

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СТЕРОИДНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ГИДРОКОРТИЗОНУ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Хатамов Х.М., Киреев В.В., Суяров А.А., Очиллов С.И.*
Институт иммунологии и геномики человека АН РУз,
Ташкентский государственный медицинский университет*

ХУЛОСА

Тадқиқотнинг мақсади. Астма билан оғриган беморларнинг қонида иммунологик ўзгаришлар ва гидрокортизонга сезгирлик даражаси ўртасидаги боғлиқлиқни ўрганиш эди.

Материаллар ва усуллар. Касалликнинг III ва IV босқичлари бўлган астма билан оғриган 40 бемор (улардан 17 нафари эркаклар) текширилди. Ўртача ёш $32,43 \pm 3,36$ ёш, касалликнинг ўртача давомийлиги $8,16 \pm 3,26$ ёш, лимфоцитлар, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD95 ни аниқлаш билан периферик қоннинг иммунологик текшируви ўтказилди. Лимфоцитлар субпопуляциясини аниқлаш моноклонал антикорлар усули билан амалга оширилди. Глюкокортикоидларга сезгирликни аниқлаш глюкокортикоидларга (гидрокортизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон, триамсинолон, бетаметазон) сезгирликни аниқлаш учун оригинал патентланган техника ёрдамида амалга оширилди.

Натижалар ва хулосалар. Юқори ва жуда паст сезгир беморлар ўртасида лейкоцитлар сонида сезиларли фарқ бор. Нисбий ва мутлақ CD индексидаги сезиларли фарқ аниқланди ва жуда юқори ва юқори гидрокортизонга сезгир беморлар ўртасида CD23 бор.

Калим сўзлар: бронхиал астма, гидрокортизон, сезгирлик, лимфоцитлар.

Бронхиальная астма (БА) – это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся обратимой обструкцией и гиперреактивностью бронхов. БА является гетерогенным заболеванием. Одним из краеугольных камней в лечении БА являются глюкокортикостероиды (ГКС), в частности, гидрокортизон, благодаря их мощному противовоспалительному действию. Однако, эффективность терапии ГКС может варьировать у разных пациентов, что обусловлено сложным взаимодействием между иммунологическими механизмами заболевания и индивидуальной чувствительностью к препарату. Понимание этой взаимосвязи открывает перспективы для персонализированного подхода к лечению БА.

В лечении тяжелой бронхиальной астмы применяется гидрокортизон – самый первый глюкокортикоидный препарат, который существенно улучшил исходы лечения БА. Однако за годы применения глю-

SUMMARY

Objective. To investigate the relationship between immunological changes and the degree of sensitivity to hydrocortisone in the blood of patients with bronchial asthma (BA).

Materials and methods. Forty patients with BA (17 men) at stages III and IV of the disease were examined. The mean age was 32.43 ± 3.36 years, and the mean disease duration was 8.16 ± 3.26 years. Immunological testing of peripheral blood was performed, determining lymphocytes, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, and CD95. Lymphocyte subpopulations were determined using monoclonal antibodies. Glucocorticoid sensitivity was determined using an original, patented method for determining sensitivity to glucocorticoids (hydrocortisone, prednisolone, methylprednisolone, dexamethasone, triamcinolone, and betamethasone).

Results and conclusions. A significant difference in leukocyte counts was observed between highly and very lowly sensitive patients. Significant differences were also found in the relative and absolute levels of CD3 and in CD23 between very highly and highly sensitive patients to hydrocortisone.

Keywords: bronchial asthma, hydrocortisone, sensitivity, lymphocytes.

кокортикоидов накоплено много фактов свидетельствующих о наличии резистентности к глюкокортикоидам [5].

Известно влияние ГК на иммунологические показатели при различных аутоиммунных ревматических заболеваниях, включая БА. Однако до настоящего времени не изучалась взаимосвязь иммунологических изменений в крови в зависимости от степени чувствительности к ГК. Это было обусловлено отсутствием методик, позволяющих в короткие сроки проводить оценку чувствительности к различным ГК. Созданные до настоящего времени методики определения чувствительности не имели градации чувствительности, были привязаны к одному препарату (обычно дексаметазону или преднизолону), были трудоемки в исполнении, требовали большого числа реагентов и оборудования, и могли быть одновременно использованы для других ГК. В связи с чем они не нашли широкого применения в клинической

практике.

БА характеризуется иммуноопосредованным патогенезом, обуславливающим активацию каскада иммунологических процессов. Выраженность этих процессов коррелирует со степенью тяжести заболевания, а ключевыми эффекторными клетками являются субпопуляции лимфоцитов.

Лимфоцит является основной фигурой иммунной системы, принимающей участие в реакциях клеточного иммунитета. Также на поверхности лимфоцита имеются рецепторы, ответственные за чувствительность к ГК. Давно известен феномен кортизол-резистентных лимфоцитов, т.е. не погибающих под действием ГК. Вот почему представляется актуальным выяснение характера взаимосвязи между степенью чувствительности и иммунологическими изменениями крови, что позволяет в большой степени понимать механизмы резистентности лимфоцитов к конкретному ГК на примере БА, являющегося широко распространенным заболеванием [2,3,5].

Но вопросы взаимоотношения чувствительности к гидрокортизону и степени чувствительности к нему остаются неизученными.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение взаимосвязи иммунологических изменений и степени чувствительности к гидрокортизону в крови больных БА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 40 больных БА (из них 17 мужчин) с III и IV степенями заболевания. Средний возраст составил $32,43 \pm 3,36$ лет, средняя продолжительность заболевания – $8,16 \pm 3,26$ лет. Диагноз БА устанавливается согласно классификации GINA (2025).

Пациентам проводилось иммунологическое исследование периферической крови, включающее определение лимфоцитов, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD95. Определение субпопуляций лимфоцитов осуществлялось методом моноклональных антител. Контрольная группа составила 20 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

Определение чувствительности к глюкокортикоидам осуществлялось с помощью оригинальной запатентованной методики определения чувствительности к глюкокортикоидам (гидрокортизону, преднизолону, метилпреднизолону, дексаметазону, триамцинолону, бетаметазону). У пациента забирают 1 мл венозной крови независимо от приема пищи в стерильную гепаринизированную центрифужную пробирку. После центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин выделяют лимфоциты по методу Boum на 76% фиколе и подсчитывают количество лимфоцитов в камере Горяева под микроскопом при увеличении 250 (ок.5, об.50). Затем в пробирку добавляют при помощи мерной пипетки 500 мкл взвеси лимфоцитов и добавляют, с использованием отдельной мерной пипетки, по 100 мкл раствора глюкокортикоидов. С учетом биоэквивалентности

глюкокортикоидов, стандартные ампулированные растворы глюкокортикоидов разводят: дексаметазон (1 мл) разводят физиологическим раствором в количестве 26,6 мл стерильного физиологического раствора (0,9% раствор хлорида натрия), триамцинолон (кеналог), урбазон (солю-медрол, метилпреднизолон) в 4 мл стерильного физиологического раствора, преднизолон в 5 мл, а бетаметазон в 22 мл раствора соответственно. Эти растворы стабильны в течении месяца при хранении в стерильных условиях в темноте в холодильнике при температуре 8 °С. Полученную смесь инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течении 1 часа, затем окрашивают трипановым синим и фиксируют глутаральдегидом, после чего проводят подсчет оставшихся лимфоцитов в камере Горяева под микроскопом. Если количество лимфоцитов уменьшалось на 1-20%, то результат чувствительности оценивают, как очень низкочувствительный; 21-40% низкочувствительный, 41-60% - чувствительный; 61- 80% высокочувствительный, свыше 80% очень высокочувствительный.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ «Statistica 12.0». Достоверность полученных величин определялась при помощи U-критерия Манна-Уитни, применяемого для расчета в малых группах. За статистически значимые изменения принимался уровень достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице.

Из данных таблицы видно, наличие достоверных различий числа лейкоцитов между высоко и очень низкочувствительными пациентами. Выявляются достоверное различие относительного и абсолютного показателя CD3 и показателя CD23 между очень высоко и высокочувствительными к гидрокортизону пациентами.

Гидрокортизон, как и другие ГКС, оказывает свое действие через связывание с внутриклеточными глюкокортикоидными рецепторами (GR). Этот комплекс GR-гидрокортизон затем транслоцируется в ядро клетки, где может индуцировать апоптоз (программируемую гибель) воспалительных клеток, особенно эозинофилов и лимфоцитов [5,7].

Чувствительность клеток к гидрокортизону напрямую зависит от количества и функциональной активности GR. Снижение экспрессии или мутации GR могут приводить к резистентности к ГКС. Иммунные клетки, вовлеченные в патогенез БА, могут иметь различную экспрессию GR, что влияет на их ответ на терапию [1,4,7].

Помимо эозинофилов и нейтрофилов, в патогенезе БА участвуют и другие клетки, такие как тучные клетки, макрофаги, дендритные клетки и различные популяции T-лимфоцитов (Th1, Th17, Treg).

Взаимосвязь иммунологических показателей и степени чувствительности к гидрокортизону при БА

№	показатели	очень высокочувствительные (n=34)	высокочувствительные (n=3)	очень низкочувствительные (n=3)	контрольная группа (n=20)
1	лейкоциты	5540,62±327,84	4366,67±88,19	6700±1928,73	6787,75±162
2	лимфоциты.%	30,87±1,05	35,0±3,05	24,0±5,03	30,1±1,1
3	лимфоцит. абс	1727,5±121,97	1523,0±123,60	1420,0±172,98	2043±147
4	CD3,%	43,44±1,76	38,0±1,15*	55,0±11,93	57,5±1,6
5	CD3.абс	742,5±64,2	579,7±50,02*	799,3±209,7	1189±89
6	CD4,%	23,03±1,62	22,67±2,67	35,0±14,01	36,2±1,03
7	CD4, абс	379,31±33,92	339,33±8,95	432,67±140,87	752±61
8	CD8,%	18,69±1,40	14,67±2,40	20,33±4,63	22,4±1,2
9	CD8, абс	301,37±25,76	229,67±51,52	267,67±68,74	475±42
10	CD4/CD8	1,33±0,08	1,73±0,54	1,70±0,35	1,56±0,01
11	CD16,%	14,78±1,0	15,67±4,25	14,33±6,17	11,9±0,8
12	CD16,абс	244,03±23,19	246,67±80,02	216,33±115,19	286±27
13	CD20,%	19,97±0,89	15,33±2,90	20,0±5,29	22,3±0,6
14	CD20,абс	332,25±28,05	240,67±59,12	295±108,78	449±37
15	CD 23,%	15,34±0,69	11,33±1,33*	12,33±2,03	16,83±0,43
16	CD 25,%	15,28±1,04	18,0±5,03	12,33±6,74	20,1±0,7
18	CD95,%	14,25±0,67	14,67±1,76	16,0±2,89	28,0±1,1

Примечание: *-достоверность между очень высоко и высокочувствительными пациентами.

Ввиду отсутствия пациентов с средней и низкой чувствительностью остальные столбцы не показаны.

Взаимодействие между этими клетками и их реакция на ГКС также могут влиять на общую чувствительность к терапии. Например, подавление активации тучных клеток и высвобождения гистамина и других медиаторов является важным противовоспалительным эффектом ГКС [1,2,4].

T-хелперы играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа. В БА особенно важны Th2-клетки, продуцирующие цитокины ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, которые стимулируют продукцию IgE, эозинофилию и гиперреактивность бронхов. Также могут быть вовлечены Th17-клетки, продуцирующие ИЛ-17, и Th1-клетки.

T-хелперы играют центральную роль в адаптивном иммунитете, регулируя как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. При БА они являются ключевыми игроками в развитии и поддержании воспаления. Различные подтипы T-хелперов характеризуются секрецией специфических цитокинов, что определяет их вклад в патогенез заболевания [6].

Гидрокортизон способен подавлять активацию и пролиферацию Th2-клеток, а также снижать продукцию ими цитокинов. Таким образом, выраженная Th2-активность, как правило, ассоциируется с хорошим ответом на ГКС.

В некоторых случаях, особенно при тяжелой и резистентной к ГКС астме, наблюдается повышение активности Th17-клеток. Эти клетки могут быть менее чувствительны к подавляющему действию ГКС, а в некоторых условиях ГКС могут даже способствовать их дифференцировке. Это может способствовать сохранению воспаления и снижению эффективности терапии.

T-регуляторные клетки (Treg): Treg-клетки играют важную роль в подавлении иммунного воспаления. Снижение количества или функции Treg-клеток может способствовать развитию и поддержанию БА. Гидрокортизон может влиять на Treg-клетки, но его действие неоднозначно и зависит от контекста. В целом, адекватное функционирование Treg-клеток, вероятно, способствует более эффективному контролю воспаления и, как следствие, лучшему ответу на ГКС [5,7].

НК-клетки являются частью врожденного иммунитета и играют роль в противовирусной защите и элиминации опухолевых клеток. В контексте БА их роль менее изучена по сравнению с эозинофилами или T-лимфоцитами, но они могут участвовать в регуляции воспалительного процесса, секреции цитокинов (например, интерферона-гамма) и взаимодействии с другими иммунными клетками. Некоторые исследования предполагают, что НК-клетки могут быть активированы при БА и способствовать воспалению.

Гидрокортизон, как и другие ГКС, может оказывать подавляющее действие на активацию и пролиферацию НК-клеток, а также на их способность продуцировать цитокины. Это могло бы способствовать снижению воспаления. Однако, в условиях хронического воспаления характерного для БА и при определенных стимулах, НК-клетки могут демонстрировать сниженную чувствительность к апоптотическому действию ГКС. Это означает, что даже при воздействии гидрокортизона, эти клетки могут сохранять свою активность и способствовать поддержанию воспалительного процесса. Исследования по

влиянию ГКС на NK-клетки при БА неоднозначны [1,2,3,5].

Таким образом, впервые были изучены иммунологические различия в зависимости от характера чувствительности к гидрокортизону, что позволит лучше раскрыть механизмы чувствительности к гидрокортизону. Дальнейшие исследования в этой области будут способствовать развитию персонализированной медицины в лечении бронхиальной астмы.

Следовательно в нашем исследовании, выявляется влияние гидрокортизона на 5 иммунологических показателей.

ВЫВОДЫ:

1. Выявляется достоверное различие числа лейкоцитов между высоко и очень низкочувствительными пациентами.

2. Обнаруживается различие относительного и абсолютного показателя CD3 и показателя CD23 между очень высоко и высокочувствительными к гидрокортизону пациентами.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Кадушкин А. Г., Таганович А.Д. Молекулярные механизмы формирования стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // Пульмонология. – 2016. – Т. 26. – № 6. – С. 736-747.
2. Калашникова А.А., Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Жданова М.В., Евлоева М.К., Новик Г.А. Выявление антиген-специфических гормонорезистентных лимфоцитов крови для прогнозирования эффективности глюкокортикоидной терапии бронхиальной астмы // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13. – № 2-3. – С. 157-166.
3. Нестеренко З.В., Лагно О.В., Панков Е.А. Поиск новых терапевтических мишеней при бронхиальной астме (обзор литературы) // Педиатр. – 2022. – Т. 13 – № 5 – С.71-80. DOI: <https://doi.org/10.17816/PED13571-80>
4. Чубарова С.В., Яковчук И.А., Крапошина А.Ю., Соловьева И.А., Демко И.В, Салмина А.Б. Стероидочувствительность при бронхиальной астме. //Молекулярная медицина, 2016; (2).
5. Barnes P.J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. // J. Allergy Clin. Immunol. 2013;131 (3):636-645.
6. Liu S., Verma M., Michalec L., Liu W., Sripada A. et al. Steroid resistance of airway type 2 innate lymphoid cells from patients with severe asthma: The role of thymic stromal lymphopoietin// J. Allergy Clin. Immunol. January 2018 P.258-268.
7. Luhadia S.K. Steroid resistant asthma. //J.Assoc. Physicians India. 2014; 62 (3): 38-40.
8. Masumoto N, Odajima H, Murakami Y. Evaluation of adrenal cortical function using salivary cortisol measurements in children with bronchial asthma. Arerugi. 2020;69(5):334-340. Japanese. doi: 10.15036/arerugi. 69.334. PMID: 32684548.
9. Reddy D., Little F.F. Glucocorticoid-resistant asthma: more than meets the eye. //J. Asthma. 2013; 50 (10): 1036–44
10. Singh R, Bansal R. Revisiting the role of steroidal therapeutics in the 21st century: an update on FDA approved steroidal drugs (2000-2024). //RSC Med Chem. 2025 May 8. doi: 10.1039/d5md00027k. Epub ahead of print. PMID: 40352672; PMCID: PMC12060906.
11. Steven W. Paugh, Erik J. Bonten, William E. Evans Inflammation-mediated glucocorticoid resistance: The receptor rheostat//Mol. Cell. Oncol. 2016 Jan; 3(1): e1065947 3P.