

Э. Ю. Арзуманян

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОТВЕТА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ НА ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Научный руководитель канд. мед. наук, доц. А. Г. Кадушкин

Кафедра биологической химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

E. Y. Arzumanyan

VARIABILITY OF THE ALVEOLAR MACROPHAGE RESPONSE TO GLUCOCORTICOSTEROIDS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Tutor associate professor A. G. Kadushkin

Department of the Biological Chemistry,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Воздействие глюкокортикостероидов на альвеолярные макрофаги вызывает снижение секреции провоспалительных цитокинов, однако ответ клеток значительно варьирует, в особенности при концентрации дексаметазона 10 нМ. Фактор некроза опухоли-альфа и интерлейкин-6 более чувствительны к воздействию дексаметазона, чем интерлейкин-8.

Ключевые слова: ХОБЛ, альвеолярные макрофаги, глюкокортикостероиды, стероидорезистентность, цитокины.

Resume. Corticosteroid effect on the alveolar macrophages decreases the proinflammatory cytokine secretion, but the cellular response varies considerably, especially at dexamethasone concentration of 10 nM. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 appear to be more sensitive to the effects of dexamethasone than interleukin-8.

Keywords: COPD, alveolar macrophages, glucocorticosteroids, steroid resistance, cytokines.

Актуальность. Для хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) характерен хронический воспалительный процесс, который продолжается даже после прекращения воздействия этиологического фактора. В настоящее время отсутствует разработанная схема противовоспалительной терапии ХОБЛ, которая могла бы изменить ход воспалительной реакции и предотвратить неуклонное снижение дыхательной функции легких.

Цель: установить чувствительность альвеолярных макрофагов пациентов с ХОБЛ к действию глюкокортикостероидов (ГКС).

Задачи:

1. Установить чувствительность цитокинов (интерлейкина-6, интерлейкина-8, фактора некроза опухоли- α), продуцируемых альвеолярными макрофагами пациентов с ХОБЛ, к ингибирующему действию ГКС.

2. Выяснить вариабельность ответа альвеолярных макрофагов пациентов с ХОБЛ на различные концентрации дексаметазона (0,01-1000 нМ).

3. Определить диагностическую ценность параметров общего анализа крови для прогнозирования чувствительности клеток пациентов с ХОБЛ к ГКС.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 24 пациента с ХОБЛ. Участникам эксперимента проводилась бронхоскопия по стандартной методике [1]. После местной анестезии с использованием лидокаина гибкий волоконно-

оптический бронхоскоп вводился трансназально и подводился к устьям субсегментарных бронхов средней доли правого легкого, куда инстиллировался предварительно подогретый до 37 °С стерильный 0,9%-ный раствор NaCl, который затем аспирировался. Бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ), собранная в стерильные пластиковые контейнеры, помещалась на лед и в течение 1 ч транспортировалась в лабораторию.

Слизь удалялась путем фильтрации (диаметр пор фильтра – 100 мкм). БАЛЖ дважды отмывалась путем добавления 0,9%-го раствора NaCl (условия центрифугирования – 400g в течение 10 мин при 4 °С), а осадок клеток ресуспендировался в среде RPMI-1640, обогащенной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамина, 100 ЕД / мл пенициллина и 100 мкг / мл стрептомицина. Подсчитывались альвеолярные макрофаги (АМ) и оценивалась их жизнеспособность. В лунки 96-луночного планшета (100 тыс. живых клеток в 1 лунку) помещались АМ с последующим выделением путем адгезии к пластику в течение 2 ч при 37 °С 5% CO₂. Прилипшие макрофаги отмывались обогащенной средой RPMI-1640 (предварительно подогретой до 37 °С), удалялись неадгезированные клетки. К АМ добавлялся дексаметазон в концентрации 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 и 1 000 нМ либо контроль (0,005%-ный диметилсульфоксид) на 1 ч. После этого к клеткам в концентрации 1 мкг / мл вносился липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* В6-026 на 24 ч. Финальный объем культивируемой среды с клетками составлял 200 мкл. По истечении 1 суток супернатанты собирались и хранились при температуре –20 °С. Методом иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя (Вектор Бест, РФ) в них определялась концентрация интерлейкина-6 (IL-6), IL-8, фактора некроза опухоли-α (TNF-α).

Формула крови и концентрация лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и тромбоцитов подсчитывалась с помощью автоматического гематологического анализатора Sysmex 5000i.

При расчете процента ингибирования за 100%-ную супрессию принималось полное подавление секреции цитокина, стимулированной ЛПС. Ингибирующая концентрация дексаметазона, которая потребовалась для 50%-го ингибирования продукции цитокина (ИК50), рассчитывалась путем построения сигмоидных кривых «концентрация/эффект», состоящих из средних значений групповых данных.

Результаты и их обсуждение. Инкубация АМ, стимулированных ЛПС, с дексаметазоном сопровождалась снижением секреции IL-6, IL-8 и TNF-α этими клетками (рис. 1), которое прослеживается при всех из исследованных концентраций дексаметазона, но в наибольшей степени – когда она составляла 100 нМ (таблица 1).

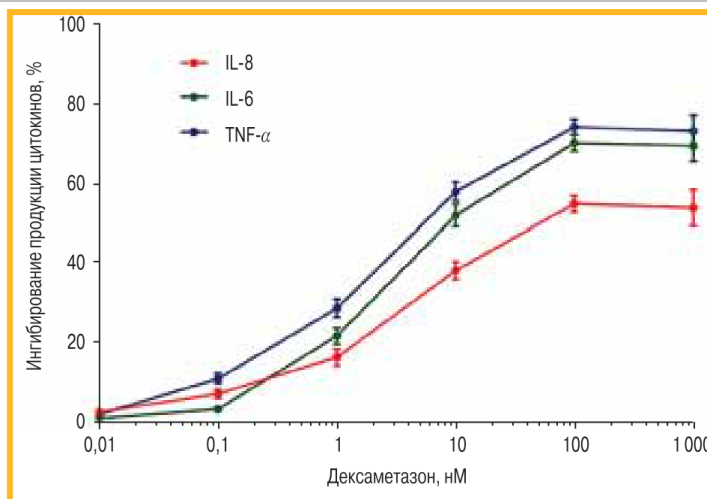


Рис. 1- Влияние дексаметазона на подавление секреции цитокинов, стимулированной липополисахаридом

IL-8 был менее чувствителен к ингибированию дексаметазоном, чем IL-6 и TNF-α, поскольку для подавления его продукции требовалась большая концентрация дексаметазона (табл. 1). Более того, максимальное значение ингибирования продукции IL-8, которое достигалось при концентрации дексаметазона 100 нМ, было существенно ниже по сравнению с таковым для IL-6 и TNF-α.

Табл.1. Максимальное значение ингибирования и эффективная концентрация дексаметазона, ингибирующая секрецию цитокинов альвеолярными макрофагами на 50 % (ИК50)

цитокин	TNF-α	IL-6	IL-8
ИК50, нМ	1,9	2,8	3,5
Максимальное ингибирование, %	74,5 (13,0)*	70,5 (14,3)*	55,2 (13,7)

По результатам анализа индивидуальных кривых «концентрация / ответ» показана значительная гетерогенность ответа АМ на ГКС среди пациентов с ХОБЛ. Наибольшая вариабельность ответа клеток проявлялась при концентрации дексаметазона 10 нМ. В этом случае размах вариации (разность между максимальным и минимальным значениями) для IL-8 составил 54,1 %, IL-6 – 76,0 %, TNF-α – 70,0 %. Вместе с тем в АМ у 4 (8,9 %) из 45 пациентов с ХОБЛ дексаметазон в самой действенной концентрации (100 нМ) не способен ингибировать на ≥ 50 % продукцию TNF-α (рис. 2).

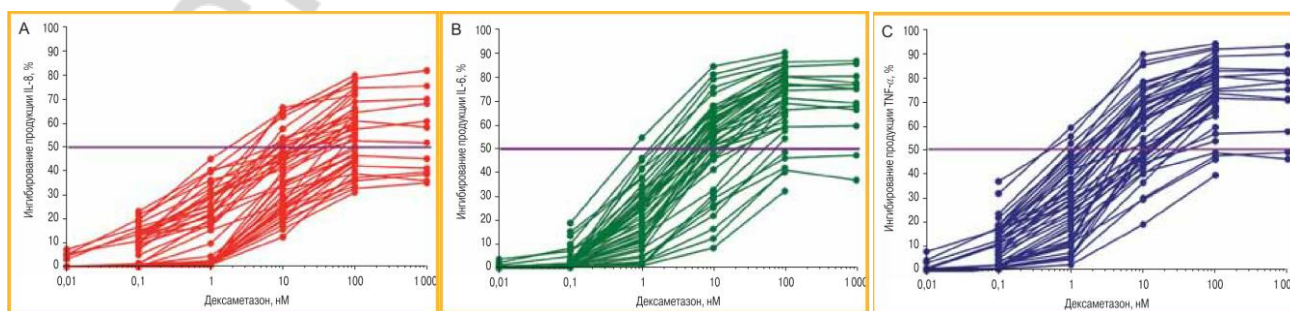


Рис. 2 – Индивидуальные кривые «концентрация дексаметазона/эффект»

Супрессии индуцированной продукции IL-6 на $\geq 50\%$ под влиянием дексаметазона не достигли клетки у 5 (11,1%), а в случае IL-8 – у 18 (40%) из 45 пациентов. Все пациенты с ХОБЛ на основании способности дексаметазона подавлять стимулированную секрецию IL-8 в АМ на 50% были условно разделены на ГКС-чувствительных и ГКС-резистентных.

В группе ГКС-чувствительных медиана относительного количества эозинофилов и лимфоцитов крови была существенно выше, а показатели относительного количества нейтрофилов, абсолютного количества тромбоцитов, отношения абсолютного количества нейтрофилов к лимфоцитам и тромбоцитов к лимфоцитам ниже, чем в группе ГКС-резистентных.

Результаты проведенного исследования показали, что АМ пациентов с ХОБЛ имеют различную чувствительность к ГКС. Наиболее вариабельные результаты подавления секреции цитокинов были получены при использовании концентрации дексаметазона 10 нМ. Как известно, такая концентрация ГКС наблюдается в периферических участках легочной ткани после ингаляции кортикостероидных препаратов [2]. Значительная вариабельность ответа клеток легких, наблюдаемая *in vitro*, может служить иллюстрацией и объяснением гетерогенности клинического ответа на иГКС у разных пациентов с ХОБЛ [3,4].

Построение индивидуальных графических кривых зависимости ингибирования стимулированной секреции провоспалительных цитокинов от концентрации дексаметазона позволило выделить группу пациентов со сниженной чувствительностью к ГКС. Такие больные ни при одной из используемых концентраций дексаметазона не достигали пятидесятипроцентного ингибирования секреции цитокинов (в случае IL-8 их было 40%, IL-6 – 11,1%, TNF- α – 8,9%). Одновременно встречались пациенты, клетки которых подавляли секрецию цитокинов более, чем на 80%. Следует отметить, что попытки использования АМ, культивируемых с ГКС, для выявления пациентов с ХОБЛ со сниженным ответом клеток на эти препараты, предпринимались ранее [6]. Так, в исследовании M.J. Ratcliffe et al. к стероидорезистентным пациентам с ХОБЛ были отнесены те, кто не достигал 30-процентного порога в ингибировании секреции TNF- α альвеолярными макрофагами, индуцированной ЛПС [6].

В ходе проведенного исследования также выявлено, что цитокины имеют различную ГКС-чувствительность. TNF- α и IL-6 оказались более чувствительными к супрессии ГКС, чем IL-8. Как известно, IL-8 является главным хемоаттрактантом нейтрофилов, которые, оказавшись в легких, продуцируют ферменты и активные формы кислорода. Последние способны повреждать внеклеточный матрикс легочной ткани. Поэтому увеличение уровня IL-8 в крови и легочной ткани и сниженный ответ клеток на продукцию этого цитокина под влиянием ГКС могут способствовать прогрессированию ХОБЛ.

В последние годы проведены исследования, результатом которых стало обнаружение тесной взаимосвязи количества эозинофилов крови с терапевтическим ответом на ГКС у пациентов с ХОБЛ [5-7]. При сопоставлении результатов чувствительности АМ к дексаметазону при ХОБЛ с результатами определения формулы крови у таких пациентов показано, что относительное количество эозинофилов крови было выше у ГКС-чувствительных, чем у ГКС-резистентных, что согласуется с результатами исследований, проведенных в других лабораториях [6,7].

Выводы:

1 Для пациентов с ХОБЛ характерен гетерогенный характер ответа АМ на ГКС *in vitro*, наиболее выраженный при концентрации дексаметазона 10 нМ.

2 Эффективная концентрация дексаметазона (ИК50) выше по отношению к продукции ИЛ-8, чем по отношению к синтезу ИЛ-6 и TNF- α АМ пациентов с ХОБЛ, что свидетельствует о большей ГКС-резистентности ИЛ-8.

3 У ГКС-чувствительных пациентов с ХОБЛ относительное количество эозинофилов и лимфоцитов выше, а относительное количество нейтрофилов, абсолютное количество тромбоцитов, отношения абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам и тромбоцитов к лимфоцитам ниже, чем у ГКС-резистентных.

Литература

1. Baughman R.P. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure / Baughman R.P. // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* – 2007. - №28 (5). – p. 475–485.

2. Esmailpour N. Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum *in vivo* / Esmailpour N., Högger P., Rabe K.F. et al. // *Eur. Respir. J.* – 1997. - №10 (7). – p. 1496–1499.

3. Calverley P.M.A. Eosinophilia, frequent exacerbations, and steroid response in chronic obstructive pulmonary disease / Calverley P.M.A., Tetzlaff K., Vogelmeier C. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2017. - №196 (9). – p. 1219–1221.

4. Siddiqui S.H. Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease / Siddiqui S.H., Guasconi A., Vestbo J. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2015. - №192 (4). – p. 523–525.

5. Barnes N.C. Blood eosinophils as a marker of response to inhaled corticosteroids in COPD / Barnes N.C., Sharma R., Lettis S. et al. // *Eur. Respir. J.* – 2016. - №47 (5). – p. 1374–1382.

6. Ratcliffe M.J. Comparison of the anti-inflammatory effects of cilomilast, budesonide and a p38 mitogen activated protein kinase inhibitor in COPD lung tissue macrophages / Ratcliffe M.J., Dougall I.G. // *BMC Pharmacol. Toxicol.* – 2012. - №13. – p. 15.

7. Siddiqui S.H. Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease / Siddiqui S.H., Guasconi A., Vestbo J. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2015. - №192 (4). – p. 523–525.