

# Молекулярные механизмы формирования стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

А.Г.Кадушкин, А.Д.Таганович

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

## Резюме

В настоящее время для терапии хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) широко применяются ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС), поскольку они способны оказывать противовоспалительное действие. Однако их эффективность при ХОБЛ значительно ограничена. К молекулярным механизмам развития стероидорезистентности (СР) относятся нарушение связывания и транслокации ГКС-рецептора (GR) в ядро, повышенная экспрессия изоформы GR $\beta$ , увеличение экспрессии фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (*macrophage migration inhibitory factor* (MIF)), снижение экспрессии фосфатазы-1 митоген-активируемой протеинкиназы (МКР-1) и гистондеацетилазы-2 (ГДА-2). Снижение экспрессии и активности ГДА-2, которая вовлечена в ингибирование ГКС генов провоспалительных цитокинов, является результатом окислительного и нитрозативного стресса, развивающихся в ответ на вдыхание сигаретного дыма. При этом окислительный стресс приводит к активации фосфатидилинозитол-3-киназы- $\delta$  (ФИЗК- $\delta$ ). Дальнейший путь передачи сигнала от ФИЗК- $\delta$  включает фосфорилирование (активацию) киназы Akt, фосфорилирование (ингибирование) киназы гликогенсинтазы-3 $\beta$  и фосфорилирование (инактивацию) ГДА-2. Сведения о механизмах формирования СР позволили выявить лекарственные препараты, оказывающие влияние на патогенетические звенья этого состояния. Так, антидепрессант нортриптилин и макролид солитромицин преодолевают СР, ингибируя фосфорилирование Akt. Комбинация ГКС и длительно действующего  $\beta_2$ -агониста увеличивает транслокацию GR в ядро клетки и ингибирует фосфорилирование Akt. Ингибитор фосфодиэстеразы-4 рофлумиласт в сочетании с дексаметазоном восстанавливает чувствительность клеток к ГКС за счет изменения экспрессии ФИЗК- $\delta$ , ГДА-2, МКР-1, MIF и GR $\beta$ . Раскрытие молекулярных механизмов СР позволяет усилить противовоспалительные свойства ГКС и улучшить эффективность лечения ХОБЛ.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, глюкокортикостероидный рецептор, стероидорезистентность, гистондеацетилаза-2, фосфатидилинозитол-3-киназа- $\delta$ , рофлумиласт.

Для цитирования: 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

# Molecular mechanisms of corticosteroid resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease

A.G.Kadushkin, A.D.Taganovich

Belarus State Medical University; pr. Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220116, Belarus

## Abstract

Glucocorticoids are widely used for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) because of their anti-inflammatory properties. However, their therapeutic effectiveness is significantly limited in COPD. Molecular mechanisms of steroid resistance include defective glucocorticoid receptor (GR) binding and translocation into the nucleus, increased expression of GR $\beta$  isoform, elevated expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF), decreased expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) and histone deacetylase 2 (HDAC2). HDAC2 is involved in suppression of inflammatory genes by glucocorticoids, and its reduced activity and expression are the result of oxidative and nitrate stress induced by cigarette smoke. Oxidative stress causes activation of phosphoinositide-3-kinase  $\delta$  (PI3K $\delta$ ) which leads to phosphorylation (activation) of Akt kinase, phosphorylation (inhibition) of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and phosphorylation (inactivation) of HDAC2. Understanding of the mechanisms leading to steroid resistance allowed identification drugs targeting this condition. Antidepressant nortriptyline and macrolide solithromycin reverse corticosteroid resistance through inhibition of Akt phosphorylation. Combination of glucocorticoid and long-acting  $\beta_2$ -agonist increases GR nuclear translocation and inhibits Akt phosphorylation. The phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast in combination with dexamethasone improves steroid responsiveness through modulation of PI3K $\delta$ , HDAC2, MKP-1, MIF and GR $\beta$  expression. Investigation of the molecular mechanisms of steroid resistance can increase anti-inflammatory properties of steroids and lead to more effective COPD treatment.

**Key words:** COPD, glucocorticoid receptor, corticosteroid resistance, histone deacetylase 2, phosphoinositide-3-kinase  $\delta$ , roflumilast.

For citation: Kadushkin A.G., Taganovich A.D. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Russian Pulmonology*. 2016; 26 (6): 736–747 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-6-736-747

Лечение хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) существенно затруднено. Ни один из препаратов, применяемых для лечения этого заболевания, в долгосрочной перспективе не позволяет предупредить прогрессирующее снижение функции легких. В настоящее время для терапии ХОБЛ широ-

ко применяются ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС), поскольку они способны оказывать противовоспалительное действие [1]. Однако их эффективность при ХОБЛ значительно ограничена [2]. Так, влияния иГКС на прогрессирование заболевания и смертность не установлено, отмечается лишь

в небольшое улучшение качества жизни пациентов [3]. Имеются данные о снижении количества обострений ХОБЛ при применении иГКС [3], однако они оспариваются в некоторых исследованиях [4]; 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 [1]. В исследованиях *in vitro* способности иГКС ингибировать секрецию цитокинов альвеолярными макрофагами не показано [5].

В настоящее время сформировалось 3 точки зрения относительно стероидорезистентности (СР) у больных ХОБЛ. С точки зрения одной из них отмечается, что все пациенты с ХОБЛ имеют сниженный ответ на ГКС, и, следовательно, всем больным необходимо корректировать лечение [2, 6]. Другое мнение основано на том, что только некоторые пациенты с ХОБЛ имеют патологический ответ на ГКС, соответственно только они нуждаются в изменении режима применяемой терапии [5].

Сейчас совершенно очевидно, что ключ к пониманию механизмов формирования СР при ХОБЛ находится в раскрытии закономерностей функционирования ГКС-рецептора (ГР) и путей передачи гормонального сигнала. В данном обзоре суммируются и анализируются сведения о строении и функциональной роли ГР, молекулярных основах резистентности к ГКС у пациентов с ХОБЛ и лекарственных препаратов, повышающих стероидочувствительность (СЧ).

## Молекулярные механизмы действия глюкокортикостероидов

### Строение глюкокортикостероидного рецептора

ГКС путем свободной диффузии проникают в клетку сквозь плазматическую мембрану и в цитоплазме связываются с рецептором [7]. ГР состоит из 3 доменов. Функция гормон-связывающего домена, расположенного на С-концевом участке полипептидной цепи ГР, заключается в связывании гормона. Он также взаимодействует с белками теплового шока hsp90 (*heat shock proteins*) с образованием единого комплекса. Этот комплекс, состоящий из гормон-связывающего домена неактивного (не связанного с гормоном) ГР и hsp90, также включает другие белки — hsp70, hsp40, Нор, p23, иммунофилины (FKBP51, FKBP52, Суп44, РР5) [8]. Молекулы hsp90 способствуют фолдингу гормон-связывающего домена. Приобретенная вследствие этого пространственная структура обеспечивает высокоаффинное связывание с гормоном. Кроме того, hsp90 препятствуют транслокации ГР, не связанного с гормоном, в ядро [8]. Центральным (ДНК-связывающий) домен вовлечен в связывание ГР с ДНК. Этот домен имеет 2 участка надвторичной структуры, получивших название «цинковые пальцы», которые после проникновения ГР в ядро связываются с определенными сайтами в молекуле ДНК. Домен, расположенный в N-концевой области рецептора, участвует в активации транскрипции генов [9].

Обязательным условием переноса ГР через ядерную пору является объединение димера ГР с белком ядерного транспорта импортином- $\alpha$  [10]. Оказавшись в ядре, димер рецептора взаимодействует со строго определенными ГКС-респонсивными элементами ДНК (*glucocorticoid response element (GRE)*), расположенными в промоторной области генов, а также с коактиваторами транскрипции. Различаются «позитивные» и «негативные» GRE. Присоединение гомодимера рецептора к GRE приводит к активации транскрипции генов (при действии через «позитивные» GRE) или ингибированию транскрипции генов (при действии через «негативные» GRE) [11]. Отмечено, что взаимодействие ГР с «негативными» GRE является одним из механизмов развития побочных эффектов ГКС. Так, ингибирование экспрессии остеокальцина, который вовлечен в синтез кости, приводит к развитию остеопороза. Известно, что связывание ГР с «негативными» GRE также ингибирует транскрипцию пролактина, проопиомеланокортина, кортикотропин-рилизинг гормона, кератина, пролиферина [11].

### Активация глюкокортикостероидами транскрипции генов

Взаимодействие комплекса ГКС и ГР с «позитивными» GRE и коактиваторами транскрипции, в частности с CBP (*cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (CREB)-binding protein*), PCAF (*p300/CBP-associated factor*), GRIP-1 (*glucocorticoid receptor-interacting protein-1*), активирует транскрипцию генов, кодирующих  $\beta_2$ -адренергические рецепторы, липокортин-1, интерлейкин (IL)-10, DOK-1 (*docking protein-1*), *Dexras*, p11/кальпактин-связывающий белок, тристетрапролин, ГКС-индуцированную лейциновую застезку (ГИЛЗ), фосфатазу-1 митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) (*mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MPK-1)*) [8].

Активная МРК-1 ингибирует за счет дефосфорилирования МАПК. Полагают, что вследствие этого данный фермент обладает выраженным противовоспалительным действием. Вместе с тем сообщается о роли МРК-1 в развитии остеопороза и метаболических нарушений, индуцированных ГКС [12]. В свою очередь, активированный белок ГИЛЗ ингибирует транскрипционный ядерный фактор- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) и пути передачи сигнала в клетке, опосредованные МАПК (в т. ч. за счет ингибирования протеинов Ras и Raf) и фосфатидилинозитол-3-киназой [13]. ГИЛЗ способен ингибировать образование хемокинов CCL3 и CCL5, антигенпрезентирующих молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, костимуляторных молекул CD80 и CD86, что приводит к снижению миграции и активации воспалительных клеток [13].

Белок «цинковых пальцев» тристетрапролин, активированный ГКС, может дестабилизировать мРНК циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС),

IL-1) благодаря связыванию с участками, богатыми адениловыми и уридиловыми нуклеотидами (*adenylate-uridylate-rich elements* (AREs)) в составе мРНК. При этом происходит деаденилирование AREs [14]. Таким образом, ГКС, индуцируя экспрессию мРНК тристетрапролина и последующий синтез этого белка, способствуют быстрому распаду мРНК цитокинов и ферментов и соответственно – снижению их образованию.

### Ингибирование глюкокортикоидами факторов транскрипции

При ХОБЛ вредные частицы сигаретного дыма, дыма от сгорания биоорганического топлива, производственной пыли и химикатов, поступающие в легочную ткань, вызывают воспаление, которое сопровождается активацией факторов транскрипции (NF-κB, AP-1, STAT, CREB) в альвеолярных макрофагах и эпителиальных клетках воздухоносных путей. Эти факторы транскрипции при содействии коактиваторов запускают транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, хемокинов и ферментов [15]. При этом в основе изменения транскрипции генов лежит модификация структуры хроматина.

Известно, что хроматин (материал хромосом) построен из нуклеосом, которые состоят из октамера гистонов (содержит 8 молекул гистонов – по 2 молекулы каждого из классов H2A, H2B, H3 и H4), во-

круг которого молекула ДНК делает приблизительно 1,65 оборота [16]. Гистоны имеют длинные N-концевые «хвосты», богатые остатками лизина (рис. 1). Ацетилирование лизина гистонов приводит к уменьшению их заряда, в результате чего гистоны легче отсоединяются от ДНК, которая становится доступна ферменту РНК-полимеразе II (обеспечивает синтез мРНК), т. е. активируется транскрипция генов (рис. 2). Показано, что ацетилирование остатков лизина гистона H4 сопровождается активированием NF-κB в эпителиальных клетках легких и повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов [17].

Известно, что семейство фактора транскрипции NF-κB включает 5 белков – p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105 (p50) и p100 (p52), которые формируют гомодимерные и гетеродимерные комплексы [18]. NF-κB находится в цитоплазме в неактивной форме за счет влияния ингибитора – IκBα. Классический путь активации NF-κB заключается в стимуляции цитокинами (TNF-α и IL-1β) ферментного комплекса ИККβ (IκB-kinase complex-β), который фосфорилирует 2 сериновых остатка IκBα. Фосфорилированный IκBα подвергается убиквитинилированию и последующему разрушению в протеасоме [19]. Высвобождение гетеродимера NFκB, включающего p65 и p50, от IκBα позволяет этому фактору транскрипции транслоцироваться в ядро, где он посредством домена RHD (*Rel homology domain*) связывается с со-

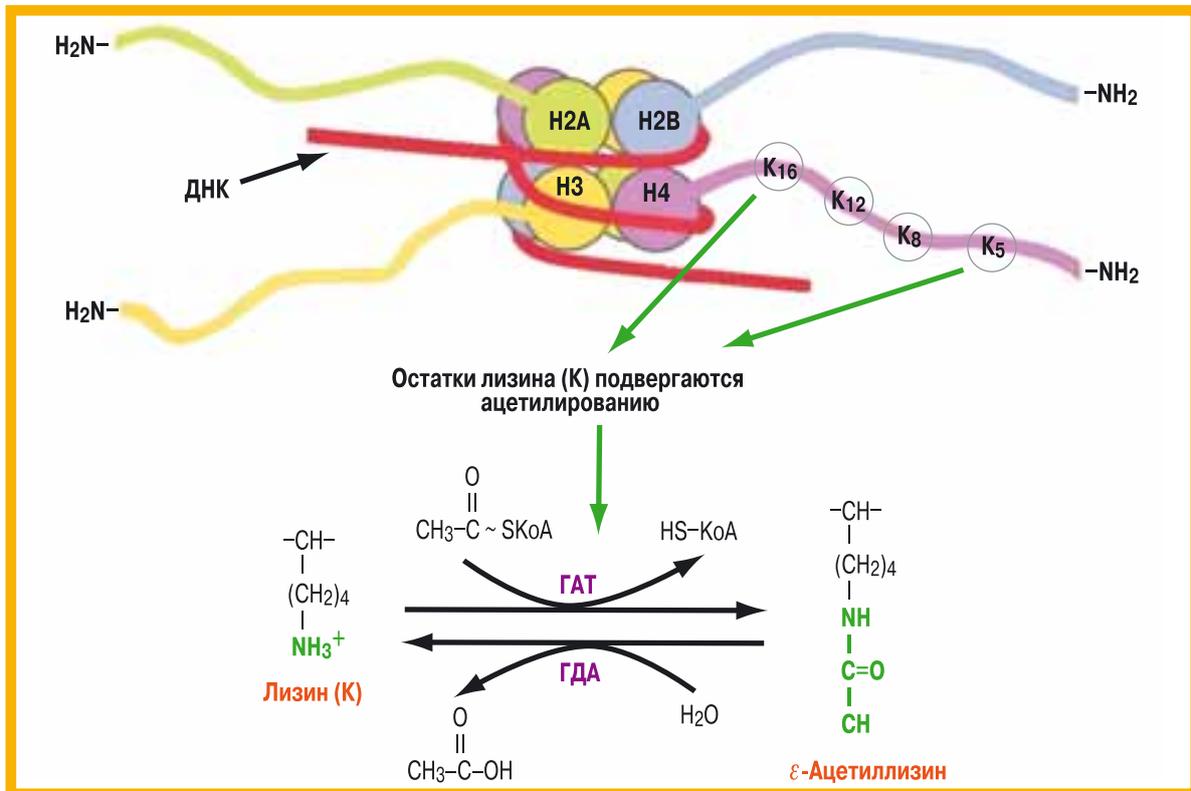


Рис. 1. Структура хроматина: ДНК окружает 8 молекул гистонов (2 молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3, H4). Гистоны имеют длинные концы, богатые остатками лизина. Ацетилирование лизина гистона H4 под действием гистонацетилазы (ГАТ) приводит к изменению его заряда и раскручиванию ДНК. Деацетилирование лизина гистона H4 с участием гистондеацетилазы (ГДА) завершается тем, что ДНК плотно окружает гистоновые белки

Figure 1. The structure of chromatin. Eight molecules of histones (two molecules each of H2A, H2B, H3, H4) are surrounded by DNA. Histone proteins have long tail rich in lysine residues. Acetylation of histone H4 lysine by histone acetyltransferase (HAT) leads to a change in its charge and unwinding of DNA. Histone deacetylase (HDAC) causes deacetylation of histone H4 lysine that results in DNA is tightly wound around histone proteins

ответствующими респонсивными элементами ДНК в промоторах генов и далее взаимодействует с коактиваторами транскрипции, в частности с СВР и PCAF [18, 19]. Тем самым усиливается транскрипция генов, вовлеченных в воспалительный ответ.

Комплекс ГР с ГКС может непосредственно связываться с белком р65 NF- $\kappa$ B и ингибировать его активность [20]. Кроме того, ГКС увеличивают экспрессию мРНК I $\kappa$ B $\alpha$ , что приводит к увеличению продукции этого белка и подавлению активности NF- $\kappa$ B в цитоплазме [21]. Еще один механизм влияния ГКС на NF- $\kappa$ B связан с тем, что взаимодействие деацетирированного ГР с коактиватором транскрипции СВР приводит к ингибированию его ГАТ-активности [17] (рис. 3). Дополнительно ГР привлекает фермент ГДА-2, который подавляет ацетилирование гистонов [17]. Как следствие, ингибируется транскрипция генов-«мишеней» NF- $\kappa$ B.

**Фактор транскрипции AP-1** является гетеродимером, состоящим из субъединиц c-Fos и c-Jun. Дополнительно к c-Jun также могут присоединяться белки ATF и GDP. Провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  способствуют образованию гетеродимера субъединиц, стимулируя активацию c-Jun N-терминальной киназы (JNK), члена семейства МАПК [22]. JNK фосфорилирует субъединицу c-Jun, что позво-

ляет ей димеризоваться с c-Fos. Гетеродимер субъединиц затем связывается с AP-1-респонсивными элементами, расположенными в промоторах генов, и изменяет их транскрипцию. ГР может подавлять транскрипционную активность AP-1, непосредственно взаимодействуя с c-Jun [23]. Согласно данным других исследователей, ГР угнетает AP-1, ингибируя активацию JNK [24].

Ингибирование ГКС NF- $\kappa$ B и AP-1 в периферической крови и воздухоносных путях пациентов с ХОБЛ приводит к подавлению транскрипции и последующего синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), TNF- $\alpha$ ), хемокинов (IL-8, CCL5, моноцитарного хемотаксического протеина-1), ферментов (матричных металлопротеиназ (ММП), индуцибельной NO-синтазы (iNOS), ЦОГ-2), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM, E-селектина), поскольку гены этих провоспалительных факторов в своей промоторной области содержат участки для взаимодействия с NF- $\kappa$ B или AP-1 [7, 8]. Роль названных цитокинов, ферментов, молекул адгезии при ХОБЛ описана ранее.

Помимо NF- $\kappa$ B и AP-1, ГКС могут ингибировать и другие факторы транскрипции, в частности CREB, IRF3 (*interferon regulatory factor-3*), ядерный фактор ак-

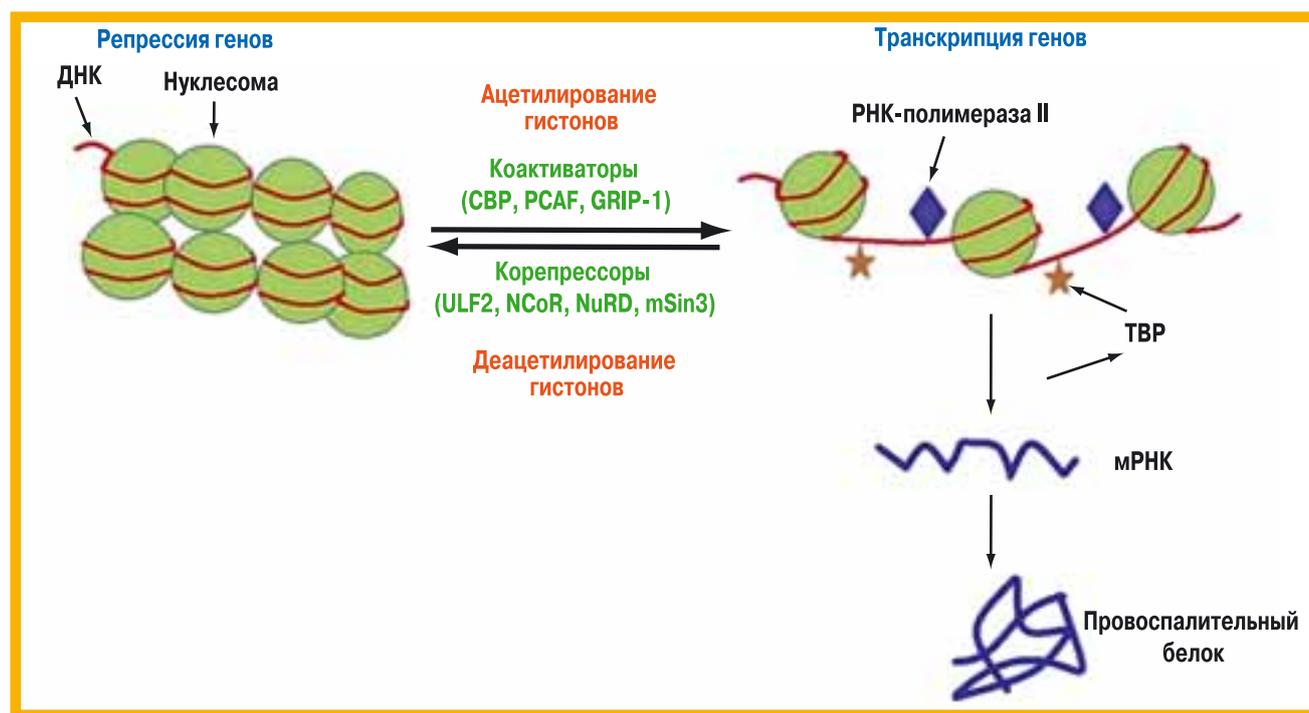


Рис. 2. Транскрипция и репрессия генов в зависимости от ацетилирования гистонов. Коактиваторы транскрипции, в частности CREB-binding protein (СВР), p300/CBP-associated factor (PCAF), glucocorticoid receptor-interacting protein-1 (GRIP-1), имеют собственную гистонацетилазную активность, которая выражается в способности ацетилировать гистоны, что вызывает уменьшение их электрического заряда. Ацетилирование изменяет структуру хроматина, что приводит к раскручиванию ДНК, присоединению ТАТА-связывающего белка (ТВР), ТВР-ассоциированных факторов и РНК-полимеразы II, которая инициирует транскрипцию генов. К корепрессорам транскрипции относятся гистондеацетилаза-2 (ГДА-2), nuclear receptor corepressor (NCoR), NuRD, mSin3, которые проявляют гистондеацетилазную активность, ингибируя транскрипцию генов

Figure 2. Gene transcription and repression depending on the acetylation of histones. Coactivator molecules, such as CBP (CREB-binding protein), PCAF (p300/CBP-associated factor), GRIP-1 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1), have their own histone acetyltransferase activity, which allows them to acetylate histones leading to the reduction in their electric charge. Acetylation changes the chromatin structure, which results in DNA unwinding, binding of TATA-box-binding protein (TBP), TBP-associated factors and RNA polymerase II, thereby causing initiation of gene transcription. Corepressor molecules include histone deacetylase 2 (HDAC2), NCoR (nuclear receptor corepressor), NuRD, mSin3 which possess histone deacetylase activity and inhibit gene transcription

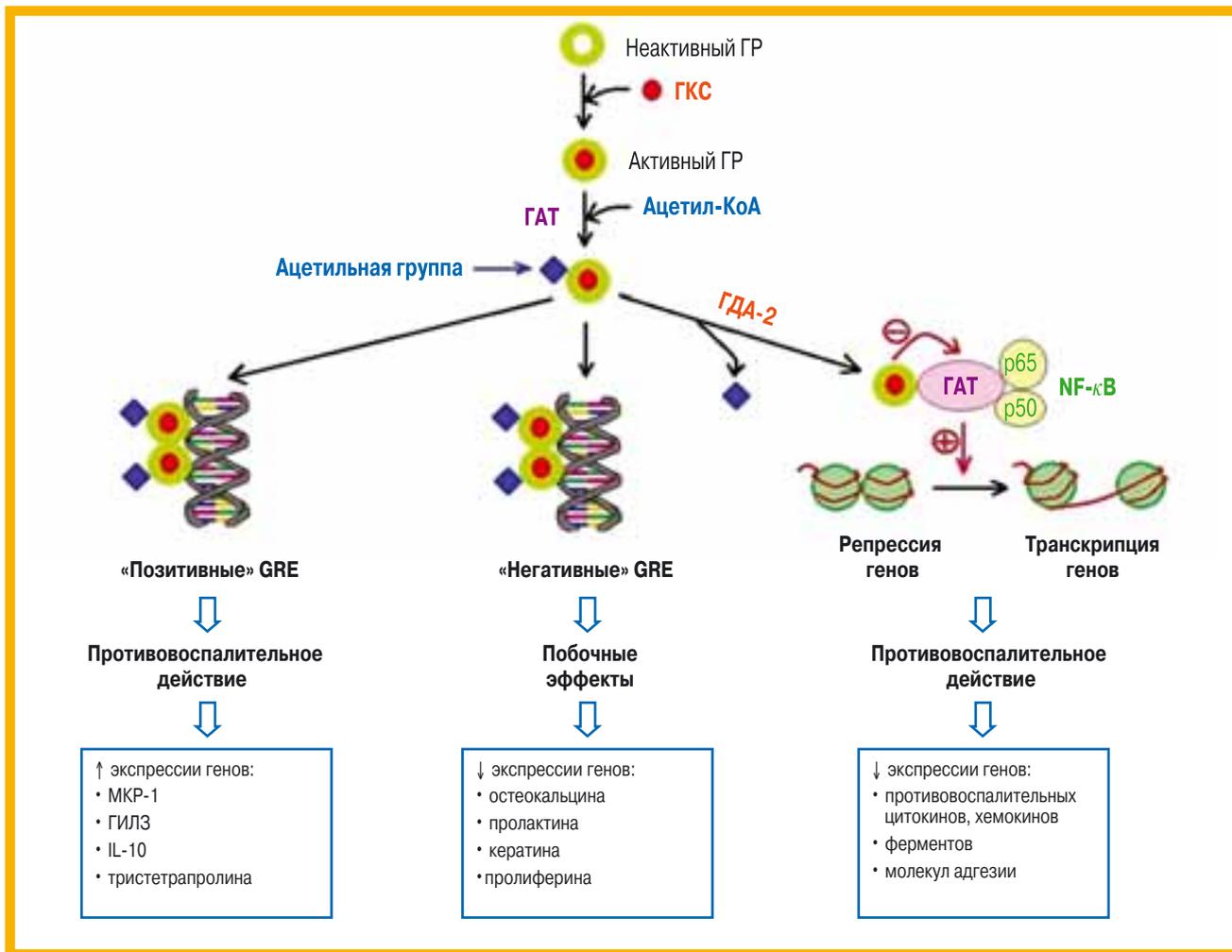


Рис. 3. Регуляция экспрессии генов глюкокортикоидами. После связывания глюкокортикоидами с глюкокортикоидным рецептором (ГР) происходит ацетилирование рецептора под действием гистонацетилаз (ГАТ), в частности CREB-binding protein (СВР) или р300/СВР activating factor (PCAF). Гомодимер ацетилированного глюкокортикоидного рецептора взаимодействует с «положительными» глюкокортикоидореспонсивными элементами ДНК (GRE), которые кодируют противовоспалительные белки. Реже димер ацетилированного глюкокортикоидного рецептора связывается с «негативными» глюкокортикоидореспонсивными элементами ДНК, что приводит к развитию побочных эффектов. Деацетилирование глюкокортикоидного рецептора за счет гистондеацетилазы-2 (ГДА-2) позволяет рецептору взаимодействовать с гистонацетилазами и ингибировать ядерный фактор-κВ (NF-κВ), состоящий из белков р50 и р65, что проявляется в снижении экспрессии генов провоспалительных цитокинов, хемокинов, ферментов, молекул адгезии

Figure 3. Regulation of gene expression by glucocorticoids. Glucocorticoid binding to the glucocorticoid receptor (GR) causes acetylation of receptor by histone acetyltransferases (HAT), such as CBP (CREB-binding protein) or PCAF (p300/CBP activating factor). Homodimer of acetylated GR interacts with positive glucocorticoid response elements (GRE) which encode anti-inflammatory proteins. Less frequently, dimer of acetylated GR binds to negative GRE leading to the development of side effects. Deacetylation of GR by histone deacetylase 2 (HDAC2) allows the receptor to interact with HAT and inhibit nuclear factor κB (NF-κB) composed of p50 and p65 proteins, which manifests in reduced gene expression of proinflammatory cytokines, chemokines, enzymes, adhesion molecules

тивированных Т-клеток (NFAT – nuclear factor of activated T-cells), STAT (signal transducer and activator of transcription), T-Bet (T-box expressed in T-cells), GATA-3 [8].

Отдельного внимания заслуживает **фактор транскрипции GATA-3**. Он стимулирует иммунный ответ с вовлечением Т-хелперов 2-го типа (Th2) и подавляет иммунный ответ, протекающий с преобладанием Th1. GATA-3 транслоцируется из цитоплазмы в ядро, как и ГР, через специальный ядерный белок импортин-α. Фосфорилирование GATA-3 при помощи р38-МАПК усиливает его взаимодействие с импортином-α и, как следствие, ускоряет последующий транспорт в ядро [25]. ГКС ингибируют транслокацию GATA-3 в ядро, т. к. ГР, связанный с гормоном, конкурирует с этим фактором транскрипции за пе-

ремещение в ядро через импортин-α, а также индуцирует МКР-1, которая препятствует фосфорилированию GATA-3 с участием р38-МАПК [10]. Сообщается, что ГКС, ингибируя GATA-3, подавляют дифференцировку и созревание Th2-клеток, а также снижают секрецию этими клетками цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 [10]. Напомним, что для ХОБЛ характерен иммунный ответ, протекающий по Th1-типу.

**Глюкокортикоиды могут угнетать пути передачи сигнала, ассоциированные с митоген-активируемыми протеинкиназами**

МАПК – ферменты, участвующие во внутриклеточной передаче сигнала. Выделяют 3 основные подсемейства МАПК: киназы, регулируемые внеклеточ-

ными сигналами (*extracellular-signal-regulated kinase* – ERK1 и ERK2); c-Jun N-терминальные киназы (JNK1, JNK2 и JNK3) и p38-МАПК ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ ). Как указывалось выше, JNK регулируют активацию фактора транскрипции AP-1 [23]. Полагают, что механизм действия p38-МАПК сводится к посттранскрипционной стабилизации мРНК посредством AREs, расположенных в 3'-нетранслируемой области мРНК. Это подсемейство МАПК стабилизирует мРНК, которые кодируют провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , ФРЭС) и ферменты (ЦОГ-2, ММП-9) [26]. ERK1/2 фосфорилируют различные субстраты и таким образом изменяют их активность. Известно более 150 субстратов, на которые оказывают влияние ERK1/2, включая факторы транскрипции, протеинкиназы, протеинфосфатазы, белки цитоскелета, рецепторы, сигнальные молекулы, апоптотические белки [27]. Комплекс ГР и ГКС угнетает МАПК, ингибируя их фосфорилирование – необходимый этап активации. Сообщается также, что ингибирование активности p38-МАПК под влиянием комплекса ГР–ГКС является результатом индуцированной экспрессии МКР-1 [28].

### Молекулярные механизмы стероидорезистентности

На сегодняшний день известно несколько механизмов развития СР. К ним относятся нарушение связывания и транслокации ГР в ядро, повышенная экспрессия изоформы ГР- $\beta$ , снижение экспрессии МКР-1 и увеличение экспрессии фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (*macrophage migration inhibitory factor* (MIF)), нарушение ацетилирования гистонов.

### Нарушение связывания и транслокации глюкокортикоидного рецептора в ядро

Полагают, что одной из причин сниженной СЧ является повышенная активность и резистентность к ГКС p38-МАПК. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты нескольких исследований. Так, отношение уровня фосфорилированной (активной) p38-МАПК к уровню общей p38-МАПК существенно повышено в мышечной ткани курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми людьми [29]. Дексаметазон не влиял на активность p38-МАПК в альвеолярных макрофагах курящих пациентов с ХОБЛ, индуцированных липополисахаридом [30]. Более того, использование преднизолона не ингибировало активность p38-МАПК в цельной крови пациентов с ХОБЛ *ex vivo* [31]. Показано, что p38-МАПК может сама модулировать активность ГР. Механизм влияния p38-МАПК на ГР связывают с тем, что этот фермент способен фосфорилировать остатки серина, расположенные в позиции 226 рецептора (Ser226), что угнетает связывание ГР с ГКС и снижает транслокацию ГР в ядро. Как следствие, ГР не способен ингибировать транскрипцию генов, кодирующих провоспалительные молекулы. В свою очередь повышенная активность p38-МАПК может привести к повышенной экспрес-

сии генов, кодирующих провоспалительные протеины, и как следствие, к усилению воспалительного процесса [32].

В исследованиях *in vitro* c-Jun N-терминальная киназа так же, как и p38-МАПК, фосфорилировала остатки Ser226 ГР и изменяла его способность модифицировать транскрипцию генов. Последнее обстоятельство было связано с нарушением транслокации ГР в ядро и усиленным его транспортом из ядра [33]. Сообщается, что и 3-я МАПК, ERK, также вовлечена в развитие СР. Так, микробные суперантигены, в частности стафилококковый энтеротоксин В, индуцировали СР Т-лимфоцитов здоровых доноров *in vitro* посредством фосфорилирования и активации ERK, что в дальнейшем приводило к фосфорилированию ГР- $\alpha$  и нарушению транслокации его в ядро [34]. Примечательно, что специфические ингибиторы ERK были способны восстанавливать СЧ [34].

Протеинфосфатаза 2А (ПФ2А) – серинтреониновая фосфатаза, которая участвует в дефосфорилировании ГР. По результатам исследования с клеточной линией моноцитов U937 показано, что снижение СЧ клеток сопровождается снижением активности ПФ2А [35]. Более того, при воздействии омега-3 кислоты (ингибитор ПФ2А) снижалась СЧ, что сопровождалось снижением фосфорилирования Ser226 ГР и нарушением транслокации ГР в ядро моноцитов. Активность и экспрессия ПФ2А снижались в мононуклеарных клетках крови СР-пациентов с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми людьми [35]. Однако в ткани легких курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими людьми активность ПФ2А была повышена [36], что ставит под сомнение вовлеченность ПФ2А в развитие СР при ХОБЛ. Есть и другая точка зрения, согласно которой активность ПФ2А в мононуклеарных клетках периферической крови существенно ниже у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми людьми [37].

По результатам исследования, проведенного *in vitro* с использованием мышинных фибробластов, показано, что нитрозилирование ГР с помощью донора оксида азота (NO) приводит к сниженной способности ГР связываться с ГКС [38]. У курящих пациентов с тяжелой степенью ХОБЛ количество пневмоцитов 2-го типа, экспрессирующих iNOS, в альвеолярных стенках было выше, чем у курящих здоровых людей [39]. Известно, что iNOS в ответ на различные патогенные стимулы способна в течение нескольких часов синтезировать большое количество NO. К сожалению, в литературе отсутствуют сведения о том, может ли нитрозилирование ГР способствовать развитию СР у пациентов с ХОБЛ. Ответ на этот вопрос в будущих исследованиях можно получить, в т. ч. используя ингибиторы iNOS.

Еще один потенциальный механизм развития СР, который пока не нашел подтверждения у пациентов с ХОБЛ, заключается в убиквитинилировании ГР. Так, остатки лизина ГР могут связаться с белком убиквитином. В последующем ГР, конъюгированный с убиквитином, подвергается деградации до

олигопептидов и аминокислот с участием протеасомы [40]. При этом способность ГР влиять на транскрипцию генов в случае убиквитин-протеасомной деградации существенно снижается. Интересно, что протеасомные ингибиторы в исследовании *in vitro* усиливали СЧ [40].

### Снижение экспрессии МКР-1 и повышение экспрессии MIF

Как указывалось, ГКС ослабляют воспалительный процесс путем индукции экспрессии МКР-1, эндогенного ингибитора всех представителей МАПК [28]. С другой стороны, ГКС могут индуцировать транскрипцию MIF, который, в свою очередь, подавляет эффекты ГКС, главным образом за счет дефосфорилирования и ингибирования МКР-1 [41]. Полагают, что сниженная экспрессия МКР-1 и повышенная экспрессия MIF могут являться еще одной причиной СР при ХОБЛ [2]. Действительно, в нейтрофилах крови пациентов с ХОБЛ экспрессия МКР-1 была ниже, а экспрессия MIF была выше, чем у здоровых людей [6]. У пациентов с другим заболеванием, имеющих сниженную СЧ, по сравнению со СЧ-пациентами экспрессия МКР-1 в альвеолярных макрофагах, которые инкубировали с добавлением ГКС, была ниже [42]. Кроме того, макрофаги мышей, у которых отсутствует ген МКР-1, имели сниженный противовоспалительный ответ на ГКС [28], а макрофаги мышей с «выключенным» геном MIF проявляли усиленный противовоспалительный ответ на ГКС [43].

### Повышение экспрессии глюкокортикоидного рецептора- $\beta$

В настоящее время известны 2 изоформы ГР –  $\alpha$  и  $\beta$ . Они образуются путем альтернативного сплайсинга пре-мРНК ГР [9]. Отличие ГР- $\alpha$  от ГР- $\beta$  заключается только в строении С-концевого домена, в котором последние 50 аминокислот (в составе ГР- $\alpha$ ) заменены на уникальную последовательность из 15 аминокислот (в составе ГР- $\beta$ ). Такое различие аминокислотного состава имеет существенное функциональное значение, поскольку ГР- $\beta$  не способен связывать ГКС и изменять активность транскрипции СЧ-генов, [9]. Зато он может регулировать экспрессию мРНК иных, нечувствительных к стероидам генов. Вместе с тем ГР- $\beta$  прямо или косвенно влияет на функционирование изоформы ГР- $\alpha$ , и как следствие, приводит к изменению транскрипции СЧ-генов [44, 45]. Это и служит причиной развития СР.

Единое мнение относительно механизма влияния ГР- $\beta$  на ГР- $\alpha$  отсутствует. Полагают, что ГР- $\beta$  является доминантным негативным ингибитором ГР- $\alpha$ . При этом ГР- $\beta$  способен конкурировать с ГР- $\alpha$  за связывание с GRE или образовывать транскрипционно неактивные гетеродимерные комплексы, состоящие из ГР- $\beta$  и ГР- $\alpha$ . Такие комплексы ГР- $\alpha$ –ГР- $\beta$  не только не влияют на транскрипцию генов, но и уменьшают количество молекул ГР- $\alpha$ , способных подавлять факторы транскрипции AP-1 и NF- $\kappa$ B [44]. Кроме того, ГР- $\beta$  конкурирует с ГР- $\alpha$

за связывание с коактиватором транскрипции GRIP1 и таким образом подавляет транскрипционную активность ГР- $\alpha$  [46]. Однако у пациентов с ХОБЛ уровень мРНК ГР- $\beta$  в большинстве типов клеток, за исключением нейтрофилов, значительно ниже, чем уровень мРНК ГР- $\alpha$  [6], что дает основание усомниться в вероятности существования подобного механизма. Другой потенциальный механизм может быть связан с влиянием ГР- $\beta$  на транслокацию ГР- $\alpha$  в ядро. Гиперэкспрессия ГР- $\beta$  в мышечных клетках линии DO-11.10 снижала транслокацию ГР- $\alpha$  в ядро и угнетала экспрессию мРНК МКР-1, индуцированную ГКС [45].

Еще один механизм действия ГР- $\beta$  не связан с ГР- $\alpha$ , однако может способствовать развитию СР. Так, гиперэкспрессия ГР- $\beta$  в трансгенных мышечных клетках снижала экспрессию мРНК и уровень белка ГДА-2. Более того, подавление экспрессии гена ГР- $\beta$  в клетках бронхоальвеолярной лаважной жидкости людей, резистентных к ГКС, повышало экспрессию гена ГДА-2 [47]. О значении ГДА-2 в развитии СР описано далее.

### Снижение активности гистондеацетилазы

Стимуляция альвеолярных макрофагов здоровых людей TNF- $\alpha$  или IL-1 $\beta$  запускает активацию факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1, что приводит к ацетилированию гистонов и последующей транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины. ГКС, связываясь с ГР- $\alpha$ , препятствуют этим процессам, вовлекая ГДА-2. Этот фермент ингибирует ацетилирование гистонов, индуцированное NF- $\kappa$ B и AP-1, что в свою очередь супрессирует гены цитокинов [15].

У пациентов с ХОБЛ сигаретный дым не только приводит к активации макрофагов, но и способствует снижению активности ГДА-2 [48]. Это усиливает воспалительный ответ, обусловленный активацией NF- $\kappa$ B, и снижает противовоспалительные эффекты ГКС, поскольку ГДА-2 не способна ингибировать ацетилирование гистонов [49]. Показано, что у пациентов с ХОБЛ активность ГДА-2 в легочной ткани, биоптатах бронхов и альвеолярных макрофагах существенно ниже, чем у здоровых людей [48, 50]. Причем снижение активности ГДА-2 в легочной ткани курящих пациентов с ХОБЛ положительно коррелировало со степенью тяжести бронхиальной обструкции, оцененной по объему форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ<sub>1</sub>) [48]. Интересно, что гиперэкспрессия ГДА-2, индуцированная с использованием плазмидного вектора, повышала СЧ альвеолярных макрофагов у пациентов с ХОБЛ до уровня, обнаруживаемого у лиц контрольной группы [49].

Молекулярные механизмы снижения экспрессии ГДА-2 в ответ на вдыхание сигаретного дыма в настоящее время связывают с окислительным нитрозативным стрессом, которые приводят к образованию пероксинитрита. Последний образуется при взаимодействии оксида азота (NO) и супероксид-аниона (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) в дыхательных путях пациентов

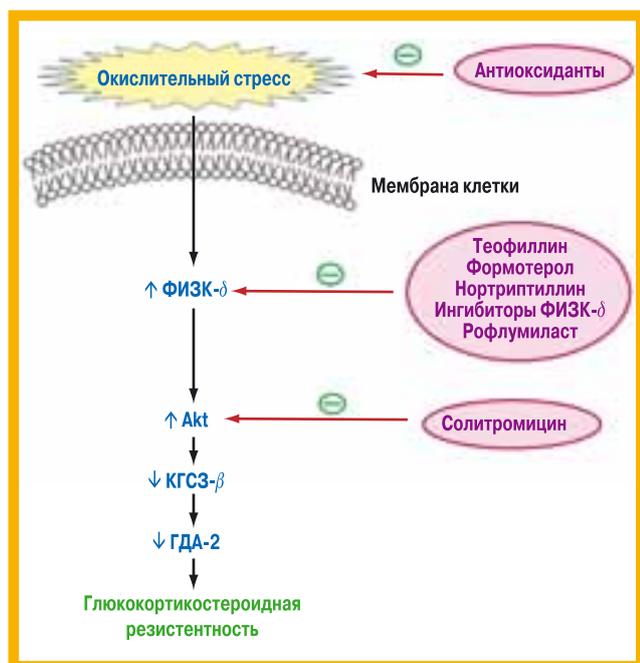


Рис. 4. Предполагаемый механизм развития глюкокортикоидной резистентности, индуцированной окислительным стрессом, и лекарственных препаратов, оказывающие влияние на узловые звенья глюкокортикоидорезистентности. Окислительный стресс, развивающийся в ответ на вдыхание сигаретного дыма, приводит к активации фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗК- $\delta$ ). Дальнейший путь передачи сигнала от ФИЗК- $\delta$  включает фосфорилирование (активацию) киназы Akt, фосфорилирование (ингибирование) киназы гликогенсинтазы- $3\beta$  (КГС3- $\beta$ ) и фосфорилирование (инактивацию) гистондеацетилазы-2 (ГДА-2)

Figure 4. Proposed mechanism of glucocorticoid resistance induced by oxidative stress and drugs that target molecules involved in steroid resistance. Oxidative stress as a result of cigarette smoke exposure activates phosphoinositide-3-kinase  $\delta$  (PI3K $\delta$ ), which leads to phosphorylation (activation) of Akt kinase, phosphorylation (inhibition) of glycogen synthase kinase  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) and phosphorylation (inactivation) of histone deacetylase 2 (HDAC2)

с ХОБЛ [51]. Сообщается, что у курящих пациентов с ХОБЛ уровень пероксинитрита в конденсате выдыхаемого воздуха значительно выше, чем у курящих здоровых людей [52]. Пероксинитрит, реагируя с остатками тирозина ГДА-2, изменяет этот фермент. Модифицированная ГДА-2 связывается с убиквитином и распадается, что приводит к снижению ее активности и СР [53].

Окислительный стресс также приводит к активации фосфатидилинозитол-3-киназы- $\delta$  (ФИЗК- $\delta$ ) (рис. 4). Этот фермент фосфорилирует ряд киназ, в т. ч. Akt (протеинкиназу В), что завершается фосфорилированием и инактивацией ГДА-2. У курящих пациентов с ХОБЛ экспрессия мРНК ФИЗК- $\delta$  в альвеолярных макрофагах выше, чем у курящих здоровых людей [54]. Кроме того, отношение уровня фосфорилированной киназы Akt к уровню общей киназы Akt повышено у курящих пациентов с крайне тяжелой ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми людьми [54].

Киназа Akt, а также ERK1/2 МАПК, могут фосфорилировать (ингибировать) КГС3- $\beta$  – серинтреониновую протеинкиназу, которая способна регулировать активность большого количества субстратов путем их фосфорилирования. Уровень фосфорили-

рованной (неактивной) КГС3- $\beta$  выше в макрофагах легочной ткани курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми людьми и повышается с увеличением степени тяжести ХОБЛ [55]. Окислительный стресс, индуцированный  $H_2O_2$  или экстрактом сигаретного дыма (ЭСД), инактивировал КГС3- $\beta$  в моноцитах крови и бронхиальных эпителиальных клетках линии 16HBE. При этом снижение уровня КГС3- $\beta$  *in vitro* ингибировало способность дексаметазона подавлять секрецию IL-8 и ГМ-КСФ моноцитами крови, стимулированными липополисахаридом, следовательно, приводило к СР клеток. Кроме того, угнетение активности КГС3- $\beta$  приводило к снижению активности ГДА-2 в моноцитах крови, что сопровождалось фосфорилированием серина 394 этого фермента [55].

### Лечебные мероприятия, направленные на преодоление стероидорезистентности

Резистентность к противовоспалительным эффектам ГКС представляется главным препятствием эффективного лечения ХОБЛ. Раскрытие отдельных молекулярных механизмов СР позволило предложить терапевтические подходы, повышающие качество лечения этого заболевания. Стратегия лечения стероидорезистентной ХОБЛ заключается в восстановлении СЧ путем влияния на различные патогенетические пути, приводящие к ее развитию [2].

### Преодоление стероидорезистентности за счет восстановления активности гистондеацетилазы-2

Сообщается, что ряд лекарственных средств повышают активность ГДА-2 и таким образом преодолевают СР, связанную с окислительным стрессом у пациентов с ХОБЛ. Так, инкубация альвеолярных макрофагов курящих пациентов с ХОБЛ с добавлением теофиллина приводила к увеличению активности ГДА-2 в них до нормальных значений, усилению степени подавления дексаметазоном секреции IL-8 этими клетками и повышению их СЧ [50]. Сигаретный дым снижал активность ГДА-2 у мышей, в то время как комбинированное пероральное введение мышам дексаметазона и теофиллина повышало активность этого фермента. Такие эффекты теофиллина обусловлены главным образом ингибированием ФИЗК- $\delta$ , активированной окислительным стрессом [54] (см. рис. 4).

У пациентов с ХОБЛ при низкой концентрации перорального теофиллина в сочетании с иГКС снижалась концентрация хемокина CCL5 и нейтрофильной эластазы в мокроте по сравнению с использованием пациентами одного лишь иГКС. Однако такое комбинированное лечение по сравнению с терапией только иГКС не влияло на уровень IL-8 и количество нейтрофилов в мокроте, ОФВ<sub>1</sub> и качество жизни пациентов с ХОБЛ [56]. Такие результаты свидетельствуют о том, что теофиллин не позволяет решить проблему СР у пациентов с ХОБЛ.

Трициклический антидепрессант нортриптилин повышал экспрессию ГДА-2 в клеточной линии

моноцитов человека U937 путем ингибирования ФИЗК- $\delta$  и подавления фосфорилирования киназы Akt [57]. Более того, селективные (IC87114) и неселективные (LY294002) ингибиторы ФИЗК- $\delta$  также оказались эффективны в ингибировании фосфорилирования киназы Akt и восстановлении активности ГДА-2 в клетках линии U937, подвергнутых окислительному стрессу [54, 57]. Ингаляционные ингибиторы ФИЗК- $\delta$  в настоящее время проходят клинические испытания для лечения ХОБЛ.

Как указывалось, окислительный стресс, развивающийся у курильщиков с ХОБЛ, приводит к СР путем снижения активности ГДА-2. Логично предположить, что антиоксиданты могут преодолевать СР за счет подавления окислительного стресса. В пользу такого предположения косвенно свидетельствуют результаты исследования, в котором при применении N-ацетилцистеина (НАС) повышалась активность общей ГДА в клетках линии U937, сниженную в условиях окислительного стресса [37]. Более того, НАС подавлял секрецию IL-8 и ММП-9 нейтрофилами крови в ответ на стимуляцию клеток ЭСД [6].

Куркумин в концентрации ниже, чем требуется для проявления его антиоксидантных свойств, повышал способность ГКС ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов клетками линии U937, подвергнутых окислительному стрессу (путем инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или ЭСД), а также повышал экспрессию ГДА-2 в этих клетках [58].

Макролид солитромицин также преодолевал СР клеток линии U937, контактировавших с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, путем повышения активности общей ГДА и ингибирования фосфорилирования киназы Akt [37].

### Ингаляционные длительно действующие $\beta_2$ -агонисты

Известно, что у пациентов с ХОБЛ комбинация и ГКС и длительно действующего  $\beta_2$ -агониста (ДДБА) по сравнению с монотерапией и ГКС более эффективно улучшает функцию легких и снижает количество обострений [59]. Такая находка объясняется тем, что сочетанное использование этих препаратов усиливает противовоспалительные эффекты ГКС путем влияния на молекулярные маркеры СР [60–62]. Так, комбинация ДДБА и ГКС по сравнению с ГКС существенно увеличивала транслокацию ГР в ядро клетки и GRE-опосредованную транскрипцию генов в культуре моноцитоподобных клеток линии U937 и первичных бронхиальных эпителиальных клеток человека (ПБЭКЧ) линии BEAS-2B [60]. ДДБА формотерол ингибировал фосфорилирование Сер226 ГР и подавлял фосфорилирование JNK1, а также повышал активность ПФ2А в клетках линии U937 в условиях воздействия на эти клетки IL-2 и IL-4, которые снижали СЧ [61].

Примечательно, что только формотерол (полный агонист  $\beta_2$ -рецепторов), но не салметерол (частичный агонист  $\beta_2$ -рецепторов), восстанавливал СЧ мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ, подвергнутых окислительному стрессу. Кроме того,

только формотерол ингибировал фосфорилирование Akt в клетках U937, стимулированных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [62].

### Ингибитор фосфодиэстеразы-4

Совсем недавно в список препаратов для лечения ХОБЛ вошел селективный ингибитор фосфодиэстеразы-4 (ФДЭ-4) рофлумиласт, регулирующий внутриклеточный уровень циклического аденозинмонофосфата [63]. Этот препарат рекомендуется использовать для снижения количества обострений ХОБЛ. Сочетанное введение его активного метаболита N-оксида рофлумиласта (RNO) и дексаметазона в культуральную среду, содержащую нейтрофилы крови пациентов с ХОБЛ, стимулированные ЭСД, восстанавливало СЧ клеток за счет изменения экспрессии ФИЗК- $\delta$ , ГДА-2, p65 NF- $\kappa$ B, MKP-1, MIF, ERK1/2 и ГР- $\beta$  [6]. Комбинация RNO и дексаметазона также модулировала СЧ ПБЭКЧ. При стимуляции этих клеток агонистом Toll-подобных рецепторов-3 (TLR3) и ЭСД снижалась экспрессия ГДА-2 и увеличивались фосфорилирование p38-MAPK, активность AP-1 и экспрессия p65 NF- $\kappa$ B. Дополнительное введение RNO и дексаметазона к ПБЭКЧ существенно ингибировало эффекты ЭСД и TLR3 [64]. В настоящее время доступна лишь таблетированная форма рофлумиласта. При этом терапевтическая эффективность его использования существенно ограничена из-за побочных симптомов (тошнота, диарея, потеря массы тела, нарушение сна, головная боль) [63], развивающихся вследствие ингибирования ФДЭ-4. Ведутся работы по созданию ингаляционной формы препарата, которая должна быть лишена этого недостатка.

### Заключение

СР у больных ХОБЛ является главным барьером для эффективной терапии этого заболевания. В последние годы был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных основ СР, определены отдельные молекулярные маркеры, которые обуславливают сниженную СЧ. Вместе с тем остается открытым вопрос о подверженности развитию этого состояния: у всех пациентов с ХОБЛ или только у части из них снижена СЧ? Ответ на этот вопрос должны раскрыть будущие исследования.

Следует выделять группы больных с преимущественным механизмом формирования резистентности к ГКС и, таким образом, определять наиболее предпочтительную для них терапию [2]. В будущем, вероятно, появится возможность изыскать биомаркеры преобладающих механизмов СР для того чтобы должным образом стратифицировать терапию.

Имеющиеся сведения о механизмах формирования СР позволили выявить лекарственные препараты, оказывающие влияние на патогенетические звенья этого состояния. Так, по результатам экспериментальных исследований отмечено, что антидепрессант нортриптилин и макролид солитромицин могут оказаться эффективными в преодолении СР, ингибируя фосфорилирование киназы Akt [37, 57].

Однако для того чтобы судить об их эффективности при использовании пациентами с ХОБЛ, требуется проведение долгосрочных клинических исследований. Новые препараты, такие как ингаляционные ингибиторы ФИЗК- $\delta$ , в настоящее время проходят клинические испытания и могут в будущем применяться в сочетании с ГКС. Ингибиторы ФДЭ-4 при пероральном применении имеют побочные эффекты, что ограничивает дозировку и как следствие — их эффективность.

Комбинация иГКС и ДДБА, рекомендованная GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) для лечения больных ХОБЛ групп С и D, безусловно, имеет преимущества перед монотерапией иГКС, но, к сожалению, не влияет на количество обострений ХОБЛ, требующих госпитализации, и смертность, оцененную в течение 12-месячного наблюдения. Более того, положительный эффект сочетанной терапии на качество жизни пациентов можно обнаружить лишь статистически, но клинически он остается незаметным [59]. С учетом экспериментальных исследований, проведенных *in vitro*, можно прийти к заключению, что комбинация иГКС и ДДБА лишь ограниченно повышает СЧ.

По результатам изложенного показана настоятельная необходимость продолжения исследования патогенетических механизмов и молекул, вовлеченных в развитие СР при ХОБЛ, и поиска лекарственных препаратов, обладающих способностью восстанавливать СЧ.

#### Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, связанных с настоящей рукописью.

Работа выполнена в рамках задания 2.18 (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» Белорусской государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» (2014–2016).

#### Conflict of interest

The authors do not have any conflict of interest pertinent to this publication.

The study was done according to the Belarus State Scientific Program "Fundamental and Applied Investigation in Medicine" (2014 – 2016).

## Литература / References

- Boersma M., Lutter R., van de Pol M.A. et al. Long-term effects of budesonide on inflammatory status in COPD. *COPD*. 2008; 5 (2): 97–104.
- Barnes P.J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131 (3): 636–645.
- Babu K.S., Kastelik J.A., Morjaria J.B. Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a pro–con perspective. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2014; 78 (2): 282–300.
- Suissa S., Barnes P.J. Inhaled corticosteroids in COPD: the case against. *Eur. Respir. J.* 2009; 34 (1): 13–16.
- Higham A., Booth G., Lea S. et al. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis. *Respir. Res.* 2015; 16 (1): 98.
- Milara J., Lluch J., Almudever P. et al. Roflumilast N-oxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014; 134 (2): 314–322.
- De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* 2003; 24 (4): 488–522.
- De Bosscher K., Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 2009; 23 (3): 281–291.
- Van der Velden V.H. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm.* 1998; 7 (4): 229–237.
- Maneechotesuwan K., Yao X., Ito K. et al. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PLoS Med.* 2009; 6 (5): e1000076.
- Dostert A., Heinzel T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10 (23): 2807–2816.
- Clark A.R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007; 275 (1–2): 79–97.
- Ayrolid E., Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 2009; 23 (11): 3649–3658.
- Smoak K., Cidlowski J.A. Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26 (23): 9126–9135.
- Barnes P.J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD*. 2004; 1 (1): 59–70.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; 389 (6648): 251–260.
- Ito K., Barnes P.J., Adcock I.M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 $\delta$ -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20 (18): 6891–6903.
- Hoesel B., Schmid J.A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer*. 2013; 12: 86.
- Gilmore T.D. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006; 25 (51): 6680–6684.
- De Bosscher K., Vanden Berghe W., Vermeulen L. et al. Glucocorticoids repress NF- $\kappa$ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97 (8): 3919–3924.
- Auphan N., DiDonato J.A., Rosette C. et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995; 270 (5234): 286–290.
- Johnson G.L., Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002; 298 (5600): 1911–1912.
- Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (28): 16483–16486.
- Caelles C., Gonzalez-Sancho J.M., Munoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev.* 1997; 11: 3351–3364.
- Maneechotesuwan K., Xin Y., Ito K. et al. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J. Immunol.* 2007; 178 (4): 2491–2498.
- Cuenda A., Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007; 1773 (8): 1358–1375.

27. Roskoski R.J. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 2012; 66 (2): 105–143.
28. Abraham S.M., Lawrence T., Kleiman A. et al. Anti-inflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J. Exp. Med.* 2006; 203 (8): 1883–1889.
29. Lemire B.B., Debigaré R., Dubé A. et al. MAPK signaling in the quadriceps of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.* 2012; 113 (1): 159–166.
30. 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.
31. Singh D., Smyth L., Borrill Z. et al. A randomized, placebo-controlled study of the effects of the p38 MAPK inhibitor SB-681323 on blood biomarkers of inflammation in COPD patients. *J. Clin. Pharmacol.* 2010; 50 (1): 94–100.
32. Mercado N., Hakim A., Kobayashi Y. et al. Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e41582.
33. Itoh M., Adachi M., Yasui H. et al. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 2002; 16 (10): 2382–2392.
34. Li L.B., Goleva E., Hall C.F. et al. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114 (5): 1059–1069.
35. Kobayashi Y., Mercado N., Barnes P.J., Ito K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One.* 2011; 6 (12): e27627.
36. Wallace A.M., Hardigan A., Geraghty P. et al. Protein phosphatase 2A regulates innate immune and proteolytic responses to cigarette smoke exposure in the lung. *Toxicol. Sci.* 2012; 126 (2): 589–599.
37. Kobayashi Y., Wada H., Rossios C. et al. A novel macro-lide/fluoroketolide, solithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 169 (5): 1024–1034.
38. Galigniana M.D., Piwien-Pilipuk G., Assrey J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55 (2): 317–323.
39. Maestrelli P., Páska C., Saetta M. et al. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur. Respir. J.* 2003; 21 (6): 971–976.
40. Wallace A.D., Cidlowski J.A. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (46): 42714–42721.
41. Flaster H., Bernhagen J., Calandra T., Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol. Endocrinol.* 2007; 21 (6): 1267–1280.
42. Bhavsar P., Hew M., Khorasani N. et al. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax.* 2008; 63 (9): 784–790.
43. Aeberli D., Yang Y., Mansell A. et al. Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase. *FEBS Lett.* 2006; 580 (3): 974–981.
44. 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.
45. Goleva E., Li L.B., Eves P.T. et al. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173 (6): 607–616.
46. Charmandari E., Chrousos G.P., Ichijo T. et al. The human glucocorticoid receptor (hGR)  $\beta$  isoform suppresses the transcriptional activity of hGR $\alpha$  by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol. Endocrinol.* 2005; 19 (1): 52–64.
47. Li L.B., Leung D.Y., Martin R.J., Goleva E. Inhibition of histone deacetylase 2 expression by elevated glucocorticoid receptor beta in steroid-resistant asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182 (7): 877–883.
48. Ito K., Ito M., Elliott W.M. et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl. J. Med.* 2005; 352 (19): 1967–1976.
49. Ito K., Yamamura S., Essilfie-Quaye S. et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- $\kappa$ B suppression. *J. Exp. Med.* 2006; 203 (1): 7–13.
50. Cosio B.G., Tsaprouni L., Ito K. et al. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J. Exp. Med.* 2004; 200 (5): 689–695.
51. Barnes P.J. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest.* 2006; 129 (1): 151–155.
52. Osoata G.O., Hanazawa T., Brindicci C. et al. Peroxynitrite elevation in exhaled breath condensate of COPD and its inhibition by fudosteine. *Chest.* 2009; 135 (6): 1513–1520.
53. Osoata G., Yamamura S., Ito M. et al. Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 384 (3): 366–371.
54. To Y., Ito K., Kizawa Y. et al. Targeting phosphoinositide-3-kinase- $\delta$  with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182 (7): 897–904.
55. Ngkelo A., Hoffmann R.F., Durham A.L. et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  modulation of glucocorticoid responsiveness in COPD. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2015; 309 (10): L1112–L1123.
56. Ford P.A., Durham A.L., Russell R.E. et al. Treatment effects of low-dose theophylline combined with an inhaled corticosteroid in COPD. *Chest.* 2010; 137 (6): 1338–1344.
57. Mercado N., To Y., Ito K., Barnes P.J. Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of PI3K- $\delta$ . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011; 337 (2): 465–470.
58. Meja K.K., Rajendrasozhan S., Adenuga D. et al. Curcumin restores corticosteroid function in monocytes exposed to oxidants by maintaining HDAC2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008; 39 (3): 312–323.
59. Nannini L.J., Poole P., Milan S.J., Kesterton A. Combined corticosteroid and long-acting beta2-agonist in one inhaler versus inhaled corticosteroids alone for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013; 8: CD006826.
60. Usmani O.S., Ito K., Maneechotesuwan K. et al. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172 (6): 704–712.
61. Kobayashi Y., Mercado N., Miller-Larsson A. et al. Increased corticosteroid sensitivity by a long acting  $\beta_2$  agonist formoterol via  $\beta_2$  adrenoceptor independent protein

- phosphatase 2A activation. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2012; 25 (3): 201–207.
62. 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.
63. Авдеев С.Н. Новые возможности противовоспалительной терапии хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология.* 2013; 4: 95–101. / Avdeev S.N. New perspectives of anti-inflammatory therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya.* 2013; 4: 95–101 (in Russian).
64. Milara J., Morell A., Ballester B. et al. Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist. *Respir. Res.* 2015; 16: 12.

Поступила 12.04.16  
Received April 12, 2016

#### Информация об авторах

**Кадушкин Алексей Геннадьевич** – к. м. н., ассистент кафедры биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»; тел.: (8017) 272-67-88; e-mail: kadushkyn@gmail.com

**Таганович Анатолий Дмитриевич** – д. м. н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»; тел.: (8017) 272-67-64; e-mail: taganovich@bsmu.by

#### Author information

**Aleksey G. Kadushkin**, Candidate of Medicine, Assistant Lecturer at Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University, tel.: (8017) 272-67-88; e-mail: kadushkyn@gmail.com

**Anatoliy D. Taganovich**, Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University, tel.: (8017) 272-67-64; e-mail: taganovich@bsmu.by