 мл фосфатно-солевого буфера («Becton Dickinson», Сан-Хосе, США). Клетки осаждали центрифугированием (1200 об./мин, 6 мин), надосадочную жидкость сливали, а осадок встряхивали. Процедуру отмывки повторяли. После этого к суспензии клеток добавляли 20 мкл моноклональных антител CD14, конъюгированных с фикоэритрином (PE) («Exbio», Чехия), инкубировали в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Эритроциты лизировали безотмывочным способом путем добавления 1 мл Versalysе («Beckton Coulter», Франция).

Для фенотипирования рецепторов лимфоцитов в пробирки помещали 100 мкл крови и соответствующее инструкции производителя количество моноклональных антител. Использовались две панели антител («Exbio», Чехия; «Beckman Coulter», Франция): 1) CD25-PE/ CD45-ECD/ CD4-PC5.5/ CD127-PC7 (мышинные моноклональные антитела к антигену человека CD25, конъюгированные с фикоэритрином; мышинные моноклональные антитела к общему лейкоцитарному антигену человека CD45, меченые флюорохромом ECD; мышинные моноклональные антитела к антигену человека CD4, меченые флюорохромом PC5.5; мышинные моноклональные антитела к антигену человека CD127, меченые флюорохромом PC7); 2) CD19-PE/ CD3-PE-DyLight 594/ CD8-PC5/ CD56-PC7/ CD45-APC-Alexa Fluor 750 (мышинные моноклональные антитела к В-линейному антигену человека CD19, конъюгированные с PE; мышинные моноклональные антитела к Т-линейному антигену человека CD3, меченые флюорохромом PE-DyLight 594; мышинные моноклональные антитела к антигену человека CD8, конъюгированные с флюорохромом PC5; мышинные моноклональные антитела к антигену человека CD56, меченые флюорохромом PC7; мышинные моноклональные антитела к антигену человека CD45, конъюгированные с APC-Alexa Fluor 750). Образцы тщательно перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. После инкубации эритроциты лизировали.

Анализ популяций лимфоцитов и моноцитов проводили на проточном цитометре Navios («Beckman Coulter», США). Для определения относительного количества субпопуляций клеток использовали программное обеспечение Kaluza («Beckman Coulter», США). Для каждой пробы учитывали не менее 50000 клеток.

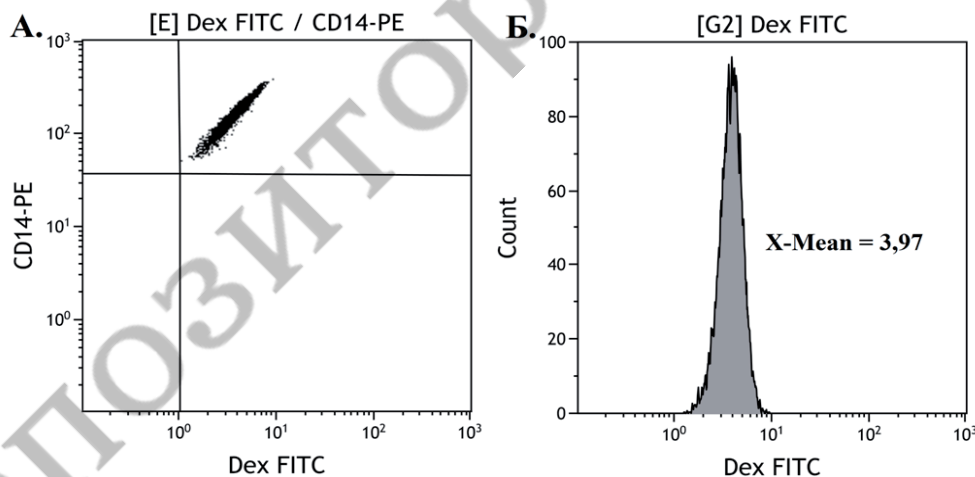
Опираясь на общий лейкоцитарный антиген CD45, выделяли регион лимфоцитов. В пределах этого региона рассчитывали процент CD3+ (Т-лимфоцитов), CD3+CD4+ (Т-хелперов), CD3+CD8+ (цитотоксических Т-лимфоцитов), CD19+ (В-лимфоцитов), CD3-CD56+ (натуральных киллеров, NK-клеток), CD3+CD56+ (NKT-клеток), CD4+CD25+CD127- (регуляторных Т-лимфоцитов) клеток в популяции лимфоцитов крови.

Результаты исследования обработаны непараметрическими методами вариационной статистики с использованием программы Statistica 10.0.

Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критериям Колмогорова–Смирнова, Шапиро–Уилка, а также путем построения гистограмм распределения. Поскольку количественные значения показателей не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики. Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25–75 %). Для оценки различий между независимыми группами применяли U-критерий Манна–Уитни. О взаимосвязи между показателями судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали равным 5 %.

Результаты и их обсуждение. Полагают, что одной из причин стероидорезистентности при ХОБЛ может являться сниженная способность глюкокортикоидных рецепторов, расположенных в цитоплазме клеток, связываться со своими лигандами. Как следствие, наблюдается неадекватно слабый ответ клеток на стероиды, что выражается в низкой способности ГКС подавлять секрецию провоспалительных цитокинов. Мы определили способность моноцитов периферической крови пациентов, страдающих ХОБЛ, связывать глюкокортикоид дексаметазон.

При анализе результатов исследования установлено, что все моноциты (100 % популяции) периферической крови могут связывать дексаметазон. Однако степень связывания ГКС, на что указывает интенсивность флуоресценции (X-mean) FITC-меченого дексаметазона, существенно варьирует среди пациентов с ХОБЛ (от 3,26 до 5,14) (рисунок 1).



а — выделение региона моноцитов, связывающих дексаметазон; б — интенсивность флуоресценции флуоресцеинизотиоцианата (FITC), связанного с дексаметазоном

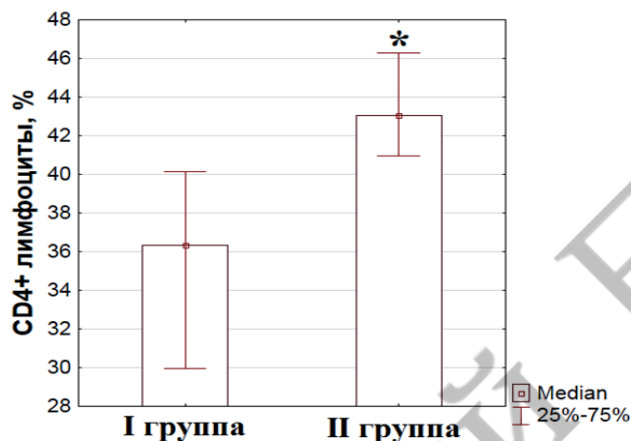
Рисунок 1. — Анализ степени связывания дексаметазона моноцитами

В ходе настоящего исследования нами была предпринята попытка выявить сопутствующие изменения со стороны лимфоцитарного звена у пациентов с низкой (интенсивность флуоресценции — менее 4,00, I группа) и высокой (интенсивность флуоресценции — более 4,00, II группа) степенью связывания дексаметазона моноцитами. Для этого мы одновременно проанализировали изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у таких пациентов.

Результаты измерения относительного количества Т- и В-лимфоцитов в крови демонстрируют отсутствие значимых различий между пациентами с ХОБЛ с низкой и высокой степенью связывания

дексаметазона [Т-лимфоциты: 71,8 (57,6–78,7) и 74,3 (69,2–78,2) %; В-лимфоциты: 11,1 (4,2–15,2) и 9,3 (7,8–16,2) % соответственно].

У пациентов с ХОБЛ с высокой степенью связывания клетками дексаметазона отмечалось увеличение доли носителей Т-клеточного рецепторного комплекса и корецептора CD4 (Т-хелперов) в общей популяции лимфоцитов периферической крови по сравнению с пациентами, клетки которых имели низкую степень связывания (рисунок 2). Более того, обнаруживалась положительная корреляционная связь умеренной силы процентного содержания Т-хелперов и интенсивности флюоресценции FITC-меченого дексаметазона в моноцитах крови ($R = 0,615$, $p = 0,007$) (рисунок 3). В литературе отсутствуют сведения о влиянии Т-хелперов на связывание глюкокортикоидного гормона со своим лигандом в моноцитах. Можно лишь высказать предположение о том, что секретируемые Т-хелперами цитокины оказывают влияние на степень экспрессии глюкокортикоидных рецепторов и их функциональную способность взаимодействовать со своим лигандом.



* — $p = 0,006$ по сравнению с пациентами, моноциты которых имели низкую интенсивность флюоресценции FITC-меченого дексаметазона

Рисунок 2. — Относительное количество Т-хелперов периферической крови у пациентов с низкой (I группа) и высокой (II группа) степенью связывания дексаметазона клетками



Рисунок 3. — Корреляционная связь между относительным количеством CD4+ лимфоцитов и средней интенсивностью флюоресценции дексаметазона, конъюгированного с флюоресцеинизотиоцианатом (FITC)

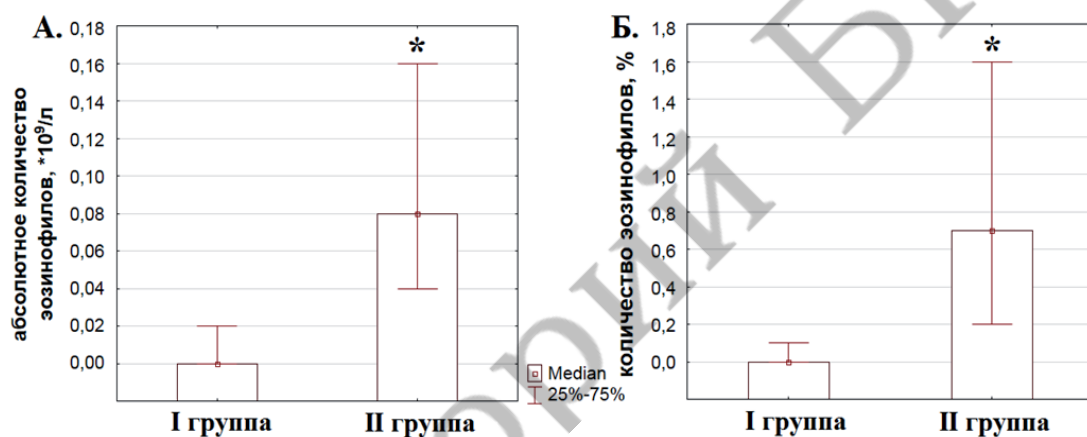
Относительное количество CD8-позитивных Т-лимфоцитов (в популяции Т-лимфоцитов) у пациентов с различной степенью связывания глюкокортикоидного гормона со своим рецептором не различалось [38,9 (30,7–52,1) % у пациентов с низким сродством лиганда к рецептору и 36,4 (30,8–38,0) % у пациентов с высоким сродством].

Не было обнаружено различий доли NK-клеток (CD3-CD56+) и NKT-клеток (CD3+CD56+) у пациентов с различной интенсивностью флюоресценции FITC-меченого дексаметазона, хотя и наблюда-

лась тенденция к снижению процентного содержания этих клеток у пациентов с высокой степенью связывания дексаметазона [14,7 (9,1–21,5) % для НК-клеток и 2,9 (2,4–5,6) % для НКТ-клеток] по сравнению с пациентами с низкой степенью взаимодействия глюкокортикоидного гормона и рецептора [19,1 (8,9–29,5) % для НК-клеток и 5,2 (3,4–5,8) % для НКТ-клеток].

Результаты нашего исследования также показали, что статистически достоверные изменения относительного количества регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с низкой [7,1 (5,2–9,6) %] и высокой [6,0 (5,1–7,6) %] степенью связывания ГКС и рецептора отсутствуют.

Сообщается о том, что лечение пациентов с ХОБЛ, имеющих относительное количество эозинофилов периферической крови более 2%, было более эффективным, чем терапия пациентов с количеством эозинофилов ≤ 2 % [7]. В нашем исследовании мы наблюдали повышение как абсолютного ($p = 0,020$), так и относительного ($p = 0,028$) количества эозинофилов периферической крови у пациентов с высокой степенью связывания дексаметазона, чем у пациентов с низкой степенью связывания (рисунок 4). Кроме того, имела место положительная корреляционная связь количества эозинофилов периферической крови со степенью связывания дексаметазона моноцитами ($R = 0,804$, $p = 0,001$ — для абсолютного количества эозинофилов; $R = 0,808$, $p < 0,001$ — для относительного количества эозинофилов). Это означает, что увеличение количества эозинофилов сопровождается усилением связи гормона с глюкокортикоидным рецептором. Патогенетическую и клиническую значимость подобной находки предстоит осмыслить в будущем.



* — $p < 0,05$ по сравнению с пациентами, моноциты которых имели низкую интенсивность флюоресценции FITC-меченого дексаметазона

Рисунок 4. — А. Абсолютное и Б. относительное количество эозинофилов в периферической крови пациентов с ХОБЛ с низкой (I группа) и высокой (II группа) степенью связывания дексаметазона клетками

Заключение. Совокупность данных, изложенных в настоящей работе, позволяет сделать следующее заключение:

1. Для пациентов с ХОБЛ, у которых наблюдается высокая степень связывания глюкокортикоидного гормона со своим рецептором, по сравнению с пациентами с низкой степенью связывания характерно повышение в крови количества Т-хелперов. Выявлена положительная корреляционная связь умеренной силы процентного содержания Т-хелперов и интенсивности флюоресценции дексаметазона, конъюгированного с флюоресцеинизотиоцианатом, в моноцитах крови ($R = 0,615$, $p = 0,007$).

2. Существенные различия относительного количества Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток, НКТ-клеток, регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с различной степенью связывания глюкокортикоидного гормона с рецептором отсутствуют.

3. У пациентов, страдающих ХОБЛ, с высокой степенью взаимодействия между глюкокортикоидным рецептором и его лигандом выше абсолютное и относительное количество эозинофилов периферической крови, чем у пациентов с низкой степенью связывания гормона и рецептора.

Литература

1. Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study / A. S. Gershon [et al.] // *Lancet*. — 2011. — Vol. 378, № 9795. — P. 991–996.
2. Sin, D. D. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease / D. D. Sin, J. Vestbo // *Proc. Am. Thorac. Soc.* — 2009. — Vol. 6, № 6. — P. 543–545.

3. Long-term effects of budesonide on inflammatory status in COPD / M. Boorsma [et al.] // COPD. — 2008. — Vol. 5, № 2. — P. 97–104.
4. Barnes, P. J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease / P. J. Barnes // J. Allergy Clin. Immunol. — 2013. — Vol. 131, № 3. — P. 636–645.
5. Babu, K. S. Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a pro-con perspective / K. S. Babu, J. A. Kastelik, J. B. Morjaria // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2014. — Vol. 78, № 2. — P. 282–300.
6. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis / A. Higham [et al.] // Respir. Res. — 2015. — Vol. 16, № 1. — P. 98.
7. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized placebo-controlled trial / M. Bafadhel [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2012. — Vol. 186, № 1. — P. 48–55.

FEATURES OF INTERACTION BETWEEN GLUCOCORTICOIDS AND THEIR RECEPTORS IN BLOOD MONOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Taganovich A. D.¹, Kadushkin A. H.¹, Movchan L. V.^{1, 2}, Shman T. V.²

¹Educational Establishment “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

*²State Institution “Republican Scientific and Practical Center of Oncology, Hematology and Immunology”,
Borovlyani, Republic of Belarus*

The degree of binding of glucocorticoid dexamethasone to its receptor in the cytoplasm of monocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was studied. A group of patients with COPD, whose glucocorticoid receptors bind to their ligands with low affinity, was determined. It was shown that the percentage of T-helpers is higher in patients with COPD, who have high degree of binding of glucocorticoid hormone to the receptor, than in patients with low degree of binding ($p = 0.006$). A positive correlation between percentage of T-helpers and fluorescence intensity of dexamethasone conjugated with fluorescein isothiocyanate in blood monocytes was found ($R = 0.615$, $p = 0.007$). There were no significant differences in the percentage of T-lymphocytes, cytotoxic T-lymphocytes, NK cells, NKT cells, regulatory T-lymphocytes in patients with different degrees of binding of glucocorticoid hormone to the receptor. In patients with COPD with high degree of interaction between the glucocorticoid receptor and its ligand the absolute ($p = 0.020$) and relative ($p = 0.028$) numbers of peripheral blood eosinophils are higher than those in patients with low level of binding of the hormone to its receptor.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease (COPD), monocytes, glucocorticoids, receptors, steroid resistance.