

УДК 616.24-036.12:615.214:577.1

## НОРТРИПТИЛИН МОДУЛИРУЕТ МИГРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

© 2022 г. А. Г. Кадушкин<sup>1,\*</sup>, А. Д. Таганович<sup>1</sup>, Л. В. Мовчан<sup>2</sup>, Т. С. Колесникова<sup>1</sup>,  
Е. В. Ходосовская<sup>1</sup>, Т. В. Шман<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН Л.П. Титовым

Поступило 13.05.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принято к публикации 02.07.2022 г.

В настоящем исследовании с помощью метода проточной цитометрии изучено влияние нортриптилина (1 и 10 мкМ), будесонида (10 нМ) и их комбинации на миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) к хемокинам CCL5 и CXCL10. Нортриптилин (10 мкМ), самостоятельно и в сочетании с будесонидом, подавлял миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов, а также ускорял перемещение к этим хемокинам моноцитов. 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 CCL5 и CXCL10 субпопуляций лимфоцитов и активировала хемотаксис к обоим хемокинам моноцитов более значительно, чем один будесонид. Результаты исследования демонстрируют способность нортриптилина самостоятельно модулировать миграцию лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ и потенцировать эффекты будесонида.

**Ключевые слова:** нортриптилин, будесонид, стероидорезистентность, ХОБЛ, хемотаксис, CCL5, CXCL10

**DOI:** 10.31857/S2686738922050122

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время от 300 до 400 млн человек во всем мире страдают от хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Это заболевание ежегодно уносит жизни до 3 млн пациентов [1]. По оценкам экспертов, в глобальном масштабе ХОБЛ приводит к экономическим издержкам в размере 2.1 трлн. долларов США. Ожидается, что к 2030 г. эти цифры могут увеличиться более чем вдвое [1].

Несмотря на риск развития серьезных побочных эффектов, ингаляционные глюкокортико-

стероиды (ИГКС), лекарственные средства (ЛС) с противовоспалительным механизмом действия широко используются для лечения ХОБЛ. Добавление ИГКС к бронходилататору (длительно действующему  $\beta_2$ -агонисту (ДДБА) или комбинации ДДБА и длительно действующего антихолинэргического препарата) снижает риск будущих обострений у пациентов с предшествующими обострениями ХОБЛ [2]. Однако глюкокортико-стероиды (ГКС) имеют ограниченную эффективность в снижении риска смерти и уровня провоспалительных медиаторов, улучшении функции легких и качества жизни пациентов с ХОБЛ [3, 4].

Исследования, направленные на поиск ЛС, способных потенцировать действие ГКС, привели к выявлению нортриптилина как ЛС, обладающего такими свойствами [5, 6]. Нортриптилин относится к группе трициклических антидепрессантов (ТЦА) и одновременно является активным метаболитом amitriptilina, который также принадлежит к группе ТЦА. Нортриптилин используется для лечения депрессии, тревоги и

<sup>1</sup> Учреждение образования “Белорусский государственный медицинский университет”, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Государственное учреждение “Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии”, Минский район, Беларусь  
\*e-mail: kadushkyn@gmail.com

никотиновой зависимости у пациентов с ХОБЛ [7, 8]. Проведенные нами ранее исследования позволили установить синергичное супрессирующее действие нортриптилина и ГКС в отношении секреции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) больных ХОБЛ [9, 10].

Привлечение лимфоцитов и моноцитов в легкие, где они продуцируют провоспалительные медиаторы, происходит под воздействием хемокинов — лигандов для хемокиновых рецепторов, локализованных на поверхности клеток. Полагают, что основное значение в перемещении клеток крови пациентов с ХОБЛ в легкие играют лиганд-рецепторные пары CCR5-CCL5 и CXCR3-CXCL9/CXCL10/CXCL11 [11, 12]. На это в том числе указывают данные об увеличенной миграции МКПК пациентов с ХОБЛ в направлении CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11 по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми [13]. Сообщается о подавлении хемотаксиса полиморфноядерных клеток в места воспаления под влиянием нортриптилина [14]. Однако сведения о способности этого ЛС потенцировать эффекты ГКС, связанные с угнетением миграции МКПК, отсутствуют.

Целью исследования явилось оценить способность комбинации нортриптилина и ГКС влиять на перемещение лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с ХОБЛ в направлении хемокинов CCL5 и CXCL10.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика пациентов.** Донорами крови для проведения исследования явились 8 больных ХОБЛ (6 мужчин и 2 женщины), в возрасте 61.5 (59.0–68.3) лет [медиана (25-й – 75-й перцентили)], имеющих индекс курящего человека 39.0 (16.3–43.8) пачка/лет и 2–3 степень тяжести заболевания (в соответствии с критериями Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких). Критериями исключения из исследования явились наличие у пациентов бронхиальной астмы, заболеваний соединительной ткани с изменениями функции дыхательной системы, онкологических и аутоиммунных заболеваний, нарушений свертывающей системы крови, а также прием системных ГКС или обострение ХОБЛ в течение 6 нед до начала исследования.

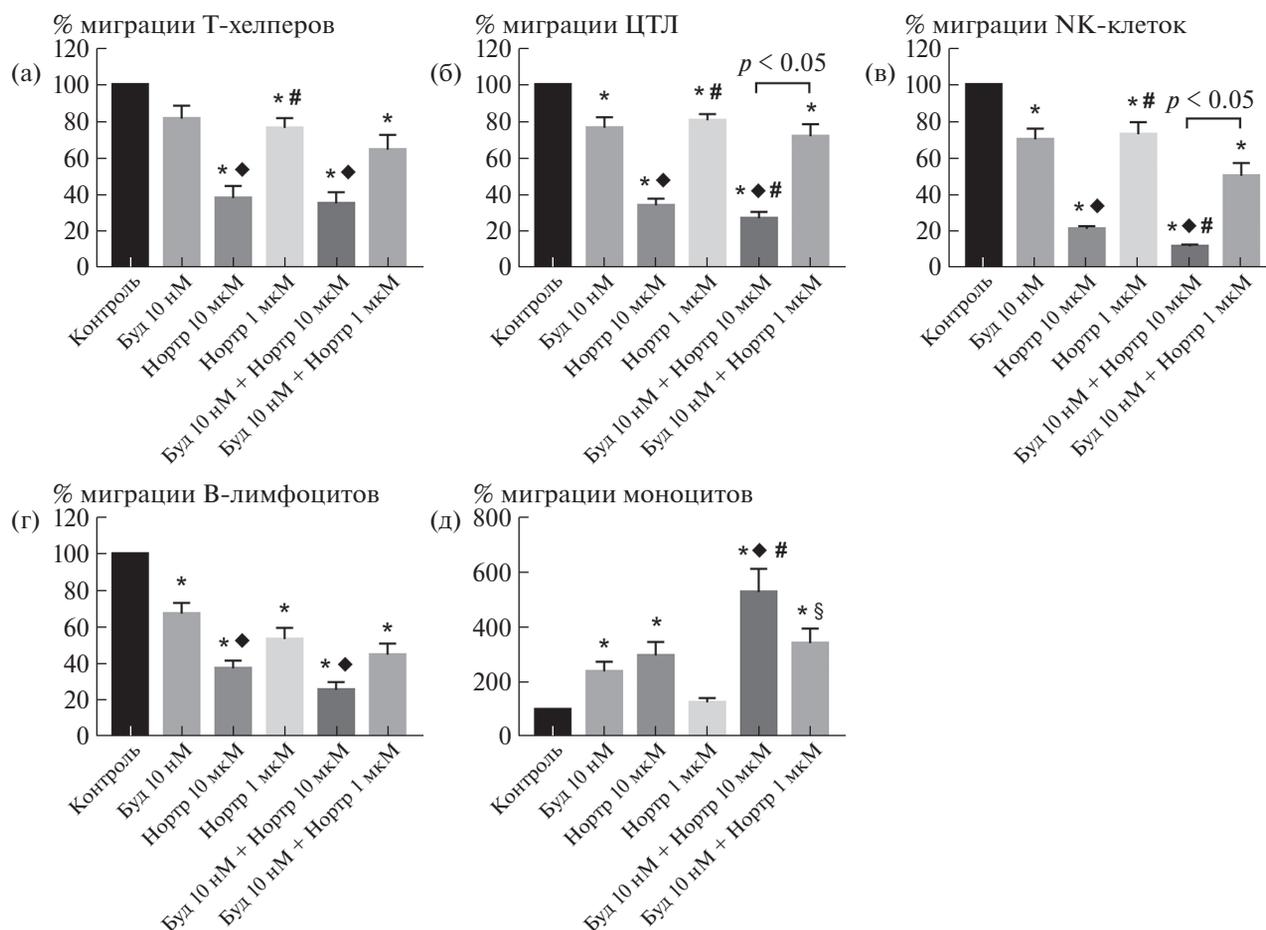
**Выделение МКПК.** Венозную кровь у пациентов забирали утром натощак в объеме 15 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия (Белмедпрепараты, Беларусь) в концентрации 10 ЕД/мл в качестве антикоагулянта. МКПК выделяли из периферической крови путем центрифугирования на градиенте плотности 1.077 с использова-

нием раствора Lymphopure (Biolegend, США). Клетки ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, США), обогащенной 1% фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Capricorn Scientific, Германия).

**Инкубация МКПК с лекарственными средствами.** В стерильные пробирки помещали 1 мл клеточной суспензии и инкубировали с ГКС будесонидом (10 нМ, Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания), нортриптилином (1 и 10 мкМ, Sigma-Aldrich, США) или их комбинацией в увлажненной 5% CO<sub>2</sub>/95% воздушной среде при 37°C. Спустя 1 ч 100 мкл клеточной суспензии (100 000 клеток) переносили в верхние камеры (съёмные вставки) 24-луночного миграционного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм (Costar Corning, США). В нижние камеры миграционного планшета помещали 600 мкл миграционного 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). В качестве нестимулированного контроля использовали миграционный буфер, не содержащий хемокины. Далее планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% атмосферного воздуха. По окончании 2 ч клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали, отмывали при помощи фосфатного солевого буфера (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша) (условия центрифугирования: 500 g, 5 мин, комнатная температура) и ресуспендировали в ФСБ. Добавляли коктейль моноклональных антител, состоящий из CD3-FITC/CD14-PE/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 мин при температуре 4°C. Далее клетки отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0.2% бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences, США), и фиксировали путем внесения в пробирку 300 мкл 1% раствора параформальдегида. Используя проточный цитометр Navios (Beckman Coulter, США), настроенный на среднюю скорость потока клеток, подсчитывали их количество в течение 100 с.

Образцы анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter). Т-хелперы идентифицировали как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) — CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, В-лимфоциты — CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, NK-клетки — CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, моноциты — CD14<sup>+</sup> клетки.

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, США). Оценка результатов исследования проводилась методом однофак-



**Рис. 1.** Влияние нортриптилина и будесонида на хемотаксис мононуклеарных клеток периферической крови в направлении CCL5. Представлены графики, демонстрирующие влияние нортриптилина (Нортр, 1 и 10 мкМ), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию Т-хелперов (а), цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (б), NK-клеток (в), В-лимфоцитов (г) и моноцитов (д), индуцированную 10 нМ CCL5. Здесь и на рис. 2: результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего;  $n = 8$ . \*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем (клетками крови, находившимися в присутствии хемокина, но в отсутствии лекарственных средств); ♦  $p < 0.05$  по сравнению с Буд 10 нМ; #  $p < 0.05$  по сравнению с Нортр 10 мкМ; §  $p < 0.05$  по сравнению с Нортр 1 мкМ.

торного 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%.

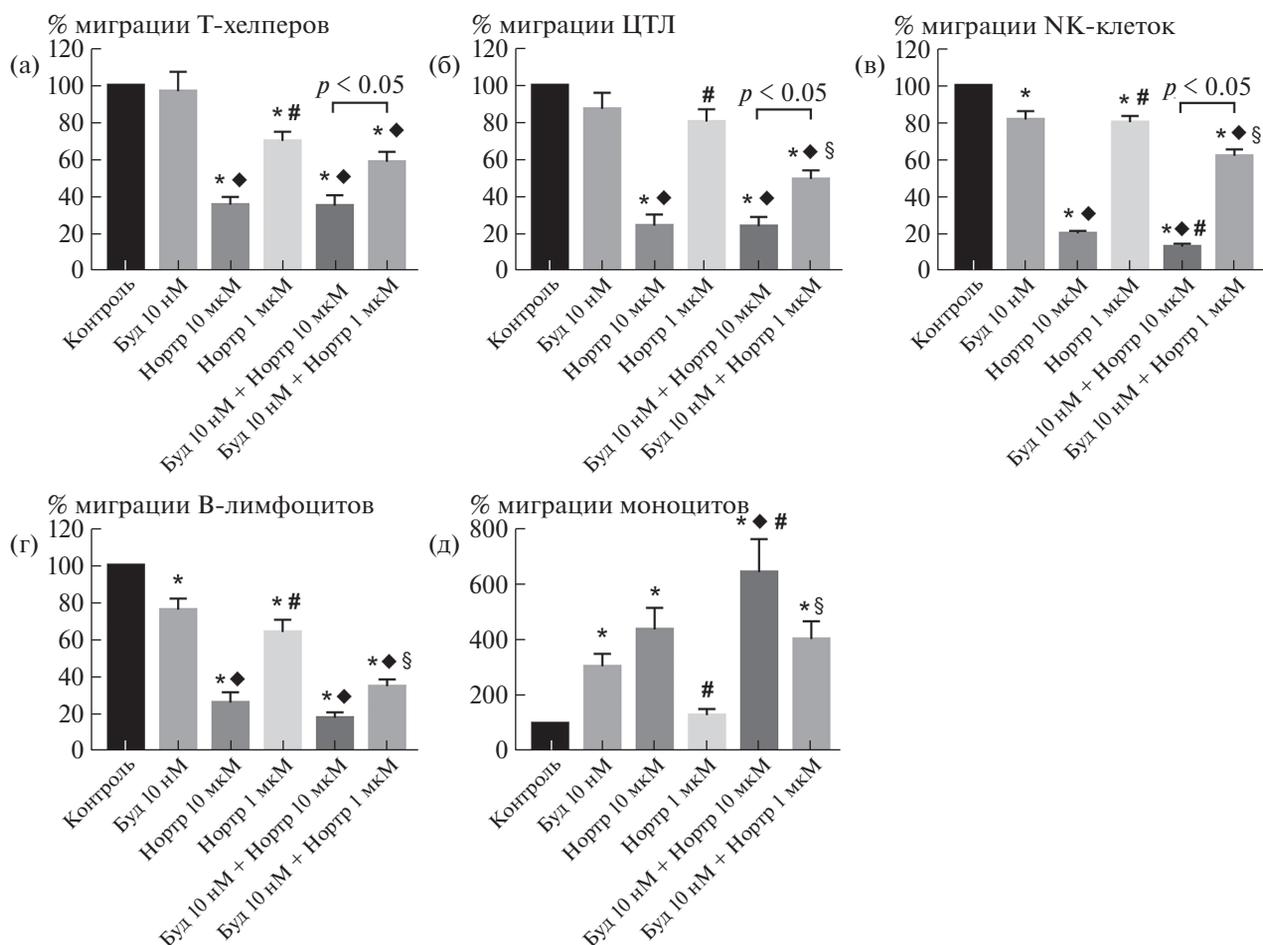
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании будесонид подавлял миграцию ЦТЛ, NK-клеток, В-лимфоцитов и ускорял перемещение моноцитов к хемокину CCL5 (рис. 1). Схожим образом ГКС влияли на хемотаксис NK-клеток, В-лимфоцитов и моноцитов в направлении CXCL10, но не были способны изменить миграцию к этому хемокину Т-хелперов и ЦТЛ (рис. 2).

Добавление к клеточной суспензии нортриптилина в обеих концентрациях (1 и 10 мкМ) при-

водило к снижению миграции Т-хелперов, ЦТЛ, NK-клеток и В-лимфоцитов в направлении CCL5. В минимальной концентрации (1 мкМ) нортриптилин не влиял на перемещение ЦТЛ и моноцитов к CXCL10, зато подавлял хемотаксис к этому лиганду рецепторов CXCR3 Т-хелперов, NK-клеток и В-лимфоцитов. Вместе с тем применение ТЦА в более высокой концентрации (10 мкМ) продемонстрировало его выраженное ингибирующее действие на миграцию к CXCL10 субпопулирующей лимфоцитов и активирующее влияние на перемещение к нему моноцитов.

Комбинация будесонида и нортриптилина (1 мкМ) не имела преимуществ по сравнению с одним будесонидом в отношении миграции МКПК к CCL5, но превосходила способность ГКС подавлять хемотаксис лимфоцитов к CXCL10. Сочетанное использование будесонида и нортриптилина в концентрации 10 мкМ сопровожда-



**Рис. 2.** Влияние нортриптилина и будесонида на хемотаксис мононуклеарных клеток периферической крови в направлении CXCL10. Представлены графики, демонстрирующие влияние нортриптилина (Нортр, 1 и 10 мкМ), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию Т-хелперов (а), цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (б), НК-клеток (в), В-лимфоцитов (г) и моноцитов (д), индуцированную 10 нМ CXCL10.

лось более существенным (ингибирующим – на лимфоциты, активирующим – на моноциты) влиянием на хемотаксис клеток крови к CCL5 и CXCL10 по сравнению с эффектом одного будесонида. Способность изменять миграцию лимфоцитов крови к обоим хемокинам оказалась лишь незначительно лучше у комбинации нортриптилина (10 мкМ) с будесонидом, чем у одного ТЦА в той же концентрации, тогда как сочетанное действие этих же лекарственных средств на хемотаксис моноцитов крови было более выраженным по сравнению с одним нортриптилином (10 мкМ).

Как известно, у пациентов с ХОБЛ наблюдается скопление лимфоцитов в легочной ткани, где они синтезируют провоспалительные цитокины, металлопротеиназы, цитотоксические гранулы (перфорины, гранзим В). Эти белки способствуют привлечению в дыхательные пути нейтрофилов и разрушают протеины внеклеточного матрикса легких с последующим развитием эмфиземы [15, 16]. Приведенные в настоящем

исследовании данные в совокупности со значением лимфоцитов в патогенезе ХОБЛ дают основание полагать, что нортриптилин как самостоятельно, так и в совокупности с будесонидом, может замедлить прогрессирование ХОБЛ за счет снижения количества мигрировавших в легкие лимфоцитов.

Сообщается, что под влиянием ГКС наступает активация популяции противовоспалительных моноцитов, которые проявляют повышенную способность к миграции в очаг воспаления, продуцируют противовоспалительные медиаторы, обладают высокой фагоцитарной активностью и ограничивают активацию Т-лимфоцитов, что в конечном счете приводит к разрешению воспалительного процесса [17]. Учитывая такие сведения, мы предполагаем, что повышение хемотаксиса моноцитов к хемокинам CCL5 и CXCL10 под влиянием ГКС будесонида и нортриптилина (10 мкМ), выявленное в нашем исследовании, может быть связано с мобилизирующим действием

ЛС на противовоспалительные моноциты, что в последующем может способствовать подавлению воспаления. Для подтверждения данной гипотезы требуется проведение дополнительных исследований, в которых будет определен фенотип мигрировавших моноцитов.

Обобщая полученные данные, можно сделать заключение, что нортриптилин (10 мкМ), самостоятельно и в сочетании с будесонидом (10 нМ), подавляет миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, ЦТЛ, НК-клеток и В-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ, а также ускоряет перемещение к этим хемокинам моноцитов крови. Комбинация нортриптилина (10 мкМ) и будесонида обладает более выраженным действием на миграцию клеток крови больных ХОБЛ (ингибирующим – на субпопуляции лимфоцитов и активирующим – на моноциты), чем один будесонид.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке белорусской ГПНИ “Фундаментальные и прикладные науки – медицине” (задание № 2.56).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Разрешение на проведение исследования с участием человека. Проведение исследования было одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования “Белорусский государственный медицинский университет” (протокол № 8 от 21.01.2019). Перед забором крови и определением функции внешнего дыхания все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adeloye D., Agarwal D., Barnes P.J., et al.* Research priorities to address the global burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the next decade // *J. Glob. Health.* 2021. V. 11. Art. 15003.
2. *Agusti A., Fabbri L.M., Singh D., et al.* Inhaled corticosteroids in COPD: friend or foe? // *Eur. Respir. J.* 2018. V. 52. Art. 1801219.
3. *Babu K.S., Kastelik J.A., Morjaria J.B.* Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a pro-con perspective // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2014. V. 78. P. 282–300.
4. *Yang I.A., Clarke M.S., Sim E.H., et al.* Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 7. Article CD002991.
5. *Lehár J., Krueger A.S., Avery W., et al.* Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. № 7. P. 659–666.
6. *Mercado N., To Y., Ito K., et al.* Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of phosphoinositide-3-kinase- $\delta$  // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. V. 337. № 2. P. 465–470.
7. *Howes S., Hartmann-Boyce J., Livingstone-Banks J., et al.* Antidepressants for smoking cessation // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020. V. 4. № 4. Article CD000031.
8. *Tselebis A., Pachi A., Ilias I., et al.* Strategies to improve anxiety and depression in patients with COPD: a mental health perspective // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2016. V. 12. P. 297–328.
9. *Kadushkin A., Tahanovich A., Movchan L., et al.* Nortriptyline enhances corticosteroid sensitivity of blood T cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease // *J. Physiol. Pharmacol.* 2021. V. 72. № 5. P. 793–805.
10. *Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., et al.* Nortriptyline overcomes corticosteroid resistance in NK and NKT-like cells from peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Research Results in Pharmacology.* 2022. V. 8. № 1. P. 59–70.
11. *Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., и др.* Субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови, коэкспрессирующих CD5 и хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // *Иммунология.* 2022. Т. 43. № 2. С. 197–207.
12. *Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., и др.* Популяционная перестройка В-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // *Биомедицинская химия.* 2022. Т. 68. № 2. С. 134–143.
13. *Costa C., Traves S.L., Tudhope S.J., et al.* Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD // *Eur. Respir. J.* 2016. V. 47. № 4. P. 1093–1102.
14. *Sacerdote P., Bianchi M., Panerai A.E.* Chlorimipramine and nortriptyline but not fluoxetine and fluvoxamine inhibit human polymorphonuclear cell chemotaxis in vitro // *Gen. Pharmacol.* 1994. V. 25. P. 409–412.
15. *Rovina N., Koutsoukou A., Koulouris N.G.* Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. Art. 413735.
16. *Polverino F., Seys L.J., Bracke K.R., et al.* B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2016. V. 311. № 4. P. L687–L695.
17. *Ehrchen J.M., Roth J., Barczyk-Kahlert K.* More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. Art. 2028.

## NORTRIPTYLINE MODULATES THE MIGRATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

A. G. Kadushkin<sup>a, #</sup>, A. D. Tahanovich<sup>a</sup>, L. V. Movchan<sup>b</sup>, T. S. Kolesnikova<sup>a</sup>,  
A. V. Khadasouskaya<sup>a</sup>, and T. V. Shman<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>b</sup> Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk Region, Belarus

<sup>#</sup>e-mail: kadushkyn@gmail.com

Presented by Academician of the RAS L.P. Titov

In the present study, the effect of nortriptyline (1 and 10  $\mu\text{M}$ ), budesonide (10 nM) and their combination on the migration of peripheral blood lymphocytes and monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) towards chemokines CCL5 and CXCL10 was evaluated by flow cytometry. Nortriptyline (10  $\mu\text{M}$ ), alone and in combination with budesonide, inhibited the migration of T helper cells, cytotoxic T lymphocytes, NK cells and B lymphocytes towards CCL5 and CXCL10, as well as enhanced monocyte migration towards these chemokines. The combination of nortriptyline (1  $\mu\text{M}$ ) and budesonide was superior to the ability of budesonide to suppress the chemotaxis of lymphocyte subpopulations towards CXCL10, but not towards CCL5. The combination of nortriptyline (10  $\mu\text{M}$ ) and budesonide was more potent at suppressing the migration of lymphocyte subpopulations towards CCL5 and CXCL10 and at increasing monocyte chemotaxis towards both chemokines than budesonide alone. The results of the study demonstrate the ability of nortriptyline alone to modulate the migration of peripheral blood lymphocytes and monocytes from patients with COPD and to potentiate the effects of budesonide.

**Keywords:** nortriptyline, budesonide, steroid resistance, COPD, chemotaxis, CCL5, CXCL10