

Шевченко М. В.

ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ МОМЕТАЗОНА И НОРТРИПТИЛИНА НА ПРОДУКЦИЮ ФНО-А МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ IN VITRO В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Научный руководитель: Т. В. Миронова (ст. преподаватель)

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Аннотация. В статье представлены результаты исследования 6 пациентов с аллергическим ринитом, изучено влияние мометазона на культуру мононуклеарных клеток, сопоставлен эффект с влиянием нортриптилина.

Ключевые слова: аллергический ринит, мононуклеарные клетки, мометазон, нортриптилин.

Введение. Аллергический ринит – атопическое заболевание, начальные проявления которого включают заложенность носа, ринорею, чихание и постназальный синдром. В патогенетическом аспекте АР является IgE-опосредованной реакцией гиперчувствительности, которая развивается в виде воспалительного ответа слизистой оболочки полости носа на воздействие причинно-значимых аллергенов. При недостаточном контроле заболевания и выраженной клинической симптоматике АР характеризуется как тяжелая хроническая патология верхних дыхательных путей (severe chronic upper airway disease – SCUAD). Для аллергического ринита свойственна значительная коморбидность, а также существенное негативное влияние на качество жизни и социальную активность пациентов.

По данным ВОЗ до 40% населения в разных странах страдают сезонным АР и до 18% - круглогодичным АР. По другим оценкам, общее число пациентов с АР составляет 10–50% населения, т. е. более 500 млн человек имеют симптомы аллергического воспаления в полости носа. В детской популяции заболеваемость АР довольно высока, данная патология является одним из самых распространенных хронических респираторных процессов в педиатрии.

Согласно общепринятой классификации, аллергический ринит (АР) подразделяется на сезонный и круглогодичный. Круглогодичная форма АР наиболее часто индуцируется сенсibilизацией к аллергенам клещей домашней пыли, животных, тараканов, а также к грибковым, пищевым и лекарственным аллергенам. Этиология сезонного АР связана с сенсibilизацией к пыльце растений и зависит от географической локализации, времени цветения и климатических особенностей региона [1].

Развитие аллергического ринита (АР) представляет собой иммунный ответ (ИО), запускаемый контактом с аллергеном. Несмотря на то, что аллергическое воспаление традиционно связывают с дисбалансом в системе Т-хелперов со сдвигом в сторону преобладания Th2-клеток и активацией компонентов ИО 2-го типа, существенную роль в этом процессе играет фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α), являющийся компонентом ИО 1-го типа. ФНО- α необходим для синтеза антиген-специфического IgE, индукции цитокинов и хемокинов, характерных для иммунного ответа 2-го типа. Кроме того, ФНО- α индуцирует экспрессию молекул адгезии, обеспечивающих рекрутинг эозинофилов в очаг аллергического воспаления. Известно, что при иммунном ответе 17-го типа продукция интерлейкинов 17A (ИЛ-17A) и ИЛ-17F стимулирует выработку ФНО- α в респираторном эпителии, который, в свою очередь, участвует в регуляции нейтрофильной инфильтрации бронхиальной стенки [2]. Отсутствие четкого понимания роли цитокинов, относящихся к компонентам ИО 1-го, 2-го и 17-го типов, в развитии аллергического воспаления ограничивает возможность выявления индивидуальных особенностей течения АР и разработку таргетных методов терапии.

Стратегия лечения АР включает, в первую очередь, элиминацию триггеров, однако для многих пациентов этот подход не всегда реализуем. Фармакотерапия заключается в применении антигистаминных препаратов, интраназальных глюкокортикостероидов (ГКС) и антагонистов лейкотриеновых рецепторов. При топическом применении ГКС возможны нежелательные явления, такие как раздражение слизистой оболочки, чувство жжения, носовые кровотечения и кандидоз. Эффективность стандартной терапии ограничена у части пациентов ввиду развития стероидорезистентности [3]. В условиях роста заболеваемости АР актуальным является поиск средств, способных повышать чувствительность к ГКС и обладающих антиоксидантной активностью, учитывая роль оксидативного стресса в патогенезе заболевания. Перспективным направлением представляется изучение противовоспалительных свойств нортриптилина – трициклического антидепрессанта, основного активного метаболита amitриптилина. Помимо применения в психиатрической практике, в экспериментальных исследованиях продемонстрирована его способность потенцировать эффекты кортикостероидов. Показано, что нортриптилин подавляет продукцию ФНО- α в НК-клетках (естественных киллерах) у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Противовоспалительное действие препарата опосредовано увеличением экспрессии гистондеацетилазы 2 (HDAC2), что приводит к ингибированию транскрипции генов провоспалительных белков. Сочетанное применение ГКС и нортриптилина позволяет модулировать внутриклеточные сигнальные пути и, как следствие, подавлять синтез провоспалительных медиаторов [4].

Цель исследования. Изучить влияние мометазона на культуру мононуклеарных клеток (МНК) пациентов с АР, сопоставив эффект с влиянием нортриптилина.

Материал и методы. Исследование проводилось с культурой клеток крови, полученной от 6-ти пациентов с АР (2 мужчин и 4 женщины, 19-22 года). Венозная кровь забиралась у пациентов утром, натощак в объеме 30 мл в пробирки с гепарином натрия в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта. МНК периферической крови пациентов выделяли путем центрифугирования (30 минут, 400g) в градиенте плотности 1,077 с использованием раствора Lymphosep (Biowest, Франция). Клетки ресуспендировали в концентрации 10^6 клеток/мл в культуральной среде RPMI 1640 (Capricorn Scientific, Эбсдорфергруд, Германия) с 10% (по объему) фетальной бычьей сывороткой (ФБС, Capricorn Scientific, регион сбора – Южная Америка), 2 мМ глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Capricorn Scientific).

В лунки 96-луночного планшета помещали $2 \cdot 10^5$ клеток и культивировали их в присутствии мометазона (10^{-8} М), нортриптилина (5 мкМ), или их комбинации. Иммунный ответ 1-го, 2-го и 17-го типа стимулировали через 1 час после внесения ингибиторов путем добавления в среду культивирования рекомбинантных белков: ИЛ-12 (5 нг/мл) и ИЛ-2 (20 Ед/мл) (для стимуляции ИО 1-го типа), ИЛ-25 (50 нг/мл), ИЛ-33 (50 нг/мл), тимического стромального лимфопоэтина (ТСЛП) (50 нг/мл) и ИЛ-2 (20 Ед/мл) (для стимуляции ИО 2-го типа), ИЛ-1 β (50 нг/мл) и ИЛ-23 (50 нг/мл) (для стимуляции ИО 17-го типа). По истечении 3 суток культивирования клеток супернатанты отбирали автоматическим дозатором, центрифугировали (5 минут, 400g) и хранили до использования при температуре -70°C . В них методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию ФНО- α с помощью набора реагентов АО «Вектор Бест», РФ.

Статистическая обработка данных проводилась в программе MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Анализ осуществляли непараметрическими методами вариационной статистики и выражали в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [25%-75%]. При изучении статистических различий между двумя группами показателей использовался критерий Фридмана. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,005$.

Результаты исследования. В условиях стимуляции ИО 2-го типа мометазон статистически достоверно снизил концентрацию ФНО- α (медиана 2,2 пг/мл). В этих же условиях нортриптилин существенно уменьшил концентрацию ФНО- α (медиана 29,9 пг/мл).

При стимуляции ИО 2-го типа комбинация мометазона и нортриптилина достоверно снизила концентрацию ФНО- α (медиана 1,9 пг/мл).

В эксперименте со стимулированным ИО 1-го типа мометазон статистически достоверно понизил концентрацию ФНО- α (медиана 2,6 пг/мл). В свою очередь, нортриптилин существенно уменьшил концентрацию ФНО- α (медиана 10,2 пг/мл). При стимуляции ИО 1-го типа с комбинацией мометазона и нортриптилина наблюдается тенденция к снижению концентрации ФНО- α (медиана 2,3 пг/мл).

В условиях стимулированного ИО 17-го типа присутствие мометазона в среде культивирования клеток сопровождалось существенным уменьшением концентрации ФНО- α (медиана 14,8 пг/мл). Присутствие в культуральной среде нортриптилина сопровождалось статистически достоверным понижением концентрации ФНО- α (медиана 53,8 пг/мл). При стимуляции ИО 17-го типа комбинация мометазона и нортриптилина достоверно снизила концентрацию ФНО- α (медиана 11,0 пг/мл).

Таблица 1. Влияние мометазона и нортриптилина на секрецию ФНО- α МНК периферической крови в условиях стимулирования ИО 2-го, 1-го и 17-го типа

ИО	Без стимуляторов	Стимулированный ИО	Стимулированный ИО; нортриптилин +	Стимулированный ИО; мометазон +	Стимулированный ИО; мометазон +; нортриптилин +
ИО 2-го типа	2,8 [2,1-3,9]	34,74* [29,8-85,6]	29,9# [20,5-37,7]	2,2#.# [1,9-2,5]	1,9#.#.# [1,6-2,3]
ИО 1-го типа	4,3 [3,2-23,5]	34,2* [26,1-172,8]	10,2# [8,9-92,6]	2,6#.# [2,3-3,1]	2,3#.# [2,1-2,3]
ИО 17-го типа	9,0 [2,8-32,5]	84,05* [52,2-181,9]	53,8# [21,2-121,3]	14,8#.# [12,2-37,3]	11,0#.#.#.# [9,4-28,6]

Примечание: * – разница достоверна относительно контрольной группы (без стимуляторов); # – разница достоверна относительно группы с моделированным ИО; #.# – разница достоверна относительно группы с моделированным ИО и добавлением нортриптилина; #.#.# – разница достоверна относительно группы с моделированным ИО и добавлением мометазона; уровень значимости $p < 0,005$

В ходе исследования было установлено, что эффект мометазона был наиболее выраженным при стимуляции иммунного ответа (ИО) 2-го типа, в сравнении с экспериментами, при которых активировались ИО 1-го и ИО 17-го типов. Наименее выраженная активность мометазона наблюдалась в отношении секреции цитокинов при стимуляции ИО 17-го типа. Такой результат выглядит ожидаемым, поскольку воспалительный процесс, обусловленный активацией ИО 17-го типа, как правило, плохо поддается терапии кортикостероидными препаратами.

Нортриптилин, как и в случае с мометазоном, оказался наименее эффективен в подавлении секреции цитокинов в условиях стимулированного ИО 17-го типа, хотя концентрация ФНО- α была достоверно ниже, чем в опытах, где клетки были культивированы без нортриптилина. Наиболее выраженный эффект нортриптилин также продемонстрировал в условиях активации ИО 2-го типа.

Комбинация мометазона и нортриптилина достоверно снижала уровень секретированного ФНО- α в условиях стимулированного ИО, за исключением эксперимента с активацией ИО 1-го типа. Наибольший эффект на уровень цитокина в крови был выявлен в условиях стимулированного ИО 2-го типа. Поскольку ведущая роль в развитии аллергического воспаления отводится именно ИО 2-го типа, полученные нами данные могут стать поводом для дальнейшего исследования потенцирующего эффекта мометазона совместно с нортриптилином.

Таким образом, как мометазон, так и нортриптилин проявили способность снижать уровень ФНО- α , секретлируемого стимулированными мононуклеарными клетками. При этом ингибирующий эффект мометазона оказался значительно более выраженным по сравнению с

нортриптилином. В то же время совместное внесение в культуральную среду мометазона и нортриптилина показало достоверное снижение уровня цитокина, что может указывать на потенциальный эффект применения данной комбинации для подавления аллергического воспаления.

Заключение.

1. Мометазон эффективно подавляет секрецию ФНО- α , вызванную иммунным ответом 1-го, 2-го и 17-го типов.

2. Присутствие в среде культивирования МНК нортриптилина в условиях активации иммунных ответов 1-го, 2-го и 17-го типов снижает секрецию ФНО- α .

3. Присутствие в инкубационной среде мометазона и нортриптилина приводит к достоверно более низкой концентрации ФНО- α , по сравнению с присутствием в среде только мометазона в условиях активации иммунных ответов 2-го и 17-го типов.

Список литературы:

1. Никифорова, Г. Н. Аллергический ринит. Современные возможности патогенетической терапии / Г.Н. Никифорова, В.М. Свистушкин, А.В. Золотова // МС. – 2019. – № 8. – С. 83–88.

2. Себекина, О.В. Клинический эффект бактериальных лизатов в терапии респираторных и аллергических заболеваний / О.В. Себекина // Уральский медицинский портал. – 2017. – № 7. – С. 26–32.

3. The expression of 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase in severe allergic rhinitis / N. Ohta, N. Noguchi, T. Takahashi [et al.] // Otolaryngology – Head and Neck Surgery. – 2018. – Vol. 158, № 1. – P. 102.

4. Подавление продукции провоспалительных цитокинов в естественных киллерах крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких под влиянием нортриптилина / А.Г. Кадушкин, А.Д. Таганович, Е.В. Ходосовская, Т.С. Колесникова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2023. – Т. 21, № 1. – С. 32–39.