

**ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ВЫРАБОТКУ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ ЕСТЕСТВЕННЫМИ
КИЛЛЕРАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ**

Кадушкин А.Г.

*к. м. н., доцент кафедры биологической химии учреждения образования
«Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск,
Беларусь*

kadushkinah@bsmu.by;

Таганович А.Д.

*д. м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии
учреждения образования «Белорусский государственный медицинский
университет», г. Минск, Беларусь taganovich@bsmu.by;*

Талабаева Э.И.

*врач-пульмонолог консультационного отделения учреждения
здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический
центр», г. Минск, Беларусь*

alina.tal@mail.ru;

Пластинина А.В.

*врач-пульмонолог консультационного отделения учреждения
здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический
центр», г. Минск, Беларусь*

alenaalina@gmail.com;

Левандовская О.В.

*заведующая центром трансфузиологии государственного учреждения
«Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и
гематологии», г. Минск, Беларусь*

o_lev77@mail.ru

В настоящей работе проведена оценка способности N-ацетилцистеина (N-АЦЦ) усиливать противовоспалительные эффекты глюкокортикоидов (ГК) в отношении продукции провоспалительных медиаторов естественными киллерами (ЕК-клетками) крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) (n=21). Внутриклеточный синтез цитокинов в ЕК-клетках крови, стимулированных форбол-миристат-ацетатом, оценивали методом проточной цитометрии. N-АЦЦ (1 мМ) подавлял синтез интерлейкина 4 (ИЛ-4) и ИЛ-8 ЕК-клетками. Сочетание 1 мМ N-АЦЦ и 10 нМ будесонида оказывало более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 ЕК-клетками, чем действие любого из этих препаратов. Статистически значимой разницы процентного содержания ЕК-клеток, продуцирующих ИЛ-8, интерферон γ и фактор некроза опухоли α , под влиянием комбинации N-АЦЦ и будесонида по сравнению с клетками,

культивированными в присутствии одного будесонида, выявлено не было. Полученные результаты свидетельствуют об ограниченной способности N-АЦЦ потенцировать противовоспалительные эффекты ГК.

Ключевые слова: *естественные киллеры; хроническая обструктивная болезнь легких; медиаторы; N-ацетилцистеин*

INFLUENCE OF N-ACETYLCYSTEINE ON THE PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS BY BLOOD NATURAL KILLER CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Kadushkin A.G.

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus
kadushkyn@gmail.com;*

Tahanovich A.D.

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus,
taganovich@bsmu.by;*

Talabayeva E.I.

*pulmonologist at the Consulting Department of the Healthcare Institution "Minsk Clinical Consultative and Diagnostic Center", Minsk, Belarus
alina.tal@mail.ru;*

Plastinina A.V.

*pulmonologist at the Consulting Department of the Healthcare Institution "Minsk Clinical Consultative and Diagnostic Center", Minsk, Belarus
alenailina@gmail.com;*

Levandovskaya O.V.

*head of the Transfusiology Center of a State Institution "Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology", Minsk, Belarus
o_lev77@mail.ru*

In this work, we have assessed the ability of N-acetylcysteine (N-ACC) to enhance the anti-inflammatory effects of glucocorticoids (GCs) on the production of pro-inflammatory mediators by natural killer cells (NK cells) in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n = 21). Intracellular synthesis of cytokines in blood NK cells stimulated with phorbol myristate acetate was assessed by flow cytometry. N-ACC (1 mM) inhibited the synthesis of interleukin 4 (IL-4) and IL-8 by NK cells. The combination of 1 mM N-ACC and 10 nM budesonide had a more pronounced inhibitory effect on the production of IL-4 by NK cells than the effect of any of these drugs. There was no statistically significant

difference in the percentage of NK cells producing IL-8, interferon γ , and tumor necrosis factor α under the influence of a combination of N-ACC and budesonide compared to cells cultured in the presence of budesonide alone. The results obtained indicate the limited ability of N-ACC to potentiate the anti-inflammatory effects of GCs.

Key words: *natural killer cells, chronic obstructive pulmonary disease, mediators, N-acetylcysteine*

Глюкокортикоиды (ГК) широко используются для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), поскольку обладают противовоспалительным механизмом действия. Однако клетки пациентов с ХОБЛ оказались устойчивыми к действию этих препаратов. В частности, сообщается о сниженной чувствительности к ГК естественных киллеров (ЕК-клеток). Процентное содержание этих лимфоцитов повышено в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ [1].

ЕК-клетки относят к эффекторным клеткам врожденной иммунной системы. Они взаимодействуют с дендритными клетками, макрофагами, Т-лимфоцитами и эндотелиальными клетками, что позволяет им ограничивать или усиливать иммунный ответ. ЕК-клетки являются важным источником цитокинов и хемокинов, таких как интерферон γ (ИФН γ), фактор некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкин 4 (ИЛ-4), ИЛ-8 и других.

Резистентность клеток пациентов с ХОБЛ к ГК подтолкнула клиницистов и ученых к поиску лекарственных средств, способных усиливать противовоспалительные эффекты стероидов. Получены данные о способности N-АЦЦ усиливать противовоспалительные эффекты ГК [2], которые не нашли подтверждения в работе других исследователей [3].

Целью настоящей работы явилось установить способность N-АЦЦ усиливать противовоспалительные эффекты ГК в отношении синтеза ФНО α , ИФН γ , ИЛ-4 и ИЛ-8 ЕК-клетками крови пациентов с ХОБЛ.

В исследовании принял участие 21 пациент с ХОБЛ (17 лиц мужского пола и 4 женщины). Средний возраст обследуемых лиц составил $65,1 \pm 1,5$, индекс массы тела – $26,7 \pm 1,2$ кг·м⁻². Критерии включения пациентов в исследование: соответствие диагноза критериям GOLD 2019, индекс курящего человека более 10 пачка-лет, стабильное течение заболевания. Критериями исключения из исследования являлись наличие у пациентов других заболеваний бронхолегочной системы, аллергологического анамнеза, острых инфекционных заболеваний, нарушений свертывающей системы крови.

Венозную кровь у пациентов забирали в пробирки, содержащие гепарин натрия, и немедленно доставляли в лабораторию. В новых стерильных пробирках смешивали 7 мл крови с 7 мл культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой. К клеточным культурам добавляли 10 нМ будесонида (Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания)

и/или 1 мМ N-АЦЦ (Sigma-Aldrich, США), и далее пробирки инкубировали в течение 1 часа при 37°C, 5% CO₂. Для стимуляции клеток в пробирки вносили 50 нг/мл форбол-миристан-ацетата (ФМА, Cayman Chemical, США) и 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (Cayman Chemical, Израиль), для прекращения секреции цитокинов из клетки – 10 мкг/мл брефельдина А (Cayman Chemical, Израиль). По окончании 6 часов к клеткам добавляли 100 мкл 20 мМ раствора ЭДТА, пробирки встряхивали в течение 20 секунд. После отмывки к клеткам добавляли моноклональные антитела (CD45-APC-Alexa Fluor 750, Beckman Coulter, Франция; CD3-PE-DyLight 594, CD56-PE-Cy7, Exbio, Чехия) для связывания с соответствующими поверхностными антигенами в течение 15 минут в темноте. Проводили лизирование эритроцитов с применением раствора Versalyse (Beckman Coulter, Франция) в течение 15 минут. Затем, используя IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter), клетки последовательно отмывали, фиксировали в течение 15 минут, снова отмывали и пермеабелизировали в течение 5 минут. В пробирки вносили конъюгированные с флюорохромами антитела к внутриклеточным цитокинам: ИЛ-8-FITC (R&D systems Europe, Великобритания), ИЛ-4-PE, ИФН γ -APC или ФНО α -PE (Beckman Coulter). Спустя 15 минут инкубации клеток с антителами, их отмывали и фиксировали, используя 500 мкл 1% раствора параформальдегида. Фенотипирование клеток проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). ЕК-клетки определяли как CD45+CD3-CD56+ события.

Обработку результатов исследования проводили с помощью программы GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Анализ полученных данных проводили с использованием метода ANOVA и критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

В настоящей работе внесение N-АЦЦ к культуре клеток периферической крови снижало продукцию ИЛ-4 ЕК-клетками (таблица). Более того, совместное использование N-АЦЦ и ГК приводило к более выраженному подавлению образования ИЛ-4 ЕК-клетками, чем каждый из препаратов по отдельности.

Таблица - Влияние N-ацетилцистеина (N-АЦЦ), будесонида и их комбинации на внутриклеточную продукцию цитокинов ЕК-клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

Субпопуляция лимфоцитов	ФМА + иономицин	ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ	ФМА + иономицин + N-АЦЦ 1 мМ	ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ + N-АЦЦ 1 мМ
ИЛ-4+ ЕК-клетки, %	3,7 ± 0,2	2,9 ± 0,2*	3,0 ± 0,1*	2,3 ± 0,1* #§

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

ИЛ-8+ ЕК-клетки, %	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1*	1,5 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*
ФНО α + ЕК-клетки, %	69,9 ± 6,6	59,3 ± 6,2*	67,4 ± 7,7	52,8 ± 4,7*
ИФН γ + ЕК-клетки, %	40,5 ± 5,0	33,8 ± 4,1*	37,7 ± 5,4	33,0 ± 5,6*

Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; n=6. ИЛ – интерлейкин; ИФН γ – интерферон γ ; ФНО α – фактор некроза опухоли α ; * p < 0,05 по сравнению с ФМА + иономицин; #p < 0,05 по сравнению с ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ; §p < 0,05 по сравнению с ФМА + иономицин + N-АЦЦ 1 мМ.

Результаты нашего исследования показали, что будесонид и N-АЦЦ по отдельности снижают процент ЕК-клеток, продуцирующих ИЛ-8. При комплексном внесении в культуральную среду будесонида и N-АЦЦ угнеталось образование ИЛ-8 в ЕК-клетках крови пациентов с ХОБЛ по сравнению с такими же клетками, находившимися в культуральной среде в отсутствии этих лекарственных средств. Однако статистически значимой разницы при сравнении процента ЕК-клеток, экспрессирующих ИЛ-8, в присутствии одновременно будесонида и N-АЦЦ с процентом этих клеток, культивированных только с одним из этих препаратов, не наблюдалось. Это свидетельствует об отсутствии преимуществ комбинированного применения N-АЦЦ и ГКС в отношении снижения продукции ИЛ-8 ЕК-клетками крови.

В то время как ИЛ-8 участвует в миграции нейтрофилов, другой цитокин, ИФН γ , способствует перемещению Т-лимфоцитов в дыхательные пути пациентов с ХОБЛ. Это происходит за счет его способности индуцировать экспрессию клетками воздухоносных путей хемокинов Mig, IP-10 и I-TAC, которые, связываясь с рецептором Т-лимфоцитов CXCR3, запускают перемещение этих клеток. Как видно из таблицы, N-АЦЦ не влиял на образование ИФН γ ЕК-клетками крови пациентов с ХОБЛ. Сочетание N-АЦЦ с ГК оказалось эффективным в подавлении продукции ИФН γ ЕК-клетками крови по сравнению с клетками, инкубация которых проводилась в отсутствии обоих лекарственных средств. Однако процент ЕК-клеток, продуцирующих ИФН γ , в присутствии одного будесонида не отличался от процента этих клеток, находившихся в культуральной среде совместно с обоими препаратами (будесонидом и N-АЦЦ).

В нашей работе внесение N-АЦЦ в культуру клеток периферической крови не приводило к изменению синтеза ФНО α ЕК-клетками периферической крови, тогда как будесонид подавлял образование ФНО α этими клетками. Сочетание N-АЦЦ и ГК также ингибировало продукцию ФНО α ЕК-клетками. Вместе с тем статистически значимой разницы процентного содержания ЕК-клеток, экспрессирующих ФНО α , при инкубации

клеток с будесонидом и комбинацией лекарственных средств N-АЦЦ/будесонид обнаружено не было. Такие результаты нашего исследования демонстрируют неспособность N-АЦЦ, во-первых, самостоятельно ингибировать синтез ФНО α , а, во-вторых, потенцировать противовоспалительные эффекты ГК в отношении продукции этого цитокина.

Таким образом, N-АЦЦ самостоятельно проявляет противовоспалительные эффекты в отношении продукции цитокинов ЕК-клетками крови пациентов с ХОБЛ. Так, N-АЦЦ подавляет синтез ИЛ-4 и ИЛ-8 ЕК-клетками. Сочетание N-АЦЦ и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 ЕК-клетками, чем действие любого из этих препаратов. Вместе с тем отсутствует разница процентного содержания ЕК-клеток, продуцирующих ИЛ-8, ИФН γ и ФНО α , в присутствии комбинации N-АЦЦ и будесонида по сравнению с клетками, находившимися в культуральной среде лишь с одним будесонидом. Полученные результаты свидетельствуют об ограниченной способности N-АЦЦ потенцировать противовоспалительные эффекты ГК.

Список литературы

1. Hodge, G. Therapeutic Targeting Steroid Resistant Pro-Inflammatory NK and NKT-Like Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease / G. Hodge, S. Hodge // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 6. – P. 1–10.
2. Benefits of high-dose N-acetylcysteine to exacerbation-prone patients with COPD / H.N. Tse [et al.] // *Chest.* – 2014. – Vol. 146, № 3. – P. 611–623.
3. Impact of smoking status and concomitant medications on the effect of high-dose N-acetylcysteine on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: A post-hoc analysis of the PANTHEON study / A. Papi [et al.] // *Respir. Med.* – 2019. – Vol. 147. – P. 37–43.