

ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА МИГРАЦИЮ НК-КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

**Кадушкин А.Г.¹, Таганович А.Д.¹, Мовчан Л.В.², Зафранская М.М.³,
Шман Т.В.²**

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

² ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

³ УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского
государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. До настоящего времени не выявлены лекарственные средства, которые могли бы замедлить неуклонное прогрессирование хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или оказали существенное влияние на смертность пациентов. Поэтому продолжаются исследования, направленные на изучение механизмов развития ХОБЛ и поиск препаратов, влияющих на молекулярные звенья его патогенеза. Целью данной работы явилось определить способность комбинации азитромицина и кортикостероидов влиять на миграцию НК-клеток крови пациентов с ХОБЛ. В настоящем исследовании с помощью метода проточной цитометрии определена экспрессия хемокиновых рецепторов CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR6 на поверхности НК-клеток периферической крови (с фенотипом CD3⁺CD56⁺) у 54 курящих пациентов с ХОБЛ, 21 курящего здорового человека и 20 здоровых некурящих лиц. Кроме того, изучено влияние азитромицина (10 мкг/мл) и будесонида (10 нМ) на миграцию НК-клеток пациентов с ХОБЛ (n = 8) к хемокинам CCL5 (10 нМ) и CXCL10 (10 нМ). Установлено, что у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми в крови повышено процентное содержание НК-клеток, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5. При этом отсутствуют различия относительного количества этих субпопуляций НК-клеток между здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми. Процентное содержание НК-клеток, обладающих хемокиновыми рецепторами CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7, не различается между тремя группами обследованных лиц. Добавление к клеточной суспензии будесонида приводило к снижению миграции НК-клеток крови к хемокинам CCL5 и CXCL10. Азитромицин также подавлял перемещение НК-клеток крови к этим хемокинам. Сочетанное использование азитромицина и будесонида оказывало более выраженное ингибирующее воздействие на хемотаксис НК-клеток к хемокинам CCL5 и CXCL10, чем любой

Адрес для переписки:

Кадушкин Алексей Геннадьевич
УО «Белорусский государственный медицинский
университет»
220083, Республика Беларусь, г. Минск,
пр. Дзержинского, 83.
Тел.: 8 (10-37517) 373-93-92.
E-mail: kadushkyn@gmail.com

Address for correspondence:

Aliaksei G. Kadushkin
Belarusian State Medical University
83 Dzerzhinski Ave
Minsk
220083 Republic of Belarus
Phone: +375 (17) 373-93-92.
E-mail: kadushkyn@gmail.com

Образец цитирования:

А.Г. Кадушкин, А.Д. Таганович, Л.В. Мовчан,
М.М. Зафранская, Т.В. Шман «Влияние азитромицина
на миграцию НК-клеток крови пациентов с
хронической обструктивной болезнью легких»
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.
С. 309-318. doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2581

© Кадушкин А.Г. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.G. Kadushkin, A.D. Tahanovich, L.V. Movchan,
M.M. Zafranskaya, T.V. Shman "Effect of azithromycin
on migration of peripheral blood NK cells from patients with
chronic obstructive pulmonary disease", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2,
pp. 309-318. doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2581

© Kadushkin A.G. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOA-2581

из этих препаратов по отдельности. Полученные результаты свидетельствуют об изменении профиля хемокиновых рецепторов НК-клеток при ХОБЛ и демонстрируют преимущества комбинированного использования глюкокортикоидов и азитромицина для лечения этого заболевания.

Ключевые слова: ХОБЛ, НК-клетки, хемокиновые рецепторы, хемотаксис, CCL5, CXCL10, азитромицин, будесонид

EFFECT OF AZITHROMYCIN ON MIGRATION OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Kadushkin A.G.^a, Tahanovich A.D.^a, Movchan L.V.^b, Zafranskaya M.M.^c, Shman T.V.^b

^a *Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

^b *Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyani, Minsk Region, Republic of Belarus*

^c *International A. Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

Abstract. Currently, no drugs have been identified that could slow progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), or have a significant impact on patient mortality. Therefore, research continues aimed at studying the mechanisms of COPD development and searching for drugs that affect its molecular pathogenesis. The aim of our work was to determine the ability of azithromycin combined with corticosteroids to affect the migration of peripheral blood NK cells from the COPD patients. In the present study, we have measured expression of chemokine receptors CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR6 on the surface of peripheral blood NK cells (CD3-CD56⁺) by means of flow cytometry in 54 smoking patients with COPD, 21 healthy smokers, and 20 healthy non-smokers. Moreover, the effect of azithromycin (10 µg/mL) and budesonide (10 nM) on the migration of NK cells from COPD patients (n = 8) towards CCL5 (10 nM) and CXCL10 (10 nM) was determined. We found that the percentage of NK cells expressing CXCR3 and CCR5 chemokine receptors was increased in smoking patients with COPD compared with healthy smokers and healthy non-smokers. However, the proportion of these NK cell subsets did not differ between healthy smokers and healthy non-smokers. There were no significant differences in the percentage of NK cells expressing CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7 chemokine receptors between the three groups of subjects. Addition of budesonide to the cell suspensions decreased the migration of blood NK cells towards CCL5 and CXCL10. Azithromycin was also shown to suppress the migration of blood NK cells towards these chemokines. The combination of azithromycin and budesonide was more potent at inhibiting NK cell chemotaxis towards CCL5 and CXCL10 than any of these drugs added alone. Our results demonstrate a change in the chemokine receptor profile of NK cells in COPD patients and indicate the advantages of the combined use of corticosteroids and azithromycin for COPD treatment.

Keywords: COPD, NK cells, chemokine receptors, chemotaxis, CCL5, CXCL10, azithromycin, budesonide

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) занимает лидирующие позиции среди причин заболеваемости и смертности во всем мире. По подсчетам ученых от этого заболевания страдают более 300 миллионов человек, большинство из которых проживают в странах с низким и средним уровнем дохода [24].

Клетки иммунной системы, включая нейтрофилы, макрофаги, субпопуляции лимфоцитов и дендритные клетки, играют ключевую роль в развитии воспаления дыхательных путей и деструкции легочной ткани при ХОБЛ [4]. НК-клетки (другое название – естественные киллеры), которые относят к клеткам врожденного иммунитета, находятся на острие защиты организма человека

от инфекций – фактора риска развития обостренных ХОБЛ [12, 19]. Относительное количество этих клеток повышено в индуцированной мокроте курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми [23], а также в крови пациентов с поздними (3-4) стадиями ХОБЛ по сравнению с больными с начальными (1-2) стадиями [18], что свидетельствует об их вовлеченности в развитие и прогрессирование заболевания.

Миграция НК-клеток крови в дыхательные пути происходит за счет расположенных на их поверхности хемокиновых рецепторов CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR5, CCR6, CCR7. Встреча данных рецепторов со своими лигандами (хемокинами) определяет перемещение клеток по градиенту концентрации хемокинов в места воспаления [22]. Достигнув очага воспаления в легких, НК-клетки продуцируют цитокины (интерферон γ , фактор некроза опухоли α , интерлейкин-8 (IL-8), IL-17A, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и цитотоксические молекулы (перфорины, гранзим В), индуцируя гибель клеток-мишеней [2, 8]. Вместе с тем точные сведения об изменении экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности НК-клеток крови при ХОБЛ отсутствуют [19].

Сообщается, что НК-клетки пациентов с ХОБЛ являются устойчивыми к действию глюкокортикостероидов (ГКС), лекарственных средств с противовоспалительным механизмом действия [9], что может служить причиной ограниченного терапевтического ответа при использовании этих препаратов [17]. Проведенные нами ранее исследования позволили установить синергичное супрессирующее действие ГКС и азитромицина в отношении секреции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) в целом и НК-клетками крови в частности [14, 15].

Макролидный антибиотик азитромицин обладает бактериостатической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также атипичных возбудителей инфекций. Он ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, ослабляя миграцию клеток иммунной системы в дыхательные пути [15, 20]. Однако способность этого препарата потенцировать эффекты ГКС, связанные с угнетением миграции НК-клеток, до сих пор не известна.

Целью настоящего исследования явилось определить способность комбинации азитромицина и кортикостероидов влиять на миграцию НК-клеток крови пациентов с ХОБЛ.

Материалы и методы

Характеристика пациентов

В исследование экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности НК-клеток периферической крови были включены 54 курящих пациента с ХОБЛ, 21 курящий здоровый человек и 20 здоровых некурящих лиц. Донорами крови для изучения хемотаксиса явились 8 больных ХОБЛ (табл. 1). Исследования, выполненные в рамках данной работы, были проведены до начала распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

Критериями включения больных в исследование были установленный в соответствии с критериями Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких (GOLD) диагноз ХОБЛ, индекс курящего человека более 10 пачка/лет, возраст старше 40 лет, отсутствие других заболеваний бронхолегочной системы (бронхиальной астмы, бронхоэктатической болезни, интерстициальных заболеваний легких), аллергических и онкологических заболеваний, декомпенсации сахарного диабета, нарушений свертывающей системы крови. Пациенты с ХОБЛ исключались из исследования, если принимали системные ГКС, перенесли инфекционное заболевание или обострение ХОБЛ в течение 6 недель до начала исследования.

В контрольные группы вошли условно здоровые добровольцы с нормальными показателями спирометрии, не имевшие в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 8 от 21.01.2019).

Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности НК-клеток крови

Венозную кровь (2 мл) у пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц забирали утром в пробирку, содержащую антикоагулянт К3 ЭДТА. Все исследования проводили в день взятия крови. К 100 мкл крови добавляли моноклональные антитела к поверхностным антигенам в различных сочетаниях: (1) CXCR3 FITC / CCR5 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD56 PE-Cy7 / CCR6 APC / CD45 APC-Cy7; (2) CXCR4 FITC / CCR7 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD56 PE-Cy7 / CD45 APC-Cy7; (3) CXCR6 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD56 PE-Cy7 / CD45 APC-Cy7 (Exbio, Прага, Чешская Республика; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США). Со-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY PARTICIPANTS

Показатель Parameter	Экспрессия хемокиновых рецепторов Expression of chemokine receptors			Хемотаксис Chemotaxis
	Курящие пациенты с ХОБЛ Smokers with COPD	Курящие здоровые люди Healthy smokers	Некурящие здоровые люди Healthy non-smokers	Курящие пациенты с ХОБЛ Smokers with COPD
Общее количество No. of subjects	54	21	20	8
Пол, м/ж Sex, M/F	44/10	17/4	16/4	6/2
Возраст, годы Age, years	64,0 (59,8-69,0)	62,0 (55,0-65,5)	61,0 (54,0-66,0)	61,5 (59,0-68,3)
Активные курильщики / экс-курильщики Current smokers / ex-smokers	26/28	12/9	0/0	4/4
Индекс курящего человека, пачка/лет Smoking history, pack-years	35,0 (22,0-42,8)	32,0 (21,0-36,0)	0	39,0 (16,3-43,8)
ОФВ ₁ , % от должного FEV ₁ , % predicted	44,0 (32,8-51,0)	102,0 (98,5-109,0)	101,5 (95,0-112,3)	53,5 (43,3-63,8)
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, % FEV ₁ /FVC, %	57,0 (50,0-62,0)	82,0 (78,5-87,0)	84,0 (78,0-88,8)	59,0 (42,8-63,5)
Степень тяжести ХОБЛ в соответствии с GOLD (1/2/3/4), количество больных GOLD stage (1/2/3/4), No. of patients	0/17/31/6	–	–	0/5/3/0

Примечание. Данные представлены в абсолютных значениях или в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й – 75-й процентиля). ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за первую секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; GOLD – Глобальная инициатива по хронической обструктивной болезни легких. Приведенные в таблице значения ОФВ₁ и ОФВ₁/ФЖЕЛ для курящих пациентов с ХОБЛ получены после проведения бронходилатационной пробы.

Note. Data are presented as absolute number or median and interquartile range (25th – 75th percentiles). FEV₁, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. FEV₁ and FEV₁/FVC values given in the table for smokers with COPD were obtained on the basis of post-bronchodilator spirometry.

ответствующие изотипические антитела, конъюгированные с флуорохромами FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикоэритрин) или APC (аллофикоцианин), использовали в качестве контролей. Образцы тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте. Спустя 20 минут разрушали эритроциты путем добавления 1 мл лизирующего раствора Versalyse (Beckman Coulter, Марсель, Франция). Фенотипирование клеток проводили на проточном цитометре Navios с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). НК-клетки опреде-

ляли как CD45⁺CD3⁺CD56⁺ события, аналогично стратегии, описанной ранее [9]. Далее оценивали экспрессию хемокиновых рецепторов на поверхности этой субпопуляции лимфоцитов.

Выделение МПКК

Для проведения культуральных работ венозную кровь пациентов в объеме 15 мл помещали в пробирку, содержащую антикоагулянт гепарин натрия (10 ЕД/мл, Белмедпрепараты, Минск, Республика Беларусь). Используя раствор Lymphopure (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США), путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077 г/мл из периферической крови выделя-

ли МКПК. Затем эти клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 /мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, Гранд Айленд, Нью-Йорк, США), обогащенной 1%-ной фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Capricorn Scientific, Эбсдорфергрунд, Германия).

Оценка миграции НК-клеток под влиянием лекарственных средств

Клеточную суспензию (1 мл) помещали в стерильные пробирки и инкубировали с кортикостероидом будесонидом (10 нМ), антибиотиком азитромицином (10 мкг/мл) (Glentham Life Sciences Ltd, Коршам, Уилтшир, Великобритания) или их комбинацией в увлажненной 5% CO₂/95% воздушной среде при 37°C. По истечении 1 часа 100 мкл клеточной суспензии переносили в верхние камеры (лунки) 24-луночного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм (Costar Corning, США). В нижние камеры планшета помещали 600 мкл буфера, содержащего культуральную среду RPMI 1640, обогащенную 1% ФТС и хемокинами CXCL10 (10 нМ, Gibco, Карлсбад, Калифорния, США) или CCL5 (10 нМ, R&D systems, Миннеаполис, Миннесота, США). Буфер, не содержащий хемокины, использовали в качестве контроля. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂/95% атмосферного воздуха в течение 2 часов. Клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали и отмывали при помощи фосфатного солевого буфера (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша). Пробирки центрифугировали при 500 g, комнатной температуре в течение 5 минут, после чего клетки ресуспендировали в ФСБ. Добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (CD3-FITC, CD56-PC7, CD45-APC Alexa Fluor 750, Beckman Coulter, Марсель, Франция; Exbio, Прага, Чешская Республика). Клетки инкубировали в темноте (20 минут, 4°C), отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0,2%-ный бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США) и фиксировали с использованием 300 мкл 1%-ного раствора параформальдегида. После настройки проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США) на среднюю скорость потока клеток подсчитывали количество НК-клеток в течение 100 секунд.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). При анализе экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности НК-клеток крови для сравнения трех независимых выборок применяли непараметрический тест Краскела–Уоллиса. Далее показатели сравнива-

ли попарно путем определения критерия Данна. Оценка результатов хемотаксиса осуществлялась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия хемокиновых рецепторов на НК-клетках крови

Результаты нашего исследования показали, что процентное содержание НК-клеток, экспрессирующих рецепторы CXCR3, повышено в крови у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми (рис. 1). При этом различия в процентном содержании этих клеток между здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми отсутствовали. Аналогичные результаты были получены при сравнении относительного количества НК-клеток, несущих на своей поверхности рецепторы CCR5, между тремя группами людей, включенных в исследование.

Проведенный в настоящей работе цитометрический анализ продемонстрировал, что большинство НК-клеток крови пациентов с ХОБЛ и здоровых людей экспрессируют хемокиновые рецепторы CXCR4. Так, 78,1% (медиана) популяции НК-клеток у здоровых некурящих людей экспрессируют CXCR4, 79,7% – у здоровых курильщиков, 80,1% – у пациентов с ХОБЛ. При этом отсутствуют различия процентного содержания НК-клеток, содержащих эти хемокиновые рецепторы, между пациентами с ХОБЛ, здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми.

Как и в случае с рецепторами CXCR4, относительное количество НК-клеток крови, имеющих на своей поверхности рецепторы CCR6, CCR7 и CXCR6, не отличается у пациентов с ХОБЛ и двух групп сравнения. Однако доля НК-клеток, экспрессирующих эти хемокиновые рецепторы, составляет меньшую часть всей популяции данных клеток: 7,8% – CCR6, 15,2% – CCR7 и 2,8% – CXCR6 (приведены медианные значения, полученные у здоровых некурящих людей).

Влияние лекарственных средств на миграцию НК-клеток крови

Добавление к клеточной суспензии будесонида приводило к снижению миграции НК-клеток крови к хемокинам CCL5 и CXCL10 (рис. 2). Азитромицин также подавлял перемещение НК-клеток крови к хемокинам CCL5 и CXCL10, но его способность ингибировать хемотаксис НК-клеток превосходила действие будесонида. При

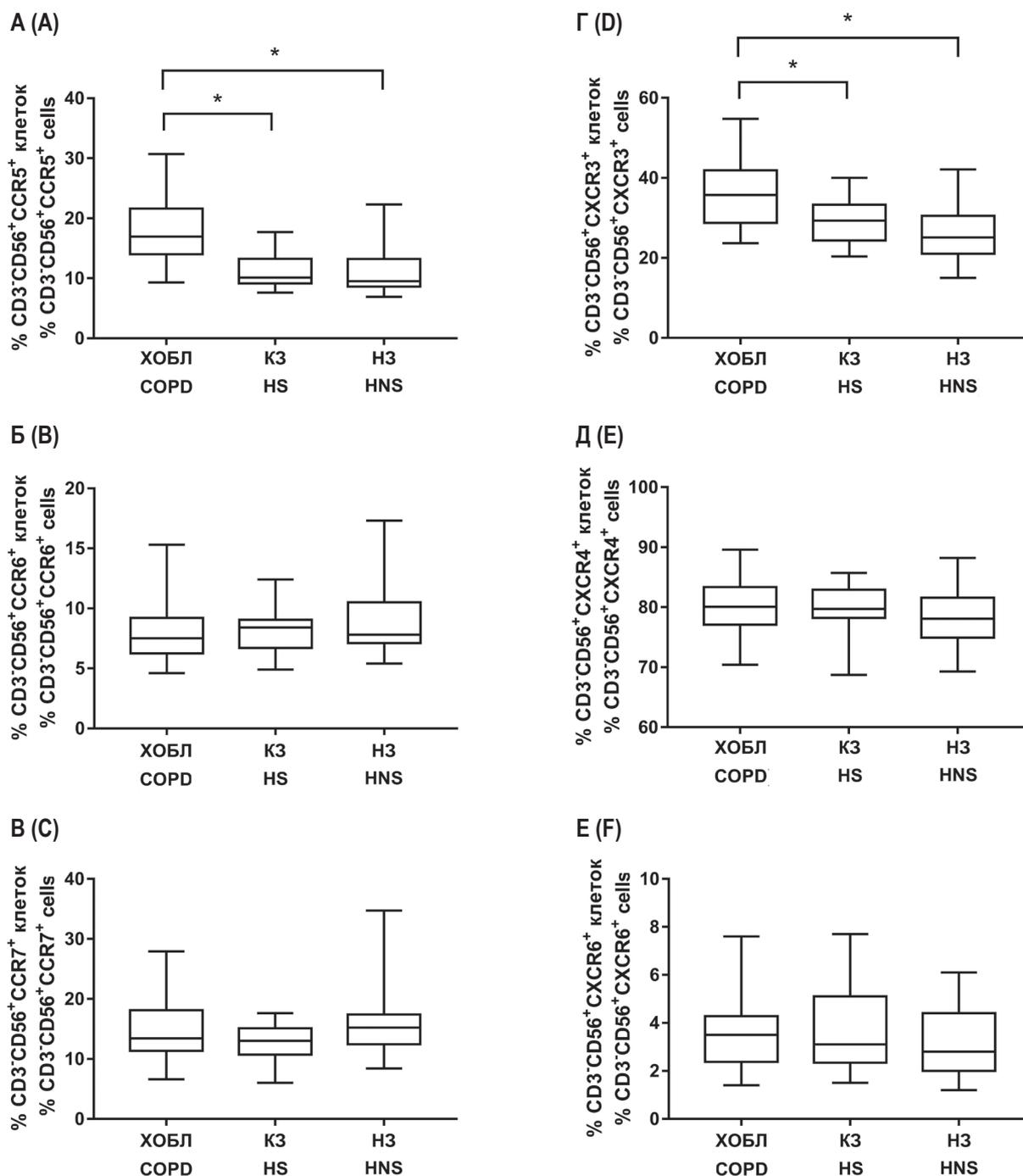


Рисунок 1. Экспрессия хемокиновых рецепторов на поверхности НК-клеток периферической крови

Примечание. Приведены графики, демонстрирующие процентное содержание НК-клеток (относительно всех НК-клеток), имеющих хемокиновые рецепторы CCR5 (А), CCR6 (Б), CCR7 (В), CXCR3 (Г), CXCR4 (Д), CXCR6 (Е), в периферической крови обследованных лиц. Диаграммы демонстрируют диапазон значений, медиану, 25-й и 75-й процентиля; ХОБЛ – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких, КЗ – курящие здоровые люди, НЗ – некурящие здоровые люди; * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей контрольной группой.

Figure 1. Expression of chemokine receptors on the surface of peripheral blood NK cells

Note. Graphs demonstrate the percentage of NK cells (in relation to all NK cells) expressing chemokine receptors CCR5 (A), CCR6 (B), CCR7 (C), CXCR3 (D), CXCR4 (E), CXCR6 (F) in the peripheral blood of the examined subjects. Plots show range, median, 25th and 75th percentiles; COPD, patients with chronic obstructive pulmonary disease; HS, healthy smokers; HN, healthy non-smokers; *, $p < 0.05$ compared with the corresponding control group.

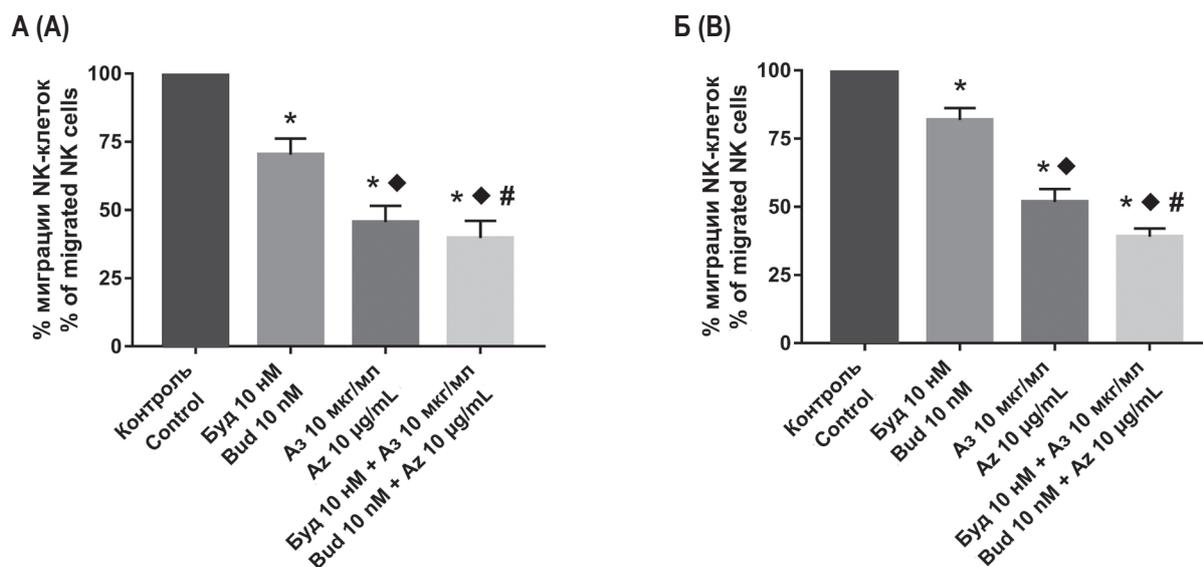


Рисунок 2. Влияние азитромицина и будесонида на хемотаксис НК-клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ в направлении CCL5 и CXCL10

Примечание. Представлены графики, демонстрирующие влияние азитромицина (Аз, 10 мкг/мл), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию НК-клеток, индуцированную 10 нМ CCL5 (А) и 10 нМ CXCL10 (Б). Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; $n = 8$. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (клетками крови, находившимися в присутствии хемокина, но в отсутствие лекарственных средств); * – $p < 0,05$ по сравнению с Буд 10 нМ; # – $p < 0,05$ по сравнению с Аз 10 мкг/мл.

Figure 2. Effect of azithromycin and budesonide on the chemotaxis of peripheral blood NK cells from COPD patients towards CCL5 and CXCL10

Note. Graphs show the effect of azithromycin (Az, 10 µg/ml), budesonide (Bud, 10 nM) and their combination on NK cell migration induced by 10 nM CCL5 (A) and 10 nM CXCL10 (B). Results are presented as mean \pm standard error of the mean; $n = 8$. *, $p < 0.05$ compared with control (blood cells cultured in the presence of chemokine, but in the absence of drugs); *, $p < 0.05$ compared with Bud 10 nM; #, $p < 0.05$ compared with Az 10 µg/mL.

совместном применении азитромицина и будесонида наблюдалось синергичное ингибирующее действие этих препаратов на миграцию НК-клеток крови в направлении обоих хемокинов.

Обсуждение

Настоящая работа проведена в два этапа. Вначале мы определили хемокиновые рецепторы, экспрессия которых повышена на поверхности НК-клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ. Так, у данной категории больных обнаружено повышение процентного содержания естественных киллеров крови, обладающих рецепторами CXCR3 и CCR5, по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми. Ранее нами был продемонстрирован рост относительного количества Т- и В-лимфоцитов, снабженных данными хемокиновыми рецепторами, у пациентов с ХОБЛ [1, 16]. В совокупности полученные данные свидетельствуют о гиперэкспрессии рецепторов CXCR3 и CCR5, обусловленной ХОБЛ, на различных субпопуляциях лимфоцитов. НК-клетки крови как больных ХОБЛ, так

и здоровых людей несут на своей поверхности и другие хемокиновые рецепторы (CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7), но доля этих клеток не различается у обследованных лиц. Такие результаты наводят на мысль о том, что рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7 не вовлечены в развитие ХОБЛ.

Миграция клеток крови происходит при взаимодействии хемокиновых рецепторов и их лигандов. Так, для перемещения клеток, снабженных рецептором CXCR3, требуется связывание с одним из трех хемокинов – CXCL9, CXCL10 или CXCL11. Основными лигандами для рецептора CCR5 являются CCL3, CCL4 и CCL5 [11, 22]. Обнаружена повышенная концентрация CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CCL5 в мокроте пациентов с ХОБЛ [6], что является еще одним доказательством участия рецепторов CXCR3 и CCR5 в развитии заболевания. Более того, МКПК пациентов с ХОБЛ, снабженные рецепторами CCR5 и CXCR3, мигрировали в направлении CCL5 и лигандов рецептора CXCR3 в большем количестве, чем МКПК здоровых курящих и здоровых некурящих людей [7].

Естественные киллеры, оказавшись в легких пациентов с ХОБЛ, могут поражать собственные эпителиальные клетки, способствуя формированию и прогрессированию эмфиземы [8]. Приведенные данные демонстрируют значимость рецептор-лигандных взаимодействий CCR5-CCL5 и CXCR3-CXCL9/CXCL10/CXCL11 для миграции NK-клеток в дыхательные пути. Поэтому поиск препаратов, способных прямо или опосредованно влиять на перемещение NK-клеток, представляется перспективным с точки зрения лечения ХОБЛ.

На следующем этапе исследования мы проанализировали способность макролидного антибиотика азитромицина потенцировать действие будесонида на миграцию NK-клеток пациентов с ХОБЛ. Выбор хемокинов (CCL5 и CXCL10) для инициации хемотаксиса NK-клеток основывался на результатах первого этапа нашей работы.

Как известно, ХОБЛ, наряду с бронхиальной астмой, системной красной волчанкой, язвенным колитом и ревматоидным артритом, относится к заболеваниям, характеризующимся устойчивостью к ГКС [3, 10, 25]. Причиной стероидорезистентности при ХОБЛ является окислительный стресс, развитие которого индуцируют активные формы кислорода, находящиеся в сигаретном дыме или производственной пыли [5]. Как следствие, изменяется экспрессия ряда сигнальных молекул – глюкокортикоидного рецептора β (ГР β), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, ферментов гистондеацетилазы 2 и p38 митоген-активируемой протеинкиназы, что ведет к неадекватному (сниженному) ответу клеток на кортикостероиды [3, 13].

В настоящей работе будесонид статистически значимо, но лишь на 29,7% (при вычитании среднего миграции под влиянием будесонида от среднего миграции в его отсутствии, т. е. от контроля, принятого за 100%) меньше контроля подавлял перемещение NK-клеток в направлении CCL5 и на 18,2% меньше контроля – в направлении CXCL10. Мы полагаем, что такой уровень ингибирования не позволяет кардинально замедлить перемещение NK-клеток.

Макролидный антибиотик азитромицин продемонстрировал лучший профиль супрессии миграции NK-клеток, чем будесонид. Так, количество NK-клеток, мигрировавших к CCL5 в присутствии азитромицина, было на 54,5% меньше контроля, а в направлении CXCL10 – на 48,2% меньше контроля. Совместное использование двух препаратов позволило добиться ощутимой супрессии перемещения NK-клеток, которая превосходила способность каждого из препаратов по отдельности: миграция NK-клеток снизилась по сравнению с контролем в 2,52 раза в на-

правлении CCL5 и в 2,56 раза – в направлении CXCL10.

К установленным механизмам, позволяющим азитромицину восстанавливать чувствительность клеток к стероидам, относят его способность повышать экспрессию фермента гистондеацетилазы 2 и ГР α , ингибировать сигнальный путь, опосредованный фосфотидилинозитол-3-киназой δ [21]. Азитромицин подавляет активность ERK-киназы и JNK-киназы [26]. Эти ферменты фосфорилируют ГР α , препятствуя его перемещению в ядро клетки, что снижает чувствительность клеток к ГКС [3]. Известно о способности азитромицина угнетать активность факторов транскрипции AP-1 и NF- κ B [26], которые индуцируют экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины, ферменты и молекулы адгезии.

В предыдущих работах мы показали более выраженное супрессирующее воздействие комбинации азитромицина и будесонида, чем действие одного будесонида, на секрецию IL-4, IL-5, IL-8, IL-17A, тимического стромального лимфопоэтина МКПК, а также на продукцию IL-4 и IL-8 Т-хелперами, цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками крови [14, 15]. Настоящее исследование расширяет представления о способности азитромицина потенцировать противовоспалительные эффекты кортикостероидов.

Заключение

У курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми в крови повышено относительное количество NK-клеток, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, и отсутствуют значимые различия доли NK-клеток, содержащих хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7.

Будесонид и азитромицин по отдельности подавляют миграцию NK-клеток крови в направлении хемокинов CCL5 и CXCL10. Сочетание азитромицина и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на хемотаксис NK-клеток к хемокинам CCL5 и CXCL10, чем действие любого из этих препаратов. Полученные результаты демонстрируют преимущества комбинированного использования ГКС совместно с азитромицином для лечения ХОБЛ.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке белорусской государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание № 2.56).

Список литературы / References

1. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., Зафранская М.М., Дядичкина О.В., Шман Т.В. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови, коэкспрессирующих CD5 и хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Иммунология, 2022. Т. 43, № 2. С. 197-207. [Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Zafranskaya M.M., Dziadzichkina V.V., Shman T.V. Peripheral blood B-lymphocyte subpopulations coexpressing CD5 and chemokine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Immunologiya = Immunology*, 2022, Vol. 43, no. 2, pp. 197-207. (In Russ.)]
2. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
3. Barnes P.J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 3, pp. 636-645.
4. Barnes P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 1, pp. 16-27.
5. Barnes P.J. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biol.*, 2020, Vol. 33, 101544. doi: 10.1016/j.redox.2020.101544.
6. Costa C., Rufino R., Traves S.L., Lapa E Silva J.R., Barnes P.J., Donnelly L.E. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest*, 2008, Vol. 133, no. 1, pp. 26-33.
7. Costa C., Traves S.L., Tudhope S.J., Fenwick P.S., Belchamber K.B., Russell R.E., Barnes P.J., Donnelly L.E. Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD. *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 47, no. 4, pp. 1093-1102.
8. Freeman C.M., Stolberg V.R., Crudgington S., Martinez F.J., Han M.K., Chensue S.W., Arenberg D.A., Meldrum C.A., McCloskey L., Curtis J.L. Human CD56⁺ cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 7, e103840. doi: 10.1371/journal.pone.0103840
9. Hodge G., Hodge S. Therapeutic targeting steroid resistant pro-inflammatory NK and NKT-Like cells in chronic inflammatory lung disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 6, 1511.
10. Henderson I., Caiazza E., McSharry C., Guzik T.J., Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 160, 105189. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105189.
11. Henrot P., Prevel R., Berger P., Dupin I. Chemokines in COPD: From Implication to Therapeutic Use. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 11, 2785. doi: 10.3390/ijms20112785.
12. Hewitt R., Farne H., Ritchie A., Luke E., Johnston S.L., Mallia P. The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Ther. Adv. Respir. Dis.*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 158-174.
13. Jiang Z., Zhu L. Update on molecular mechanisms of corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2016, Vol. 37, pp. 1-8.
14. Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Kolesnikova T.S., Khadasouskaya A.V., Shman T.V. The effect of glucocorticoids in combination with azithromycin or theophylline on cytokine production by NK and NKT-Like blood cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.*, 2021, Vol. 15, no. 4, pp. 337-344.
15. Kadushkin A., Tahanovich A., Movchan L., Talabayeva E., Platinina A., Shman T. Azithromycin modulates release of steroid-insensitive cytokines from peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Adv. Respir. Med.*, 2022, Vol. 90, no. 1, pp. 17-27.
16. Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Zafranskaya M.M., Dziadzichkina V.V., Shman T.V. Population rearrangement of B lymphocytes expressing chemokine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.*, 2022, Vol. 16, no. 3, pp. 216-224.
17. Mei D., Tan W.S.D., Wong W.S.F. Pharmacological strategies to regain steroid sensitivity in severe asthma and COPD. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2019, Vol. 46, pp. 73-81.
18. Pascual-Guardia S., Ataya M., Ramírez-Martínez I., Yélamos J., Chalela R., Bellido S., López-Botet M., Gea J. Adaptive NKG2C⁺ natural killer cells are related to exacerbations and nutritional abnormalities in COPD patients. *Respir. Res.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 63. doi: 10.1186/s12931-020-1323-4.
19. Rao Y., Le Y., Xiong J., Pei Y., Sun Y. NK cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 666045. doi: 10.3389/fimmu.2021.666045.
20. Reijnders T.D.Y., Saris A., Schultz M.J., van der Poll T. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 6, pp. 619-630.
21. Sun X.J., Li Z.H., Zhang Y., Zhou G., Zhang J.Q., Deng J.M., Bai J., Liu G.N., Li M.H., MacNee W., Zhong X.N., He Z.Y. Combination of erythromycin and dexamethasone improves corticosteroid sensitivity induced by CSE through inhibiting PI3K- δ /Akt pathway and increasing GR expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 309, no. 2, pp. L139-L146.
22. Tomankova T., Kriegova E., Liu M. Chemokine receptors and their therapeutic opportunities in diseased lung: far beyond leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 308, no. 7, pp. L603-L618.
23. Urbanowicz R.A., Lamb J.R., Todd I., Corne J.M., Fairclough L.C. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir. Res.*, 2010, Vol. 11, no. 1, 76. doi: 10.1186/1465-9921-11-76.

24. Vos T, Lim S.S., Abbafati C., Abbas K.M., Abbasi M., Abbasifard M., GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10258, pp. 1204-1222.

25. Wu B., Tong J., Ran Z. Tacrolimus Therapy in Steroid-Refractory Ulcerative Colitis: A Review. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2020, Vol. 26, no. 1, pp. 24-32.

26. Yang J. Mechanism of azithromycin in airway diseases. *J. Int. Med. Res.*, 2020, Vol. 48, no. 6, 300060520932104. doi: 10.1177/0300060520932104.

Авторы:

Кадушкин А.Г. — к.м.н., доцент кафедры биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Таганович А.Д. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Мовчан Л.В. — к.б.н., врач лабораторной диагностики клинично-диагностической лаборатории ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

Зафранская М.М. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой иммунологии УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Шман Т.В. — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

Authors:

Kadushkin A.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Tahanovich A.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Movchan L.V., PhD (Biology), Doctor of Laboratory Diagnostics, Clinical Diagnostic Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyani, Minsk Region, Republic of Belarus

Zafranskaya M.M., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Immunology Department, International A. Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Shman T.V., PhD (Biology), Head, Immunological Research Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyani, Minsk Region, Republic of Belarus

Поступила 09.09.2022

Отправлена на доработку 13.09.2022

Принята к печати 08.11.2022

Дата онлайн-публикации 14.11.2022

Received 09.09.2022

Revision received 13.09.2022

Accepted 08.11.2022

Date of publication online 14.11.2022