© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

УДК 615.234:616.24-036.12

HTTP://DOI.ORG/10.21292/2075-1230-2021-99-10-14-22

Влияние комбинации теофиллина и будесонида на выработку провоспалительных цитокинов клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

А. Г. КАДУШКИН[1], А. Д. ТАГАНОВИЧ[1], Л. В. МОВЧАН[2], Э. И. ТАЛАБАЕВА[3], А. В. ПЛАСТИНИНА[3], Т. В. ШМАН[2]

[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минская область

[3]Учреждение здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический центр», г. Минск

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценить способность комбинации теофиллина и будесонида подавлять выработку провоспалительных цитокинов клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ).

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК-клетки) или клетки цельной крови пациентов с ХОБЛ ($n = 27$) инкубировали с будесонидом (10 нМ), теофиллином (1 мкМ) или их комбинацией и стимулировали фитогемагглютинином (ФГА) или форбол-миристат-ацетатом (ФМА) с иономицином. Секрецию тимического стромального лимфопоэтина (ТСЛП), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), интерлейкина 17А (ИЛ-17А), ИЛ-33 и других медиаторов МКПК-клетками, индуцированную ФГА, определяли методом иммуноферментного анализа. Внутриклеточную продукцию провоспалительных цитокинов, стимулированную ФМА/иономицином, в Т-хелперах ($CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитах ($CD8^+$) крови анализировали методом проточной цитометрии.

Результаты. Теофиллин снижал секрецию ИЛ-4 и ИЛ-17А МКПК-клетками. Комбинация будесонида с теофиллином подавляла синтез ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ТСЛП, ФИММ МКПК-клетками, а также продукцию ИЛ-4, ИЛ-8, фактора некроза опухоли-α и интерферона-γ цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами крови. Сочетание теофиллина и будесонида оказывало более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 МКПК-клетками, а также на синтез ИЛ-4 $CD4^+$ Т-клетками и ИЛ-8 $CD8^+$ Т-лимфоцитами, чем действие одного будесонида.

Ключевые слова: теофиллин, будесонид, стероидорезистентность, лимфоциты, цитокины, интерлейкины, хроническая обструктивная болезнь легких

Для цитирования: Кадушкин А. Г., Таганович А. Д., Мовчан Л. В., Талабаева Э. И., Пластинина А. В., Шман Т. В. Влияние комбинации теофиллина и будесонида на выработку провоспалительных цитокинов клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2021. – Т. 99, № 10. – С. 14-22. http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-10-14-22

Effect of the Combination of Theophylline and Budesonide on Production of Proinflammatory Cytokines by Blood Cells of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

A. G. KADUSHKIN[1], A. D. TAGANOVICH[1], L. V. MOVCHAN[2], E. I. TALABAEVA[3], A. V. PLASTININA[3], T. V. SHMAN[2]

[1]Belorussian State Medical University, Minsk, Belarus

[2]Republican Scientific Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk Region, Belarus

[3]Minsk Clinical Consulting and Diagnostic Center, Minsk, Belarus

ABSTRACT

The objective: to evaluate the ability of the combination of theophylline and budesonide to suppress proinflammatory cytokine production by blood cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Subjects and Methods. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or whole blood cells of COPD patients ($n = 27$) were incubated with budesonide (10 nM), theophylline (1 μM), or the combination thereof and stimulated with phytohemagglutinin (PHA) or phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin. The enzyme immunoassay was used to evaluate the secretion of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), macrophage migration inhibitory factor (MIF), interleukin 17A (IL-17A), IL-33, and other mediators of PBMC cells, and induced PHA. The flow cytometry was used to analyze intracellular production of proinflammatory cytokines stimulated by PMA/ionomycin in T-helpers ($CD4^+$) and cytotoxic T-lymphocytes ($CD8^+$).

Results. Theophylline reduced the secretion of IL-4 and IL-17A by PBMC cells. The combination of budesonide with theophylline inhibited the synthesis of IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IL-17A, IL-33, TSLP, MIF by PBMC cells as well as the production of IL-4, IL-8, tumor necrosis factor-α, and interferon-γ by cytotoxic T-lymphocytes and T-helpers. The combination of theophylline and budesonide had a more pronounced inhibitory effect on the production of IL-4 and IL-8 by PBMC cells as well as the synthesis of IL-4 by $CD4^+$ T-cells and IL8 by $CD8^+$ T-lymphocytes versus the effect of monotherapy with budesonide.

Key words: theophylline, budesonide, steroid resistance, lymphocytes, cytokines, interleukins, chronic obstructive pulmonary disease

For citations: Kadushkin A.G., Taganovich A.D., Movchan L.V., Talabaeva E.I., Plastinina A.V., Shman T.V. Effect of the combination of theophylline and budesonide on production of proinflammatory cytokines by blood cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2021, Vol. 99, no. 10, P. 14-22. (In Russ.) http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-10-14-22

Для корреспонденции:
Кадушкин Алексей Геннадьевич
E-mail: kadushkyn@gmail.com

Correspondence:
Aleksey G. Kadushkin
Email: kadushkyn@gmail.com

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется хроническим воспалительным процессом в дыхательных путях и персистирующим иммунным ответом, которые являются важной «мишенью» при лечении заболевания [1]. Ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС) являются препаратами с противовоспалительным действием, которые чаще других назначаются для лечения ХОБЛ. В соответствии с докладом Глобальной инициативы по ХОБЛ (GOLD 2021) ИГКС в настоящее время следует назначать пациентам с высоким риском обострений (имеющим два обострения и более в год или госпитализацию в течение предыдущего года), несмотря на исчерпывающую поддерживающую терапию броходилататорами длительного действия [13]. Более того, ИГКС в сочетании с одним или двумя бронходилататорами длительного действия должны назначаться при количестве эозинофилов крови > 300 кл/мкл, а также пациентам с синдромом перекреста бронхиальной астмы и ХОБЛ [13].

Вместе с тем у части пациентов кортикостероиды имеют ограниченную эффективность в улучшении функции легких, качества жизни и снижении количества клеток воспаления и высвобождаемых ими медиаторов [22]. В настоящее время описано несколько молекулярных механизмов, которые могут приводить к развитию стероидорезистентности, включая повышенную экспрессию глюкокортикоидного рецептора (ГР) β, сниженную экспрессию гистондеацетилазы-2 (ГДА2) и фосфатазы-1 митоген-активируемой протеинкиназы (МКП-1), увеличение продукции фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ) [1, 17]. Реализация проведения сигналов с помощью этих молекулярных механизмов приводит к изменению функционального состояния клеток, прежде всего лимфоцитов. При наличии стероидорезистентности цитокин-продуцирующая их способность не снижается или снижается, но незначительно. Таким образом, одним из подходов к оценке стероидорезистентности на клеточном уровне является анализ способности к синтезу и секреции цитокинов ассоциированными участниками формирования воспалительного ответа после или в результате контакта с глюкокортикостероидами (ГКС).

Как известно, продуцентами цитокинов являются клетки крови, в том числе лимфоциты. Показано, что процент $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), продуцирующих провоспалительные цитокины интерферон-γ (ИФНγ) и фактор некроза опухоли-α (ФНОα), повышен в периферической крови, бронхоальвеолярной лаважной жидкости и бронхиальных смывах у пациентов с ХОБЛ независимо от использования ИГКС, что свидетельствует о сниженной чувствительности этих клеток к стероидам [16]. Эти клетки, наряду с $CD4^+$ Т-хелперами 1-го типа (Тх1) и Тх17-лимфоцитами, привлекаются в легкие пациентов с ХОБЛ и участвуют в адаптивном иммунном ответе. Кроме того, ЦТЛ секретируют цитотоксические белки, такие как перфорины и гранзим В, которые индуцируют апоптоз или некроз альвеолярных клеток.

Тх1-клетки секретируют ИФНγ и ФНОα, тогда как Тх17-лимфоциты продуцируют интерлейкин 17А (ИЛ-17А), ИЛ-17F, ИЛ-21, ИЛ-22 [15]. ИФНγ, в частности, повышает секрецию хемокинов CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) и CXCL11 (I-TAC), которые привлекают Тх1-клетки и ЦТЛ 1-го типа в легкие пациентов с ХОБЛ [15]. ФНОα активирует фактор транскрипции – ядерный фактор-κВ (NF-κB), который стимулирует транскрипцию генов, кодирующих цитокины, хемокины и молекулы адгезии, такие как ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИФНβ, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), моноцитарный хемотаксический протеин 1, CCL5, молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1, Е-селектин [8]. Более того, ФНОα и ИФНγ способствуют сниженной чувствительности к кортикостероидам гладкомышечных клеток дыхательных путей в связи с нарушением функционирования ГР [9].

ИЛ-17А индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая ИЛ-8 и ГМ-КСФ, в нескольких типах клеток, включая эпителиальные и эндотелиальные клетки, и усиливает миграцию нейтрофилов в очаг воспаления [18]. Показано, что при ХОБЛ воспаление, индуцированное ИЛ-17А, ассоциировано со снижением ответа на ИГКС [5].

В ряде случаев ХОБЛ сопровождается вовлечением Тх2-клеток [4]. Последние клетки и врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2) секретируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и, таким образом, индуцируют эозинофильное воспаление, которое характеризуется более эффективным ответом на ГКС [4].

В настоящее время предпринимаются попытки повысить стероидочувствительность при наличии резистентности к препаратам этой группы. Теофиллин на протяжении десятилетий используется для лечения ХОБЛ в качестве бронходилататора. Для достижения умеренного расширения бронхов требуется концентрация этого препарата в крови 10-20 мг/л. В последние годы появился интерес к использованию теофиллина у пациентов с ХОБЛ в низких дозах с достижением плазменной концентрации от 1 до 5 мг/л. Доклинические исследования продемонстрировали, что именно при этой плазменной концентрации теофиллин проявляет противовоспалительные свойства [7]. Молекулярный механизм противовоспалительного эффекта теофиллина обусловлен ингибированием фосфодиэстеразы-4 и активацией ГДА2, что ведет к снижению экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Появились данные о способности теофиллина потенцировать противовоспалительные эффекты ГКС [12], что оспаривается другими учеными [10].

Цель исследования: оценить способность комбинации теофиллина и будесонида подавлять выработку провоспалительных цитокинов клетками крови пациентов с ХОБЛ.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 27 больных ХОБЛ (характеристика пациентов представлена в табл. 1). Диагностика ХОБЛ и оценка ее степени тяжести проводились в соответствии с критериями Глобальной инициативы по ХОБЛ (GOLD) [13]. Критериями исключения из исследования явились наличие у пациентов других заболеваний легких, включая бронхиальную астму, заболевания соединительной ткани с изменениями функции дыхательной системы, онкологические заболевания, нарушения свертывающей системы крови, а также прием системных ГКС или обострение ХОБЛ в течение 6 нед. до начала исследования.

Таблица 1. **Характеристика участников исследования**
Table 1. **Characteristics of the subjects**

Характеристики	Пациенты с ХОБЛ, *n* = 27
Пол, м/ж (абс.)	22/5
Возраст (годы)	66,4 ± 1,5
ИМТ, кг·м$^{-2}$	27,6 ± 1,1
Статус курения курильщик (абс.) экс-курильщик (абс.)	 12 15
Индекс курящего человека	36,3 ± 2,6
ОФВ$_1$ после БП, % от должного	51,0 ± 3,3
ОФВ$_1$/ФЖЕЛ после БП, %	55,4 ± 2,3

Примечание: данные представлены как абсолютные числа или среднее ± стандартная ошибка среднего. БП – бронходилатационная проба; ИМТ – индекс массы тела; ОФВ$_1$ – объем форсированного выдоха за первую секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

Проведение исследования одобрено решением комитета по биомедицинской этике Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». Все пациенты, включенные в исследование, дали письменное добровольное согласие на участие в нем.

Оценка внутриклеточной продукции цитокинов Т-лимфоцитами крови

Забор венозной крови у пациентов проводили утром натощак в объеме 7 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия (Белмедпрепараты, Минск, Республика Беларусь) в концентрации 10 Ед/мл в качестве антикоагулянта, и немедленно доставляли в лабораторию. В стерильных пробирках смешивали 7 мл крови с аналогичным объемом культуральной среды RPMI 1640 (Gibco, Гранд Айленд, Нью-Йорк, США), содержащей 10%-ную фетальную телячью сыворотку (ФТС, Capricorn Scientific, Эбсдорферграунд, Германия), и инкубировали с будесонидом (10 нМ, Glentham Life Sciences Ltd, Коршам, Уилтшир, Великобритания), теофиллином (1 мкМ, Glentham Life Sciences Ltd) или их комбинацией в увлажненной воздушной среде с 5% CO_2 при 37°C в течение 1 ч. Клеточные культуры затем стимулировали с добавлением форбол-миристат-ацетата (ФМА, 50 нг/мл) (Cayman Chemical, Энн-Арбор, Мичиган, США) и иономицина (1 мкг/мл) (Cayman Chemical, Израиль) в присутствии брефельдина А (10 мкг/мл) (Cayman Chemical, Израиль) и далее инкубировали в увлажненной воздушной среде с 5% CO_2 при 37°C. После стимуляции в течение 6 ч в пробирки вносили 100 мкл 20 мМ раствора этилендиаминтетраацетата динатрия дигидрата в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) для прекращения активации клеток и удаления адгезированных клеток. Далее клетки отмывали и добавляли коктейль моноклональных антител к поверхностным антигенам (CD45, CD3, CD4, CD8, Beckman Coulter, Марсель, Франция; Exbio, Прага, Чешская Республика), после чего клетки инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Эритроциты лизировали путем добавления лизирующего раствора Versalyse (Beckman Coulter, Марсель, Франция). Спустя 15 мин пробирки центрифугировали при 500g в течение 5 мин, клетки отмывали с использованием ФСБ, содержащего 1%-ную ФТС. После фиксации лейкоцитов клетки пермеабилизировали с использованием IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter) и добавляли моноклональные антитела к ИЛ-4 PE, ИФНγ APC, ФНОα PE (все Beckman Coulter) или ИЛ-8 FITC (R&D systems Europe, Абингдон, Великобритания) на 15 мин в темноте при комнатной температуре. Затем вносили 3 мл отмывочного буфера и пробирки центрифугировали при 500g в течение 5 мин. После удаления супернатанта в пробирки помещали 500 мкл 1%-ного раствора параформальдегида в ФСБ и клетки анализировали не позднее 12 ч на проточном цитометре Navios с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Образцы анализировали путем гейтирования лимфоцитов с использованием антител к CD45 и сигнала от бокового светорассеивания. Тх-клетки идентифицировали как $CD45^+CD3^+CD4^+$ события, а ЦТЛ определяли как $CD45^+CD3^+CD8^+$ клетки.

Стоит отметить, что концентрация, в которой теофиллин применялся в настоящем исследовании (1 мкМ), относится к низким и аналогична концентрации этого препарата, использованной в других экспериментах *in vitro*.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК-клеток)

МКПК-клетки выделяли из периферической крови пациентов с ХОБЛ путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077 с использованием Lymphopure (Biolegend, Сан Диего, Ка-

лифорния, США). Клетки ресуспендировали в концентрации 10^6/мл в культуральной среде RPMI 1640, обогащенной 10%-ной ФТС, 2 мМ глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Определение секреции цитокинов МКПК-клетками

Помещали 2 × 10^5 МКПК-клеток в лунки 96-луночного планшета и культивировали в присутствии или отсутствие будесонида (10 нМ) и теофиллина (1 мкМ) в течение 1 ч. В последующем клетки активировали путем добавления фитогемагглютинина (ФГА, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл). По истечении суток супернатанты собирали и хранили при температуре -20°С. В них определяли концентрацию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ТСЛП, ФИММ методом иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя (АО «Вектор Бест», РФ; Bioassay Technology Laboratory, Шанхай, Китай).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета статистического анализа данных GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Результаты исследования представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего от общего числа наблюдений с нормальным распределением данных, что подтверждалось построением гистограмм распределения и определением критерия Шапиро – Уилка. Оценка результатов исследования проводилась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5%.

Результаты исследования

Влияние лекарственных средств на секрецию цитокинов МКПК-клетками

Проведенные исследования показали, что теофиллин подавлял секрецию ИЛ-4 и ИЛ-17А МКПК-клетками, а будесонид – секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8 и ИЛ-13 (табл. 2). Внесение в культуру МКПК-клеток, стимулированных ФГА, комбинации теофиллина и будесонида приводило к угнетению синтеза ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ФИММ и ТСЛП. При этом сочетание теофиллина и будесонида оказалось более эффективным в супрессии выработки ИЛ-4 и ИЛ-8 МКПК-клетками, чем использование одного будесонида.

Влияние лекарственных средств на внутриклеточную продукцию цитокинов Т-клетками крови

Инкубация клеток крови с будесонидом приводила к снижению синтеза ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх-клетками и ЦТЛ, стимулированными ФМА и иономицином, а также угнетению выработки ФНОα Тх-клетками и ИФНγ ЦТЛ (табл. 3). Теофиллин не оказывал влияния на продукцию цитокинов Тх-клетками и ЦТЛ. Зато комбинация будесонида и теофиллина оказалась способна ингибировать синтез ИЛ-4, ИЛ-8, ФНОα и ИФНγ обеими субпопуляциями Т-лимфоцитов крови (рис.). Более того, будесонид в сочетании с теофиллином обладал более выраженным ингибирующим воздействием на продукцию ИЛ-4 Тх-клетками и ИЛ-8 ЦТЛ, чем один будесонид.

В настоящем исследовании продемонстрирована способность теофиллина в низкой концентрации при сочетанном использовании с будесонидом подавлять выработку провоспалительных цитокинов МКПК-клетками и, в частности, Т-лимфоцитами крови пациентов с ХОБЛ. Полученные результаты обосновывают фармакологическую целесообразность использования теофиллина в низкой дозе при лечении пациентов с ХОБЛ.

В нашем исследовании будесонид снижал процент Тх-клеток, продуцирующих ФНОα, и ЦТЛ, синтезирующих ИФНγ. Другими авторами получены схожие результаты, демонстрирующие дозозависимое ингибирование продукции ИФНγ ЦТЛ

***Таблица 2*. Влияние теофиллина, будесонида и их комбинации на секрецию цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови**

***Table 2*. The effect of theophylline, budesonide and their combination on the secretion of cytokines by peripheral blood mononuclear cells**

Цитокин	Контроль	ФГА	ФГА + будесонид 10 нМ	ФГА + теофиллин 1 мкМ	ФГА + будесонид 10 нМ + теофиллин 1 мкМ
ИЛ-4, пг/мл	1,4 ± 0,1	7,2 ± 1,2*	1,7 ± 0,1#	4,0 ± 0,9#	1,4 ± 0,1#♦
ИЛ-5, пг/мл	31,6 ± 3,7	42,3 ± 1,8*	35,8 ± 2,0#	33,8 ± 3,0	26,3 ± 2,5#§
ИЛ-8, пг/мл	37 452 ± 10 404	129 941 ± 8 186*	55 039 ± 10 312#	126 858 ± 9 453*♦	44 254 ± 10 032#♦§
ИЛ-13, пг/мл	3,2 ± 0,6	79,7 ± 6,3*	59,8 ± 3,1*#	66,2 ± 1,8*	45,6 ± 5,2*#
ИЛ-17А, пг/мл	17,2 ± 1,0	23,0 ± 1,4*	23,5 ± 1,2*	16,2 ± 1,0#	19,6 ± 1,1*#§
ИЛ-33, пг/мл	52,3 ± 5,2	75,1 ± 4,6*	62,1 ± 5,8	69,5 ± 4,7	59,7 ± 4,0#
ТСЛП, пг/мл	29,1 ± 4,6	82,8 ± 6,0*	74,3 ± 5,9*	66,7 ± 9,2	52,9 ± 6,5#
ФИММ, нг/мл	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2#

Примечание: результаты представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего;
* – $p < 0,05$ по сравнению с данными «контроль»; # – $p < 0,05$ по сравнению с «ФГА»; ♦ – $p < 0,05$ по сравнению с «ФГА + будесонид 10 нМ»; § – $p < 0,05$ по сравнению с «ФГА + теофиллин 1 мкМ»

Таблица 3. **Влияние теофиллина, будесонида и их комбинации на продукцию цитокинов Т-лимфоцитами крови**
Table 3. **The effect of theophylline, budesonide and their combination on the production of cytokines by T-lymphocytes**

Субпопуляция лимфоцитов	ФМА + иономицин	ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ	ФМА + иономицин + теофиллин 1 мкМ	ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ + теофиллин 1 мкМ
$CD4^+$ИЛ-4^+ Т клетки, %	3,4 ± 0,4	2,3 ± 0,2#	3,0 ± 0,4♦	1,8 ± 0,2#♦§
$CD8^+$ИЛ-4^+ Т клетки, %	4,4 ± 0,6	3,1 ± 0,5#	3,6 ± 0,6	2,8 ± 0,5#
$CD4^+$ИЛ-8^+ Т клетки, %	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,2#	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,2#
$CD8^+$ИЛ-8^+ Т клетки, %	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2#	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,1#♦
$CD4^+$ФНОα$^+$ Т клетки, %	61,4 ± 3,6	50,8 ± 4,5#	58,3 ± 4,1♦	50,0 ± 5,5#
$CD8^+$ФНОα$^+$ Т клетки, %	77,4 ± 6,7	69,9 ± 6,5	73,6 ± 7,1	68,7 ± 5,9#
$CD4^+$ИФНγ$^+$ Т клетки, %	25,7 ± 3,4	24,5 ± 3,4	23,6 ± 3,3	22,2 ± 3,5#
$CD8^+$ИФНγ$^+$ Т клетки, %	75,4 ± 5,7	72,1 ± 5,7#	76,2 ± 5,8	72,3 ± 5,8#

Примечание: результаты представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего;
– $p < 0,05$ по сравнению с данными «ФМА + иономицин»; ♦ – $p < 0,05$ по сравнению с «ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ»; § – $p < 0,05$ по сравнению с «ФМА + иономицин + теофиллин 1 мкМ»

крови пациентов с ХОБЛ под влиянием дексаметазона [14].

В настоящем исследовании теофиллин не влиял на выработку ФНОα и ИФНγ Тх-клетками и ЦТЛ. В другом исследовании теофиллин в аналогичной концентрации (1 мкМ) не оказывал влияния на экспрессию гена ИФНγ в $CD4^+$ Т-лимфоцитах крови здоровых доноров [6]. Как видно из табл. 3, комбинация будесонида и теофиллина подавляла продукцию обоих цитокинов, ФНОα и ИФНγ, Тх-клетками и ЦТЛ. В клиническом испытании у пациентов с обострением ХОБЛ добавление теофиллина в низкой дозе к стандартной терапии, включающей системные кортикостероиды, приводило к снижению концентрации ФНОα в мокроте.

Тх2-клетки продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 [4]. В нашей работе будесонид подавлял уровень ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 в супернатантах МКПК-клеток пациентов с ХОБЛ, стимулированных ФГА, по сравнению с клетками, культивированными в отсутствие будесонида. ГКС также снижали относительное количество Тх-лимфоцитов и ЦТЛ, продуцирующих ИЛ-4. Вместе с тем теофиллин продемонстрировал способность ингибировать секрецию ИЛ-4 МКПК-клетками, но не влиял на продукцию этими клетками ИЛ-5 и ИЛ-13. В другом исследовании теофиллин в концентрации 1 мкМ не оказывал влияния на экспрессию гена ИЛ-5 в $CD4^+$ Т-лимфоцитах крови здоровых доноров [6].

Нами установлено, что комбинация будесонида и теофиллина угнетала продукцию ИЛ-5 МКПК-клетками более значительно, чем культивация этих клеток в присутствии только теофиллина. Более того, совместное использование будесонида и теофиллина приводило к более выраженному снижению процента $CD4^+$ Т-клеток крови, продуцирующих ИЛ-4, чем воздействие одного из этих лекарственных средств. Полученные результаты свидетельствуют, что теофиллин в сочетании с ГКС способен подавлять воспалительный ответ, развивающийся при посредстве Тх2-клеток.

ИЛ-33 и ТСЛП способны индуцировать иммунный ответ, опосредованный Тх2-клетками, и последующую продукцию цитокинов активированными Тх2-лимфоцитами [20]. Повышенные концентрации ИЛ-33 и ТСЛП были выявлены в дыхательных путях и сыворотке крови пациентов с ХОБЛ [11, 20]. ИЛ-33 стимулирует избыточную продукцию слизи в дыхательных путях, повышение миграции нейтрофилов в легкие и проницаемости эндотелия сосудов, усиливая воспалительный ответ при ХОБЛ [11]. Показано, что ИЛ-33 способствует развитию эозинофильного типа воспаления у пациентов с ХОБЛ [3]. В настоящем исследовании МКПК-клетки оказались нечувствительны к ингибированию будесонидом секреции ИЛ-33 и ТСЛП, индуцированной ФГА. Как видно из табл. 2, теофиллин самостоятельно также не был способен подавить секрецию ИЛ-33 и ТСЛП МКПК-клетками. Вместе с тем продукция ИЛ-33 и ТСЛП существенно снижалась в МКПК-клетках, культивированных с добавлением комбинации теофиллина и будесонида, по сравнению с клетками, находившимися в культуральной среде в отсутствие этих лекарственных средств. Такие находки свидетельствуют о возможности преодоления стероидорезистентности у пациентов с ХОБЛ при сочетанном использовании теофиллина и ГКС.

Тх17-клетки в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ продуцируют ИЛ-17А, который стимулирует секрецию ИЛ-8 и ГМ-КСФ эпителиальными клетками бронхов [18]. Воспалительный процесс, обусловленный ИЛ-17А, характеризуется снижением ответа на кортикостероиды при ХОБЛ [5]. В настоящей работе теофиллин блокировал продукцию ИЛ-17А МКПК-клетками, в то время как будесонид не оказывал влияния на секрецию этого цитокина. Примечательно, что комбинация теофиллина с будесонидом ослабляла влияние ФГА на синтез ИЛ-17А, но теряла преимущества перед использованием одного теофиллина.

ИЛ-8 стимулирует миграцию нейтрофилов в дыхательные пути. Нейтрофилы, оказавшись в ды-

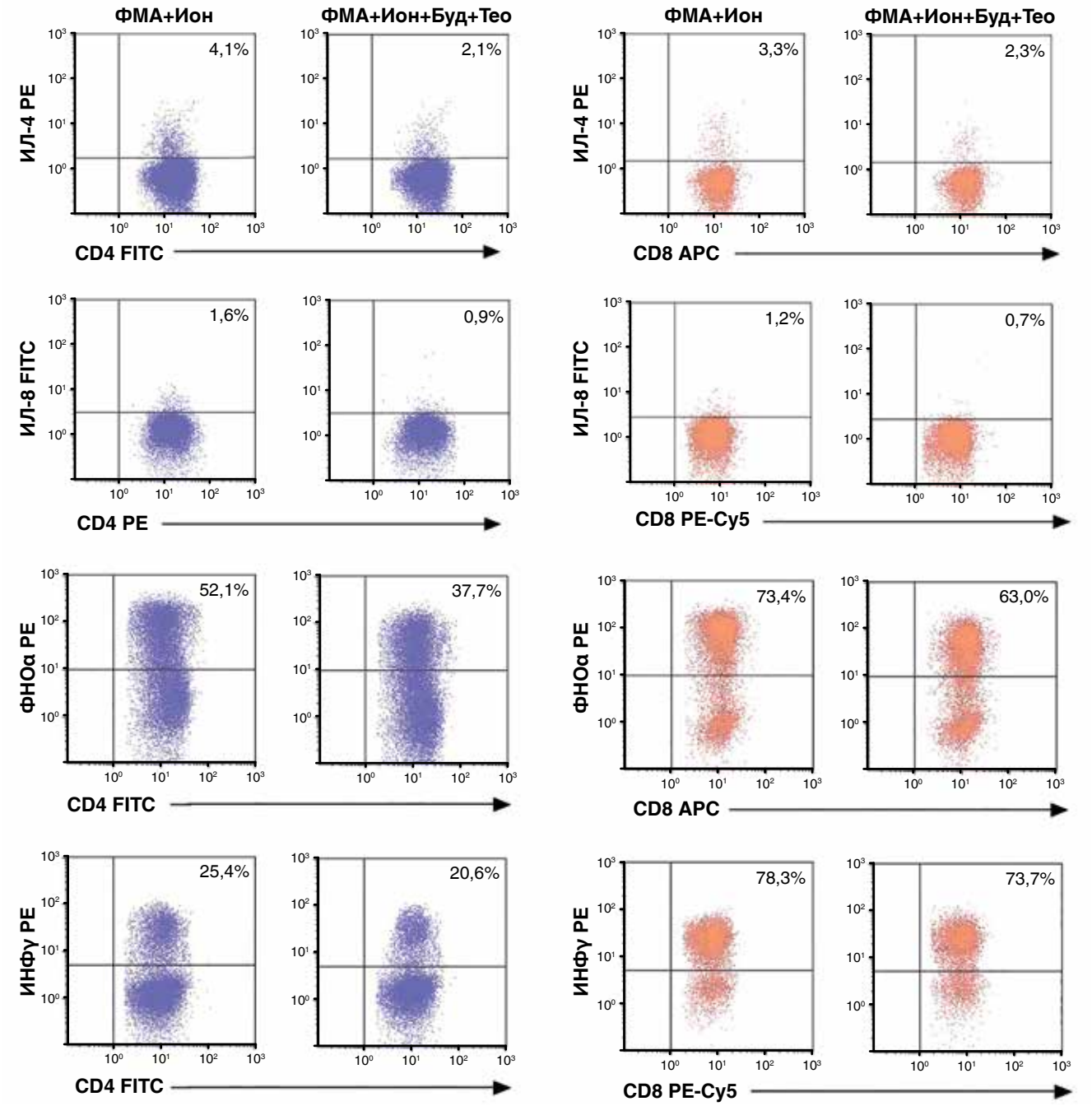

Рис. *Графики, полученные при анализе данных методом проточной цитометрии, демонстрирующие комбинированный эффект 1 мкМ теофиллина (Тео) и 10 нМ будесонида (Буд) на процент Т-хелперов ($CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$), продуцирующих ИЛ-4, ИЛ-8, ИФНγ, ФНОα, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких*

Fig. *Flow cytometry data plots showing the combined effect of 1 μM theophylline (Theo) and 10 nM budesonide (Bud) on the percentage of T-helpers ($CD4^+$) and cytotoxic T-lymphocytes ($CD8^+$) producing IL-4, IL-8, IFNγ, and TNFα, in patients with chronic obstructive pulmonary disease*

хательных путях пациентов с ХОБЛ, секретируют сериновые протеазы, включая матриксную металлопротеиназу-8 (ММП-8), ММП-9, нейтрофильную эластазу, катепсин G и протеиназу-3, которые могут приводить к альвеолярной деструкции и гиперсекреции слизи [21]. В настоящем исследовании мы обнаружили, что синтез ИЛ-8 МКПК-клетками пациентов с ХОБЛ снижался под воздействием будесонида. Кроме того, будесонид снижал относительное количество Тх-клеток и ЦТЛ крови, продуцирующих ИЛ-8. В другом исследовании дексаметазон дозозависимо ингибировал секрецию ИЛ-8 МКПК-клетками пациентов с ХОБЛ и здоровых курильщиков [19].

Проведенные нами исследования показали, что теофиллин самостоятельно не оказывает влияния ни на секрецию ИЛ-8 МКПК-клетками, ни на продукцию этого цитокина Тх-лимфоцитами и ЦТЛ. Однако

сочетанное применение теофиллина с будесонидом приводит к более выраженному подавлению секреции ИЛ-8 МКПК-клетками и синтеза ИЛ-8 ЦТЛ, чем при использовании одного будесонида. В другой лаборатории инкубация альвеолярных макрофагов курящих пациентов с ХОБЛ с добавлением теофиллина приводила к усилению степени подавления дексаметазоном секреции ИЛ-8 этими клетками и повышению их чувствительности к стероидам.

Повышенная экспрессия противовоспалительного цитокина ФИММ представляет собой дополнительный молекулярный механизм развития стероидорезистентности при ХОБЛ [1]. Концентрация ФИММ была выше в плазме крови резистентных к ГКС-терапии пациентов с ХОБЛ по сравнению со стероидочувствительными [2]. В настоящей работе мы обнаружили снижение секреции ФИММ при сочетанном использовании будесонида и теофиллина, тогда как каждый из них по отдельности обладал минимальной ингибирующей активностью. Это означает, что стероидорезистентность, опосредованная ФИММ, может быть преодолена при добавлении к клеткам теофиллина.

Заключение

Необходимо отметить, что теофиллин самостоятельно демонстрирует противовоспалительные эффекты в отношении продукции цитокинов клетками крови пациентов с ХОБЛ. Так, теофиллин снижает секрецию ИЛ-4 и ИЛ-17А МКПК-клетками. Комбинация теофиллина и будесонида супрессирует воспалительный процесс, подавляя секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, ТСЛП и ФИММ МКПК-клетками, а также продукцию ФНОα, ИФНγ, ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх-клетками и ЦТЛ. Сочетание теофиллина и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 МКПК-клетками, а также на синтез ИЛ-4 $CD4^+$ Т-клетками и ИЛ-8 $CD8^+$ Т-лимфоцитами, чем действие одного будесонида. Полученные данные служат дополнительным обоснованием целесообразности использования теофиллина в низкой концентрации совместно с ГКС в клинической практике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.
Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

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. Кадушкин А. Г., Таганович А. Д., Мовчан Л. В., Шман Т. В., Панасюк В. К., Новская Г. К. Использование рутинных тестов общего анализа крови для прогнозирования устойчивости к глюкокортикостероидной терапии у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // Пульмонология. – 2018. – Т. 28, № 6. – С. 681-692.
3. Barnes P. J. Inflammatory endotypes in COPD // Allergy. – 2019. – Vol. 74, № 7. – P. 1249-1256.
4. Barnes P. J. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease // Nat. Rev. Immunol. – 2018. – Vol. 18, № 7. – P. 454-466.
5. Brightling C., Greening N. Airway inflammation in COPD: progress to precision medicine // Eur. Respir. J. – 2019. – Vol. 54, № 2. – P. 1-13.
6. Choy D. K., Ko F., Li S. T., lp L. S., Leung R., Hui D., Lai K. N., Lai C. K. Effects of theophylline, dexamethasone and salbutamol on cytokine gene expression in human peripheral blood $CD4^+$ T-cells // Eur. Respir J. – 1999. – Vol. 14, № 5. – P. 1106-1112.
7. Cosio B. G., Soriano J. B. Theophylline again? Reasons for believing // Eur. Respir. J. –2009. – Vol. 34, № 1. – P. 5-6.
8. De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression // Endocr. Rev. – 2003. – Vol. 24, № 4. – P. 488-522.
9. Dejager L., Vandevyver S., Petta I., Libert C. Dominance of the strongest: inflammatory cytokines versus glucocorticoids // Cytokine Growth Factor Rev. – 2014. – Vol. 25, № 1. – P. 21-33.
10. Devereux G., Cotton S., Fielding S., McMeekin N., Barnes P. J., Briggs A., Burns G., Chaudhuri R., Chrystyn H., Davies L., De Soyza A., Gompertz S., Haughney J., Innes K., Kaniewska J., Lee A., Morice A., Norrie J., Sullivan A., Wilson A., Price D. Effect of theophylline as adjunct to inhaled corticosteroids on exacerbations in patients with copd: a randomized clinical trial // JAMA. – 2018. – Vol. 320, № 15. – P. 1548-1559.

REFERENCES

1. Kadushkin A.G., Taganovich A.D. Molecular mechanisms of steroid resistance development in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 736-747. (In Russ.)
2. Kadushkin A.G., Taganovich A.D., Movchan L.V., Shman T.V., Panasyuk V.K., Novskaya G.K. Use of routine CBC tests to predict resistance to glucocorticosteroid therapy in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya*, 2018, vol. 28, no. 6, pp. 681-692. (In Russ.)
3. Barnes P.J. Inflammatory endotypes in COPD. *Allergy*, 2019, vol. 74, no. 7, pp. 1249-1256.
4. Barnes P.J. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 18, no. 7, pp. 454-466.
5. Brightling C., Greening N. Airway inflammation in COPD: progress to precision medicine. *Eur. Respir. J.*, 2019, vol. 54, no. 2, pp. 1-13.
6. Choy D.K., Ko F., Li S.T., lp L.S., Leung R., Hui D., Lai K.N., Lai C.K. Effects of theophylline, dexamethasone and salbutamol on cytokine gene expression in human peripheral blood $CD4^+$ T-cells. *Eur. Respir J.*, 1999, vol. 14, no. 5, pp. 1106-1112.
7. Cosio B.G., Soriano J.B. Theophylline again? Reasons for believing. *Eur. Respir. J.*, 2009, vol. 34, no. 1, pp. 5-6.
8. De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.*, 2003, vol. 24, no. 4, pp. 488-522.
9. Dejager L., Vandevyver S., Petta I., Libert C. Dominance of the strongest: inflammatory cytokines versus glucocorticoids. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014, vol. 25, no. 1, pp. 21-33.
10. Devereux G., Cotton S., Fielding S., McMeekin N., Barnes P.J., Briggs A., Burns G., Chaudhuri R., Chrystyn H., Davies L., De Soyza A., Gompertz S., Haughney J., Innes K., Kaniewska J., Lee A., Morice A., Norrie J., Sullivan A., Wilson A., Price D. Effect of theophylline as adjunct to inhaled corticosteroids on exacerbations in patients with copd: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2018, vol. 320, no. 15, pp. 1548-1559.

11. Donovan C., Hansbro P. M. IL-33 in Chronic Respiratory Disease: From Preclinical to Clinical Studies // ACS Pharmacol. Transl. Sci. – 2019. – Vol. 3, № 1. – P. 56-62.
12. 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. – Vol. 137, № 6. – P. 1338-1344.
13. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2021 Report). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Available: http://www.goldcopd.org (Accessed: 19.01.2021).
14. Grundy S., Plumb J., Kaur M., Ray D., Singh D. Additive anti-inflammatory effects of corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitors in COPD CD8 cells // Respir. Res. 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1-11.
15. Henrot P., Prevel R., Berger P., Dupin I. Chemokines in COPD: from implication to therapeutic use // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 1-26.
16. Hodge G., Nairn J., Holmes M., Reynolds P.N., Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Vol. 150, № 1. – P. 22-29.
17. Hodge G., Tran H. B., Reynolds P. N., Jersmann H., Hodge S. Lymphocyte senescence in COPD is associated with decreased sirtuin 1 expression in steroid resistant pro-inflammatory lymphocytes // Ther. Adv. Respir. Dis. – 2020. – Vol. 14, № 1753466620905280. – P. 1-12.
18. Honda K., Wada H., Nakamura M., Nakamoto K., Inui T., Sada M., Koide T., Takata S., Yokoyama T., Saraya T., Kurai D., Ishii H., Goto H., Takizawa H. IL-17A synergistically stimulates TNF-α-induced IL-8 production in human airway epithelial cells: A potential role in amplifying airway inflammation // Exp. Lung Res. – 2016. – Vol. 42, № 4. – P. 205-216.
19. Khorasani N., Baker J., Johnson M., Chung K. F., Bhavsar P. K. Reversal of corticosteroid insensitivity by p38 MAPK inhibition in peripheral blood mononuclear cells from COPD // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2015. – Vol. 10. – P. 283-291.
20. Oishi K., Matsunaga K., Shirai T., Hirai K., Gon Y. Role of Type2 Inflammatory Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // J. Clin. Med. – 2020. – Vol. 9, № 8. – P. 1-23.
21. Owen C. A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 253-268.
22. Zervas E., Samitas K., Gaga M., Beghe B., Fabbri L. M. Inhaled corticosteroids in COPD: pros and cons // Curr. Drug Targets. – 2013. – Vol. 14, № 2. – P. 192-224.

11. Donovan C., Hansbro P.M. IL-33 in Chronic Respiratory Disease: From Preclinical to Clinical Studies. *ACS Pharmacol. Transl.* Sci., 2019, vol. 3, no. 1, pp. 56-62.
12. 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, vol. 137, no. 6, pp. 1338-1344.
13. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2021 Report). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Available: http://www.goldcopd.org (Accessed: 19.01.2021).
14. Grundy S., Plumb J., Kaur M., Ray D., Singh D. Additive anti-inflammatory effects of corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitors in COPD CD8 cells. *Respir Res.,* 2016, vol. 17, no. 9, pp. 1-11.
15. 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, pp. 1-26.
16. Hodge G., Nairn J., Holmes M., Reynolds P.N., Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, vol. 150, no. 1, pp. 22-29.
17. Hodge G., Tran H.B., Reynolds P.N., Jersmann H., Hodge S. Lymphocyte senescence in COPD is associated with decreased sirtuin 1 expression in steroid resistant pro-inflammatory lymphocytes. *Ther. Adv. Respir. Dis.*, 2020, vol. 14, no. 1753466620905280, pp. 1-12.
18. Honda K., Wada H., Nakamura M., Nakamoto K., Inui T., Sada M., Koide T., Takata S., Yokoyama T., Saraya T., Kurai D., Ishii H., Goto H., Takizawa H. IL-17A synergistically stimulates TNF-α-induced IL-8 production in human airway epithelial cells: A potential role in amplifying airway inflammation. *Exp. Lung Res.*, 2016, vol. 42, no. 4, pp. 205-216.
19. Khorasani N., Baker J., Johnson M., Chung K.F., Bhavsar P.K. Reversal of corticosteroid insensitivity by p38 MAPK inhibition in peripheral blood mononuclear cells from COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2015, vol. 10, pp. 283-291.
20. Oishi K., Matsunaga K., Shirai T., Hirai K., Gon Y. Role of Type2 Inflammatory Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Clin. Med*., 2020, vol. 9, no. 8, pp. 1-23.
21. Owen C. A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.,* 2008, vol. 3, no. 2, pp. 253-268.
22. Zervas E., Samitas K., Gaga M., Beghe B., Fabbri L.M. Inhaled corticosteroids in COPD: pros and cons. *Curr. Drug Targets,* 2013, vol. 14, no. 2, pp. 192-224.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

Кадушкин Алексей Геннадьевич
кандидат медицинских наук,
доцент кафедры биологической химии.
Тел.: (37517) 373-93-92.
E-mail: kadushkyn@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-1620-8477

Таганович Анатолий Дмитриевич
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой биологической химии.
Тел.: (37517) 277-17-64.
E-mail: taganovich@bsmu.by
https://orcid.org/0000-0002-0668-2888

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Belorussian State
Medical University,
83, Dzerzhinskogo Ave.,
Minsk, Belarus Republic, 220116.

Aleksey G. Kadushkin
Candidate of Medical Sciences,
Associate Professor of Biological Chemistry Department.
Phone: (37517) 373-93-92.
Email: kadushkyn@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-1620-8477

Anatoliy D. Taganovich
Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of of Biological Chemistry Department.
Phone: (37517) 277-17-64.
Email: taganovich@bsmu.by
https://orcid.org/0000-0002-0668-2888

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
223053, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, д. 43.
Тел.: (37517) 265-40-89.

Мовчан Людмила Викторовна
кандидат биологических наук, врач лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории.
E-mail: movchan-l@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0441-0109

Шман Татьяна Викторовна
кандидат биологических наук, заведующая лабораторией иммунологических исследований.
E-mail: shman@oncology.by

Учреждение здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический центр»,
220045, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Семашко, д. 10.
Тел.: (37517) 277-19-87.

Талабаева Элина Ивановна
врач-пульмонолог консультационного отделения.
E-mail: alina.tal@mail.ru

Пластинина Алёна Всеволодовна
врач-пульмонолог консультационного отделения.
E-mail: alenailina@gmail.com

Republican Scientific Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology,
43, Frunzenskaya St., Borovlyany, Minsky District, Minsky Region, the Republic of Belarus, 223053.
Phone: (37517) 265-40-89.

Lyudmila V. Movchan
Candidate of Biological Sciences, Laboratory Diagnostics Physician of Clinical Diagnostic Laboratory.
Email: movchan-l@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0441-0109

Tatiana V. Shman
Candidate of Biological Sciences, Head of Immunological Laboratory.
Email: shman@oncology.by

Minsk Clinical Consulting and Diagnostic Center,
10, Semashko St., Minsk, Belarus, 220045.
Phone: (37517) 277-19-87.

Elina I. Talabaeva
Pulmonologist of Consulting Department.
Email: alina.tal@mail.ru

Alena V. Plastinina
Pulmonologist of Consulting Department.
Email: alenailina@gmail.com

Поступила 15.01.2021

Submitted as of 15.01.2021