

Е.Ю. Шерстобоев, А.П. Бабенко, Д.А. Климентова, Н.В. Масная

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА- И БЕТА-АДРЕНОБЛОКАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ПРИ РАЗВИТИИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

Изучали влияние альфа- и бета-адреноблокаторов на выработку цитокинов спленоцитами мышей-гибридов F₁(СВАхС57Вl/6) при развитии гуморального иммунного ответа. Было показано, что применение дигидроэрготамина снижало на фоне иммунизации выделение *ex vivo* целого ряда лимфокинов — ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10. Однако при этом происходила стимуляция выработки монокинов — ФНО-α и ИЛ-1β. Введение иммунизированным мышам обзидана так же, как и дигидроэрготамина, усиливало выработку ФНО-α и снижало продукцию ИЛ-2. Влияние бета-адреноблокатора на выделение других цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10) спленоцитами иммунизированных мышей было неоднозначным.

Ключевые слова: цитокины, альфа- и бета-адреноблокаторы, гуморальный иммунный ответ

Известно, что лимфоидные органы (тимус, селезенка, костный мозг, лимфоузлы) богато снабжены нервами симпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС) [4, 8, 10, 11, 14]. Катехоламины, выделяющиеся нервными окончаниями, способны воздействовать на пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток через специфические рецепторы, расположенные на их клеточной мембране [3, 12]. Повышение симпатического влияния и эндогенной продукции катехоламинов может приводить к ингибции функций Th1 лимфоцитов и продукции ими провоспалительных цитокинов [7]. При этом катехоламины не оказывают прямой эффект на выработку цитокинов Th2 клетками [6]. Однако в условиях развития иммунного ответа эффекты катехоламинов на иммунокомпетентные клетки могут быть различными в зависимости от условий специфического окружения. В связи с этим целью работы явилось исследование влияния блокаторов адренорецепторов на продукцию цитокинов при развитии гуморального иммунного ответа.

Методика

Исследования были проведены на 126 мышам-самках гибридов F₁(СВАхС57Вl/6) в возрасте 2-2,5 месяцев, массой 18-20 г, полученных из лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертифицирована). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Животных иммунизировали корпускулярным тимусзависимым антигеном

(ТЗА) — эритроцитами барана (ЭБ), полученными из НПО «Микроген» (Томск). ЭБ трижды отмывали стерильным физиологическим раствором и вводили однократно внутривентриально по 0,2 мл 15% взвеси эритроцитов. Одной группе животных (n=40) за 3-5 мин до иммунизации и через 6 часов после воздействия вводили подкожно альфа-адреноблокатор дигидроэрготамин («Galena», Чехия) в дозе 3,9 мг/кг, другой (n=40) — бета-адреноблокатор обзидан («Isis Pharma», Германия) в дозе 5 мг/кг. Непосредственно перед использованием препараты растворяли в стерильном физиологическом растворе. В качестве контроля (n=40) использовали иммунизированных животных, которым в аналогичных условиях эксперимента вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Мышей умерщвляли методом декапитации под эфирным наркозом. Забор материала для исследований осуществляли на 1, 4, 7 и 10 сут. после иммунизации ЭБ. В качестве фона использовали интактных мышей (n=6) соответствующего пола и возраста.

Проводилось изучение уровней цитокинов ФНО-α, ИЛ-1β, ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 в супернатантах спленоцитов экспериментальных животных. Для получения спленоцитов селезенки измельчали стеклянным гомогенизатором в среде 199 («ГНЦ ВБ Вектор», Новосибирск), содержащей 40 мкг/мл гентамицина («Дальхимфарм», Хабаровск) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («BioClot», Германия) [1]. Полученные клетки суспендировали (фильтровали), пропуская через капроновую сеточку, затем центрифугировали и дважды отмывали средой 199 с 5% ЭТС. Осадок ресуспендировали в полной культураль-

ной среде (ПРС) следующего состава: 90% среды RPMI-1640 («ГНЦ ВБ Вектор», Новосибирск), 10% ЭТС («BioClot», Германия), предварительно инактивированной теплом (56 °C, 30 мин), 2 mM L-глутамина («Sigma», США), 10 mM HEPES («Flow», Великобритания), 40 мг/л гентамицина («Serva», ФРГ), 25 мкМ 2-меркаптоэтанола («Sigma», США), после чего подсчитывали количество жизнеспособных клеток в суспензии с трипановым синим в камере Горяева с помощью световой микроскопии. Количество жизнеспособных спленоцитов доводили до концентрации 2×10^6 клеток/мл и инкубировали в ПРС в течение 20 часов при 37 °C, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха при добавлении к части спленоцитов конканавалина А (Кон А) («ICN», США) 5 мкг/мл, а к части — липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli* Serotype 055:B5 («Sigma», США) 10 мкг/мл. По окончании инкубации собирали кондиционные среды и хранили не более месяца при -50 °C.

ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 определяли в супернатантах спленоцитов, стимулированных ЛПС, а ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, и ИЛ-10 — при добавлении к спленоцитам Кон А иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы «Amersham Pharmacia Biotech» (Великобритания) согласно методическим указаниям, прилагаемым к наборам, и анализатора иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01, производства ЗАО «Пикон», г. Москва.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Statistica for Windows (версия 5.0) с предварительной оценкой нормальности распределения и использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

Динамика продукции ИЛ-1 β спленоцитами мышей, иммунизированных ТЗА, достоверно не отличалась от фоновых значений на протяжении всего периода наблюдения. Введение животным дигидроэрготамина перед иммунизацией не вызывало существенных изменений в количестве ИЛ-1 β в исследуемых супернатантах на 1-е и 4-е сут. эксперимента, однако на 7-е сут. опыта отмечалось достоверное увеличение продукции цитокина спленоцитами по сравнению с контролем, а на 10-е сут. исследования наблюдалось статистически значимое снижение выработки ИЛ-1 β в группе мышей с введением альфа-адреноблокатора относительно исходного уровня. Применение обзидана не вызывало достоверных изменений продукции ИЛ-1 β по сравнению с группой только иммунизированных животных, однако при этом отмечалось статистически значимое снижение выработки исследуемого цитокина относительно фоновых значений на протяжении всего периода наблюдения (за исключением 7-х сут. опыта) (Рис. 1, а).

Иммунизация мышей ЭБ не влияла на продук-

цию ФНО- α спленоцитами в течение всего эксперимента. Введение животным дигидроэрготамина не изменяло выработки ФНО- α в ранние сроки после иммунизации и достоверно повышало продукцию исследуемого цитокина как по сравнению с группой только иммунизированных животных, так и с исходным уровнем на 7-е и 10-е сут. эксперимента. Применение бета-адреноблокатора усиливало продукцию ФНО- α спленоцитами иммунизированных мышей во все сроки наблюдения относительно контрольной и фоновой групп (Рис. 1, б).

Применение ТЗА приводило к повышению выработки ИЛ-6 спленоцитами мышей на 1-е и 4-е сут. эксперимента (в 1,99 и 2,02 раза относительно исходного уровня соответственно). В дальнейшем продукция исследуемого цитокина снижалась и достоверно не отличалась от фона. Введение дигидроэрготамина угнетало продукцию ИЛ-6 спленоцитами иммунизированных мышей практически на протяжении всего периода наблюдения, за исключением 7-х сут. опыта. Причем на 10-е сут. эксперимента выработка исследуемого цитокина в группе животных с введением альфа-адреноблокатора была статистически значимо ниже как по сравнению с контролем, так и с фоном. Применение обзидана снижало продукцию ИЛ-6 спленоцитами иммунизированных мышей с 1-х по 7-е сут. наблюдения, а на 10-е сут. опыта отмечалась иная картина — количество ИЛ-6 в культуральных супернатантах данной экспериментальной группы было достоверно выше контрольных и фоновых значений (Рис. 1, в).

Иммунизация мышей ЭБ приводила к снижению продукции ИФН- γ спленоцитами на 4-е сут. исследования по сравнению с фоновыми значениями. В группе мышей, получивших дигидроэрготамин и ТЗА, отмечалось повышение выработки ИФН- γ на 10-е сут. опыта. Введение обзидана приводило к волнообразной динамике продукции исследуемого цитокина спленоцитами иммунизированных мышей. Так, на 4-е сут. наблюдения в этой экспериментальной группе отмечалось повышение выработки ИФН- γ , а на 7-е — более чем двукратное снижение продукции данного цитокина как по сравнению с контролем, так и с фоном (Рис. 2, а).

У иммунизированных мышей продукция ИЛ-2 спленоцитами была снижена на 7-е сут. исследования. Введение дигидроэрготамина и ЭБ подавляло выработку ИЛ-2 относительно фона на протяжении всего эксперимента, по сравнению с контролем — на 4-е, 7-е и 10-е сут. опыта. Применение обзидана так же, как и альфа-адреноблокатора, значительно снижало выработку исследуемого цитокина спленоцитами иммунизированных мышей. Необходимо отметить, что продукция ИЛ-2 была ниже в этой экспериментальной группе во все сроки наблюдения как по сравнению с исходным уровнем, так и с контрольными значениями (Рис. 2, б).

Иммунизация мышей ТЗА приводила к незначительному повышению продукции ИЛ-4 спленоцитами на 4-е сут. опыта. Введение дигидроэрготамина так же, как и обзидана, снижало выработку исследуемого цитокина спленоцитами иммунизированных животных на 7-е сут. наблюдения (Рис. 3, а).

Как показали наши исследования, введение мышам ЭБ приводило к статистически достоверному снижению уровня продукции ИЛ-10 спленоцитами на 1-е сут. эксперимента и к повышению — на 4-е сут. по сравнению с фоновой группой животных. Применение дигидроэрготамина предотвращало падение выработки ИЛ-10 спленоцитами иммунизированных мышей на 1-е сут. опыта, повышало продукцию исследуемого цитокина на 4-е сут. относительно исходного уровня, но уровень ИЛ-10 в группе с введением альфа-адреноблокатора был достоверно ниже, чем в группе только иммунизированных животных. Применение обзидана вызывало увеличение продукции ИЛ-10 спленоцитами

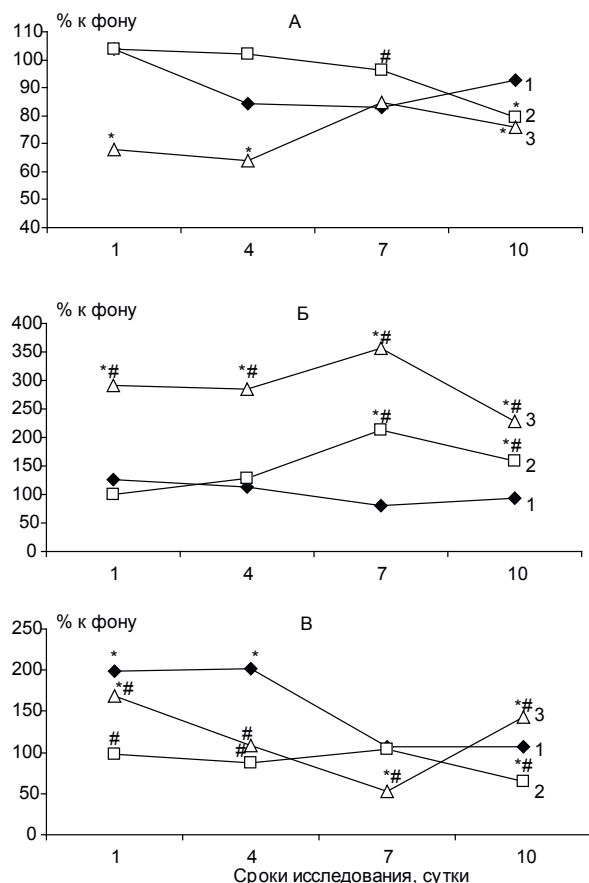


Рис. 1. Динамика продукции ИЛ-1β (А), ФНО-α (Б) и ИЛ-6 (В) спленоцитами иммунизированных мышей-гибридов F₁ (СВАхС57В1/6) (1), на фоне введения альфа- (2) либо бета-адреноблокатора (3).

Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс — сроки исследования (сутки), по оси ординат — содержание цитокинов в супернатантах спленоцитов (в процентах от уровня интактных животных); * — $p < 0,05$ по сравнению с фоном, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

иммунизированных мышей на 1-е и 4-е сут. относительно фона и на 1-е сут. по сравнению с контролем. Однако при этом уровень ИЛ-10 в группе с сочетанным введением бета-адреноблокатора и ЭБ был ниже контрольных значений на 4-е сут., а на 7-е сут. — фоновых (Рис. 3, б).

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований было установлено, что введение мышам ТЗА не влияло на продукцию ИЛ-1β и ФНО-α спленоцитами, в основном снижало выработку ИЛ-2 и ИФН-γ и повышало продукцию ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-10 в ранние сроки развития гуморального иммунного ответа. Как известно, попадание антигена

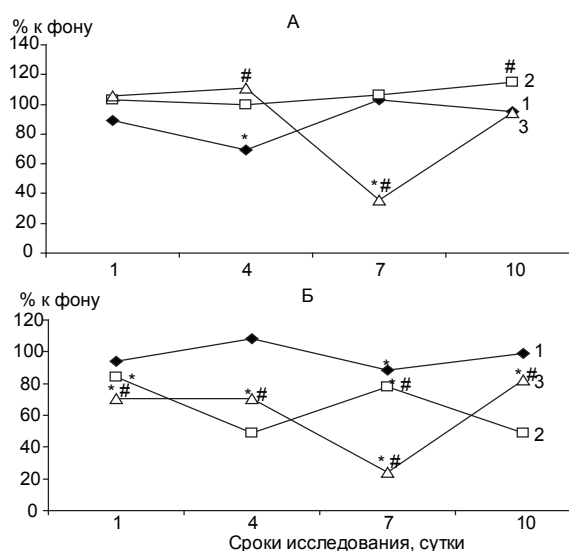


Рис. 2. Динамика продукции ИФН-γ (А) и ИЛ-2 (Б) спленоцитами иммунизированных мышей-гибридов F₁ (СВАхС57В1/6) (1), на фоне введения альфа- (2) либо бета-адреноблокатора (3)

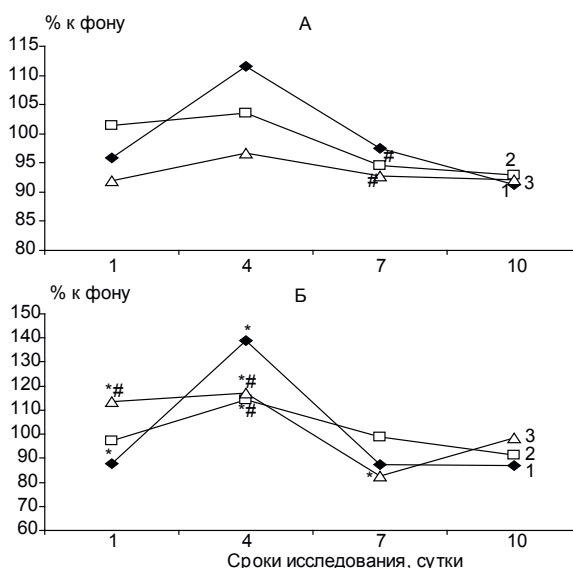


Рис. 3. Динамика продукции ИЛ-4 (А) и ИЛ-10 (Б) спленоцитами иммунизированных мышей-гибридов F₁ (СВАхС57В1/6) (1), на фоне введения альфа- (2) либо бета-адреноблокатора (3)

в организм сопровождается активацией пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов и смещением цитокинового профиля в сторону Th2 типа [2].

Применение альфа-адреноблокатора на фоне иммунизации приводило к усилению выработки ФНО- α и ИЛ-1 β спленocyтами мышей на поздние сроки исследования, снижению продукции ИЛ-10 и ИЛ-4 — соответственно на 4-е и 7-е сут. эксперимента. При этом введение дигидроэрготамина вызывало подавление выработки ИЛ-2 и ИЛ-6 практически на протяжении всего периода наблюдения, а продукция ИФН- γ , напротив, усиливалась. Хотя альфа-адренорецепторы экспрессируются только на отдельных видах клеток, принимающих участие в реализации иммунного ответа (альвеолярные или перитонеальные макрофаги, моноциты), воздействие как на альфа1-, так и на альфа2-адренорецепторы может приводить к изменению параметров иммунного реагирования [5, 9].

Введение обзидана иммунизированным мышам не влияло на выработку ИЛ-1 β спленocyтами, усиливало продукцию ФНО- α во все сроки исследования, снижало выработку ИЛ-6 с 1-х по 7-е сут. после иммунизации, но повышало его продукцию на 10-е сутки опыта. Как сообщалось ранее, применение пропранолона, антагониста бета-адреноблокаторов, блокировало ингибиторный эффект катехоламинов на цитокинпродуцирующие клетки, что приводило к отчетливому повышению ЛПС-стимулированного синтеза ФНО- α и ИЛ-12 у мышей [9, 13].

Введение бета-адреноблокатора усиливало выработку ИЛ-10 и ИФН- γ на ранние сроки опыта, но угнетало — на 4-е и 7-е сутки соответственно, а также на этот срок приходилось падение уровня ИЛ-4 в культуральных супернатантах. Сочетанное введение мышам обзидана и ТЗА приводило к снижению продукции ИЛ-2 на протяжении всего периода наблюдения. Необходимо отметить, что бета2-адренорецепторы экспрессируются на Th1 клетках, но не на Th2, поэтому препараты, воздействующие на бета₂-адренорецепторы, могут прямо влиять на продукцию цитокинов 1-го типа, в то же время их эффект на выработку цитокинов 2-го типа является опосредованным [6].

INFLUENCE OF ALPHA- AND BETA-ADRENOBLOCKERS ON PRODUCTION OF CYTOKINES AT DEVELOPMENT OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE

E.Yu. Sherstoboev, A.P. Babenko, D.A. Klimentova, N.V. Masnaya

It has been studied the influence of alpha- and beta-adrenoblockers on production of cytokines by splenocytes of mice-hybrids F1(CBAx57Bl/6) at development of humoral immune response. It has been shown that dihydroergotamine has lymphocytotoxicity properties, reducing on the background of immunization of the ex vivo release a lot of lympho-

kines — IL-2, IL-4 and IL-10. However, thus there was a stimulation of monokines production — TNF- α and IL-1 β . Introduction of obsidan to immunized mice as well as dihydroergotamine enhanced production of TNF- α and reduced production of IL-2. Influence of beta-adrenoblocker on release of others cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-6 and IL-10) by splenocytes of immunized mice was ambiguous.

Литература

1. Гольдберг, Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. — Томск, 1992. — 272 с.
2. Roitt, A. Иммунология / Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
3. Beta-adrenoceptor-mediated effects in rat cultured thymic epithelial cells / B. Kurz, J. Feindt, B. von Gaud-ecker, et al. // Br. J. Pharmacol. — 1997. — Vol. 120. — P. 1401-1408.
4. Cavallotti, C. Occurrence of adrenergic nerve fibers and of noradrenaline in thymus gland of juvenile and aged rats / C. Cavallotti, N. Artico, D. Cavallotti // Immunol. Lett. — 1999. — Vol. 70. — P. 53-62.
5. Differential effect of selective block of alpha 2-adrenoceptors on plasma levels of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and corticosterone induced by bacterial lipopolysaccharide in mice / G. Hasko, I.J. Elenkov, V. Kvetan, E.S. Vizi // J. Endocrinol. — 1995. — Vol. 144. — P. 457-462.
6. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: Implications for cytokine production and B cell help / V.M. Sanders, R.A. Baker, D.S. Ramer-Quinn, et al. // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158. — P. 4200-4210.
7. Elenkov, I.J. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity / I.J. Elenkov, G.P. Chrousos // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2002. — Vol. 966. — P. 290-303.
8. Felten, S.Y. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synaptic-like contacts on lymphocytes in the splenic white pulp / S.Y. Felten, J. Olschowka // J. Neurosci. Res. — 1987. — Vol. 18. — P. 37-48.
9. Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by selective alpha- and beta-adrenergic drugs in mice / I.J. Elenkov, G. Hasko, K.J. Kovacs, E.S. Vizi // J. Neuroimmunol. — 1995. — Vol. 61. — P. 123-131.
10. Molecular anatomy of the neuro-immune connection / E. Weihe, D. Nohr, S. Michel, et al. // Int. J. Neurosci. — 1991. — Vol. 59. — P. 1-23.
11. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs / S.Y. Felten, D.L. Felten, D.L. Bellingier, et al. // Prog. Allergy. — 1988. — Vol. 43. — P. 14-36.
12. Plaut, M. Lymphocyte hormone receptors / M. Plaut // Annu. Rev. Immunol. — 1987. — № 5. — P. 621-669.
13. Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice / G. Hasko, C. Szabo, Z.H. Nemeth, et al. // J. Neuroimmunol. — 1998. — Vol. 88. — P. 57-61.
14. Sympathetic innervation of lymph nodes in mice / D.L. Felten, S. Livnat, S.Y. Felten, et al. // Brain Res. Bull. — 1984. — Vol. 13. — P. 693-699.