

ИЗМЕНЕНИЕ ХЕМОТАКСИСА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ПОД ВЛИЯНИЕМ НОРТРИПТИЛИНА

Кадушкин А. Г.

кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биологической химии, учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
kadushkinah@bsmu.by;

Таганович А. Д.

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии, учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
taganovich@bsmu.by;

Колесникова Т. С.

старший научный сотрудник, учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
tanyakolesnikova@list.ru;

Ходосовская Е. В.

старший научный сотрудник, учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
leno4ka_579@mail.ru

Аннотация. Влияние нортриптилина (1 и 10 мкМ), будесонида (10 нМ) и их комбинации на миграцию субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) к хемокинам CCL5 и CXCL10 изучено с помощью метода проточной цитометрии. Нортриптилин (10 мкМ), самостоятельно и в сочетании с будесонидом, подавлял миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, NK-клеток и В-лимфоцитов. Сочетание нортриптилина (1 мкМ) и будесонида превосходило способность одного будесонида подавлять хемотаксис субпопуляций лимфоцитов к CXCL10, но не к CCL5. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида супрессировала миграцию к обоим хемокинам субпопуляций лимфоцитов более значительно, чем один будесонид. Результаты исследования демонстрируют способность нортриптилина потенцировать эффекты будесонида в отношении миграции субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ.

Ключевые слова: нортриптилин; ХОБЛ; хемотаксис; CCL5; CXCL10

EFFECT OF NORTRIPTYLINE ON THE CHEMOTAXIS OF BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Kadushkin A. G.

*PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of Biological Chemistry Department, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
kadushkinah@bsmu.by;*

Tahanovich A. D.

*PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Biological Chemistry Department, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
taganovich@bsmu.by;*

Kolesnikova T. S.

*Senior Researcher, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
tanyakolesnikova@list.ru;*

Khadouskaya E. V.

*Senior Researcher, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
leno4ka_579@mail.ru*

Annotation. *The effect of nortriptyline (1 and 10 μ M), budesonide (10 nM), and their combinations on the migration of blood lymphocyte subpopulations from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to chemokines CCL5 and CXCL10 was studied using flow cytometry. Nortriptyline (10 μ M), alone and in combination with budesonide, inhibited the migration of T-helper cells, cytotoxic T-lymphocytes, NK-cells and B-lymphocytes to CCL5 and CXCL10. The combination of nortriptyline (1 μ M) and budesonide was superior to the ability of budesonide alone to suppress the chemotaxis of lymphocyte subpopulations to CXCL10, but not to CCL5. The combination of nortriptyline (10 μ M) and budesonide suppressed the migration of lymphocyte subpopulations to both chemokines more significantly than budesonide alone. The results of the study demonstrate the ability of nortriptyline to potentiate the effects of budesonide in relation to the migration of peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with COPD.*

Keywords: *nortriptyline; COPD; chemotaxis; CCL5; CXCL10*

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является социально значимым заболеванием, что обусловлено ее высокой распространенностью, значительной инвалидностью и смертностью пациентов. Глобальная распространенность ХОБЛ среди лиц старше 40 лет составляет 13,1% [1]. Ежегодно это заболевание уносит жизни более 3 миллионов пациентов [2].

Нарастание выраженности воспалительной реакции у пациентов с ХОБЛ вовлекает моноциты/альвеолярные макрофаги (АМ), лимфоциты и нейтрофилы. Эти клетки играют определяющую роль в регуляции легочного и системного воспаления путем секреции хемокинов, цитокинов, факторов роста и протеаз. Вместе с тем они оказались резистентными к действию глюкокортикоидов, лекарственных средств с противовоспалительным механизмом действия [3].

Предпринимаются попытки повысить стероидочувствительность при наличии устойчивости к этой группе препаратов. Результаты экспериментальных исследований указывают на то, что трициклический антидепрессант нортриптилин может оказаться эффективным в преодолении стероидорезистентности [4]. Однако способность этого препарата потенцировать эффекты глюкокортикоидов, связанные с угнетением миграции субпопуляций лимфоцитов, ранее не изучалась.

Целью исследования явилось оценить способность комбинации нортриптилина и будесонида влиять на перемещение субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ к хемокинам CCL5 и CXCL10.

В исследовании приняли участие 8 пациентов с ХОБЛ (6 мужчин и 2 женщины) со стабильным течением заболевания, II-III степенью тяжести (в соответствии с критериями GOLD, Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких) и индексом курящего человека более 10 пачка/лет. Возраст обследованных лиц составил 61,5 (59,0–68,3) лет. Из исследования исключались пациенты с другими хроническими заболеваниями бронхолегочной системы, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, нарушениями свертывающей системы крови, а также пациенты, принимавшие системные глюкокортикоиды последние 6 недель до проведения исследования.

Венозную кровь у пациентов забирали утром натощак в объеме 15 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия в качестве антикоагулянта. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности 1,077, используя раствор Lymphopure (Biolegend, США). Клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 /мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 1% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, Capricorn Scientific, Германия).

В чистые пробирки помещали 1 мл суспензии клеток (1×10^6 мононуклеарных клеток крови) и инкубировали с глюкокортикоидом будесонидом (10 нМ) (Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания), трициклическим антидепрессантом нортриптилином (1 и 10 мкМ) (Sigma-Aldrich, США), или их сочетанием в увлажненной 5% CO₂ при 37°C. Через 1 час 100 мкл суспензии клеток переносили в верхние камеры планшета с порами диаметром 5 мкм (Costar Corning, США). В нижние камеры планшета добавляли

600 мкл хемотаксического буфера, состоящего из культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС и хемокинами CCL5 (10 нМ, R&D systems, США) или CXCL10 (10 нМ, Gibco, США). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂. По окончании 2 часов клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали, отмывали при помощи фосфатного солевого буфера (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша) и ресуспендировали в ФСБ. Вносили моноклональные антитела CD3-FITC / CD19-ECD / CD4-PerCP-Cy5.5 / CD56-PC7 / CD8-APC / CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, Франция; Exbio, Чехия; BD Biosciences, США), после чего клетки инкубировали в темноте в течение 20 минут при температуре 4°C. Затем клетки отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0,2% бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences, США), и фиксировали путем добавления 300 мкл 1% раствора параформальдегида. На проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США), настроенном на среднюю скорость потока клеток, в течение 100 секунд подсчитывали количество клеток.

Для анализа образцов использовали программное обеспечение Kaluza (Beckman Coulter). Т-хелперы идентифицировали как CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клетки, цитотоксические Т-лимфоциты – CD45⁺CD3⁺CD8⁺, В-лимфоциты – CD45⁺CD19⁺, НК-клетки – CD45⁺CD3⁻CD56⁺.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, США). Оценку результатов исследования проводили 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%.

В настоящей работе будесонид подавлял миграцию к CCL5 цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов, а к CXCL10 – НК-клеток и В-лимфоцитов, но не влиял на перемещение цитотоксических Т-лимфоцитов к CXCL10 и Т-хелперов к CCL5 и CXCL10 (таблица).

Таблица – Влияние нортриптилина и будесонида на хемотаксис субпопуляций лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ в направлении CCL5 и CXCL10

Тип клеток	Контроль	Буд	Нт 1 мкМ	Нт 10 мкМ	Буд + Нт 1 мкМ	Буд + Нт 10 мкМ
% клеток, мигрировавших к CCL5						
Тх	100,0±0,0	81,6±7,0	76,5±5,4* [#]	38,4±6,6* [♦]	64,7±8,1* [*]	35,4±6,1* [♦]
ЦТЛ	100,0±0,0	76,6±5,8*	80,7±3,4* [#]	34,4±3,7* [♦]	72,0±6,6* ^β	27,4±3,5* ^{♦#}
НК	100,0±0,0	70,3±5,9*	73,0±6,7* [#]	21,5±1,5* [♦]	50,4±7,0* ^β	12,1±1,0* ^{♦#}
В-лимф.	100,0±0,0	67,4±5,9*	53,5±6,2*	37,5±4,2* [♦]	45,0±6,1* [*]	25,7±4,3* [♦]

% клеток, мигрировавших к CXCL10						
Тх	100,0±0,0	96,9±10,4	70,1±4,9* [#]	35,7±4,2* [♦]	58,8±5,4* ^{♦β}	35,2±5,7* [♦]
ЦТЛ	100,0±0,0	87,3±8,7	80,5±6,7 [#]	24,5±6,0* [♦]	49,5±4,7* ^{♦§β}	24,2±5,0* [♦]
НК	100,0±0,0	81,8±4,5*	80,2±3,5* [#]	20,4±1,4* [♦]	62,2±3,5* ^{♦§β}	13,3±1,6* ^{♦#}
В-лимф.	100,0±0,0	76,1±6,0*	64,2±6,5* [#]	26,2±5,6* [♦]	34,9±3,7* ^{♦§}	17,9±3,0* [♦]

Примечание: Буд – будесонид (10 нМ), В-лимф. – В-лимфоциты; Нт – нортриптилин, Тх – Т-хелперы, ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=8. * – p<0,05 по сравнению с контролем (клетками крови с хемокином, но без лекарственных средств); ♦ – p<0,05 по сравнению с Буд 10 нМ; # – p<0,05 по сравнению с Нт 10 мкМ; § – p<0,05 по сравнению с Нт 1 мкМ; β – p<0,05 по сравнению с Буд 10 нМ + Нт 10 мкМ.

В концентрации 1 мкМ нортриптилин снижал хемотаксис к CXCL10 Т-хелперов, НК-клеток и В-лимфоцитов, а к CCL5 – Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов, но не изменял перемещение цитотоксических Т-лимфоцитов к CXCL10. Комбинация этого препарата (1 мкМ) с будесонидом более существенно, чем один будесонид, подавляла миграцию к CXCL10 субпопуляций лимфоцитов. В концентрации 10 мкМ нортриптилин, самостоятельно и в сочетании с будесонидом, ингибировал миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида обладала более выраженным ингибирующим действием на миграцию субпопуляций лимфоцитов крови к CCL5 и CXCL10, чем один будесонид.

Список литературы

1. Geographic distribution of COPD prevalence in the world displayed by Geographic Information System maps / I. Blanco [et al.] // Eur. Respir. J. – 2019. – Vol. 54, № 1 (1900610). – P. 1–3.
2. Triple Therapy in COPD: Can We Welcome the Reduction in Cardiovascular Risk and Mortality? / P. Solidoro [et al.] // Front. Med. – 2022. – Vol. 9, № 816843. – P. 1–9.
3. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD / Y. Wang [et al.] // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2018. – Vol. 13. – P. 3341–3348.
4. Nortriptyline enhances corticosteroid sensitivity of blood T cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Kadushkin [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2021. – Vol. 72, № 5. – P. 793–805.