

*А.О. Пермякова, М.В. Сакович*  
**ВЛИЯНИЕ НОРТРИПТИЛИНА НА ВЫРАБОТКУ  
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ В ЕК-КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ  
С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ**

*Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А.Г. Кадушкин*  
*Кафедра биологической химии*  
*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*A. O. Permiakova, M. V. Sakovich*  
**THE EFFECT OF NORTRIPTYLINE ON THE PRODUCTION  
OF PROINFLAMMATORY MEDIATORS IN NK-CELLS FROM PATIENTS  
WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

*Tutor: associate professor A.G. Kadushkin*  
*Department of Biological Chemistry*  
*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Основными препаратами при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) являются ингаляционные глюкокортикостероиды (ГКС), однако у пациентов отмечается снижение чувствительности к ним ЕК-клеток. В статье оценивается влияние нортриптилина, ГКС и их комбинации на выработку провоспалительных медиаторов в ЕК-клетках пациентов с ХОБЛ.

**Ключевые слова:** нортриптилин, стероидная резистентность, ХОБЛ, ЕК-клетки.

**Resume.** The main drugs for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are inhaled glucocorticosteroids (GCs), but patients have a decreased sensitivity of NK-cells to them. This article evaluates the effect of nortriptyline, GCs and their combination on the production of proinflammatory mediators in NK-cells of COPD patients.

**Keywords:** COPD, nortriptyline, NK-cells, steroid resistance.

**Актуальность.** Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется прогрессирующей обструкцией дыхательных путей, являющейся лишь частично обратимой, воспалительной реакцией в них и системными эффектами. ХОБЛ признается третьей ведущей причиной смертности в мире, на долю которой приходится 6% от общего числа летальных исходов [1]. Курение сигарет является основным фактором риска развития и прогрессирования ХОБЛ. Основу лечения составляют ингаляционные глюкокортикостероиды (ГКС), однако у пациентов с ХОБЛ отмечается снижение чувствительности к стероидам естественных киллеров (ЕК), что препятствует проявлению основного терапевтического эффекта данных лекарственных средств [2,3].

**Цель:** оценить влияние антидепрессанта нортриптилина, ГКС будесонида и их комбинации на экспрессию провоспалительных медиаторов в ЕК-клетках (CD3-CD56+) крови пациентов с ХОБЛ.

**Задачи:**

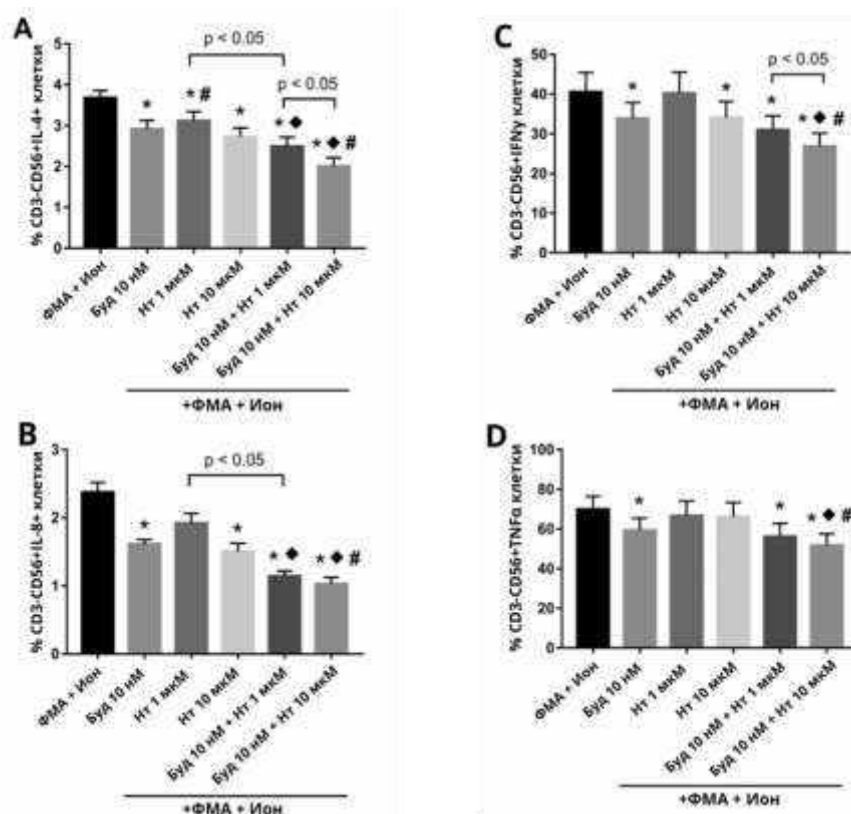
1. Определить влияние нортриптилина и будесонида на продукцию цитокинов (интерлейкина 4 (IL-4), IL-8, интерферона  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) в ЕК-клетках.

2. Оценить влияние нортриптилина и будесонида на экспрессию глюкокортикоидного рецептора  $\beta$  (GR $\beta$ ), гистондеацетилазы 2 (HDAC2) и гистонацетильтрансферазы (НАТ) ЕК-клетками.

3. Проанализировать влияние нортриптилина и будесонида на фосфорилирование p65 NF- $\kappa$ B и p38 митоген-активированной протеинкиназы (p38 MAPK) в ЕК-клетках больных ХОБЛ.

**Материалы и методы.** В исследовании участвовал 21 пациент с ХОБЛ. Цельную кровь смешивали в стерильных пробирках с равным объемом культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 10% инактивированной фетальной телячьей сывороткой. Затем клетки инкубировали в присутствии или отсутствии нортриптилина (1 и 10 мкМ), будесонида (10 нМ) и их комбинаций в течение 1 часа. После инкубации с препаратами лейкоциты стимулировали форбол-миристат-ацетатом (ФМА, 50 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл). Для ингибирования секреции цитокинов добавляли брэфельдин А (10 мкг/мл). Внутриклеточную продукцию цитокинов ЕК-клетками крови оценивали методом проточной цитометрии. Идентификацию клеток проводили с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами и специфичных к CD45, CD3, CD56, IL-4, IL-8, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , HDAC2, НАТ, p38 MAPK, и поликлональных антител к GR $\beta$ . Обработка данных осуществлялась с помощью пакета статистического анализа данных GraphPad Prism (версия 7.00) и программного обеспечения Kaluza Analysis.

**Результаты и их обсуждение.** Будесонид подавлял индуцированную ФМА/иономицином продукцию IL-4, IL-8, TNF $\alpha$  и INF $\gamma$  в ЕК. Нортриптилин 10 мкМ снижал синтез IL-4, IL-8 и INF $\gamma$  в ЕК-клетках пациентов с ХОБЛ. В концентрации 1 мкМ нортриптилин снижал только продукцию IL-4. После внесения к стимулированным ФМА/иономицином клеткам цельной крови комбинации нортриптилина 10 мкМ и будесонида значительно снижалась экспрессия IL-4, IL-8, INF $\gamma$  и TNF $\alpha$  ЕК-клетками по сравнению с влиянием одного будесонида. Совместное применение нортриптилина 1 мкМ и будесонида приводило к развитию аддитивного эффекта, состоящего в снижении продукции IL-4 и IL-8 в ЕК-клетках пациентов с ХОБЛ (рисунок 1).



**Рис. 1** – Процент ЕК-клеток (CD3-CD56+) периферической крови пациентов с ХОБЛ, продуцирующих IL-4, IL-8 (А,В), INF $\gamma$  и TNF $\alpha$  (С,Д), после инкубации с будесонидом и нортриптилином. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион; ◆ –  $p < 0,05$  по сравнению с Буд 10 нМ; # –  $p < 0,05$  по сравнению с Нт 10 мкМ

В ответ на ФМА и иономицин в ЕК увеличивались фосфорилирование и активация p38 MAPK и p65 NF- $\kappa$ B. Нортриптилин 10 мкМ подавлял фосфорилирование p38 MAPK и p65 NF- $\kappa$ B. ЕК-клетки пациентов с ХОБЛ, к которым предварительно добавляли нортриптилин, становились значительно более восприимчивыми к супрессирующему действию ГКС (таблица 1).

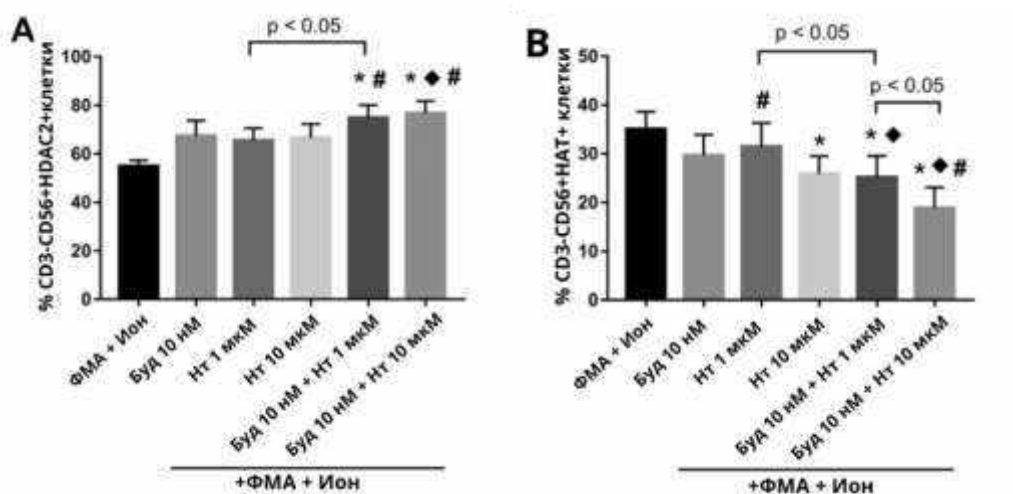
**Табл. 1.** Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) GR, GR $\beta$ , фосфорилированных p38 MAPK и p65 NF- $\kappa$ B в ЕК-клетках крови пациентов с ХОБЛ

	ФМА + Ион	ФМА + Ион + Буд 10 нМ	ФМА + Ион + Нт 1 мкМ	ФМА + Ион + Нт 10 мкМ	ФМА + Ион + Буд 10 нМ + Нт 1 мкМ	ФМА + Ион + Буд 10 нМ + Нт 10 мкМ
СИФ GR	30,87 $\pm$ 2,26	27,73 $\pm$ 2,30	33,43 $\pm$ 1,14	32,92 $\pm$ 1,34	32,40 $\pm$ 1,05	31,80 $\pm$ 1,91
СИФ GR $\beta$	3,56 $\pm$ 0,25	3,43 $\pm$ 2,24	3,30 $\pm$ 0,25	3,17 $\pm$ 0,23*◆	3,16 $\pm$ 0,23*◆	2,99 $\pm$ 0,19*◆
СИФ p38 MAPK	2,56 $\pm$ 0,23	2,50 $\pm$ 0,26	2,47 $\pm$ 0,22	2,37 $\pm$ 0,24*	2,28 $\pm$ 0,25*◆	2,24 $\pm$ 0,22*◆
СИФ p65 NF- $\kappa$ B	1,78 $\pm$ 0,20	1,73 $\pm$ 0,19	1,69 $\pm$ 0,16	1,58 $\pm$ 0,17*	1,60 $\pm$ 0,21*	1,57 $\pm$ 0,21*◆

**Примечания:** \* -  $P < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион; ◆ -  $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Буд 10 нМ; Буд – будесонид; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; GR – глюкокортикоидный рецептор; Ион – иономицин; ЕК-клетки – естественные киллерные клетки; Нт – нортриптилин; ФМА – форбол-миристан-ацетат; p38 MAPK – p38 митоген-активированная протеинкиназа; p65 NF- $\kappa$ B – p65 ядерный фактор- $\kappa$ B.

На экспрессию GR $\beta$  внесение к клеткам цельной крови будесонида или нортриптилина в концентрации 1 мкМ не оказывало влияния. Нортриптилин 10 мкМ эффективно подавлял экспрессию GR $\beta$ . Более того, комбинация нортриптилина (от 1 мкМ до 10 мкМ) с будесонидом значительно снижала экспрессию GR $\beta$  ЕК-клетками (таблица 1).

Нортриптилин самостоятельно не изменял экспрессию ГДА2, но значительно снижал экспрессию НАТ, индуцированную ФМА/иономицином, в CD3-CD56+ клетках. Вместе с тем комбинация нортриптилина (от 1 мкМ до 10 мкМ) с будесонидом увеличивала процент ЕК-клеток, экспрессирующих HDAC2, и ослабляла экспрессию НАТ (рисунок 2).



**Рис. 2** – Процент ЕК-клеток (CD3-CD56+) периферической крови пациентов с ХОБЛ, экспрессирующих HDAC2 и НАТ, после инкубации с будесонидом и нортриптилином.

\* –  $p < 0,05$  в сравнении с ФМА + Ион; ◆ –  $p < 0,05$  по сравнению с Буд 10 нМ; # –  $p < 0,05$  по сравнению с Нт 10 мкМ

### Выводы:

1. Нортриптилин усиливает противовоспалительное действие будесонида на продукцию IL-4, IL-8, TNF $\alpha$  и INF $\gamma$  ЕК-клетками пациентов с ХОБЛ. Нортриптилин может усиливать эффекты ГКС путем изменения экспрессии НАТ, HDAC2, GR $\beta$ , p38 MAPK.

2. Полученные данные являются убедительным обоснованием использования нортриптилина с будесонидом для лечения пациентов с ХОБЛ.

### Литература

- 10 ведущих причин смерти в мире [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения: 17.02.23).
- Hodge, G. Therapeutic targeting steroid resistant pro-inflammatory NK and NKT-Like cells in chronic inflammatory lung disease / G. Hodge, S. Hodge // National Library of Medicine [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471110/> (дата обращения: 17.02.23).
- Leung, J. M. Inhaled corticosteroids in COPD: the final verdict is.... / J. M. Leung, D. D. Sin // European Respiratory Journal [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://erj.ersjournals.com/content/52/6/1801940> (дата обращения: 17.02.23).