

## 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  
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

*Цель.* Определить способность нортриптилина самостоятельно и в сочетании с будесонидом ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов в естественных киллерах (ЕК-клетках) крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и установить молекулярные механизмы, лежащие в основе комбинированного действия данных препаратов.

*Материал и методы.* Клетки крови пациентов с ХОБЛ ( $n=21$ ) инкубировали с будесонидом, нортриптилином или их сочетанием. Продукцию цитокинов, экспрессию глюкокортикоидного рецептора  $\beta$  (ГР $\beta$ ), гистон деацетилазы 2 (ГДА2) и фосфорилированной р38 митоген-активируемой протеинкиназы (ф-р38 МАПК) в ЕК-клетках анализировали методом проточной цитометрии.

*Результаты.* Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида (10 нМ) снижала в ЕК-клетках синтез интерлейкина 4 (ИЛ-4), ИЛ-8, интерферона  $\gamma$ , фактора некроза опухоли  $\alpha$  и экспрессию ГР $\beta$ , ф-р38-МАПК, а также повышала экспрессию ГДА2 более значительно, чем один будесонид.

*Выводы.* Нортриптилин усиливает противовоспалительное действие будесонида путем изменения экспрессии ГДА2, ГР $\beta$ , ф-р38 МАПК в ЕК-клетках крови пациентов с ХОБЛ. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности комбинации нортриптилина с будесонидом для лечения ХОБЛ.

**Ключевые слова:** ХОБЛ, стероидорезистентность, цитокины, нортриптилин, будесонид, естественные киллеры.

*Для цитирования:* 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. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2023-21-1-32-39>

### Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется хроническим ограничением скорости воздушного потока, которое постепенно нарастает и сопровождается воспалительной реакцией в дыхательных путях. ХОБЛ – серьезная проблема здравоохранения. В 1990-х гг. это заболевание занимало пятую строчку среди причин смерти в мире, а сегодня переместилось на третье место, ежегодно приводя к 3,23 млн смертельных исходов. Прогнозируется, что к 2040 г. это количество может возрасти до 4,4 млн [1].

Курение сигарет признается главным фактором риска ХОБЛ. Отказ от курения – эффективный подход к замедлению прогрессирования заболевания и снижению смертности от ХОБЛ. Однако разрешение воспаления не наступает даже после прекращения курения [2]. Сигаретный дым индуцирует окислительный стресс и последующую активацию фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. Этот фактор в свою очередь стимулирует экспрессию и продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов активированными макрофагами, эпителиальными клетками дыхательных путей, нейтрофилами и лимфоцитами [3].

Глюкокортикоиды (ГК), препараты с противовоспалительным механизмом действия, широко используются для лечения ХОБЛ, однако польза от их применения сомнительная [4]. Снижение чувствительности клеток к стероидам препятствует эффективному лечению ХОБЛ.

Стероидорезистентность развивается в ответ на окислительный стресс и приводит к изменению экспрессии глюкокортикоидного рецептора (ГР)  $\beta$ , гистон деацетилазы 2 (ГДА2) и р38 митоген-активируемой протеинкиназы (р38 МАПК) [3]. Сообщается о сниженной чувствительности к стероидам естественных киллеров (ЕК-клеток) пациентов с ХОБЛ [5]. Процент этих лимфоцитов повышен в дыхательных путях пациентов, страдающих ХОБЛ [6].

ЕК-клетки – это эффекторные клетки врожденной иммунной системы. Они управляют ходом иммунного ответа путем взаимодействия с дендритными клетками, макрофагами, Т-лимфоцитами и эндотелиальными клетками. ЕК-клетки могут индуцировать апоптоз собственных эпителиальных клеток легких посредством секреции перфорина и гранзима В [7, 8]. У пациентов с ХОБЛ выявлена повышенная цитотоксичность ЕК-клеток в дыхательных путях и гиперэкспрессия гранзима В в ЕК-клетках крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости [6]. Более того, эти лимфоциты – важный источник цитокинов и хемокинов, таких как интерферон  $\gamma$  (ИФН $\gamma$ ), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), интерлейкин 4 (ИЛ-4), ИЛ-8 и других [8].

Стероидорезистентность, развивающаяся у пациентов ХОБЛ, привела к поиску препаратов, способных потенцировать противовоспалительное действие ГК. Экспериментальные исследования позволили предположить способность нортриптилина преодолевать нечувствительность к

стероидам [9]. Нортриптилин – трициклический антидепрессант и основной активный метаболит другого трициклического антидепрессанта – амитриптилина. Нортриптилин используется для лечения депрессии, тревоги и никотиновой зависимости у пациентов с ХОБЛ [10]. Два независимых исследования продемонстрировали синергизм между ГК и нортриптилином в снижении секреции провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) здоровых людей и клеток моноцитарной линии человека U937 [9, 11]. Однако влияние нортриптилина на клетки крови пациентов с ХОБЛ ранее не изучалось, а молекулярный механизм его действия в клетках, подвергнутых воздействию кортикостероидов, не ясен.

**Цель** настоящего исследования – определить способность нортриптилина самостоятельно и в сочетании с ГК будесонидом ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов в ЕК-клетках крови у пациентов с ХОБЛ и установить возможные молекулярные механизмы, лежащие в основе комбинированного действия этих препаратов.

### **Материал и методы**

В исследование были включены 21 пациент с ХОБЛ (табл. 1). Диагностика заболевания и оценка его степени тяжести проводилась в соответствии с критериями Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких (GOLD). Все участники исследования были активными или бывшими курильщиками с индексом курящего человека не менее 10 пачка/лет, отношением объема форсированного выдоха за первую секунду к форсированной жизненной емкости легких (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ) <0,70 и ОФВ<sub>1</sub> (% от должного) <80%. К экс-курильщикам мы относили людей, которые бросили курить более 6 месяцев назад. Из исследования исключались пациенты с бронхиальной астмой, заболеваниями соединительной ткани, аллергическими, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, нарушениями свертывающей системы крови, а также принимавшие системные ГК или перенесшие обострение ХОБЛ в течение 6 недель до начала исследования.

Перед забором крови и определением функции внешнего дыхания все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании.

### **Стимуляция клеток**

Венозную кровь забирали у пациентов утром натощак в пробирку, содержащую гепарин натрия, и немедленно доставляли в лабораторию. В стерильных пробирках кровь смешивали в соотношении 1:1 с культуральной средой RPMI 1640, обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой, инактивированной нагреванием (ФТС, Capricorn Scientific, Германия). Далее в пробирки вносили нортриптилин (1 и 10 мкМ, Sigma-Aldrich, США) и/или будесонид (10 нМ, Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания). После инкубации с лекарственными средствами в течение 1 часа лейкоциты стимулировали,

**Таблица 1.** – Характеристика участников исследования

**Table 1.** – Characteristics of study participants

Характеристика участников исследования	Пациенты с ХОБЛ
Количество пациентов	21
Пол, м/ж	17/4
Возраст (годы)	65,1±1,5
ИМТ, кг·м <sup>-2</sup>	26,7±1,2
Статус курения (курильщик/экс-курильщик)	10/11
Индекс курящего человека	32,5±2,4
ОФВ <sub>1</sub> после БП % от должного	52,4±4,1
ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ после БП, %	57,0±2,5

*Примечание* – Данные представлены как абсолютное количество или среднее ± стандартная ошибка среднего. БП – бронходилатационная проба; ИМТ – индекс массы тела; ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за первую секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

используя форбол-миристан-ацетат (ФМА, 50 нг/мл) (Cayman Chemical, США) и иономицин (1 мкг/мл) (Cayman Chemical, Израиль). Добавляли брэфельдин А (10 мкг/мл) (Cayman Chemical, Израиль), который препятствует секреции цитокинов за пределы клетки, и в течение 6 часов клетки инкубировали с лекарственными средствами и стимуляторами в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C. Затем для прекращения активации и удаления адгезированных клеток в пробирки на 10 минут вносили 100 мкл 20 мМ раствора этилендиаминтетраацетата динатрия дигидрата в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

### **Производство цитокинов и экспрессия ГДА2 в ЕК-клетках**

Вслед за стимуляцией клеток, описанной выше, в пробирки вносили моноклональные антитела к поверхностным антигенам (CD3 PE-DyLight 594, CD56 PE-Cy7 и CD45 APC-Cy7, Exbio, Чехия) и клетки инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре. Пробирки центрифугировали при 500×g в течение 5 минут, удаляли супернатант, вносили 3 мл буфера (5% ФТС в CellWASH (BD, Польша)) и снова центрифугировали. После удаления супернатанта лейкоциты фиксировали с использованием 100 мкл реагента А (Fixation Medium из набора FIX & PERM Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit, Life technologies, Нидерланды). Клетки отмывали (как описано выше) и пермеабилizировали с использованием 100 мкл реагента В (Permeabilization Medium из набора FIX & PERM Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit, Life technologies). После блокирования Fc-рецепторов Fc-блоком (BD Pharmingen, США) в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре к клеткам добавляли моноклональные антитела к ИЛ-4 PE, ИФН $\gamma$  PE, ФНО $\alpha$  PE (Beckman Coulter), ИЛ-8 FITC (R&D systems Europe, Великобритания) или ГДА2 Alexa Fluor 488 (Abcam, Великобритания). Во всех экспериментах в ка-

честве контроля также использовали соответствующие изотипические антитела. Клетки инкубировали с внутриклеточными антителами в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего их отмывали и фиксировали, добавляя 500 мкл 1% раствора параформальдегида. Фиксированные образцы хранили при 4°C в темноте и анализировали не позднее, чем через 12 часов, на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с последующей обработкой данных в программе Kaluza. ЕК-клетки идентифицировали как CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> события.

#### **Экспрессия ГРβ в ЕК-клетках**

Для определения экспрессии в ЕК-клетках ГРβ клетки крови стимулировали и фиксировали, а их цитоплазматическую мембрану пермеабилizировали в соответствии с методикой, описанной выше. В пробирки помещали поликлональные антитела к ГРβ (GeneTex, США). Затем клетки инкубировали с антителами в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут, отмывали и окрашивали с помощью вторичных козых против кроличьих антител IgG H&L Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. После окончательной отмывки клетки ресуспендировали в 1% растворе параформальдегида и анализировали с помощью метода проточной цитометрии аналогично тому, как описано выше.

#### **Фосфорилирование p38 МАПК в ЕК-клетках**

После инкубации клеток крови с будесонидом и нортриптилином в течение 1 часа в пробирки добавляли моноклональные антитела к поверхностным антигенам CD3 PE-DyLight 594, CD56 PE-Cy7 и CD45 APC-Cy7 (Exbio) и клетки культивировали в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре. Далее клеточные культуры стимулировали путем добавления ФМА (250 нг/мл) и иономицина (1 мкг/мл) в течение 15 минут при температуре 37°C. С целью лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов 200 мкл крови смешивали с 4 мл подогретого до 37°C буфера BD Phosflow Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences, США). Затем пробирки инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 10 минут и центрифугировали при 500×g в течение 5 минут. Лейкоциты однократно отмывали с помощью CellWash (BD), пермеабилizировали с использованием охлажденного до -20°C 1 мл буфера BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences, США) в течение 30 минут на льду. После двукратной промывки с буфером BD Pharmingen Stain Buffer (BD Biosciences) клетки окрашивали с использованием антител к p38 МАПК (pT180/pY182) PE (BD Biosciences) в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. В качестве контроля применяли изотипические антитела. После окончательной отмывки клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера BD Pharmingen Stain Buffer и анализировали не позднее 2 часов на проточном цитометре Navios с использованием программы Kaluza (Beckman Coulter, США).

#### **Статистический анализ**

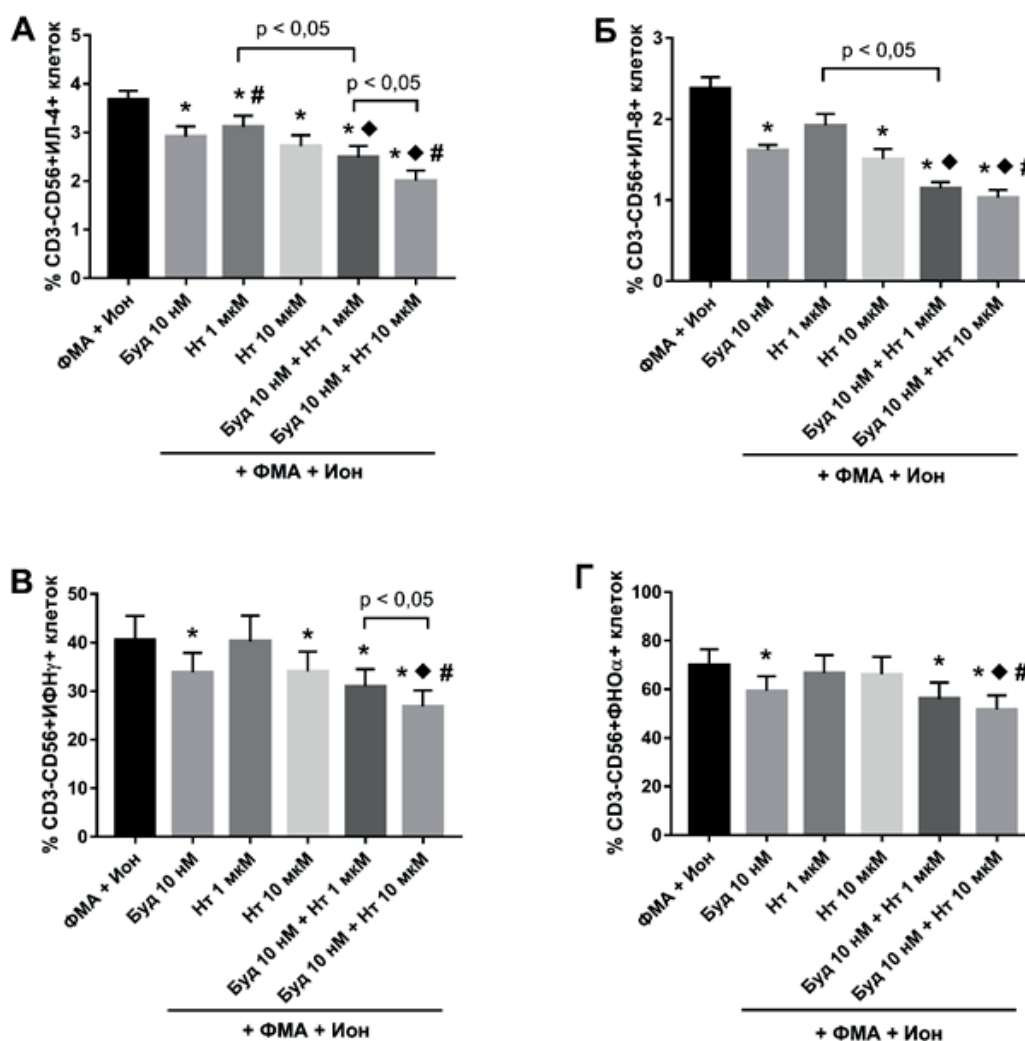
Данные анализировали, используя программу GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software Inc., США). Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Проверку данных на Гауссовское распределение проводили при помощи критерия Шапиро-Уилка. Множественные сравнения были проведены на основе однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и последующего определения теста Тьюки. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты и обсуждение**

Резистентность к ГК – серьезное препятствие для успешного лечения ХОБЛ. Настоящее исследование показало, что трициклический антидепрессант нортриптилин проявляет противовоспалительное действие, самостоятельно и в сочетании с ГК, снижая продукцию цитокинов в ЕК-клетках крови у пациентов с ХОБЛ. Комбинированная терапия кортикостероидами и нортриптилином имеет преимущества по сравнению с монотерапией ГК, поскольку степень ингибирования продукции цитокинов растет при одновременном использовании двух препаратов. Более того, мы обнаружили способность нортриптилина преодолевать молекулярные механизмы, ведущие к снижению чувствительности ЕК-клеток к кортикостероидам. Полученные данные убедительно доказывают целесообразность комбинированного применения нортриптилина и кортикостероидов для подавления воспалительного процесса у пациентов с ХОБЛ.

ИЛ-4 вовлечен в развитие воспаления и ремоделирование дыхательных путей. Он участвует в дифференцировке наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Т-хелперы 2-го типа, альтернативной активации макрофагов и синтезе коллагена в фибробластах [12]. ИЛ-4 стимулирует продукцию и секрецию хемокина CCL26/эотаксина-3 эпителиальными клетками дыхательных путей, что способствует привлечению эозинофилов в очаг воспаления в легком посредством рецепторов CCR3 [13]. Как известно, высокий уровень эозинофилов в крови связан с повышенным риском обострений у пациентов с ХОБЛ [14]. В настоящей работе мы наблюдали повышение продукции ИЛ-4 в ЕК-клетках после их стимуляции ФМА и иономицином. Будесонид и нортриптилин (1 мкМ и 10 мкМ) самостоятельно подавляли синтез этого цитокина (рисунок). Комбинация будесонида и нортриптилина (1 мкМ или 10 мкМ) снижала продукцию ИЛ-4 в ЕК-клетках более эффективно, чем один будесонид, что свидетельствует о способности нортриптилина даже в низких концентрациях повышать чувствительность клеток пациентов с ХОБЛ к ГК.

ИЛ-8 известен своей способностью привлекать нейтрофилы в очаг воспаления в легочной ткани. Концентрация этого цитокина повышена в сыворотке крови пациентов со стабильным течением ХОБЛ и в дальнейшем еще больше возрастает при обострении заболевания [15]. Установлена взаимосвязь между концентрацией ИЛ-8 в крови пациентов с ХОБЛ и прогрессиру-



Примечание – Клетки крови у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких ( $n=6$ ) инкубировали с нортриптилином (Нт, 1 мкМ или 10 мкМ), будесонидом (Буд, 10 нМ), или их комбинацией в течение 1 часа, после чего стимулировали форбол-миристан-ацетатом (ФМА, 50 нг/мл) или ионоцицином (Ион, 1 мкг/мл) на протяжении 6 часов. Процентное содержание ЕК-клеток, продуцирующих интерлейкин 4 (ИЛ-4, А), ИЛ-8 (Б), интерферон  $\gamma$  (В) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ , Г), определяли методом проточной цитометрии. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Анализ данных проведен методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим определением теста Тьюки: \* $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион; ◆ $p < 0,05$  по сравнению с Буд 10 нМ; # $p < 0,05$  по сравнению с Нт 10 мкМ

**Рисунок – Влияние будесонида и нортриптилина на продукцию цитокинов в ЕК-клетках крови у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких**

**Figure – The effect of budesonide and nortriptyline on the production of cytokines by blood NK cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease**

ванием эмфиземы [16]. В этой связи снижение уровня ИЛ-8 в крови пациентов с ХОБЛ – одна из приоритетных задач при лечении данного заболевания. В нашем исследовании будесонид и нортриптилин в концентрации 10 мкМ значительно подавляли процентное содержание ЕК-клеток, экспрессирующих ИЛ-8. Мы также обнаружили усиление ингибирующего действия будесонида на синтез ИЛ-8 в ЕК-клетках в присутствии нортриптилина (1 мкМ и 10 мкМ). Ранее сообщалось о синергичном супрессирующем действии ГК и нортриптилина на секрецию ИЛ-8 клетками моноцитарной линии человека U937 [9]. Следовательно, подавление ИЛ-8 с использованием комбинации нортриптилина и ГК

может стать адекватным терапевтическим подходом при ХОБЛ, в развитии которой данный цитокин играет важную роль.

ИФН $\gamma$  индуцирует экспрессию эпителиальными клетками бронхов и макрофагами хемокинов MIG, IP-10 и I-TAC, которые служат лигандами для хемокинового рецептора CXCR3. Этот рецептор экспрессируется на лимфоцитах, включая ЕК-клетки, участвует в их миграции в нижние дыхательные пути пациентов с ХОБЛ [17]. Стимуляция макрофагов ИФН $\gamma$  и липополисахаридом приводит к их поляризации в сторону фенотипа M1, который характеризуется продукцией провоспалительных цитокинов,

включая ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  [18]. Более того, ИФН $\gamma$  способствует снижению чувствительности альвеолярных макрофагов у пациентов с ХОБЛ к ГК путем активации фактора транскрипции STAT1 [19]. В настоящей работе будесонид снижал продукцию ИФН $\gamma$  в ЕК-клетках. Более того, комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида оказывала аддитивное действие, ингибируя синтез ИФН $\gamma$  в ЕК-клетках.

У пациентов с ХОБЛ ФНО $\alpha$  активирует факторы транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1, которые способствуют синтезу провоспалительных медиаторов. Так, ФНО $\alpha$  повышает продукцию других цитокинов (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8), хемокинов (CCL5, CCL11, MCP-1), матриксных металлопротеиназ 9 и 12, молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1, E-селектина) и муцинов (MUC1, MUC2, MUC5AC) в клетках воспаления и структурных клетках легких [20]. Обнаружено, что уровень ФНО $\alpha$  повышен в крови у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми [21]. В настоящем исследовании добавление будесонида к клеткам крови у пациентов с ХОБЛ приводило к снижению продукции ФНО $\alpha$  в ЕК-клетках. Кроме того, процент ФНО $\alpha$ -продуцирующих ЕК-клеток значительно снижался при добавлении 10 мкМ нортриптилина к будесониду по сравнению с клетками, находившимися в присутствии одного будесонида. В другом исследовании при комбинации нортриптилина и ГК выявлено синергичное подавление секреции ФНО $\alpha$  стимулированными МКПК здоровых людей [11]. Приведенные данные свидетельствуют о пользе комбинированной терапии нортриптилином и кортикостероидами у пациентов с ХОБЛ.

Показав преимущества сочетанного действия ГК и нортриптилина на продукцию цитокинов в ЕК-клетках, на следующем этапе исследования

мы изучили молекулярные механизмы комбинированного действия данных препаратов. С этой целью мы определили способность будесонида и нортриптилина модулировать известные маркеры стероидорезистентности.

В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что репрессия генов, кодирующих провоспалительные медиаторы, опосредована ферментами гистон деацетилазами. Так, ГДА2 индуцирует деацетилирование ГР, что позволяет этому рецептору связаться с p65 NF- $\kappa$ B и подавить экспрессию генов, кодирующих провоспалительные медиаторы [22]. Сниженная экспрессия ГДА2 у пациентов с ХОБЛ впервые была продемонстрирована в макрофагах легких, а недавно обнаружена в МКПК [23]. Подавление экспрессии ГДА2 приводит к гиперацетилированию гистонов и усилению экспрессии генов, кодирующих провоспалительные медиаторы. Более того, сниженная активность и экспрессия ГДА2 нарушает взаимодействие между ГР и NF- $\kappa$ B, что ведет к синтезу устойчивых к стероидам цитокинов [22]. В нашем исследовании стимуляция клеток крови ФМА и иономицином приводила к подавлению ГДА2 в ЕК-клетках (до стимуляции: 70,9 $\pm$ 4,7%, после стимуляции: 55,5 $\pm$ 3,1%,  $p < 0,05$ ). Будесонид и нортриптилин самостоятельно не оказывали влияния на экспрессию ГДА2 в ЕК-клетках (табл. 2). Более того, применение нортриптилина (1 мкМ и 10 мкМ) в сочетании с будесонидом повышало экспрессию ГДА2 в ЕК-клетках у пациентов с ХОБЛ. Таким образом, индукция экспрессии ГДА2 может быть возможным механизмом, с помощью которого нортриптилин восстанавливает чувствительность ЕК-клеток пациентов с ХОБЛ к стероидам.

Предыдущие исследования показали, что ГР $\beta$ , доминантная негативная изоформа ГР, может ингибировать связывание гормона с ГР $\alpha$ , что приводит к устойчивости клеток к стеро-

**Таблица 2.** – Влияние лекарственных средств на экспрессию ГДА2, ГР $\beta$  и фосфорилированной p38 МАПК в ЕК-клетках крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

**Table 2.** – Effect of drugs on the expression of HDAC2, GR $\beta$ , and phosphorylated p38 MAPK in blood NK cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease

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
% клеток, экспрессирующих ГДА2					
54,9 $\pm$ 2,4	67,4 $\pm$ 6,4	65,5 $\pm$ 5,0	66,6 $\pm$ 5,6	74,8 $\pm$ 5,3*#	76,7 $\pm$ 5,1*#
Средняя интенсивность флуоресценции ГР $\beta$					
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*♦
Средняя интенсивность флуоресценции ф-p38 МАПК					
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*♦

Примечание – Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего;  $n=6$ . \* $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион; ♦ $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Буд 10 нМ; # $p < 0,05$  по сравнению с ФМА + Ион + Нт 10 мкМ. Буд – будесонид; ГР $\beta$  – глюкокортикоидный рецептор  $\beta$ ; Ион – иономицин; Нт – нортриптилин; ФМА – фобол-миристан-ацетат; ф-p38 МАПК – фосфорилированная p38 митоген-активируемая протеинкиназа

идам [24]. В нашем исследовании будесонид не влиял на экспрессию ГРβ, стимулированную ФМА/иономицином, в ЕК-клетках пациентов с ХОБЛ. При этом нортриптилин в концентрации 10 мкМ снижал процент ГРβ-экспрессирующих ЕК-клеток. Угнетение экспрессии ГРβ было более выраженным в ЕК-клетках, культивированных в присутствии комбинации нортриптилина (1 мкМ или 10 мкМ) и будесонида, по сравнению с клетками, находившимися без лекарственных средств или только с будесонидом. Полученные данные означают способность нортриптилина подавлять экспрессию ГРβ, позволяя, таким образом, ГРА выполнять свои функции.

Известно, что при ХОБЛ повышается передача гормонального сигнала через р38 МАПК, что является одной из причин неэффективности ГК при супрессии воспаления [3]. Активированная р38 МАПК индуцирует фосфорилирование ГР, в результате чего замедляется транслокация ГР в ядро клетки и снижается транскрипционная активность ГР [3]. Полученные нами данные демонстрируют неспособность будесонида изменять экспрессию фосфорилированной (активной) р38 МАПК, индуцированную ФМА/иономицином, в ЕК-клетках крови пациентов с ХОБЛ. В другой работе кортикостероид пред-

низолон, назначенный пациентам с ХОБЛ перорально, не ингибировал активность р38 МАПК в цельной крови [25]. В нашей работе нортриптилин в концентрации 10 мкМ снижал экспрессию фосфорилированной р38 МАПК в ЕК-клетках пациентов с ХОБЛ. Более того, комбинация нортриптилина (1 мкМ или 10 мкМ) с будесонидом подавляла активность р38 МАПК более эффективно, чем один будесонид. Таким образом, комбинированное лечение кортикостероидами и нортриптилином позволяет снижать передачу сигналов через р38 МАПК и в последующем ингибировать медиаторы воспаления.

### Выводы

В совокупности результаты проведенного исследования демонстрируют способность нортриптилина усиливать противовоспалительное действие будесонида, связанное с подавлением продукции ИЛ-4, ИЛ-8, ФНОα и ИФНγ в ЕК-клетках крови у пациентов с ХОБЛ. Нортриптилин потенцирует эффекты ГК в ЕК-клетках за счет изменения экспрессии ГДА2, ГРβ и фосфорилированной р38 МАПК. Полученные данные убедительно доказывают преимущества комбинации нортриптилина и будесонида для лечения ХОБЛ.

### Литература

1. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 / J. B. Soriano [et al.] // *Lancet Respir Med.* – 2020. – Vol. 8, № 6. – P. 585-596. – doi: 10.1016/S2213-2600(20)30105-3.
2. Cytotoxic lymphocytes in COPD airways: increased NK cells associated with disease, iNKT and NKT-like cells with current smoking / J. E. Ström [et al.] // *Respir Res.* – 2018. – Vol. 19, № 1. – Art. 244. – doi: 10.1186/s12931-018-0940-7.
3. Кадушкин, А. Г. Молекулярные механизмы формирования стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович // *Пульмонология.* – 2016. – Т. 26, № 6. – С. 736-747. – edn: XXMMGN. – doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-6-736-747.
4. Leung, J. M. Inhaled corticosteroids in COPD: the final verdict is... / J. M. Leung, D. D. Sin // *Eur Respir J.* – 2018. – Vol. 52, № 6. – Art. 1801940. – doi: 10.1183/13993003.01940-2018.
5. 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. – Art. 1511. – doi: 10.3390/ijms20061511.
6. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway / G. Hodge [et al.] // *Respirology.* – 2013. – Vol. 18, № 2. – P. 369-376. – doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02287.x.
7. Human CD56+ cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease / C. M. Freeman [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 7. – Art. e103840. – doi: 10.1371/journal.pone.0103840.
8. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization / A. M. Abel [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 1869. – doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
9. Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of phosphoinositide-3-kinase-δ / N. Mercado [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2011. – Vol. 337, № 2. – P. 465-470. – doi: 10.1124/jpet.110.175950.
10. Strategies to improve anxiety and depression in patients with COPD: a mental health perspective / A. Tselebis [et al.] // *Neuropsychiatr Dis Treat.* – 2016. – Vol. 12. – P. 297-328. – doi: 10.2147/NDT.S79354.
11. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity / J. Lehár [et al.] // *Nat Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27, № 7. – P. 659-666. – doi: 10.1038/nbt.1549.
12. Junttila, I. S. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes / I. S. Junttila // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 888. – doi: 10.3389/fimmu.2018.00888.
13. Abonyo, B. O. Autoregulation of CCL26 synthesis and secretion in A549 cells: a possible mechanism by which alveolar epithelial cells modulate airway inflammation / B. O. Abonyo, M. S. Alexander, A. S. Heiman // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 3. – P. L478-L488. – doi: 10.1152/ajplung.00032.2005.
14. Blood eosinophils and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. The Copenhagen General Population Study / S. Vedel-Krogh [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2016. – Vol. 193, № 9. – P. 965-974. – doi: 10.1164/rccm.201509-1869OC.
15. Zhang, J. The significance of serum interleukin-8 in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / J. Zhang, C. Bai // *Tanaffos.* – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 13-21.

16. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD / E. Bradford [et al.] // *Respir Res.* – 2017. – Vol. 18, № 1. – Art. 180. – doi: 10.1186/s12931-017-0662-2.
  17. Hughes, C. E. A guide to chemokines and their receptors / C. E. Hughes, R. J. B. Nibbs // *FEBS J.* – 2018. – Vol. 285, № 16. – P. 2944-2971. – doi: 10.1111/febs.14466.
  18. Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals / T. D. Smith [et al.] // *Integr Biol (Camb).* – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. 946-955. – doi: 10.1039/c6ib00105j.
  19. IFN- $\gamma$  synergistically enhances LPS signalling in alveolar macrophages from COPD patients and controls by corticosteroid-resistant STAT1 activation / T. Southworth [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2012. – Vol. 166, № 7. – P. 2070-2083. – doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01907.x.
  20. Matera, M. G. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water / M. G. Matera, L. Calzetta, M. Cazzola // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 121-128. – doi: 10.1016/j.pupt.2009.10.007.
  21. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis / Y. Yao [et al.] // *Ther Adv Respir Dis.* – 2019. – Vol. 13. – Art. 1753466619866096. – doi: 10.1177/1753466619866096.
  22. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression / K. Ito [et al.] // *J Exp Med.* – 2006. – Vol. 203, № 1. – P. 7-13. – doi: 10.1084/jem.20050466.
  23. Decreased histone deacetylase 2 (HDAC2) in peripheral blood monocytes (PBMCs) of COPD patients / C. Tan [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, № 1. – Art. e0147380. – doi: 10.1371/journal.pone.0147380.
  24. Kino, T. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology / T. Kino, Y. A. Su, G. P. Chrousos // *Cell Mol Life Sci.* – 2009. – Vol. 66, № 21. – P. 3435-3448. – doi: 10.1007/s00018-009-0098-z.
  25. A randomized, placebo-controlled study of the effects of the p38 MAPK inhibitor SB-681323 on blood biomarkers of inflammation in COPD patients / D. Singh [et al.] // *J Clin Pharmacol.* – 2010. – Vol. 50, № 1. – P. 94-100. – doi: 10.1177/0091270009347873.
- References**
1. Soriano JB, Kendrick PJ, Paulson KR, Gupta V, Abrams EM, Adedoyin RA, Adhikari TB, Advani SM, Agrawal A, Ahmadian E, Alahdab F, Aljunid SM, Altirkawi KA, Alvis-Guzman N, Anber NH, Andrei CL, Anjomshoa M, Ansari F, Antó JM, Arabloo J, Athari SM, Athari SS, Awoke N, Badawi A, Banoub JAM, Bennett DA, Bensenor IM, et al. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):585-596. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30105-3.
  2. Ström JE, Pourazar J, Linder R, Blomberg A, Lindberg A, Bucht A, Behndig AF. Cytotoxic lymphocytes in COPD airways: increased NK cells associated with disease, iNKT and NKT-like cells with current smoking. *Respir Res.* 2018;19(1):244. doi: 10.1186/s12931-018-0940-7.
  3. Kadushkin AG, Taganovich AD. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya.* 2016;26(6):736-747. edn: XXMMGN. doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-6-736-747. (Russian).
  4. Leung JM, Sin DD. Inhaled corticosteroids in COPD: the final verdict is.... *Eur Respir J.* 2018;52(6):1801940. doi: 10.1183/13993003.01940-2018.
  5. Hodge G, Hodge S. Therapeutic Targeting Steroid Resistant Pro-Inflammatory NK and NKT-Like Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1511. doi: 10.3390/ijms20061511.
  6. Hodge G, Mukaro V, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway. *Respirology.* 2013;18(2):369-376. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02287.x.
  7. Freeman CM, Stolberg VR, Crudgington S, Martinez FJ, Han MK, Chensue SW, Arenberg DA, Meldrum CA, McCloskey L, Curtis JL. Human CD56+ cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014;9(7):e103840. doi: 10.1371/journal.pone.0103840.
  8. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
  9. Mercado N, To Y, Ito K, Barnes PJ. Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of phosphoinositide-3-kinase- $\delta$ . *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337(2):465-470. doi: 10.1124/jpet.110.175950.
  10. Tselebis A, Pachi A, Ilias I, Kosmas E, Bratis D, Moussas G, Tzanakis N. Strategies to improve anxiety and depression in patients with COPD: a mental health perspective. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:297-328. doi: 10.2147/NDT.S79354.
  11. Lehár J, Krueger AS, Avery W, Heilbut AM, Johansen LM, Price ER, Rickles RJ, Short GF 3rd, Staunton JE, Jin X, Lee MS, Zimmermann GR, Borisy AA. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol.* 2009;27(7):659-666. doi: 10.1038/nbt.1549.
  12. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol.* 2018;9:888. doi: 10.3389/fimmu.2018.00888.
  13. Abonyo BO, Alexander MS, Heiman AS. Autoregulation of CCL26 synthesis and secretion in A549 cells: a possible mechanism by which alveolar epithelial cells modulate airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(3):L478-L488. doi: 10.1152/ajplung.00032.2005.
  14. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Blood Eosinophils and Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(9):965-974. doi: 10.1164/rccm.201509-1869OC.
  15. Zhang J, Bai C. The Significance of Serum Interleukin-8 in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tanaffos.* 2018;17(1):13-21.
  16. Bradford E, Jacobson S, Varasteh J, Comellas AP, Woodruff P, O'Neal W, DeMeo DL, Li X, Kim V, Cho M, Castaldi PJ, Hersh C, Silverman EK, Crapo JD, Kechris K, Bowler RP. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD. *Respir Res.* 2017;18(1):180. doi: 10.1186/s12931-017-0662-2.
  17. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018;285(16):2944-2971. doi: 10.1111/febs.14466.
  18. Smith TD, Tse MJ, Read EL, Liu WF. Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activa-

- tion signals. *Integr Biol (Camb)*. 2016;8(9):946-955. doi: 10.1039/c6ib00105j.
19. Southworth T, Metryka A, Lea S, Farrow S, Plumb J, Singh D. IFN- $\gamma$  synergistically enhances LPS signalling in alveolar macrophages from COPD patients and controls by corticosteroid-resistant STAT1 activation. *Br J Pharmacol*. 2012;166(7):2070-2083. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01907.x.
  20. Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(2):121-128. doi: 10.1016/j.pupt.2009.10.007.
  21. Yao Y, Zhou J, Diao X, Wang S. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis*. 2019;13:1753466619866096. doi: 10.1177/1753466619866096.
  22. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med*. 2006;203(1):7-13. doi: 10.1084/jem.20050466.
  23. Tan C, Xuan L, Cao S, Yu G, Hou Q, Wang H. Decreased Histone Deacetylase 2 (HDAC2) in Peripheral Blood Monocytes (PBMCs) of COPD Patients. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147380. doi: 10.1371/journal.pone.0147380.
  24. Kino T, Su YA, Chrousos GP. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(21):3435-3448. doi: 10.1007/s00018-009-0098-z.
  25. Singh D, Smyth L, Borrill Z, Sweeney L, Tal-Singer R. A randomized, placebo-controlled study of the effects of the p38 MAPK inhibitor SB-681323 on blood biomarkers of inflammation in COPD patients. *J Clin Pharmacol*. 2010;50(1):94-100. doi: 10.1177/0091270009347873.

## SUPPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION IN PERIPHERAL BLOOD NATURAL KILLER CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE BY NORTRIPTYLINE

A. G. Kadushkin, A. D. Tahanovich, A. V. Khadasouskaya, T. S. Kolesnikova  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

*Aim.* To determine the ability of nortriptyline, alone and in combination with budesonide, to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines in the peripheral blood natural killer (NK) cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and to establish the molecular mechanisms of the combined action of these drugs.

*Material and methods.* Blood cells from COPD patients ( $n=21$ ) were incubated with budesonide, nortriptyline, or their combination. Cytokine production, expression of glucocorticoid receptor  $\beta$  (GR $\beta$ ), histone deacetylase 2 (HDAC2), and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK) in NK cells were analyzed by flow cytometry.

*Results.* The combination of nortriptyline (10  $\mu$ M) and budesonide (10 nM) reduced the synthesis of interleukin 4 (IL-4), IL-8, interferon  $\gamma$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  as well as the expression of GR $\beta$  and p-p38 MAPK in NK cells; it also increased the expression of HDAC2 more significantly than budesonide alone.

*Conclusions.* Nortriptyline enhances the anti-inflammatory effect of budesonide by altering the expression of HDAC2, GR $\beta$ , p-p38 MAPK in peripheral blood NK cells of patients with COPD. The data obtained indicate the advisability of combining nortriptyline with budesonide for the treatment of COPD.

**Keywords:** COPD, steroid resistance, cytokines, nortriptyline, budesonide, NK cells.

**For citation:** Kadushkin AG, Tahanovich AD, Khadasouskaya AV, Kolesnikova TS. Suppression of pro-inflammatory cytokine production in peripheral blood natural killer cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease by nortriptyline. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2023;21(1):32-39. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2023-21-1-32-39>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание № 2.56).

**Financing.** The study was supported by the State Scientific Program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” (task no. 2.56).

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Об авторах/About the authors**

\*Кадушкин Алексей Геннадьевич / Kadushkin Aliaksei, e-mail: kadushkyn@gmail.com, ORCID: 0000-0002-1620-8477

Таганович Анатолий Дмитриевич / Tahanovich Anatoli, e-mail: taganovich@bsmu.by, ORCID: 0000-0002-0668-2888

Ходосовская Елена Вячеславовна / Khadasouskaya Alena, e-mail: leno4ka\_579@mail.ru, ORCID: 0000-0003-0840-6729

Колесникова Татьяна Сергеевна / Kolesnikova Tatsiana, e-mail: tanyakolesnikova@list.ru, ORCID: 0000-0002-2961-0465

\*автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 26.10.2022

Принята к публикации / Accepted for publication: 25.01.2023