

УДК 615.37:612.428

**ВЛИЯНИЕ БЕТАЛЕЙКИНА
НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КАПСУЛЫ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ**

М.Н. Панькова, Г.И. Лобов

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
г. Санкт-Петербург

E-mail: mpankova@bk.ru

Панькова Марина Николаевна, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург.

E-mail: mpankova@bk.ru

Область научных интересов: физиология лимфатической системы, физиология гладких мышц

Лобов Геннадий Иванович, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург.

E-mail: gilobov@yandex.ru

Область научных интересов: физиология лимфатической и кровеносной систем, физиология гладких мышц

Определяющая роль IL-1 β (беталейкина) в протекании иммунных процессов в организме и широкое использование его в клинической практике диктуют необходимость исследований, направленных на изучение его эффектов на различные структуры, в особенности на вовлеченные в осуществление иммунологических и воспалительных реакций организма, ключевую роль в реализации которых играют лимфатические узлы. Цель работы: оценить влияние беталейкина на сократительную деятельность гладких мышц капсулы лимфатических узлов и выявить механизмы, лежащие в основе их осуществления. Работа была выполнена на полосках капсулы изолированных брыжеечных лимфатических узлов быка, которые размещали в термостатируемой камере при непрерывном протоке оксигенированного физиологического раствора. Регистрацию сократительной активности препаратов проводили с помощью изометрического датчика силы FORT-10. Установлено, что беталейкин (IL-1 β) оказывает прямое ингибиторное действие на сократительную функцию капсулы лимфатических узлов быка. Релаксационные ответы гладких мышц капсулы лимфатических узлов на действие IL-1 β в

концентрациях от $2,5 \times 10^{-15}$ до $2,5 \times 10^{-10}$ М/л носили дозозависимый характер. Они проявлялись в виде снижения амплитуды и частоты фазной сократительной активности гладких мышц вплоть до полного прекращения спонтанной фазной активности при действии беталейкина в высоких концентрациях. На фоне аспирина ингибиторные эффекты IL-1 β были значительно снижены, тогда как использование ингибитора синтазы NO L-NAME не предотвращало развитие релаксационных ответов, инициированных применением IL-1 β . Таким образом, беталейкин оказывает ингибиторное влияние на сократительную деятельность капсулы лимфатических узлов, в значительно большей степени выраженное в подавлении спонтанной фазной активности гладких мышц. Преимущественно простагландин-опосредованные и NO-независимые механизмы лежат в основе реализации этих эффектов.

Ключевые слова:Капсула лимфатических узлов, гладкая мышца, сократительная активность, беталейкин, интерлейкин 1 β .

Беталейкин, созданный на основе рекомбинантного интерлейкина-1 β (IL-1 β) человека методами генной инженерии, представляет собой аналог человеческого белка IL-1 β . Являясь медиатором острого и хронического воспаления [1], IL-1 участвует не только в специфическом иммунном реагировании, но и является одним из основных медиаторов, ответственных за развитие неспецифических форм защиты. Среди множественных эффектов IL-1 β , связанных с острофазными реакциями при воспалении [2], ряд исследователей отмечает его гипотензивное действие [3]. Тем не менее воздействие IL-1 β на транспортную функцию до настоящего времени остается практически неизученным. Определяющая роль IL-1 β (беталейкина) в протекании иммунных процессов в организме и широкое использование его в клинической практике диктуют необходимость интенсивных исследований, направленных на изучение его эффектов на различные структуры, в особенности на вовлеченные в осуществление иммунологических и

воспалительных реакций организма. Несомненно, ключевую роль в их реализации играют лимфатические узлы.

За последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении функции лимфатических узлов в осуществлении иммунных реакций организма [4]. В то же время вопрос о транспорте лимфы через узел, лежащему в основе реализации всех его физиологических функций, остается практически за пределами внимания исследователей. Обладая некоторыми особенностями [5, 6], во многом сократительная активность гладкомышечных клеток капсулы узла сходна с таковой в стенке лимфатических сосудов и характеризуется наличием спонтанных фазных сокращений [7, 8] и высокой чувствительностью к различным химическим веществам [9]. Многие вещества, выделяющиеся при воспалении, могут в значительной степени влиять на транспорт лимфы через узел, который обеспечивается за счет сократительной деятельности гладких мышц, входящих в состав капсулы лимфатического узла.

Целью данной работы было оценить влияния беталейкина (IL-1 β) на сократительную деятельность гладких мышц капсулы брыжеечных лимфатических узлов быка и выявить механизмы, лежащие в основе их осуществления.

Работа была выполнена на полосках капсулы изолированных брыжеечных лимфатических узлов быка. 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) сатураировали газовой смесью, состоящей из 95 % O₂ и 5 % CO₂. Температуру раствора поддерживали на уровне 37 ± 0,2 °С с помощью термостата ВТ-5-1 (Termex). Регистрацию сокращений гладких мышц капсулы лимфатических узлов осуществляли с помощью тензодатчика FORT-10 (WPI), работающего в изометрическом режиме, при достижении стабильного уровня через 45–50 минут после задания исходного натяжения препаратов. 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-1 β (беталейкин, НИИ ОЧБП) – от 2,5×10⁻¹⁷ до 2,5×10⁻¹⁰ М/л, acetylsalicylic acid (ICN Biomedicals) – 3×10⁻⁶ М/л, noradrenaline hydrochloride (ICN Biomedicals) – 1×10⁻⁵ М/л, N ω -nitro-L-arginine methyl ester – L-NAME (ICN Biomedicals) – 1×10⁻⁵ М/л, готовили непосредственно перед экспериментами путем растворения необходимого количества указанных веществ в физиологическом растворе.

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

В ходе проведенных экспериментов была выявлена минимальная концентрация беталейкина, способная вызывать изменения параметров сократительной активности гладких мышц капсулы лимфатических узлов. Она составила 2,5×10⁻¹⁵ М/л, некоторые незначительные изменения в деятельности препаратов наблюдались и в более низких концентрациях, однако не являлись статистически достоверными. Учитывая, что физиологические и терапевтические дозы беталейкина являются достаточно низкими, максимальная концентрация, использованная в наших экспериментах, была 2,5×10⁻¹⁰ М/л. Во всем диапазоне исследованных концентраций беталейкин вызывал снижение сократительной деятельности капсулы, которое имело дозозависимый характер, увеличиваясь по мере нарастания концентрации препарата.

Гладкие мышцы капсулы лимфатических узлов обладают спонтанной фазной активностью, которая в значительной степени изменялась при действии беталейкина. На рис. 1 представлена оригинальная кривая записи сократительной активности капсулы лимфатического узла при действии беталейкина 2,5×10⁻¹² М/л. Эффекты беталейкина проявлялись главным образом в снижении амплитуды спонтанных фазных сокращений, тогда как изменение их частоты было более переменным показателем, т. к. значительная редукция силы сокращений могла приводить к довольно частым мелким сокращениям, напоминающим фибрилляцию. Существование релаксационных ответов гладких мышц на действие IL-1 β отмечалось в немногочисленных работах других исследователей [10–12], проведенных на изолированных сосудистых пре-

паратах. Однако в этих исследованиях оценивали изменения только тонического компонента, поскольку препараты не обладали фазной активностью.

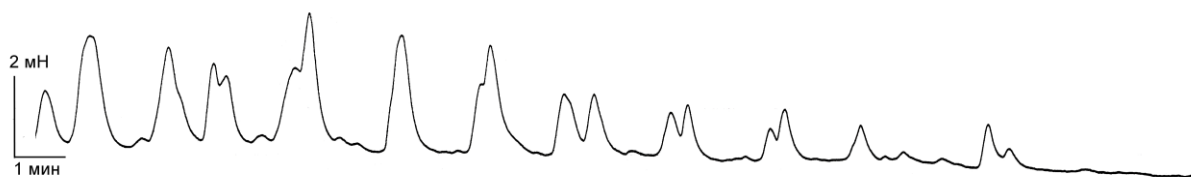


Рис. 1. Оригинальная кривая записи сократительной активности капсулы лимфатических узлов при действии бетаметазона в концентрации $2,5 \times 10^{-12}$ М/л

Выраженное снижение параметров фазной сократительной активности регистрировали к 10-й минуте воздействия бетаметазоном, по мере увеличения длительности воздействия ингибиторные эффекты возрастали, и при использовании высоких концентраций к 30-й минуте воздействия наблюдалось полное прекращение спонтанных фазных сокращений. В дальнейших экспериментах в качестве контрольных точек были использованы измерения, проведенные на 10-й и 20-й минутах воздействия бетаметазоном. Так, применение бетаметазона ($2,5 \times 10^{-12}$ М/л) на 10-й минуте воздействия приводило к снижению амплитуды спонтанных фазных сокращений на 48,9 %, а на 20-й минуте оно составляло уже 71,4 %. Изменения уровня тонического напряжения гладких мышц под влиянием бетаметазона были менее значительными, и для их развития требовалось больше времени. Бетаметазон в концентрации $2,5 \times 10^{-12}$ М/л вызывал снижение тонуса на 14,7 % на 10-й минуте и на 35,6 % на 20-й минуте воздействия. Ингибиторные эффекты $\text{IL-1}\beta$, отмеченные ранее в других работах [13, 14], регистрировали при значительно более длительном воздействии, и могли быть обусловлены вовлечением большего количества механизмов в их реализацию, включая, возможно, изменение биосинтеза белков [13]. В то же время на изолированных кровеносных сосудах [11] было показано наличие быстрых сосудистых цитокин-индуцированных ответов.

Введение активаторов сократительной активности гладкомышечных клеток лимфатических узлов, в частности норадреналина (1×10^{-5} М/л), на фоне отсутствия спонтанных фазных сокращений, вызванного бетаметазоном, приводило к восстановлению сократительной деятельности препаратов. Это свидетельствует о том, что прекращение под влиянием бетаметазона спонтанной фазной активности гладких мышц капсулы не является показателем неспособности гладких мышц к фазным сокращениям.

Известно, что характерным действием IL-1 является индукция COX-2 в некоторых клеточных типах. С целью выявления вовлечения синтеза простагландинов в реализацию эффектов бетаметазона на сократительную деятельность узлов была проведена серия экспериментов при экспозиции в растворе с блокатором циклооксигеназы аспирином. Введение аспирина (3×10^{-6} М/л) осуществляли за 20 минут до начала воздействия бетаметазоном и продолжали в течение всего экспериментального периода. На фоне аспирина ингибиторные эффекты $\text{IL-1}\beta$ были значительно снижены. В литературе есть данные о возможности стимулирующего действия $\text{IL-1}\beta$ на мобилизацию арахидоновой кислоты из клеточных липидов, приводящую к повышению уровня PGI₂, до повышения экспрессии циклооксигеназы и ее активности [15, 16]. Ранее в работе Marceau [11], проведенной с использованием иммунореактивных методов измерения, было установлено, что в сосудистых гладких мышцах увеличение продукции PGE₂ и PGI₂ после стимуляции $\text{IL-1}\beta$ происходит быстро, уже к 15-й минуте достигая значительного прироста, и хотя в дальнейшем наблюдается дальнейшее повышение их концентрации, уже этих значений достаточно для подавления сократительной активности гладкомышечных препаратов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изменения продукции простагландинов определяют ингибиторные ответы гладких мышц узлов на действие бетаметазона.

Важным фактором, опосредующим ингибиторные влияния многих физиологически активных веществ на сократительную деятельность гладких мышц капсулы лимфатических узлов, является оксид азота [9]. Интерлейкин-1 способен стимулировать продукцию NO [17, 18]

путем активации индуцибельной NO синтазы [19–21], но его способность влиять на активность конститутивной NO синтазы и на развитие быстрых релаксационных ответов до настоящего времени не была исследована. Для решения этой задачи был проведен ряд экспериментов с применением ингибитора синтеза NO L-NAME (5×10^{-5} М/л), который начинал поступать в рабочую камеру за 20 минут до введения беталейкина. На его фоне беталейкин ($2,5 \times 10^{-12}$ М/л) к 10-й минуте воздействия приводил к уменьшению амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений на 40,05 и 12,1 % соответственно и снижению тонического напряжения на 8,3 %, что фактически свидетельствует о том, что подавление синтеза конститутивной NOS не способно предотвращать ингибиторные эффекты беталейкина на параметры фазной и тонической активности капсулы (рис. 2). Однако это не исключает возможности интерференции влияний $IL-1\beta$, опосредованных как путем усиления продукции NO, так и путем активации продукции эндотелинов [22]. На настоящем этапе исследований мы можем сделать вывод о том, что этот путь не является определяющим в осуществлении зарегистрированных нами ингибиторных эффектов беталейкина на сократительную активность капсулы лимфатических узлов.

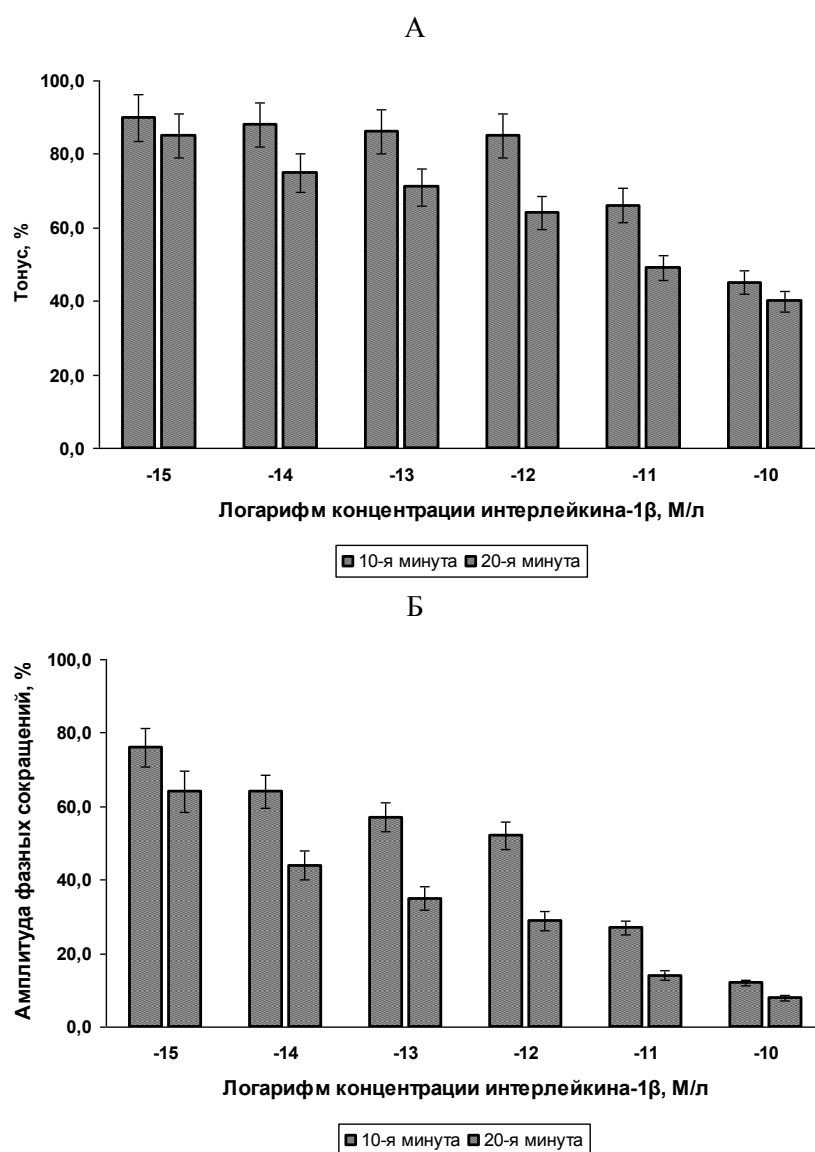


Рис. 2. Действие беталейкина в различных концентрациях на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов: А – изменения тонуса; Б – изменения амплитуды фазных сокращений

Таким образом, на основании проведенного исследования можно прийти к заключению, что беталейкин оказывает ингибиторное влияние на сократительную деятельность капсулы лимфатических узлов, в значительно большей степени выраженное в подавлении спонтанной фазной активности гладких мышц. В основе реализации этих эффектов лежат преимущественно простагландин-опосредованные и NO-независимые механизмы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braquet, P., Paubert-Braquet, M., Bourgain, R.H. et al. PAF/cytokine auto-generated feedback networks in microvascular immune injury: consequences in shock, ischemia and graft rejection // *J. Lipid Mediators*. – 1989. – V. 1. – № 2. – P. 75–112.
2. Dinarello C.A., Cannon J.G., Mier J.W. et al. Multiple Biological Activities of Human Recombinant Interleukin I // *J. Clin. Invest.* – 1986. – V. 77. – P. 1734–1739.
3. Okusawa S., Gelfand J.A., Ikejima T. et al. Interleukin 1 Induces a Shock-like State in Rabbits // *Clin. Invest.* – 1988. – V. 81. – P. 1162–1172.
4. Benahmed F., Ely S., Lu T.T. Lymph node vascular-stromal growth and function as a potential target for controlling immunity // *Clin Immunol.* – 2012. – V. 144. – № 2. – P. 109–116.
5. Лобов Г.И., Панькова М.Н. Транспорт лимфы: роль лимфатических узлов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 2. – № 42. – С. 52–56.
6. Петренко В.М. Структурные основы в структурной организации активного лимфооттока // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – Т. 2. – № 14. – С. 5–12.
7. Мороз В.А. Сократительная активность различных участков лимфатического русла / под ред. А.В. Борисова. Лимфатический сосуд. – Л.: ЛСГ-МИ, 1984. – С. 65–68.
8. Tьmer A. et al. Spontaneous contractions and stretch-evoked responses of isolated lymph nodes // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1983. – V. 4 (1). – P. 103–113.
9. Лобов Г.И., Панькова М.Н. Транспорт лимфы по лимфатическим узлам: механизмы регуляции // *Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова*. – 2012. – Т. 98. – № 11. – С. 1350–1361.
10. Beasley D. Interleukin 1 Inhibits Contraction of Vascular Smooth Muscle / Beasley D., Cohen R A., Levinsky N.G. // *J. Clin. Invest.* – 1989. – V. 83. – P. 331–335.
11. Marceau F. et al. Human interleukin-1 induces a rapid relaxation of the rabbit isolated mesenteric artery // *Br J Pharmacol.* – 1991. – V. 103 (2). – P. 1367–1372.
12. Takizawa S, Ozaki H, Karaki H. Interleukin-1beta-induced, nitric oxide-dependent and -independent inhibition of vascular smooth muscle contraction / *Eur J Pharmacol.* – 1997. – V. 9 (330). – P. 143–150.
13. Beasley D. Interleukin 1 Inhibits Contraction of Vascular Smooth Muscle / Beasley D., Cohen R.A., Levinsky N.G. // *J. Clin. Invest.* – 1989. – V. 83. – P. 331–335.
14. Takizawa S., Ozaki H., Karaki H. Interleukin-1beta-induced, nitric oxide-dependent and independent inhibition of vascular smooth muscle contraction / Takizawa S, Ozaki H, Karaki H. // *Eur J Pharmacol.* – 1997. – V. 9 (330). – P. 143–150.
15. Breviario F. et al. Interleukin-1 stimulates prostacyclin production by cultured human endothelial cells by increasing arachidonic acid mobilization and conversion // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1990. – V. 10. – P. 129–134.
16. Camacho M. Rate of Vasoconstrictor Prostanoids Released by Endothelial Cells Depends on Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin I Synthase Activity / Camacho M., Lypez-Belmonte J., Vila L. // *Circ. Res.* – 1998. – V. 83. – P. 353–365.
17. Busse R., Mьlsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 275 (1–2). – P. 87–90.

18. Wen F. Nitric oxide enhances PGI(2)production by human pulmonary artery smooth muscle cells / Wen F., Watanabe K., Yoshida M. // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. – 2000. – V. 62 (6). – P. 369–378.
19. Hirokawa K. et al. Induction of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells: the role of cyclic AMP // *Br J Pharmacol*. – 1994. – V. 112 (2). – P. 396–402.
20. Jiang B. Persistent Activation of Nuclear Factor- κ B by Interleukin-1 β and Subsequent Inducible NO Synthase Expression Requires Extracellular Signal-Regulated Kinase / Jiang B., Brecher P., Cohen R.A. // *Arterioscl., Thrombosis, Vasc. Biol*. – 2001. – V. 21. – P. 1915–1920.
21. Wakabayashi I. Enhancement of interleukin-1beta-induced iNOS expression in cultured vascular smooth muscle cells of Goto-Kakizaki diabetes rats / I. Wakabayashi, T. Nakano, Y. Takahashi // *Eur J Pharmacol*. – 2010. – V. 10 (629). – P. 1–6.
22. White L.R. Cyclooxygenase inhibitors attenuate endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery / White L.R. et al. // *Eur J Pharmacol*. – 2002. – V. 448 (1). – P. 51–57.

Поступила 10.11.2014.