

А.О. Пермякова, М.В. Сакович

ВЛИЯНИЕ НОРТРИПТИЛИНА НА ВЫРАБОТКУ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ В НК-КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ

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: PhD, associate professor A.G. Kadushkin

Department of Biological Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) признаётся третьей ведущей причиной смертности в мире, на её долю приходится 6% от общего числа летальных исходов. Основными препаратами для лечения этого заболевания являются ингаляционные глюкокортикостероиды (ГКС), однако у пациентов с ХОБЛ отмечается снижение чувствительности к стероидам НК-клеток. В настоящей статье оценивается влияние нортриптилина, ГКС или их комбинации на выработку провоспалительных медиаторов в НК-клетках пациентов с ХОБЛ.

Ключевые слова: нортриптилин, стероидная резистентность, ХОБЛ, НК-клетки.

Resume. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the third leading cause of death in the world, accounting for 6% of all deaths. Inhaled glucocorticosteroids (GCs) are the mainstay of treatment, but patients with COPD have a decreased sensitivity of NK-cells to steroids. This article evaluates the effect of nortriptyline, GCs or 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 лёгких (ХОБЛ) характеризуется прогрессирующей обструкцией дыхательных путей, которая является лишь частично обратимой, воспалительной реакцией в дыхательных путях и системными эффектами. ХОБЛ признаётся третьей ведущей причиной смертности в мире, на её долю 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 (НК), что препятствует проявлению основного терапевтического эффекта данных лекарственных препаратов [2,3].

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

Задачи:

1. Определить влияние нортриптилина и будесонида на продукцию цитокинов (интерлейкина 4 (ИЛ-4), ИЛ-8, интерферона γ (ИНФ γ), фактора некроза опухоли α (ФНО α));

2. Оценить влияние нортриптилина и будесонида на экспрессию глюкокортикоидного рецептора β (ГР β), гистондеацетилазы 2 (ГДА2) и гистонацетилтрансферазы (ГАТ);

3. Проанализировать влияние нортриптилина и будесонида на фосфорилирование p65 NF- κ B и p38 митоген-активированной протеинкиназы (p38 МАПК).

Материалы и методы. В исследовании участвовал 21 пациент с ХОБЛ. Цельную кровь смешивали в стерильных пробирках с равным объемом культуральной среды RPMI 1640, обогащённой 10% инактивированной фетальной телячьей сывороткой. Затем клетки инкубировали в присутствии или отсутствии нортриптилина (1 и 10 мкМ), будесонида (10 нМ) или 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 НК-клетками крови оценивали методом проточной цитометрии. Идентификацию клеток проводили с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами и специфичных к CD45, CD3, CD56, ИЛ-4, ИЛ-8, ИНФ γ , ФНО α , ГДА2, ГАТ, p38 МАПК и поликлональных антител к ГР β . 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 ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО α и ИНФ γ в НК-клетках. Нортриптилин 10 мкМ снижал синтез ИЛ-4, ИЛ-8 и ИНФ γ в НК-клетках пациентов с ХОБЛ. В концентрации 1 мкМ нортриптилин только снижал продукцию ИЛ-4. Внесение к стимулированным ФМА/иономицином клеткам цельной крови комбинации нортриптилина 10 мкМ и будесонида приводило к значительному снижению экспрессии ИЛ-4, ИЛ-8, ИНФ γ и ФНО α НК-клетками по сравнению с влиянием одного будесонида. Совместное применение нортриптилина 1 мкМ и будесонида приводило к развитию аддитивного эффекта, состоящего в снижении продукции ИЛ-4 и ИЛ-8 в НК-клетках пациентов с ХОБЛ (рис.1).

Фосфорилирование и активация p38 МАПК и p65 NF- κ B в НК-клетках увеличивались в ответ на ФМА и иономицин. Нортриптилин 10 мкМ подавлял фосфорилирование p38 МАПК и p65 NF- κ B в НК-клетках пациентов с ХОБЛ. НК-клетки пациентов с ХОБЛ, к которым предварительно добавляли нортриптилин, становились значительно более восприимчивыми к супрессирующему действию ГКС (таблица 1).

Внесение к клеткам цельной крови будесонида или нортриптилина в концентрации 1 мкМ не оказывало влияния на экспрессию ГР β . Нортриптилин 10 мкМ эффективно подавлял экспрессию ГР β . Более того, комбинация нортриптилина (от 1 мкМ до 10 мкМ) с будесонидом значительно снижала экспрессию ГР β НК-клетками (таблица 1).

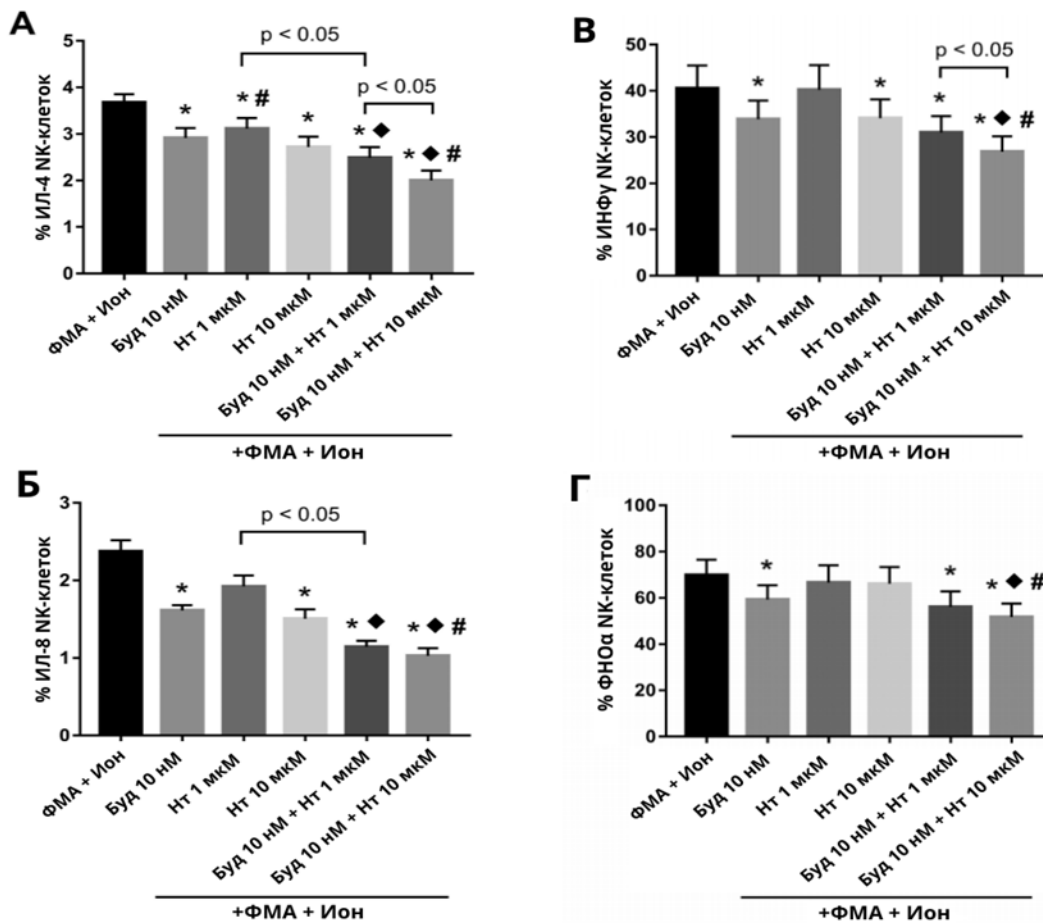


Рис. 1 – Процент НК-клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ, продуцирующих ИЛ-4, ИЛ-8 (А,Б), ИНФγ и ФНОα (В,Г), после инкубации с будесонидом и нортриптилином. * – p<0,05 по сравнению с ФМА + Ион; ◆ – p<0,05 по сравнению с Буд 10 нМ; # – p<0,05 по сравнению с Нт 10 мкМ.

Табл. 1. Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) ГР, ГРβ, фосфорилированных p38 МАПК и p65 NF-κB в НК-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 ГР	30,87±2,26	27,73±2,30	33,43±1,14	32,92±1,34	32,40±1,05	31,80±1,91
СИФ ГРβ	3,56±0,25	3,43±2,24	3,30±0,25	3,17±0,23*◆	3,16±0,23*◆	2,99±0,19*◆
СИФ p38 МАПК	2,56±0,23	2,50±0,26	2,47±0,22	2,37±0,24*	2,28±0,25*◆	2,24±0,22*◆
СИФ p65 NF-κB	1,78±0,20	1,73±0,19	1,69±0,16	1,58±0,17*	1,60±0,21*	1,57±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; ГР - глюкокортикоидный рецептор; Ион - иономицин; НК-клетки - естественные киллерные клетки; Нт - нортриптилин; ФМА – форбол-миристан-ацетат; p38 МАПК – p38 митоген-активированная протеинкиназа; p65 NF-κB – p65 ядерный фактор-κB.

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

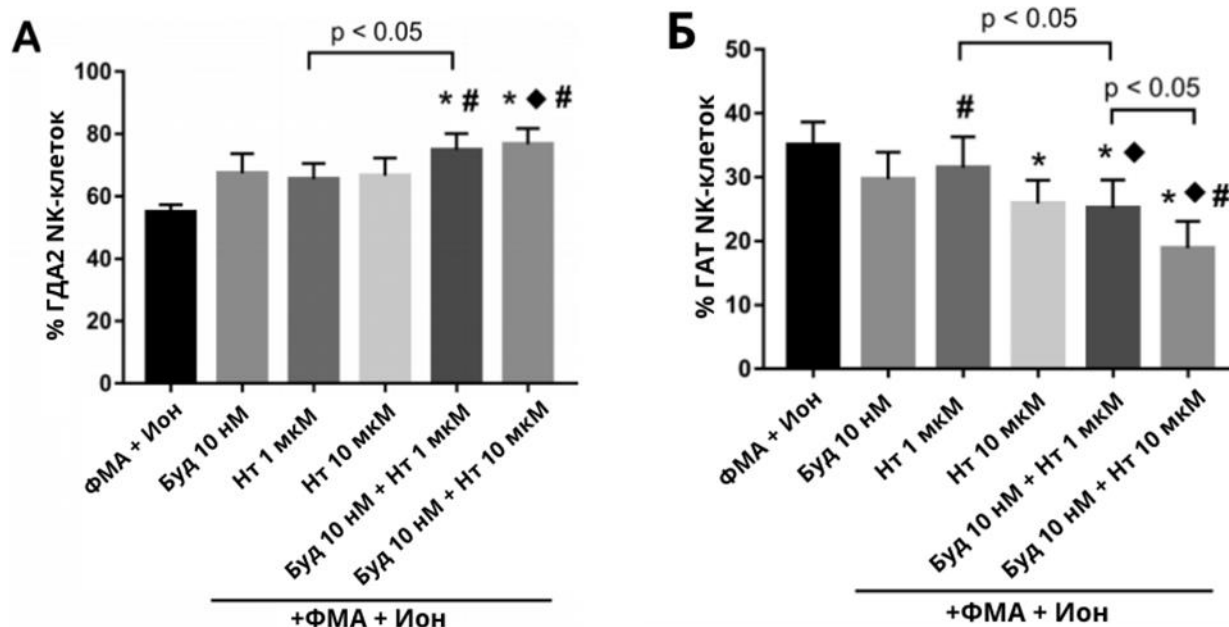


Рис. 2 – Процент НК-клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ, экспрессирующих ГДА2 и ГАТ, после инкубации с будесонидом и нортриптилином. * – $p < 0,05$ в сравнении с ФМА + Ион; ♦ – $p < 0,05$ по сравнению с Буд 10 нМ; # – $p < 0,05$ по сравнению с Нт 10 мкМ

Выводы: нортриптилин усиливает противовоспалительное действие будесонида на продукцию ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО α и ИНФ γ НК-клетками пациентов с ХОБЛ. Нортриптилин может усиливать эффекты ГКС путём изменения экспрессии ГАТ, ГДА2, ГР β , p38 МАПК.

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

Литература

1. 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).
2. Leung JM, Sin DD. Inhaled corticosteroids in COPD: the final verdict is.... European Respiratory Journal. 2018; 52(6): 1801940. DOI: 10.1183/13993003.01940-2018
3. Hodge G, Hodge S. Therapeutic targeting steroid resistant pro-inflammatory NK and NKT-Like cells in chronic inflammatory lung disease. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(6): 1511. DOI: 10.3390/ijms20061511