

УДК 611.42

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ: ЭФФЕКТЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β И ИНТЕРЛЕЙКИНА-2

Унт Д.В., Лобов Г.И.

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, e-mail: dariaunth@yandex.ru

Существование специфических белков, с помощью которых клетки иммунной системы обмениваются информацией и осуществляют координацию действий, позволяет реализовывать защитную функцию иммунной системы. Разновидностью таких белков являются цитокины, к которым, в частности, принадлежат интерлейкины (IL): IL-1 β и IL-2. Являясь провоспалительными цитокинами, они участвуют в процессе развития и усиления иммунного ответа, однако, эффекты, оказываемые IL-1 β и IL-2 на лимфатические узлы, остаются малоизученными. Цель настоящего исследования состояла в оценке влияния ронколейкина (IL-2) и беталейкина (IL-1 β) на сократительную деятельность гладких мышц капсулы брыжеечных лимфатических узлов быка и выявлении механизмов, лежащих в основе их осуществления, сравнении эффектов их воздействия. Показано, что релаксационные ответы гладких мышц капсулы лимфатических узлов на действие IL-1 β в концентрациях от 2 пг/мл до 200 пг/мл и IL-2 в концентрациях от 2 пг/мл до 200 пг/мл носили дозо-зависимый характер и проявлялись в виде снижения амплитуды и частоты фазной сократительной активности гладких мышц и понижения тонуса. Действие IL-1 β носило более выраженный характер, чем действие IL-2 в схожих концентрациях.

Ключевые слова: капсула лимфатических узлов; гладкая мышца; сократительная активность; беталейкин; интерлейкин 1 β ; ронколейкин; интерлейкин-2 человека рекомбинантный.

CONTRACTILE FUNCTION OF THE LYMPH NODES: EFFECTS OF INTERLEUKIN IL-1 β AND INTERLEUKIN-2

Unt D.V., Lobov G.I.

FGBUN Institute of Physiology n.a. I.P. Pavlov Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, e-mail: dariaunth@yandex.ru

Existence of specific proteins by means of which cells of immune system communicate and carry out coordination of actions, allows to implement protective function of immune system. Kind of such proteins are cytokines to which, in particular, interleykina (IL) belong: IL-1 β and IL-2. Being pro-inflammatory cytokines, they participate in development and strengthenings of immune response, however, the effects rendered to IL-1 β and IL-2 on lymph nodes remain low-studied. The purpose of the real research consisted in impact assessment of Ronkoleykin (IL-2) and Betaleukin (IL-1 β) on contractile activity of unstriated muscles of capsule of mesenteric lymph nodes of bull and identification of the mechanisms which are the cornerstone of their implementation, comparison of effects of their influence. It is shown that relaxation responses of unstriated muscles of capsule of lymph nodes to action of IL-1 β in concentration from 2 pg/ml to 200 pg/ml and IL-2 in concentration from 2 pg/ml to 200 pg/ml had dozo-dependent character and were shown in the form of decrease in amplitude and frequency of phase contractile activity of unstriated muscles and lowering of tone. Action of IL-1 β had more expressed character than action of IL-2 in similar concentration.

Keywords: lymph node capsule; smooth muscle; contractile activity; betaleukin; interleukin-1 β ; roncoleukin; interleukin-2 human recombinant.

Изучение процесса клеточного и гуморального иммунитета позволило выявить и охарактеризовать значительное количество цитокинов, которые оказались неотъемлемыми модуляторами иммунного ответа [1]. Эндогенные цитокины, представляя собой пептидные или гликопептидные молекулы с различной структурой и функцией, в большинстве своем продуцируются клетками иммунной системы для осуществления бесконтактной координации межклеточных взаимодействий. Они осуществляют взаимосвязь между специфическим иммунитетом и неспецифическими защитными реакциями организма, а

также координируют работу иммунной, нервной, эндокринной, кровеносной и других систем.

Интерлейкин-1 β (IL-1 β), являющийся провоспалительным цитокином, способен стимулировать функции не только многих типов лейкоцитов, но и оказывать влияние на разнообразные клетки другого происхождения [1]. Об этом свидетельствуют результаты исследований, в которых отмечено гипотензивное действие IL-1 β и его модулирующий эффект на дыхательную систему [8]. Помимо указанного, IL-1 β вызывает подъем температуры тела и воздействует на функции фибробластов и эндотелиальных клеток [1]. Кроме этого, он ускоряет рост кровеносных сосудов в случае их повреждения.

Интерлейкин-2 (IL-2) является плеiotропным цитокином, относящимся к группе цитокинов-гемопоэтинов, имеет основное значение как ростовой фактор, оказывает влияние на механизмы врожденного иммунитета и на адаптивный антиген-зависимый иммунный ответ, реализующийся через Т- и В-лимфоциты [3]. В то же время IL-2 усиливает проницаемость гематоэнцефалического барьера и влияет на структурную целостность эндотелия мозговых сосудов, участвует в процессах ангиогенеза, а также активирует парасимпатический отдел вегетативной нервной системы [4,6]. Он также способен изменять продукцию фосфоинозитола и активировать MAP-киназу.

Цитокиновые препараты находят все более широкое применение в современной врачебной практике. Беталейкин, созданный на основе рекомбинантного IL-1 β человека методами генной инженерии, представляет собой аналог человеческого белка IL-1 β . Терапевтические применения IL-1 следующие: его часто используют как адъювант при вакцинации, в качестве ранозаживляющего вещества, стимулятора гемопоэза и продукции антител. Ронколейкин является полным структурным и функциональным аналогом эндогенного IL-2 человека. Для применения в клинике его выделяют из клеток рекомбинантного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Применяется в медицинской практике как компонент противоопухолевой терапии.

Основными источниками IL-1 β в организме являются макрофаги, моноциты и эндотелиоциты, а также и Т- и В-лимфоциты, а IL-2 секретируется в основном Т(CD4+)-хелперами, т.е. оба цитокина образуются клетками, представленными в значительном количестве в лимфатических сосудах и узлах. Данных о влиянии интерлейкинов на транспортную функцию лимфатических сосудов и узлов мало [5], а они необходимы, поскольку оба препарата являются фармакопейными, входят в группу «Иммуномодуляторы» и достаточно широко применяются в медицинской практике. В связи с этим целью нашей работы было изучение эффектов IL-1 β и IL-2 на сократительную деятельность гладких мышц капсулы брыжеечных лимфатических узлов и раскрытие механизмов их действия на

гладкомышечные клетки.

Материалы и методы исследования

Брыжеечные лимфатические узлы забирали через 15 минут после забоя здоровых бычков черно-пестрой породы в возрасте 18–20 месяцев и в охлажденном до +4 °С физиологическом солевом растворе доставляли в лабораторию. Из лимфатических узлов вырезали полоски капсулы (32 полоски из 17 узлов от 10 животных) размером 15x2x0,2 мм в направлении от ворот узла к приносящим лимфатическим сосудам. Эксперименты проводили при непрерывном протоке в рабочей камере физиологического солевого раствора следующего состава (в мМ): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2; NaH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 15,5; глюкоза – 11,5. Раствор с целью оксигенации и поддержания стабильного pH (7,35–7,40) сатурировали газовой смесью, состоящей из 95 % O₂ и 5 % CO₂. Температуру раствора поддерживали на уровне +37±0,2°C с помощью термостата ВТ-5-1 (Termex). Исходное натяжение полосок капсулы лимфатических узлов соответствовало трансмуральному давлению 5 см водн. ст. Регистрацию сокращений препаратов осуществляли с помощью тензодатчика FORT-10 (WPI), работающего в изометрическом режиме. Тестовые вещества применяли через 30–40 минут после размещения препарата в камере с физиологическим раствором и задания исходного натяжения. Запись данных, поступающих на компьютер через аналого-цифровой преобразователь (MD-155, Pavlov Institute of Physiology RAS), проводили непрерывно на протяжении всего эксперимента.

Растворы, содержащие IL-1β (беталейкин, НИИОЧБП, Санкт-Петербург, РФ) и IL-2 (ронколейкин, ООО «НПК «БИОТЕХ» Санкт-Петербург, РФ) в концентрации – от 2 пг/мл до 200 пг/мл готовили непосредственно перед экспериментами путем растворения необходимого количества указанных веществ в физиологическом растворе. Анакинра (Kineret) производства Swedish Orphan Biovitrum применяли в концентрации 1 мг/мл в качестве антагониста рецепторов интерлейкина-1β. L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, 1,0×10⁻⁴ М/л) применяли в качестве ингибитора эндотелиальной синтазы NO. LY-294002, 1×10⁻⁵ М/л, применяли в качестве ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы, индометацин (ингибитор циклоксигеназы) растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид) в концентрации 10⁻² М/л и перед воздействием разбавляли физиологическим раствором до концентрации 1,0×10⁻⁵ М/л. Последние три вещества были произведены Sigma Aldrich.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы StatSoft STATISTICA 6.1.478. Полученные данные соответствовали условиям нормального распределения и представлены в виде средних значений с их стандартным отклонением (M±SE). Для установления достоверности различий использовали критерий t-Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Спонтанная фазная сократительная активность регистрировалась в 28 полосках капсулы лимфатических узлов. После установления стабильных параметров (тонус, амплитуда и частота фазных сокращений) в камеру вводили физиологический раствор с IL-1 β или IL-2 и на протяжении 30 минут регистрировали сократительную деятельность препаратов. Интерлейкины в концентрациях ниже 2 пг/мл не оказывали статистически значимых эффектов, а в концентрациях выше 200 пг/мл приводили к подавлению фазной сократительной активности полосок. Как правило, эффект IL-1 β и IL-2 начинал проявляться на 4–5 минутах действия. Полностью действие интерлейкинов проявлялось к 10–12 минутам, поэтому в дальнейшем для анализа использовали параметры сокращений, зарегистрированные до воздействия и в интервале 15–20 минуты действия интерлейкинов. Достаточно быстрое проявление эффекта интерлейкинов на узлы позволяет сделать заключение о том, что их действие реализуется через рецепторы на мембране гладкомышечных и эндотелиальных клеток лимфатических узлов.

На рис. 1 представлены усредненные данные, полученные при исследовании эффектов интерлейкинов на полоски капсулы лимфатических узлов. IL-1 β приводил к снижению всех показателей сократительной деятельности полосок капсулы лимфатических узлов. При увеличении концентрации IL-1 β ингибиторный эффект на гладкомышечные клетки возрастал. IL-2 также оказывал тормозное влияние на миоциты капсулы лимфатических узлов, однако его ингибиторный эффект был менее выраженным. Наименьшее влияние IL-2 оказывал на уровень тонического напряжения ГМК.

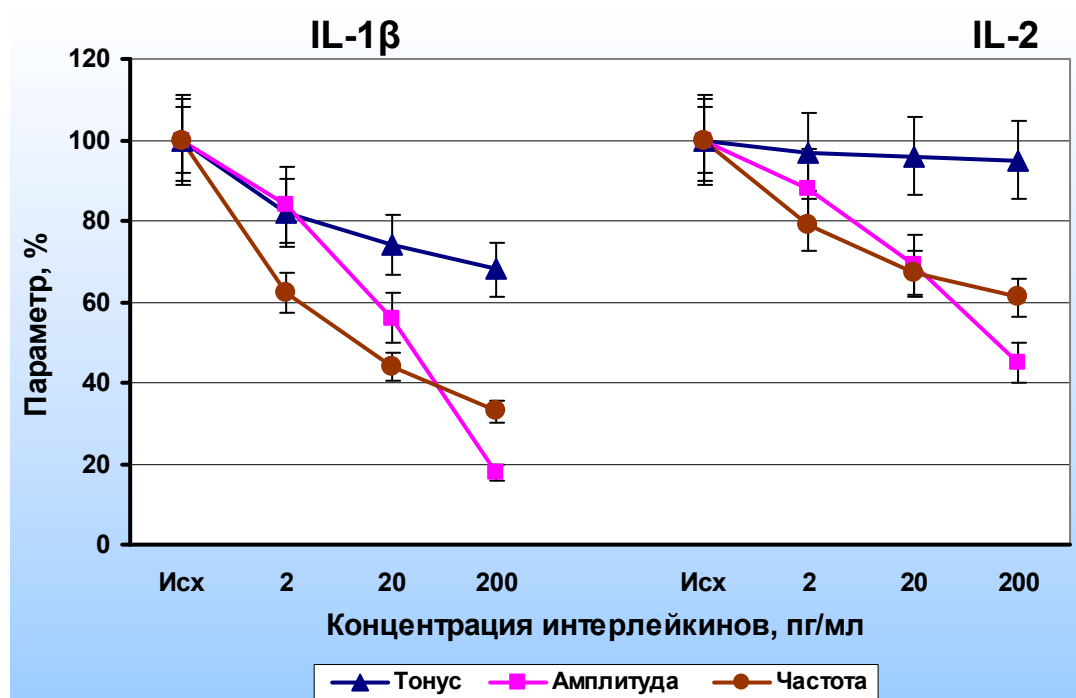


Рис. 1. Эффекты интерлейкина-1 β (IL-1 β) и интерлейкина-2 (IL-2) на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов. По оси абсцисс – концентрации IL-1 β и IL-2, по оси ординат – тонус, амплитуда и частота фазных сокращений (в % от исходных)

Реакции деэндотелизированных полосок капсулы лимфатических узлов на интерлейкины сильно отличались от таковых по сравнению с интактными. IL-1 β в концентрации 200 пг/мл незначительно снижал тонус ГМК, а также частоту и амплитуду фазных сокращений (на $9,2 \pm 1,64$ %, $7,4 \pm 1,58$ %, $11,5 \pm 2,47$ % соответственно). Применение IL-1 β в низких концентрациях сопровождалось статистически недостоверными изменениями параметров сократительной активности ГМК. Действие IL-2 на деэндотелизированные полоски капсулы лимфатических узлов сопровождалось выраженным повышением тонуса ГМК (рис. 3).

Ранее нами было показано, что реакции лимфатических узлов и сосудов на различные эндогенные вещества и фармакологические препараты в существенной степени модулируются эндотелиальными клетками посредством активации продукции ими NO или простациклина [5,2]. Поскольку реакции деэндотелизированных полосок капсулы лимфатических узлов на интерлейкины значительно отличались от реакций препаратов с интактным слоем эндотелиоцитов, представляло определенный интерес исследовать механизмы действия интерлейкинов на лимфатические узлы.

Деэндотелизированные капсулы лимфатических узлов практически не реагировали на введение в раствор IL-1 β . Лишь максимальные концентрации IL-1 β приводили к незначительному снижению тонуса гладкомышечных клеток. Эти данные позволили нам предположить, что ингибиторный эффект IL-1 β в лимфатических узлах реализуется посредством активации продукции эндотелиоцитами вазодилататоров. Тормозный эффект IL-1 β на интактные препараты предотвращался при предварительном добавлении в физиологический раствор антагониста рецепторов интерлейкина-1 β – анакинры. Предварительная блокада эндотелиальной синтазы NO L-NAME приводила к существенному снижению тормозного эффекта IL-1 β . Ингибирование синтеза простациклина индометацином сопровождалась незначительными изменениями реакций ГМК капсулы лимфатических узлов на IL-1 β . с Результаты этой серии экспериментов представлены на рис. 2.

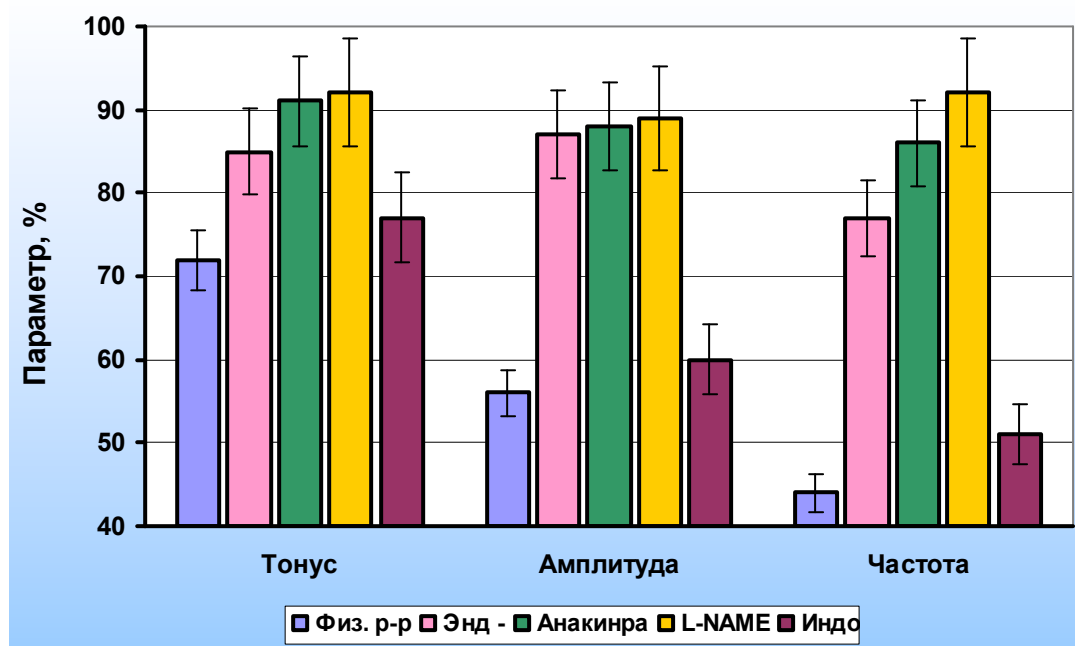


Рис. 2. Эффекты илтерлейкина-1 β (20 нг/мл) на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов: Физ. р-р – в физиологическом растворе, Энд (-) – деэндотелизированные полоски, Анакинра – на фоне действия антагониста рецепторов IL-1 β , L-NAME – на фоне действия ингибитора синтазы NO, Индо – на фоне действия индометацина (в % от исходных)

Полученные данные дали нам основание сделать заключение о механизме ингибиторного эффекта IL-1 β на сократительную активность ГМК лимфатических узлов. IL-1 β связывается преимущественно с рецепторами на мембране эндотелиальных клеток синусов лимфатических узлов. Комплекс IL-1 β -рецептор стимулирует в эндотелиоцитах конститутивную синтазу NO. Увеличение продукции NO сопровождается снижением всех параметров сократительной активности ГМК капсулы лимфатических сосудов. Роль простаноидов в развитии ингибиторного эффекта IL-1 β значительно меньше. На мембране гладкомышечных клеток капсулы лимфатических узлов мало рецепторов к IL-1 β , и они не играют значимой роли в реакции лимфатических узлов на IL-1 β .

IL-2 при действии на деэндотелизированные капсулы лимфатических узлов приводил к выраженному повышению тонуса препаратов, амплитуда фазных сокращений при этом практически не изменялись, а частота – несколько возрастала. Известно, что IL-2 активирует в клетках, как минимум, три внутриклеточных сигнальных пути, в т.ч. стимулирует фосфоинозитидный механизм [7]. С целью оценки возможной роли этого сигнального пути в повышении тонуса гладкомышечных клеток мы провели опыты с его блокированием LY-294002. На фоне блокады фосфоинозитид-3-киназы IL-2 приводил к достоверному снижению тонуса, а также амплитуды и частоты фазных сокращений ГМК интактных капсул

лимфатических узлов и практически не оказывал влияния на амплитуду и частоту фазных сокращений ГМК деэндотелизированных капсул. На фоне блокады эндотелиальной синтазы NO L-NAME IL-2 вызывал меньшее повышение тонического напряжения интактных препаратов по сравнению с деэндотелизированными, в то же время изменения амплитуды и частоты фазных сокращений практически не отличались от соответствующих изменений в деэндотелизированных препаратах. Применение ингибитора циклооксигеназы – индометацина не приводило к достоверным изменениям параметров сократительной активности ГМК интактных капсул лимфатических узлов. Результаты исследования механизма действия IL-2 на капсулу лимфатических узлов представлены на рис. 3.

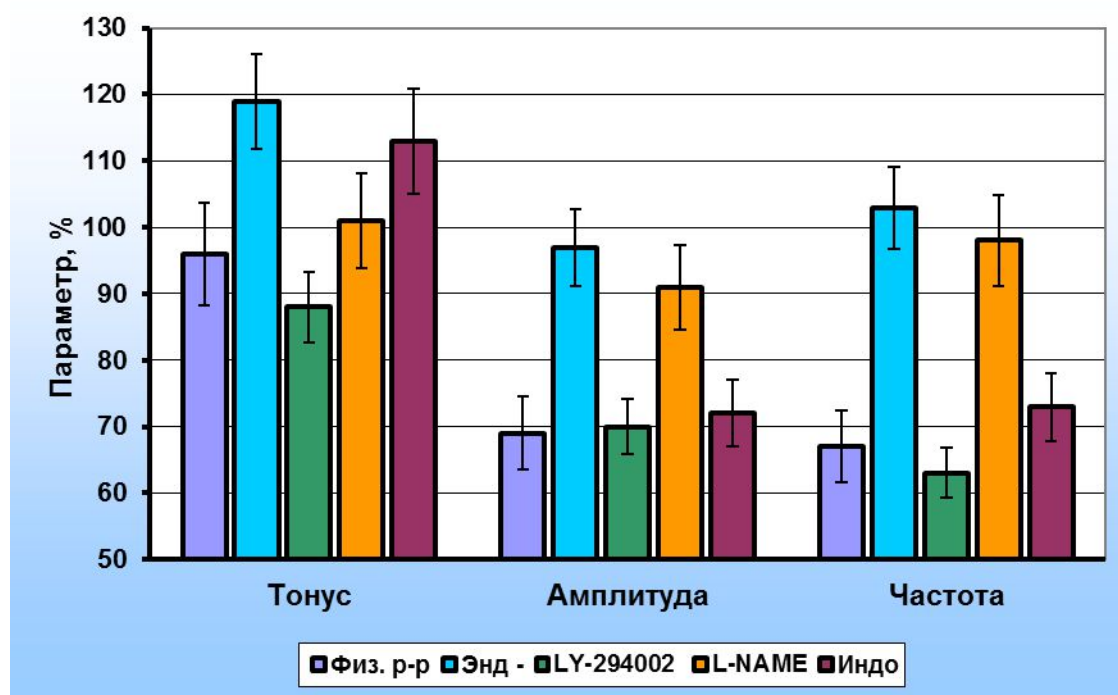


Рис. 3. Эффекты интерлейкина-2 (20 нг/мл) на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов: Физ. р-р – в физиологическом растворе, Энд (-) – деэндотелизированные полоски, LY-294002 – на фоне действия ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы, L-NAME – на фоне действия ингибитора синтазы NO, Индо – на фоне действия индометацина (в % от исходных)

Таким образом, мы приходим к заключению, что механизмы, посредством которых IL-1 β и IL-2 оказывают влияние на транспортную функцию лимфатических узлов, существенно отличаются. Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что эффекты обоих интерлейкинов запускаются через мембранные рецепторы. Эффект IL-1 β является эндотелий-зависимым. После связывания IL-1 β с рецептором в эндотелиальных

клетках увеличивается продукция NO. Действие NO на ГМК лимфатических узлов приводит к снижению амплитуды и частоты фазных сокращений на фоне выраженного снижения тонуса. Механизмы действия IL-2 на лимфатические узлы являются более сложными. Экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что рецепторы к IL-2 имеются как на эндотелиоцитах, так и на ГМК. Комплекс IL-2-рецептор на ГМК запускает в них фосфоинозитидный механизм, что приводит к повышению тонуса миоцитов. В то же время комплекс IL-2-рецептор на эндотелиоцитах стимулирует продукцию NO, который способствует снижению тонуса и уменьшению амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений. В итоге при действии IL-2 амплитуда и частота фазных сокращений лимфатических узлов снижаются при практически неизменном уровне тонуса.

Список литературы

1. Кетлинский С.А., Симбирцев С.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. – СПб.: Гиппократ, 1992. – 256 с.
2. Лобов Г.И., Панькова М.Н. Транспорт лимфы по лимфатическим узлам: механизмы регуляции // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т.98.11. – С. 1350-1361.
3. Мозжерина А.Н., Повещенко О.В., Колесников А.П. и др. Активация лимфоцитов человека препаратом интерлейкин-2 как возможный способ лечения лимфедемы // Вестник лимфологии. – 2008. – № 2. – С.29-30.
4. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.
5. Панькова М.Н., Лобов Г.И. Ингибиторный эффект интерлейкина-1 β на сократительную деятельность гладких мышц капсулы лимфатических узлов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2013. – Т. 12, № 3 (47). – С. 53-56.
6. Christopher S. NG, Andrew C. Novick, Charles S. Tannenbaum. et al. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NF κ B suppression // Urology. – 2002. – Vol. 59. – P.9-14.
7. Kandasamy K.I., Mohan S.S., Raju R., et al. NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways // Genome Biology. 2010 Jan 12;11(1):R3. doi: 10.1186/gb-2010-11-1-r3.
8. Okusawa S., Gelfand J.A., Ikejima T., et al. Interleukin 1 Induces a Shock-like State in Rabbits // Clin. Invest. – 1988. – Vol. 81. – P. 1162-1172.