

Чувствительность к глюкокортикостероидам и гетерогенность ответа клеток *in vitro* у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

А.Г.Кадушкин¹, А.Д.Таганович¹, А.А.Арабей¹, Л.М.Шишло², А.П.Любецкая³, Л.В.Алешкевич³

1 – Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»: 220116, Республика Беларусь, Минск, пр. Дзержинского, 83;

2 – Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н.Александрова»: 223040, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, агрогородок Лесной;

3 – Учреждение здравоохранения «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница»: 223041, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, агрогородок Лесной

Информация об авторах

Кадушкин Алексей Геннадьевич – к. м. н., доцент кафедры биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»; тел.: (37517) 207-93-92; e-mail: kadushkyn@gmail.com

Таганович Анатолий Дмитриевич – д. м. н., заведующий кафедрой биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»; тел.: (37517) 277-17-64; e-mail: taganovich@bsmu.by

Арабей Анастасия Анатольевна – научный сотрудник научной группы «Стероиды» научно-исследовательской части Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»; тел.: (37517) 272-98-94; e-mail: belsoloby@gmail.com

Шишло Людмила Михайловна – к. б. н., ведущий научный сотрудник диагностического отдела с группой лучевой диагностики Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н.Александрова»; тел.: (37517) 389-95-14; e-mail: luda_jess@mail.ru

Любецкая Анна Петровна – врач-эндоскопист Учреждения здравоохранения «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница»; тел.: (37517) 265-22-74; e-mail: dr.pit78@list.ru

Алешкевич Лариса Васильевна – заведующая отделением аллергологии и пульмонологии Учреждения здравоохранения «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница»; тел.: (37517) 265-21-72; e-mail: drlora@list.ru

Резюме

Ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС) широко используются для лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), однако их эффективность значительно различается. Целью настоящего исследования явилось определение подходов к выявлению пациентов с ХОБЛ, чувствительных и нечувствительных к ГКС, при использовании клеток легких и крови. **Материалы и методы.** В исследовании цитокин-секретирующей функции альвеолярных макрофагов (АМ) под влиянием ГКС приняли участие пациенты ($n = 45$), которым выполнялась бронхоскопия. АМ, выделенные из бронхоальвеолярной лаважной жидкости, культивировались с липополисахаридом и различными концентрациями дексаметазона (0,01–1 000 нМ). По истечении 1 суток собирались супернатанты, в них определялась концентрация интерлейкина (IL)-6, IL-8 и фактора некроза опухоли- α (TNF- α). Для изучения особенностей взаимодействия ГКС и их рецепторов обследованы пациенты с ХОБЛ ($n = 24$), здоровые курильщики ($n = 20$) и здоровые некурящие ($n = 20$). Клетки крови культивировались с дексаметазоном, меченным флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) и моноклональными антителами к поверхностным антигенам популяций лимфоцитов и моноцитов. Анализ интенсивности флюоресценции FITC-меченного дексаметазона в клетках крови проводился с использованием проточной цитометрии. **Результаты.** При использовании дексаметазона дозозависимо снижалась секреция IL-6, IL-8 и TNF- α . Максимальное значение ингибирования продукции цитокинов АМ наблюдалось при концентрации дексаметазона 100 нМ, а наибольшая степень вариабельности ответа клеток – при 10 нМ. IL-8 был менее чувствителен к иГКС, чем IL-6 и TNF- α . При любой из используемых концентраций дексаметазон не ингибировал более чем на 50 % индуцированную продукцию IL-8 в АМ у 40 % пациентов с ХОБЛ, IL-6 – у 11,1 %, TNF- α – у 8,9 %. У курящих пациентов с ХОБЛ интенсивность флюоресценции FITC-меченного дексаметазона в популяциях лимфоцитов и моноцитах крови оказалась ниже, чем у курящих и некурящих здоровых. Связывание дексаметазона со своими рецепторами в клетках крови было выше у некурящих здоровых, чем у здоровых курильщиков. **Заключение.** ХОБЛ характеризуется существенной межиндивидуальной вариабельностью *in vitro* ответа АМ на ГКС. Ограниченное ингибирование синтеза IL-8 ГКС может способствовать поддержанию нейтрофильного типа воспаления при ХОБЛ. Для пациентов с ХОБЛ характерно снижение способности ГКС-рецепторов связываться со своими лигандами в лимфоцитах и моноцитах крови.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, альвеолярные макрофаги, глюкокортикостероиды, резистентность к глюкокортикостероидам, бронхоальвеолярная лаважная жидкость, цитокины, интерлейкин-8.

Для цитирования: Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Арабей А.А., Шишло Л.М., Любецкая А.П., Алешкевич Л.В. Чувствительность к глюкокортикостероидам и гетерогенность ответа клеток *in vitro* у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология*. 2018; 28 (5): 558–566. DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-5-558-566

Sensitivity to glucocorticosteroids and heterogeneity of *in vitro* cell response in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Aleksey G. Kadushkin¹, Anatoliy D. Taganovich¹, Anastasia A. Arabey¹, Liudmila M. Shishlo², Anna P. Lyubetskaya³, Larisa V. Aleshkevich³

1 – Educational Institution Belarusian State Medical University: pr. Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220116, Belarus;

2 – State Institution N.N.Aleksandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology: agrogorodok Lesnoy, Minskiy rayon, Minskaya obl., 223040, Belarus;

3 – Health Care Institution Labor Red Banner Order Minsk Regional Clinical Hospital: agrogorodok Lesnoy, Minskiy rayon, Minskaya obl., 223041, Belarus

Author information

Aleksey G. Kadushkin – Candidate of Medicine, Associate Professor, Chair of Biological Chemistry, Educational Institution Belarusian State Medical University; tel.: (37517) 207 93 92; e-mail: kadushkyn@gmail.com
Anatoliy D. Taganovich – Doctor of Medicine, Head of Chair of Biological Chemistry, Educational Institution Belarusian State Medical University; tel.: (37517) 277-17-64; e-mail: taganovich@bsmu.by
Anastasia A. Arabey – Researcher of Scientific Group “Steroids”, Scientific Research Department, Educational Institution Belarusian State Medical University; tel.: (37517) 272-98-94; e-mail: belsoloby@gmail.com
Liudmila M. Shishlo – Candidate of Biology, Leading Researcher of the Diagnostic Department with the Group of Radiation Diagnostics, State Institution N.N.Aleksandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology; tel.: (37517) 389-95-14; e-mail: luda_less@mail.ru
Anna P. Lyubetskaya – Endoscopist, Labor Red Banner Order Minsk Regional Clinical Hospital; tel.: (37517) 265-22-74; e-mail: dr.pit78@list.ru
Larisa V. Aleshkevich – Head of Allergy and Pulmonology Department, Labor Red Banner Order Minsk Regional Clinical Hospital; tel.: (37517) 265-21-72; e-mail: dr.lora@list.ru

Abstract

Inhaled corticosteroids are widely used for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), but their efficacy significantly varies between patients. **The aim** of the study was to establish approaches to reveal steroid-sensitive and steroid-resistant patients with COPD using the blood and lung cells. **Methods.** Forty five patients with COPD undergoing bronchoscopy were recruited for the study of cytokine secretion by alveolar macrophages under the influence of glucocorticoids. Alveolar macrophages isolated from bronchoalveolar lavage fluid were cultured with lipopolysaccharide (LPS) and different concentrations of dexamethasone (0.01 – 1000 nM) for 24 h. Then, supernatants were removed and analyzed for concentrations of interleukin 6 (IL-6), IL-8 and tumor necrosis factor α (TNF- α). Binding of the glucocorticoid with its receptors was investigated in 24 patients with COPD, 20 healthy smokers and 20 healthy non-smokers. Blood cells were cultured with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled dexamethasone and monoclonal antibodies against surface antigens of lymphocyte and monocyte populations. Fluorescence intensity of FITC-labelled dexamethasone was analyzed in blood cells using flow cytometry. **Results.** Dexamethasone significantly inhibited IL-6, IL-8, and TNF- α production in alveolar macrophages in a dose dependent manner. The maximal inhibition of cytokine production was observed at dexamethasone concentration of 100 nM, and the maximal cell response variability was found at 10 nM. IL-8 was less sensitive to the corticosteroid compared to IL-6 and TNF- α . Dexamethasone at any concentration failed to reach > 50% inhibition of LPS-induced production of IL-8, IL-6 and TNF- α in alveolar macrophages of 40.0%; 11.1% and 8.9% of COPD patients, respectively. The fluorescence intensity of FITC-labelled dexamethasone in blood lymphocytes and monocytes was lower in smokers with COPD compared to healthy smokers and healthy non-smokers. The binding of dexamethasone with its receptors in the blood cells was higher in healthy non-smokers compared to healthy smokers. **Conclusion.** In vitro response of alveolar macrophages to glucocorticoids in COPD patients is characterized by significant inter-individual variability. The weak corticosteroid-related inhibition of IL-8 production can contribute to neutrophilic inflammation in COPD. The capacity of glucocorticoid receptors to bind with their ligands in blood lymphocytes and monocytes is decreased in COPD patients.

Key words: COPD, alveolar macrophages, glucocorticosteroids, steroid resistance, bronchoalveolar lavage fluid, cytokines, interleukin 8.

For citation: Kadushkin A.G., Taganovich A.D., Arabey A.A., Shishlo L.M., Lyubetskaya A.P., Aleshkevich L.V. Sensitivity to glucocorticosteroids and heterogeneity of in vitro cell response in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Russian Pulmonology*. 2018; 28 (5): 558–566 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-5-558-566

Важная особенность хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) состоит в том, что хронический воспалительный процесс продолжается даже после прекращения воздействия этиологического фактора [1]. В результате дыхательная функция легких постоянно ослабевает и заболевание прогрессирует.

Нарастание выраженности воспалительной реакции у пациентов с ХОБЛ вовлекает альвеолярные макрофаги (АМ) и лимфоциты, количество которых существенно растет в дыхательных путях [2]. Эти клетки играют определяющую роль в регуляции легочного воспаления путем секреции хемокинов (интерлейкина (IL)-8, CXCL1, CCL2), цитокинов (фактора некроза опухоли- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 и интерферона- γ) и протеаз (нейтрофильной эластазы, металлопротеиназы-9) [3].

Несмотря на то, что аномально протекающее хроническое воспаление повсеместно признается ведущим механизмом прогрессирования заболевания, в настоящее время отсутствует разработанная схема противовоспалительной терапии ХОБЛ, которая могла бы изменить ход воспалительной реакции и предотвратить неуклонное снижение дыхательной функции легких.

Ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС) являются основными противовоспалительными препаратами, которые используются для лечения ХОБЛ. Они проникают в цитоплазму клеток-мишеней и там связываются со своими рецепторами, образуя

гормон-рецепторный (ГР) комплекс. Такой комплекс проникает в ядро и индуцирует транскрипцию генов, кодирующих противовоспалительные белки путем связывания с ГКС-респонсивными элементами ДНК в промоторной области гена. С другой стороны, он может угнетать действие активаторов транскрипции – ядерного фактора κ B (NF- κ B) и AP-1. В результате замедляется образование провоспалительных белков и пептидов, в частности IL-6, IL-8, TNF- α [4]. Однако эффективность иГКС при лечении ХОБЛ ограничена. Сообщается об отсутствии их влияния на прогрессирование снижения дыхательной функции легких при этом заболевании. Вместе с тем они могут облегчить состояние части пациентов с более выраженной ХОБЛ и частыми обострениями [5], поэтому выяснение индивидуальной чувствительности к иГКС у пациентов с ХОБЛ приобретает принципиальный характер. От решения этого вопроса зависит тактика проводимого лечения. В ряде случаев безрезультатное длительное использование иГКС приводит к развитию остеопороза, пневмонии [6]. В связи с этим у иГКС-нечувствительных пациентов целесообразно проведение альтернативной терапии [4].

О подходах к распознаванию индивидуальной чувствительности к иГКС у пациентов с ХОБЛ известно немного. Как уже упоминалось, взаимодействие ГКС со своими рецепторами является необходимым и важным этапом передачи гормонального сигнала в клетке. Показано, что степень гормон-

рецепторного связывания в общей фракции мононуклеарных клеток снижена у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками [7]. По данным единичных исследований с участием небольшого числа пациентов с ХОБЛ продемонстрировано снижение секреции некоторых цитокинов *in vitro* при помощи АМ, подвергнутых воздействию ГКС [8]. При использовании иГКС существенно улучшалось качество жизни и снижалось число обострений, но только у пациентов с высоким уровнем эозинофилов в крови [9].

Целью настоящего исследования явилось определение подходов к выявлению ГКС-чувствительных и ГКС-резистентных пациентов с ХОБЛ при использовании клеток легких и крови.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. В исследовании цитокин-секретирующей функции АМ в ответ на воздействие ГКС приняли участие пациенты, которым выполнялась бронхоскопия ($n = 45$; 1-я группа). Для изучения особенностей взаимодействия ГКС и ГР были обследованы пациенты с ХОБЛ ($n = 24$; 2-я группа), здоровые курильщики ($n = 20$) и здоровые некурящие ($n = 20$) (табл. 1). Индекс курения > 10 пачко-лет отмечен у всех больных ХОБЛ и здоровых курильщиков. Для исключения острого влияния сигаретного дыма на результаты исследования обследуемые воздерживались от курения в течение 12 ч, предшествующих бронхоскопии и забору крови.

Критерии включения пациентов с ХОБЛ в исследование:

- среднетяжелая и тяжелая степень тяжести (согласно критериям Глобальной инициативы по ХОБЛ GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) – GOLD);

- возраст старше 40 лет;
- способность правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

Критериями исключения из исследования являлись бронхиальная астма, атопия, аллергический ринит, острые инфекционные заболевания, туберкулез, заболевания соединительной ткани с изменениями функции дыхательной системы, острый коронарный синдром, онкологические заболевания, бронхоэктатическая болезнь, нарушения свертывающей системы крови, прием системных ГКС в течение 2 мес. до проведения исследования.

У всех обследуемых получено письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования одобрено решением Комитета по биомедицинской этике Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Связывание дексаметазона с глюкокортикостероидными рецепторами в лимфоцитах и моноцитах крови. Венозная кровь у обследуемых забиралась рано утром натощак. В пробирки помещались 100 мкл крови и дексаметазон, меченный флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) (*Life Technologies*, США) в концентрации 10 нМ. В контрольную пробирку предварительно на 10 мин добавлялся несвязанный дексаметазон (*Sigma Aldrich*, США) в концентрации 10^{-5} М, а затем дексаметазон, конъюгированный с FITC, в концентрации 10 нМ. Пробы инкубировались в течение 60 мин в темноте при 37 °С при тщательном перемешивании каждые 10 мин; затем добавляли 3 мл фосфатно-солевого буфера (*Becton Dickinson*, США). Клетки осаждались центрифугированием (1 200 об. / мин, 6 мин), надосадочная жидкость сливалась, а осадок встряхивался. Процедура отмывки повторялась.

Таблица 1
Характеристика участников исследования
Table 1
The study participants' characteristics

Характеристика	Пациенты с ХОБЛ		Здоровые	
	1-я группа ($n = 45$)	2-я группа ($n = 24$)	курящие ($n = 20$)	некурящие ($n = 20$)
Возраст, годы	61,0 (55,0–69,0)	60,5 (57,0–66,5)	54,0 (48,0–56,5)	55,0 (48,0–57,0)
Пол:				
• мужчины	39	17	15	11
• женщины	6	7	5	9
Статус курения:				
• курящие	18	11	14	0
• бывшие курильщики	27	13	6	0
Индекс курения, пачко-лет	37 (25–48)	38 (27–45)	30 (25–35)	0
ОФВ ₁ , %дож.	46,0 (36,0–55,0)	44,5 (37,0–56,5)	99,0 (89,5–107,0)	105,0 (96,0–112,5)
ОФВ ₁ / ФЖЕЛ, %	53,0 (46,0–62,0)	52,0 (43,5–62,0)	82,5 (81,0–85,0)	85,0 (82,0–87,5)
Пациенты с обострениями в предыдущем году:				
• редкими (0–1)	26	15	–	–
• частыми (≥ 2)	19	9	–	–
Использование иГКС, n	24	16	0	0

Примечание: ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких.

К суспензии клеток добавляли 2 коктейля моноклональных антител:

- CD25-PE / CD3-ECD / CD4-PE-Cy 5.5 / CD127-PC7 / CD14-APC / CD45-APC *Alexa Fluor 750*;
- CD19-PE / CD3-ECD / CD8-PC5 / CD56-PC7 / CD45-APC *Alexa Fluor 750* (*Beckman Coulter*, Франция).

Клетки инкубировались в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Эритроциты лизировались безотмывочным способом путем добавления 1 мл лизирующего раствора *Versalyse* (*Beckman Coulter*, Франция).

Анализ интенсивности флуоресценции FITC-меченного дексаметазона в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах проводился на проточном цитометре *Navios* с использованием программного обеспечения *Kaluza* (*Beckman Coulter*, США).

Бронхоскопия. Бронхоскопия проводилась по стандартной методике [10]. После местной анестезии с использованием лидокаина гибкий волоконно-оптический бронхоскоп (*Olympus Optical Co Ltd*, Япония) 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. Максимальное количество вводимого физиологического раствора достигало 240 мл (4 × 60 мл). Полученный объем бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ), как правило, не превышал 50 % введенного. Аспирированная БАЛЖ, собранная в стерильные пластиковые контейнеры, помещалась на лед и в течение 1 ч транспортировалась в лабораторию для дальнейшего анализа.

Культивирование макрофагов. Слизь удалялась путем фильтрации (диаметр пор фильтра – 100 мкм). БАЛЖ дважды отмывалась путем добавления 0,9%-го раствора NaCl (условия центрифугирования – 400 g в течение 10 мин при 4 °С), а осадок клеток ресуспендировался в среде RPMI-1640, обогащенной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамин, 100 ЕД / мл пенициллина и 100 мкг / мл стрептомицина. Подсчитывались АМ и оценивалась их жизнеспособность.

В лунки 96-луночного планшета (100 тыс. живых клеток в 1 лунку) помещался АМ и выделялся путем адгезии к пластику (культуральный планшет *Corning Costar*, США) в течение 2 ч при 37 °С 5%-го CO₂. Прилипшие макрофаги отмывались обогащенной средой RPMI-1640 (предварительно подогретой до 37 °С), удалялись неадгезированные клетки. К АМ добавлялся дексаметазон (*Sigma Aldrich*, США) 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 вносился 1 мкг / мл липополисахарида (ЛПС), *Escherichia coli* B6-026 (*Sigma Aldrich*, США) 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 про-

изводителя (Вектор Бест, РФ) в них определялась концентрация IL-6, IL-8 и TNF-α.

Подсчет формулы крови. Формула крови и концентрация лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и тромбоцитов подсчитывалась с помощью автоматического гематологического анализатора *Sysmex 5000i* (*Sysmex Corporation*, Япония).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакетов статистического анализа данных *GraphPad InStat software* (*GraphPad Software Inc.*, США) и *Statistica for Windows 10.0* (*StatSoft Inc.*, США). Для проверки гипотезы нормальности распределения данных использовался критерий Шапиро–Уилка. Поскольку количественные значения показателей ингибирования секреции цитокинов при влиянии различных концентраций дексаметазона подчинялись нормальному распределению, анализ проводился методами параметрической статистики. Сравнение показателей осуществлялось при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим проведением теста Бонферрони. При расчете процента ингибирования за 100%-ную супрессию принимались 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. Анализ показателей интенсивности флуоресценции FITC-меченного дексаметазона проводился методами непараметрической статистики. Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25–75 %). Для оценки различий между 3 группами применялся критерий Краскела–Уоллиса с последующим сравнением 2 независимых групп с использованием U-критерия Манна–Уитни. Взаимосвязь между показателями определялась на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

Результаты и обсуждение

Интенсивность флуоресценции FITC-меченного дексаметазона в популяциях лимфоцитов и моноцитах крови была существенно ниже у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими и некурящими здоровыми (табл. 2), причем выраженность снижения была приблизительно одинакова и колебалась соответственно от 15,2 до 27,5 % и от 30,0 до 41,5 %.

Обращает внимание, что в случае привычного курения само по себе снижается связывание дексаметазона всеми из исследованных популяций клеток крови. Разница интенсивности флуоресценции FITC-меченного дексаметазона у курящих по сравнению с некурящими здоровыми в составе натуральных киллеров (CD3–CD56⁺-клеток) составила 16,7 %, а в составе цитотоксических Т-лимфоцитов она была максимальной – 20,9 %. Во всех случаях разница статистически достоверна.

Таблица 2
Средняя интенсивность флуоресценции дексаметазона, меченного флуоресцеинизотиоцианатом, в различных популяциях лимфоцитов и моноцитах периферической крови
Table 2
Mean fluorescence intensity of fluorescein isothiocyanate-labelled dexamethasone in peripheral blood lymphocytes and monocytes

Субпопуляция клеток крови	ХОБЛ (n = 24)	Здоровые	
		курящие (n = 20)	некурящие (n = 20)
CD3 ⁺ -лимфоциты (Т-лимфоциты)	2,5 (2,2–2,8)* **	3,2 (3,0–3,8)**	4,0 (3,6–4,4)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -лимфоциты (Т-хелперы)	2,8 (2,4–3,4)* **	3,3 (3,1–3,8)**	4,0 (3,7–4,3)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -лимфоциты (цитотоксические Т-лимфоциты)	2,7 (2,4–3,1)* **	3,4 (3,3–4,0)**	4,3 (3,7–4,7)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ -лимфоциты (регуляторные Т-лимфоциты)	2,8 (2,6–3,3)* **	3,4 (3,0–3,8)**	4,1 (3,6–4,5)
CD19 ⁺ -лимфоциты (В-лимфоциты)	2,4 (2,2–2,7)* **	3,3 (3,1–3,9)**	4,1 (3,6–4,5)
CD3 ⁺ CD56 ⁺ -клетки (НК-клетки)	2,9 (2,6–3,7)* **	4,0 (3,6–4,5)**	4,8 (4,0–5,3)
CD3 ⁺ CD56 ⁺ -клетки (НКТ-клетки)	3,4 (3,1–3,9)* **	4,5 (4,2–5,1)**	5,5 (4,8–6,0)
CD14 ⁺ -клетки (моноциты)	6,1 (5,4–7,5)* **	8,2 (7,1–9,8)**	9,9 (8,4–10,8)

Примечание: ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; данные представлены как медиана и 50%-ный интерквартильный размах между 25-м и 75-м перцентилями; * – $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми курящими; ** – $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми некурящими.

Notes. Data are shown as median and 50% interquartile range between the 25th and the 75th quartiles ($p_{25} - p_{75}$); *, $p < 0.05$ compared to healthy smokers; **, $p < 0.05$ compared to healthy non-smokers.

Данные о сниженной связывающей способности клеток крови для ГКС послужили основанием для следующего этапа исследования, призванного выяснить 2 обстоятельства:

- как снижение связывающей способности отражается на функции клеток легких у лиц с ХОБЛ;
- у всех ли пациентов имеет место ослабление чувствительности к этим гормонам.

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 (табл. 3). IL-8 был менее чувствителен к ингибированию дексаметазоном, чем IL-6 и TNF- α , поскольку большая концентрация дексаметазона требовалась для подавления продукции IL-8 на 50 % (ИК50) (см. табл. 3). 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. 3).

По данным проведенных экспериментов показано, что 0,005%-ный диметилсульфоксид, использованный в качестве растворителя для дексаметазона, не оказывал влияния на продукцию цитокинов макрофагами. Эффекты ГКС не различались между больными с частыми и редкими (за последний год)

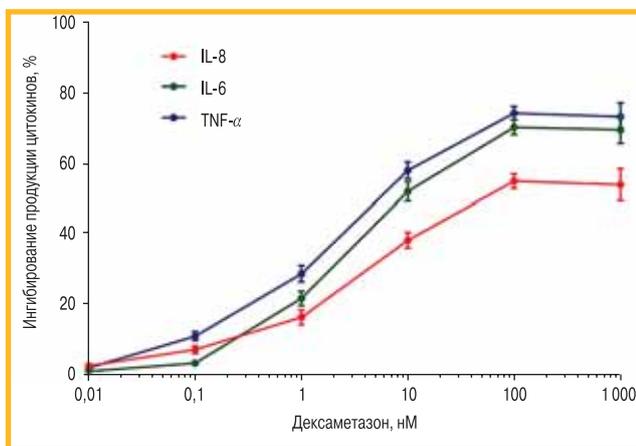


Рис. 1. Влияние дексаметазона на подавление секреции цитокинов, стимулированной липополисахаридом. Альвеолярные макрофаги, полученные от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких ($n = 45$), культивировались в течение 24 ч с 1 мг / мл липополисахарида после преинкубации на протяжении 1 ч с дексаметазоном (0,01–1 000 нМ). В супернатантах определялась концентрация IL-8 (красная кривая), IL-6 (зеленая кривая) и TNF- α (синяя кривая). Данные представлены в виде среднего значения групповых данных \pm стандартная ошибка среднего. Примечание: IL – интерлейкин; TNF- α – фактор некроза опухоли- α .
Figure 1. Dexamethasone-related inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine production. Alveolar macrophages from COPD patients ($n = 45$) were cultured with LPS (1 mg/ml) for 24 hours after 1-h pre-incubation with dexamethasone (0.01–1000 nM). Concentrations of IL-8 (red plot), IL-6 (green plot) and TNF- α (blue plot) were then measured in cell supernatants. Data are shown as mean \pm SE.

Таблица 3
Максимальное значение ингибирования и эффективная концентрация дексаметазона, ингибирующая секрецию цитокинов альвеолярными макрофагами на 50 %, по отношению к стимулированной липополисахаридом продукции цитокинов

Table 3
The maximal inhibition and an effective dexamethasone concentration caused 50% inhibition of LPS-induced cytokine production in alveolar macrophages

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)

Примечание: ИК50 – концентрация дексаметазона, ингибирующая секрецию цитокинов альвеолярными макрофагами на 50 %; максимальное ингибирование продукции цитокинов представлено в виде среднего значения (стандартного отклонения) при концентрации дексаметазона 100 нМ; IL – интерлейкин; TNF- α – фактор некроза опухоли- α ; * – $p < 0,001$ по сравнению со степенью ингибирования продукции IL-8.

обострениями, активными курильщиками и экс-курильщиками, пациентами, принимавшими и не принимавшими иГКС, мужчинами и женщинами (данные не представлены).

По результатам анализа индивидуальных кривых «концентрация / ответ» при ингибировании дексаметазоном стимулированной продукции цитокинов показана значительная гетерогенность ответа АМ на

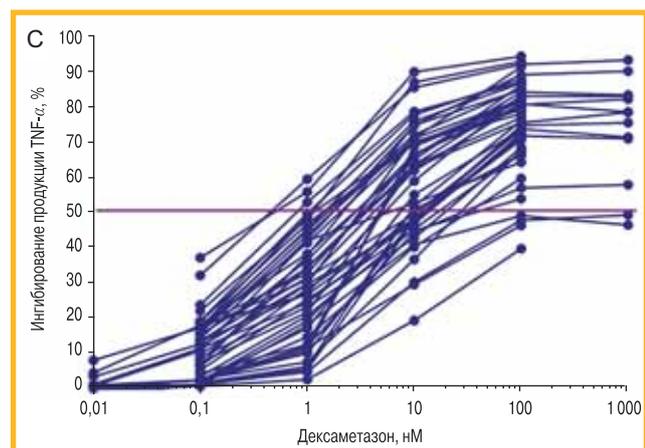
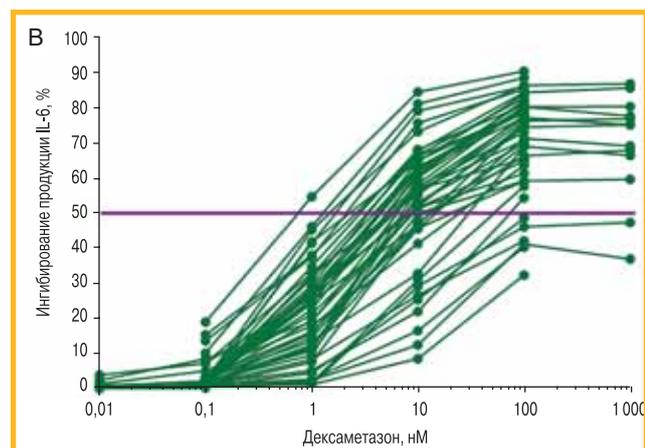
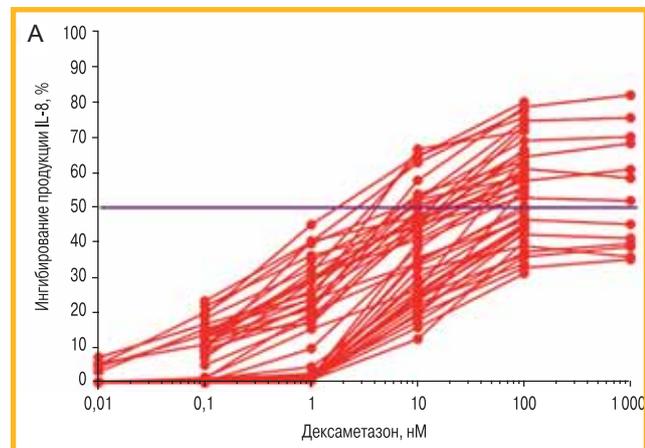


Рис. 2. Индивидуальные кривые «концентрация дексаметазона / эффект». Ингибирование продукции: А – IL-8; В – IL-6; С – TNF-α под влиянием дексаметазона (представлено для курящих пациентов (n = 45) с хронической обструктивной болезнью легких)

Примечание: IL – интерлейкин; TNF-α – фактор некроза опухоли-α.
Figure 2. Individual dexamethasone concentration – response curves. Individual concentration - response curves for dexamethasone-related inhibition of IL-8 (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) production are shown for 45 COPD patients

ГКС среди пациентов с ХОБЛ. Размах вариации (разность между максимальным и минимальным значениями) степени подавления продукции каждого из анализируемых цитокинов при концентрации дексаметазона от 1 до 1 000 нМ был выше на 44 %. Наибольшая вариабельность ответа клеток проявлялась при концентрации дексаметазона 10 нМ. В этом случае размах вариации 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). Супрессии индуцированной продукции IL-6 на ≥ 50 % под влиянием дексаметазона не достигли клетки у 5 (11,1 %), а в случае IL-8 – у 18 (40 %) из 45 пациентов.

Между ингибированием стимулированной секреции IL-6, IL-8 и TNF-α АМ пациентов с ХОБЛ под влиянием дексаметазона обнаруживается положительная корреляционная связь. Коэффициенты корреляции (R) составляют от 0,360 до 0,974, что свидетельствует о наличии умеренных и сильных ассоциаций (табл. 4).

Все больные 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 (табл. 5).

Согласно полученным данным продемонстрировано изменение способности моноцитов и различных популяций лимфоцитов крови связывать дексаметазон. Существует точка зрения, что в клетках крови и легких образуются 2 изоформы ГР – ГРα и ГРβ [11]. При этом только ГРα может связывать

Таблица 4
Коэффициенты корреляции (R) степени ингибирования секреции цитокинов при воздействии различных концентраций дексаметазона
Table 4
Spearman's correlation coefficients for cytokine inhibition by different concentrations of dexamethasone

Концентрация дексаметазона, нМ	Корреляционные связи ингибирования цитокинов, %		
	IL-8 и IL-6	IL-8 и TNF-α	IL-6 и TNF-α
0,01	0,418	0,665*	0,707*
0,1	0,366*	0,360*	0,392*
1	0,509*	0,383*	0,734*
10	0,474*	0,518*	0,903*
100	0,696*	0,705*	0,966*
1 000	0,616*	0,615*	0,974*

Примечание: IL – интерлейкин; TNF-α – фактор некроза опухоли-α; * – p < 0,05.
Notes. *, p < 0.05.

Таблица 5
Параметры общего анализа крови у резистентных и чувствительных к глюкокортикостероидам пациентов с хронической обструктивной болезнью легких
 Table 5
Complete blood count in steroid-resistant and steroid-sensitive patients with COPD

Показатель	ГКС-резистентные	ГКС-чувствительные	Значимость отличий, p
Относительное количество, %			
• нейтрофилов	69,0 (62,0–82,0)	62,0 (54,0–66,0)	0,005
• лимфоцитов	20,0 (15,0–24,4)	26,9 (20,0–36,0)	0,011
• моноцитов	7,0 (3,0–11,0)	9,0 (6,0–11,0)	0,371
• эозинофилов	0,5 (0,0–1,0)	2,0 (1,0–3,0)	0,004
Абсолютное количество тромбоцитов, × 10⁹ / л	236 (218–278)	185 (176–230)	0,014
Показатель отношения абсолютного количества:			
нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов	3,6 (2,4–5,5)	2,4 (1,5–3,6)	0,009
тромбоцитов к абсолютному количеству лимфоцитов	123,5 (91,0–146,0)	92,0 (72,0–116,0)	0,046

Примечание: ГКС – глюкокортикостероиды.

ГКС и подавлять факторы транскрипции активаторного белка (AP)-1 и ядерного фактора κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* – *NF- κ B*). ГР β не способен взаимодействовать с ГКС и изменять активность транскрипции ГКС-чувствительных генов. Более того, ГР β может связывать ГР α , чем существенно снижает количество молекул ГР α [12]. Экспрессия ГР α в клетках легких курильщиков с ХОБЛ ниже по сравнению со здоровыми курильщиками [13], что может приводить к ослаблению гормон-рецепторного взаимодействия.

Совсем недавно появились сведения о возможности штамма бактерии *non-typeable Haemophilus influenza* вызывать фосфорилирование рецептора для ГКС в АМ, опосредованное субъединицей р38 митоген-активируемой протеинкиназы [14]. В результате снижается функция таких рецепторов. С учетом того обстоятельства, что данный вид патогена распространен в легких больных ХОБЛ, обнаруженное явление может служить в качестве альтернативной причины снижения связывания дексаметазона лимфоцитами и моноцитами крови при этом заболевании.

При анализе результатов исследования авторы столкнулись с совершенно новым следствием вдыхания сигаретного дыма – способностью снижать связывание ГКС иммунокомпетентными клетками у здоровых людей. Обнаружено, что в лейкоцитах крови курящих здоровых людей снижена концентрация ГР (без дифференцировки на α - и β -изоформы) по сравнению со здоровыми некурящими [15]. Аналогичные данные в отношении α -рецепторов к ГКС получены в легочной паренхиме при сравнении здоровых курящих и некурящих [13]. Обнаруженное явление заслуживает самого серьезного внимания с точки зрения как ущерба для организма, наносимого курением, так и возможных причин сниженной ГКС-чувствительности при ХОБЛ.

По данным проведенного исследования показано, что АМ у пациентов с ХОБЛ обладают различной ГКС-чувствительностью. Наиболее вариабельные результаты подавления секреции цитокинов получены при использовании концентрации дексаметазона 10 нМ. Как известно, такая концентрация ГКС

наблюдается в периферических участках легочной ткани после ингаляции препаратов ГКС [16]. Значительная вариабельность ответа клеток легких, наблюдаемая *in vitro*, может служить иллюстрацией и объяснением гетерогенности клинического ответа на иГКС у разных пациентов с ХОБЛ [5, 9].

Построение индивидуальных графических кривых зависимости ингибирования стимулированной секреции провоспалительных цитокинов от концентрации дексаметазона позволило выделить группу пациентов со сниженной ГКС-чувствительностью. Такие больные ни при одной из используемых концентраций дексаметазона не достигали 50%-го ингибирования секреции цитокинов (в случае IL-8 их было 40 %, IL-6 – 11,1 %, TNF- α – 8,9 %). Одновременно встречались лица, в клетках которых секреция цитокинов подавлялась на > 80 %. Следует отметить, что попытки использования АМ, культивируемых с ГКС, для выявления больных ХОБЛ со сниженным ответом клеток на эти препараты предпринимались ранее [8, 17]. Так, в исследовании *M.J.Ratcliffe et al.* к ГКС-резистентным пациентам с ХОБЛ были отнесены не достигшие 30%-го порога в ингибировании секреции TNF- α АМ, индуцированной ЛПС [8]. В другой лаборатории деление пациентов на ГКС-резистентных и ГКС-чувствительных происходило на основании способности ингибировать продукцию IL-8 на 50 % [17]. Кроме того, секреция цитокинов АМ у пациентов с ХОБЛ, принимавших ГКС, была снижена по сравнению со здоровыми [18, 19]. Вместе с тем имеются сведения о том, что ответ АМ у лиц с ХОБЛ на супрессивное влияние ГКС в отношении продукции цитокинов не отличается от ответа клеток у здоровых курящих [20].

Обнаруженные умеренные и сильные корреляционные связи между подавлением секреции различных провоспалительных цитокинов представляются закономерными. Они демонстрируют системный противовоспалительный эффект дексаметазона, связанный с торможением транскрипции участников воспаления.

В ходе проведенного исследования также выявлено, что цитокины имеют различную ГКС-чувствительность. TNF- α и IL-6 оказались более чувстви-

тельными к супрессии ГКС, чем ИЛ-8. В исследовании [14] дексаметазон существенно ингибировал секрецию TNF- α , ИЛ-6 и ИЛ-10 АМ пациентов с ХОБЛ, индуцированную *Haemophilus influenzae*, но не оказывал влияния на продукцию ИЛ-8. Ранее показано, что уровень ИЛ-8 выше в крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми, в то время как концентрация TNF- α и ИЛ-6 не различается между курильщиками с ХОБЛ и курильщиками без ограничения степени воздушного потока [21]. Обнаружено также увеличение концентрации ИЛ-8 в легочной ткани курящих больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками [22, 23]. Как известно, ИЛ-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 ИЛ-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, 9, 24]. Так, применение иГКС больными ХОБЛ с высоким уровнем эозинофилов в крови ($\geq 279,8$ кл. / мкл) привело к существенному улучшению качества жизни больных и снижению частоты обострений, в то время как использование этих препаратов лицами с низким уровнем эозинофилов ($< 181,6$ кл. / мкл) не вызывало таких изменений [9]. В другом исследовании назначение иГКС пациентам, имеющим одновременно частые обострения в анамнезе (≥ 2) и высокий уровень эозинофилов в крови (≥ 300 кл. / мкл), приводило к снижению частоты обострений и замедлению прогрессирующего снижения функции легких [5]. 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 проведенных исследований в других лабораториях [9, 24]. Наблюдалось также снижение показателя отношения абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам у ГКС-чувствительных по сравнению со ГКС-резистентными больными ХОБЛ. Данный показатель ранее был описан в качестве предиктора обострений при ХОБЛ [25], однако его взаимосвязь с ответом на ГКС не изучалась.

Заключение

Итак, продемонстрирована возможность использования клеток формулы крови, в частности лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, тромбоцитов для определения чувствительности пациентов с ХОБЛ к иГКС. Такой подход получил патогенетическое обоснование по результатам исследования функцио-

нальной способности клеток легких и связывающей способности ГКС клетками крови. Безусловно, это обоснование требует своего развития в будущих исследованиях, но полученные данные внушают оптимизм.

Наиболее существенные результаты исследования, приведенные в настоящей работе, позволяют сделать следующие обобщения:

- у курящих пациентов с ХОБЛ степень связывания дексаметазона со своими рецепторами в популяциях лимфоцитов и моноцитах крови ниже, чем у курящих здоровых; фактор курения снижает лиганд-рецепторное взаимодействие, нарушая поглощение ГКС лимфоцитами и моноцитами крови здоровых людей;
- для больных ХОБЛ характерен гетерогенный характер ответа АМ на ГКС *in vitro*, наиболее выраженный при концентрации дексаметазона 10 нМ;
- эффективная ИК50 дексаметазона выше по отношению к продукции ИЛ-8, чем по отношению к синтезу ИЛ-6 и TNF- α АМ лиц с ХОБЛ, что свидетельствует о большей ГКС-резистентности ИЛ-8; ингибирование секреции ИЛ-8 не достигает 50 % при любой концентрации ГКС в диапазоне 0,01–1 000 нМ у 40 % больных ХОБЛ, ИЛ-6 – у 11,1 %, TNF- α – у 8,9 %;
- у ГКС-чувствительных лиц 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.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, связанных с настоящей рукописью. Работа выполнена в рамках задания 2.56 «Изучить молекулярно-клеточные механизмы развития стероидной резистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких для оптимизации их лечения» Белорусской государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (2017–2019).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest pertinent to this publication. The study was done according to “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” Belarus State Scientific Program (2017–2019).

Литература / References

1. Halbert R.J., Natoli J.L., Gano A. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 2006; 28 (3): 523–532. DOI: 10.1183/09031936.06.00124605.
2. Hogg J.C., Chu F., Utokaparch S. et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350 (26): 2645–2653. DOI: 10.1056/NEJMoa032158.
3. Barnes P.J. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2009; 41 (6): 631–638. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0220TR.
4. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д. Молекулярные механизмы формирования стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология.* 2016; 26 (6): 736–747. DOI: 10.18093/

- 0869-0189-2016-26-6-736-747. / Kadushkin A.G., Taganovich A.D. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2016; 26 (6): 736–747. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-6-736-747 (in Russian).
5. Calverley P.M.A., Tetzlaff K., Vogelmeier C. et al. Eosinophilia, frequent exacerbations, and steroid response in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017; 196 (9): 1219–1221. DOI: 10.1164/rccm.201612-2525LE.
 6. Price D., Yawn B., Brusselle G., Rossi A. Risk-to-benefit ratio of inhaled corticosteroids in patients with COPD. *Prim. Care Respir. J.* 2013; 22 (1): 92–100. DOI: 10.4104/pcrj.2012.00092.
 7. Rossios C., To Y., Osoata G. et al. Corticosteroid insensitivity is reversed by formoterol via phosphoinositide-3-kinase inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 167 (4): 775–786. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01864.x.
 8. Ratcliffe M.J., Dougall I.G. Comparison of the anti-inflammatory effects of cilomilast, budesonide and a p38 mitogen activated protein kinase inhibitor in COPD lung tissue macrophages. *BMC. Pharmacol. Toxicol.* 2012; (13): 15. DOI: 10.1186/2050-6511-13-15.
 9. Siddiqui S.H., Guasconi A., Vestbo J. et al. Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 192 (4): 523–525. DOI: 10.1164/rccm.201502-0235LE.
 10. Baughman R.P. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 28 (5): 475–485. DOI: 10.1055/s-2007-991520.
 11. Van der Velden V.H. Glucocorticoids: mechanisms of action and antiinflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm.* 1998; 7 (4): 229–237. DOI: 10.1080/0962935980910.
 12. Oakley R.H., Jewell C.M., Yudit M.R. et al. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (39): 27857–27866. DOI: 10.1074/jbc.274.39.27857.
 13. Marwick J.A., Caramori G., Stevenson C.S. et al. Inhibition of PI3Kdelta restores glucocorticoid function in smoking-induced airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179 (7): 542–548. DOI: 10.1164/rccm.200810-1570OC.
 14. Khalaf R.M., Lea S.R., Metcalfe H.J. et al. Mechanisms of corticosteroid insensitivity in COPD alveolar macrophages exposed to NTHi. *Respir. Res.* 2017. (18): 61. DOI: 10.1186/s12931-017-0539-4.
 15. Zeng M., Li Y., Jiang Y. et al. Local and systemic oxidative stress and glucocorticoid receptor levels in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can. Respir. J.* 2013; 20 (1): 35–41. DOI: 10.1155/2013/985382.
 16. Esmailpour N., Högger P., Rabe K.F. et al. Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum *in vivo*. *Eur. Respir. J.* 1997; 10 (7): 1496–1499.
 17. Higham A., Booth G., Lea S. et al. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis. *Respir. Res.* 2015; (16): 98. DOI: 10.1186/s12931-015-0260-0.
 18. Khorasani N., Baker J., Johnson M. et al. Reversal of corticosteroid insensitivity by p38 MAPK inhibition in peripheral blood mononuclear cells from COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015; (10): 283–291. DOI: 10.2147/COPD.S72403.
 19. Knobloch J., Hag H., Jungck D. et al. Resveratrol impairs the release of steroid-resistant cytokines from bacterial endotoxin-exposed alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2011; 109 (2): 138–143. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00707.x.
 20. Armstrong J., Harbron C., Lea S. et al. Synergistic effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with a corticosteroid in alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011; 338 (3): 732–740. DOI: 10.1124/jpet.111.180737.
 21. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Картун Л.В. и др. Уровень цитокинов в плазме крови некурящих и курящих пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология*. 2013; (6): 27–32. DOI: 10.18093/0869-0189-2013-0-6-718-723. / Kadushkin A.G., Taganovich A.D., Kartun L.V. et al. Plasma cytokine levels in non-smoking and smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2013; (6): 27–32. DOI: 10.18093/0869-0189-2013-0-6-718-723 (in Russian).
 22. Keatings V.M., Collins P.D., Scott D.M., Barnes P.J. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153 (2): 530–534. DOI: 10.1164/ajrccm.153.2.8564092.
 23. Soler N., Ewig S., Torres A. et al. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1999; 14 (5): 1015–1022.
 24. Barnes N.C., Sharma R., Lettis S., Calverley P.M. Blood eosinophils as a marker of response to inhaled corticosteroids in COPD. *Eur. Respir. J.* 2016; 47 (5): 1374–1382. DOI: 10.1183/13993003.01370-2015.
 25. Tunçay E.A., Karakurt Z., Aksoy E. et al. Eosinophilic and non-eosinophilic COPD patients with chronic respiratory failure: neutrophil-to-lymphocyte ratio as an exacerbation marker. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2017; (12): 3361–3370. DOI: 10.2147/COPD.S147261.

Поступила 07.07.18
Received July 07, 2018