

7. Левина И. С., Никитина Г. В., Куликова Л. Е., Камерницкий А. В. // Изв. АН СССР. Сер.: Химия. — 1995. — № 3. — С. 564—568.
8. Никитина Г. В., Корхов В. В., Никитин А. И. и др. // Арх. анат. — 1986. — Т. 90, № 4. — С. 70—73.
9. Петтен В. Эмбриология человека. — М., 1959. — С. 49—93.
10. Смирнов А. Н., Покровская Е. В., Левина И. С. и др. // Фармакол. и токсикол. — 2001. — Т. 131. — С. 293—296.
11. Ponsold K., Kash H., Stolzner W. et al. // Pat. DDR 263776 A1, 1989.

Поступила 29.10.04

© С. В. ГЕЙН, Т. А. БАЕВА, 2005

УДК 612.015.08

С. В. Гейн, Т. А. Баева

РОЛЬ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ИЗМЕНЕНИИ Th1/Th2-ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ¹

Аналитическая лаборатория (зав. — канд. г.-м наук М. А. Шишкин) Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, кафедрa микробиологии и иммунологии (зав. — акад. РАН В. А. Черешнев) Пермского государственного университета

Изучена роль β -эндорфина на фоне блокады опиатных рецепторов и селективных агонистов μ - и δ -рецепторов DAMGO и DADLE на реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и продукцию IL-1 β , γ -IFN и IL-4 в присутствии фитогемагглютина (ФГА). Установлено, что β -эндорфин, налоксон и селективные μ - и δ -агонисты стимулировали ФГА-индуцированную РБТЛ, не влияя на спонтанный пролиферативный ответ. На фоне блокады опиатных рецепторов эффект β -эндорфина не отменялся, а напротив, усиливался, так как налоксон оказывал самостоятельное стимулирующее действие на РБТЛ. В условиях предварительной обработки опиоидами в течение 1 ч влияния на пролиферативный ответ не зарегистрировано. β -эндорфин, налоксон и DADLE усиливали ФГА-индуцированную продукцию IL-4. Налоксон оказывал разнонаправленное влияние на синтез этого цитокина, угнетая его в спонтанном варианте. На продукцию IL-1 β и γ -IFN опиоидные пептиды и налоксон влияния не оказывали. Высказано предположение о том, что β -эндорфин, налоксон и селективные μ - и δ -агонисты способствуют дифференцировке Т-лимфоцитов в сторону Th2-клеток.

Ключевые слова: опиоидные пептиды, лимфоциты, Th1/Th2-цитокиновый профиль.

The authors studied a role of β -endorphin during the blockade of opiate receptors and selective μ - and δ -receptor agonists DAMGO and DADLE to the reaction of lymphocytic blast-cell transformation (RLBCT) and to the production of IL-1 β , γ -IFN, and IL-4 in the presence of phytohemagglutinin (PHA). It was found that β -endorphin, naloxone, and the selective μ - and δ -receptor agonists stimulated PHA-induced RLBCT, without affecting a spontaneous proliferative response. During opiate receptor blockade, the effect of β -endorphin was not abolished, but, on the contrary, enhanced as naloxone exerted a stimulating effect on RLBCT. A proliferative response was not recorded during preliminary one-hour opioid treatment. β -endorphin, naloxone, and DADLE enhanced the PHA-induced production of IL-4. Naloxone exerted a heterodirectional effect on the synthesis of this cytokine, by inhibiting it spontaneously. The opioid peptides and naloxone produced no effect on the production of IL-1 β and γ -IFN. It is suggested that β -endorphin, naloxone, and the selective μ - and δ -receptor agonists promote the differentiation of T lymphocytes towards Th2-cells.

Key words: opioid peptides, lymphocytes, Th1/Th2-cytokine profile.

Поддержание внутреннего гомеостаза определяется взаимодействием трех основных систем организма: нервной, эндокринной и иммунной. В настоящее время известно, что иммунная система многокомпонентна и ее функционирование обеспечивается сложной сетью взаимосвязанных сигналов. Эндогенные опиоидные пептиды являются одними из важнейших посредников во взаимодействии нервной и иммунной систем, кроме этого, они представляют собой группу факторов, играющих ключевую роль в процессах адаптации организма [8, 14]. Несмотря на то что изучению влияния эндогенных опиоидных пептидов на процессы пролиферации уделено достаточно много внимания [1, 2, 11], вопрос о механизмах реализации эффектов опиоидов, в частности β -эндорфина, способного действовать через несколько типов опиатных рецепторов, остается актуальным. Также недостаточно изученной остается проблема влияния опиоидных пептидов на продукцию ряда ключевых цитокинов (γ -IFN, IL-4, IL-10, IL-12), являющихся маркерными для регуляторных Т-лимфоцитов 1-го и 2-го типа (Th1/Th2) и определяющих выбор типа иммунного ответа [4, 12, 13]. Цель работы — оценка влияния β -эндорфина на фоне блокады опиатных рецепторов и селективных δ - и μ -агонистов на пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro*

и установка взаимосвязи пролиферативных процессов с продукцией IL-1 β , γ -IFN и IL-4.

Материалы и методы

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови здоровых мужчин-добровольцев в возрасте 22—30 лет. Лейкоциты культивировали с фитогемагглютинином Р — ФГА ("Sigma"; конечная концентрация в культуре составляла 2,5 мкг/мл) в 96-луночных круглодонных планшетах. Каждая культура содержала $2 \cdot 10^5$ клеток в 0,2 мл полной питательной среды, которую готовили на основе среды 199 с добавлением 10 мм HEPES ("Sigma"), 2 mM L-глутамин ("Sigma"), 100 мкг/мл гентамицина и 10% аутоплазмы. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C в течение 72 ч. За 18 ч до окончания культивирования в каждую лунку вносили по 2 мкКи ³H-метилтимидина ("Изотоп", Санкт-Петербург) в объеме 10 мкл. Радиоактивность проб определяли на жидкостном скинтилляционном счетчике "Guardian" ("Wallac", Финляндия).

В эксперименте использовали β -эндорфин ("Sigma") в концентрации 10⁻⁷ М; μ -агонист DAMGO ([d-Ala₂, N-Me-Phe₄, Gly₅-ol]-энкефалин; "Sigma") — 10⁻⁸ М; δ -агонист DADLE ([d-Ala₂, d-Leu₅]-энкефалин; "Sigma") — 10⁻⁷ М; налоксона гидрохлорид ("DuPont", США) — 10⁻⁶ М. Выбор концентрации опиоидов и ФГА основывался на

¹Работа поддержана грантом программы президиума РАН № 27 "Молекулярная и клеточная биология".

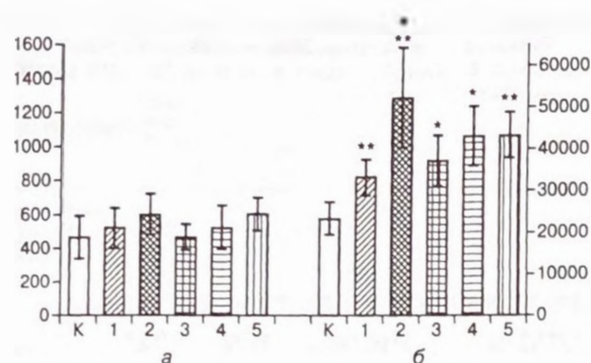


Рис. 1. Влияние β-эндорфина, налоксона и селективных агонистов μ и δ-рецепторов на спонтанный (а) и ФГА-индуцированный (б) пролиферативный ответ лимфоцитов.

Здесь и на рис. 2: по осям ординат — захват ³H-тимидина (в имп/мин); по осям абсцисс: К — контроль; 1 — β-эндорфин; 2 — β-эндорфин + налоксон; 3 — налоксон; 4 — DAMGO; 5 — DADLE. Данные представлены в виде средней и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Число наблюдения во всех выборках равно 9. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем, • — $p < 0,05$ по сравнению с β-эндорфином.

исследованиях, проведенных ранее [1]. При оценке пролиферации все исследуемые соединения вносили в культуру в двух вариантах: одновременно с митогеном и за 1 ч до внесения митогена (клетки обрабатывали опиоидами в течение 1 ч при 37°C, затем в культуры вносили 2,5 мкг/мл ФГА).

Концентрацию IL-1β, IL-4 и γ-IFN определяли при одномоментном внесении опиоидов и ФГА в супернатантах 48-часовых культур параллельно оценке пролиферативной активности. Применяли метод ELISA с использованием наборов "ProCon" ("Протеиновый контур", Санкт-Петербург). Определение проводили в соответствии со стандартной методикой, предложенной производителем.

Все полученные в работе данные представлены в виде средней и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Использовали корреляционный, факторный анализ для парных данных с β-эндорфином и налоксонам в качестве факторов и парный t-критерий для межгруппового сравнения.

Результаты и их обсуждение

Анализ влияния β-эндорфина на фоне блокады опиатных рецепторов налоксонам гидрохлоридом показал наличие статистически значимого самостоятельного влияния как β-эндорфина ($F = 7,53$; $p = 0,025$), так и налоксона ($F = 9,27$; $p = 0,016$) на пролиферацию лимфоцитов в присутствии ФГА. Статистически значимого воздействия между собой ($F = 0,439$; $p = 0,526$) β-эндорфин и налоксон не проявили. Оценка направленности их эффектов показала (рис. 1) стимулирующее влияние β-эндорфина на выраженность реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) по сравнению с контрольными культурами. Блокада опиатных рецепторов налоксонам не отменяла стимулирующего эффекта β-эндорфина, а напротив, приводила к статистически достоверному усилению пролиферации по сравнению как с контролем, так и с эффектом одного β-эндорфина. Аналогичное β-эндорфину влияние на выраженность пролиферативного ответа оказывали налоксон, а также селективные μ- и δ-агонисты. В культуре без митогена статистически достоверных эффектов исследуемых опиоидов не выявлено.

Не было зарегистрировано ответа на включение ³H-тимидина при предварительной обработке в течение 1 ч клеточной суспензии β-эндорфином, налоксонам, а также селективными μ- и δ-агонистами как в стимулированных ФГА, так и в нестимулированных культурах (рис. 2).

Оценку уровня IL-1β, γ-IFN и IL-4 проводили параллельно определению пролиферативной активности с целью исследования взаимосвязи между пролиферативными процессами и направлением дифференцировки Т-лимфоцитов (Th1/Th2). Как видно из таблицы, уровень γ-IFN в супернатантах под воздействием β-эндорфина, его комбинации с налоксонам и селективных μ- и δ-агонистов не отличался от контроля как в спонтанных, так и в стимулированных ФГА культурах. Анализ влияния β-эндорфина и налоксона на ФГА-индуцированную продукцию IL-4 показал их статистически достоверное взаимодействие ($F = 36,5$; $p < 0,0003$). β-Эндорфин значительно активировал синтез IL-4. Аналогичный β-эндорфину эффект давал налоксон. В то же время при одномоментном внесении в культуру β-эндорфина и налоксона усиления продукции IL-4 по сравнению с контролем не зарегистрировано. Активирующее влияние на синтез IL-4 в присутствии ФГА оказывал δ-агонист DADLE. При анализе влияния опиоидов на спонтанную продукцию IL-4 был выявлен статистически значимый эффект налоксона ($F = 6,61$; $p < 0,05$). Антагонист опиатных рецепторов угнетал синтез этого цитокина по сравнению с контрольными культурами. β-Эндорфин, его комбинация с налоксонам, а также селективные агонисты μ- и δ-рецепторов в нестимулированных митогеном культурах влияния на уровень IL-4 не оказывали. Анализ продукции IL-1β показал отсутствие влияния исследуемых опиоидов на этот показатель как в спонтанных, так и в стимулированных ФГА образцах.

Проведенный корреляционный анализ выявил статистически достоверную отрицательную зависимость между интенсивностью пролиферации и уровнем IL-4 в культурах с совместным внесением β-эндорфина и налоксона в присутствии ФГА ($r = -0,68$; $p < 0,05$).

Ранее в литературе уже была описана возможность как супрессивного, так и активирующего влияния β-эндорфина на выраженность РБТЛ преимущественно в присутствии низких концентраций митогена [1, 2]. Отсутствие влияния β-эндорфина, налоксона и селективных μ- и δ-агонистов на спонтанную пролиферативную активность может служить свидетельством того, что опиоидные пептиды являются важными факторами регуляции уже активированных иммунокомпетентных клеток.

Стимулирующая направленность влияния β-эндорфина, налоксона и селективных агонистов δ- и μ-опиатных рецепторов на РБТЛ, на наш взгляд, опосредована прежде всего системой IL-1, поскольку этот цитокин играет ключевую роль в запуске иммунного ответа как *in vivo*, так и *in vitro*. Показано, что β-эндорфин способен стимулировать синтез IL-1β [3] и его антагониста IL-1ra моноцитами-макрофагами на фоне их стимуляции липо-

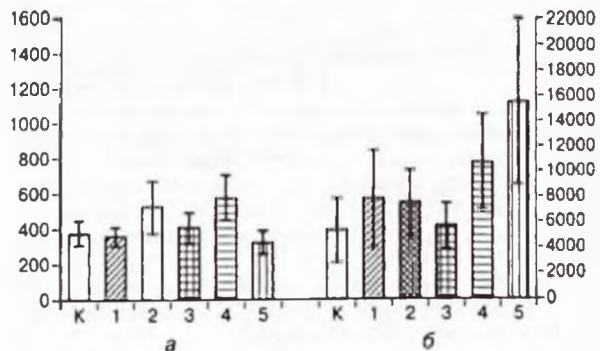


Рис. 2. Влияние предварительной обработки β-эндорфином, налоксонам и селективными агонистами μ и δ-рецепторов на спонтанный (а) и ФГА-индуцированный (б) пролиферативный ответ лимфоцитов.

Влияние β-эндорфина, налоксона и селективных агонистов μ- и δ-рецепторов на продукцию γ-IFN, IL-4 и IL-1β (в пг/мл)

Экспериментальное воздействие	γ-IFN		IL-4		IL-1β	
	среда	ФГА	среда	ФГА	среда	ФГА
Контроль	17,57 ± 3,34	44,76 ± 8,58	31,76 ± 5,49	29,32 ± 8,33	215,44 ± 122,51	148,81 ± 67,08
β-эндорфин	14,16 ± 3,18	52,90 ± 10,75	30,71 ± 7,06	40,34 ± 8,29	212,99 ± 106,19	197,42 ± 120,02
β-эндорфин + налоксон	17,82 ± 6,69	49,97 ± 11,74	28,58 ± 4,26	33,73 ± 7,73	179,35 ± 63,23	221,16 ± 121,76
Налоксон	12,33 ± 2,79	47,71 ± 10,97	23,23 ± 6,35	37,59 ± 9,02	149,95 ± 59,39	208,26 ± 117,21
DAMGO	22,13 ± 2,96	61,04 ± 24,62	38,05 ± 6,35	30,55 ± 2,32	340,83 ± 118,84	372,06 ± 110,97
DADLE	18,72 ± 3,06	62,86 ± 32,06	34,35 ± 4,94	44,67 ± 7,26*	373,62 ± 105,75	267,89 ± 121,58

полисахаридом [6]. Способность модулировать систему IL-1 была показана и для ФГА [5]. Отсутствие в нашем случае влияния опиоидов на IL-1β объясняется, с одной стороны, сроками измерения, поскольку пик синтеза IL-1β наступает через 12 часов культивирования, а с другой — увеличением концентрации IL-4, подавляющего экспрессию IL-1β и активирующего экспрессию гена антагониста IL-1ra [10].

Известно, что β-эндорфин способен усиливать синтез IL-4 CD4⁺-лимфоцитами [4]. Кроме прямого влияния опиоидов на Т-лимфоциты, увеличение уровня IL-4, как и усиление пролиферативного ответа, может быть опосредовано системой IL-1, поскольку для реализации эффекта IL-1β требуется присутствие Th2-клеток [9]. Таким образом, β-эндорфин, налоксон и селективный агонист δ-рецепторов DADLE, усиливая пролиферацию, способствуют изменению соотношения Т-хелперов в сторону Th2-клеток.

Ранее было показано отсутствие отмены влияния β-эндорфина на пролиферативный ответ на фоне блокады опиатных рецепторов [8]. Суммация действия β-эндорфина и налоксона на пролиферативный ответ связана с наличием у налоксона самостоятельного стимулирующего влияния, а также с существованием в пределах μ-опиатного рецептора различных доменов связывания для опиоидных алкалоидов и пептидов [7]. В то же время при выраженном изолированном влиянии β-эндорфина и налоксона на синтез IL-4 их совместное применение не дало эффекта, что может свидетельствовать о различных механизмах влияния опиоидов на пролиферацию и цитокиновый синтез.

Сравнительный анализ действия β-эндорфина и селективных агонистов δ- и μ-рецепторов пептидной природы не показал существенной разницы в выраженности и направленности их влияния как на РБТЛ, так и на ФГА-индуцированную продукцию IL-1β, γ-IFN и IL-4.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные указывают на то, что опиоидергическая регуляция пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток является сложным многофакторным процессом, в котором как агонисты, так и антагонисты опиатных рецепторов способны давать самостоятельные модулирующие эффекты.

Выводы

1. β-эндорфин, налоксон и селективные μ- и δ-агонисты оказывали активирующее влияние на ФГА-индуцированную пролиферативную активность лимфоцитов, не влияя на спонтанный пролиферативный ответ.

2. На фоне блокады опиатных рецепторов наблюдалась суммация стимулирующего влияния β-эндорфина и налоксона на выраженность пролиферативного ответа лимфоцитов.

3. β-эндорфин, налоксон и селективный агонист δ-рецепторов усиливали продукцию IL-4, способствуя переклону направления дифференцировки Т-лимфоцитов в сторону Th2-клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гейн С. В., Симоненко Т. А., Черешнев В. А. // Докл. АН. — 2003. — Т. 391, № 1. — С. 1–3.
2. Зозуля А. А., Пацакова Э., Кост Н. В. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1986. — Т. 102, № 12. — С. 731–733.
3. Apte R. N., Durum S. K., Oppenheim J. J. // Immunol. Lett. — 1990. — Vol. 24. — P. 141–148.
4. van den Bergh P., Dobber R., Ramlal S. et al. // Cell. Immunol. — 1994. — Vol. 154. — P. 109–122.
5. Dabrowski M. P., Stankiewicz W., Plusa T. et al. // Mediators Inflamm. — 2001. — Vol. 10. — P. 101–107.
6. Kovalovsky D., Pereda M. P., Stalla G. K. et al. // Neuroimmunomodulation. — 1999. — Vol. 6. — P. 367–372.
7. Law P. Y., Loh H. H. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1999. — Vol. 289. — P. 607–624.
8. Madden K. S., Felten D. L. // Physiol. Rev. — 1995. — Vol. 75. — P. 77–106.
9. Nakae S., Komiyama Y., Yokoyama H. et al. // Int. Immunol. — 2003. — Vol. 15, N 4. — P. 483–490.
10. Orino E., Sone S., Nii A. et al. // J. Immunol. — 1992. — Vol. 149, N 3. — P. 925–931.
11. Panerai A. E., Sacerdote P. // Trends Immunol. Today. — 1997. — Vol. 18. — P. 317–319.
12. Peterson P. K., Sharp B., Gekker G. et al. // J. Clin. Invest. — 1987. — Vol. 80. — P. 824–831.
13. Sacerdote P. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2003. — Vol. 992. — P. 129–140.
14. Vaccarino A. L., Kastin A. J. // Peptides. — 2000. — Vol. 21. — P. 1975–2034.

Поступила 29.06.04