

ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА РЕАКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Лобанова Е.Г.

Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания, Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Владивосток

Резюме. Изучалась возможность ингибирования синтеза TNF α и IL-8 с помощью лигандов каннабиноидных рецепторов WIN-55,212-2 и анандамида у здоровых доноров и лиц с аллергопатологией. Для установления механизма действия изучаемых веществ использовали селективные антагонисты CB₁-рецептора – SR141716A и CB₂-рецептора – SR144528. Исследование цельной крови позволило изучить биологические свойства WIN-55,212-2 и анандамида в условиях максимально приближенных к *in vivo*. Установлено, что WIN-55,212-2 и анандамид в концентрации 3-10 мкМ способны снижать синтез TNF α и IL-8 индуцированной липополисахаридом клетками крови здоровых доноров и больных с аллергопатологией. Выявлено, что антагонист CB₁-рецептора SR141716A не проявлял рецепторопосредованный эффект к WIN-55,212-2 и анандамиду. В то же время антагонист CB₂-рецептора SR144528 полностью устранял выявленный ингибирующий эффект анандамида и WIN-55,212-2.

Ключевые слова: иммунокомпетентные клетки, TNF α , IL-8, лиганды каннабиноидных рецепторов WIN-55,212-2 и анандамид.

Lobanova E.G.

EFFECTS OF SYNTHETIC CANNABINOID RECEPTOR LIGANDS WIN 55,212-2 AND ANANDAMID UPON *IN VITRO* ACTIVITY OF IMMUNOCOMPETENT CELLS

Abstract. Ability of cannabinoid receptor ligands WIN 55,212-2 and anandamid to inhibit synthesis of TNF α and IL-8 was studied in healthy donors and men with allergic disorders. To establish mechanism of action for investigated substances, the selective antagonists of the CB₁-receptor (SR141716A) and for CB₂-receptor (SR144528) were applied. Studies with whole blood dilutions allowed of approximating *in vivo* conditions when investigating biological properties of WIN-55.212-2 and anandamid. The synthetic cannabinoids WIN-55.212-2 and anandamid at a concentration of 3-10 μ M were capable of reducing synthesis of TNF α and IL-8 in lipopolysaccharide-stimulated blood leukocytes, both from healthy donors and subjects with allergic disorders. It was revealed that the antagonist of CB₁-receptor (SR141716A) did not exert a receptor-mediated effect for WIN-55.212-2 and anandamid. Meanwhile, a CB₂-receptor antagonist (SR144528) entirely eliminated completely the blocking effect of anandamid and WIN-55.212-2. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 2-3, pp 261-264)

Введение

Цитокины вырабатываются иммунокомпетентными клетками (ИКК) при развитии воспалительных процессов в организме. Одним из первых при воспалительной реакции синтезируется фактор некроза опухоли (TNF α) [3]. Интерлейкин-8 (IL-8)

также играет важную роль в воспалении: этот цитокин усиливает хемотаксис нейтрофилов, способствует выделению гистамина из базофилов [3]. Действие провоспалительных цитокинов направлено на уничтожение повреждающего агента и на ликвидацию последствий его повреждения. Однако в ряде случаев, когда в силу разных причин защитные механизмы неразвиты или произошел их сбой, течение воспалительной реакции становится бурным, неуправляемым, что может привести к серьезным, а в ряде случаев и к необратимым повреждениям тканей, нарушению функций

Адрес для переписки:

Лобанова Елена Григорьевна,
690105, г. Владивосток 105, ул. Русская, д. 73г.
Тел./факс: (4232) 345-502.
E-mail: isachenko1@yandex.ru

организма. При этом зачастую создается основа для возникновения хронического воспалительного процесса. В связи с этим имеется существенная необходимость изучения веществ, которые могли бы регулировать воспаление, ограничивать его развитие, останавливать на стадии физиологической защиты, препятствуя бурному развитию, выраженному повреждению тканей и хронизации процесса. В целом ряде патологических состояний задача снижения провоспалительного ответа, в том числе и уменьшения синтеза цитокинов, приобретает важное значение.

Эндоканнабиноидная система способна регулировать иммунный ответ в организме. В ряде исследований *in vitro* и *in vivo* было показано, что лиганды каннабиноидных рецепторов проявляют противовоспалительный эффект, модулируя иммунный ответ [4, 5].

В настоящее время наиболее изученным представителем каннабиноидной группы является агонист каннабиноидных рецепторов – анандамид. В 1990 г. был открыт новый лиганд каннабиноидных рецепторов – WIN-55,212-2, который экспрессирован преимущественно на ИКК [5, 7, 8]. Наличие каннабиноидных рецепторов на ИКК свидетельствует о том, что каннабиноиды являются внешними лигандами внутренней программы дифференцировки иммунных клеток в процессе реализации ими биологических эффектов [2, 4, 6, 9]. До сих пор не установлено, какова степень участия каннабиноидных рецепторов ИКК при влиянии различных концентраций синтетических лигандов каннабиноидов.

Целью нашего исследования было установление механизма регуляции лигандами каннабиноидных рецепторов WIN-55,212-2 и анандамида выработки TNF α и IL-8 иммунокомпетентными клетками в условиях повышенной экспрессии провоспалительных цитокинов.

Материалы и методы

Изучали два агониста каннабиноидных рецепторов в различных дозах (0,1; 1,0; 3,0 и 10,0 мкМ): WIN-55,212-2 (R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl] pyrrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-yl]-(1-naphthalenyl) methadone mesylate; анандамид (N-арахидоноилэтаноламид; arachidonic acid N-(hydroxyethyl)amide), который является производной арахидоновой кислоты.

Использовали селективные антагонисты CB₁-рецептора – SR141716A (N-[piperidin-1-yl]-1-[1,2-dichlorophenyl]-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamid HCl) и CB₂-рецептора – SR144528 (N-(1S)-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2,2,1]hepta-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazole-3-carboxamide) в дозе 100,0 мкМ. Изучаемые каннабиноиды фирмы SIGMA-RBI (St. Louis, MO, USA).

Обследовано 12 больных (5 мужчин, 7 женщин) в возрасте от 26 до 45 лет, из них 33% с диагнозом atopическая бронхиальная астма (БА), с наследственной отягощенностью по аллергическим заболеваниям, положительными кожными скарификационными пробами. Диагноз БА устанавливали в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечению БА (Global Initiative of Asthma – GINA, 2006). Больные с БА имели легкую степень тяжести, контролируемое течение. Внелегочные аллергические синдромы отмечены у 67% обследуемых, в виде аллергического ринита – у четырех, риноконъюнктивита – у двух, сочетание аллергического ринита и аллергодерматоза – у двух пациентов. У всех больных была выявлена сенсibilизация к домашней пыли и пыльце растений, во всех случаях она была поливалентная. Все больные на момент обследования находились в стадии ремиссии в течение 1-2 месяцев. Диагноз и степень тяжести были подтверждены врачом аллергологом-иммунологом на основании клинических, лабораторных и инструментальных исследований.

Контрольную группу составили 12 человек (2 мужчин, 10 женщин) в возрасте от 24 до 38 лет, без наследственной отягощенности по аллергопатологии с отрицательными скарификационными кожными пробами, уровень провоспалительных цитокинов не превышал значения нормы.

Эксперименты по изучению влияния лигандов каннабиноидных рецепторов WIN-55,212-2 и анандамида на уровень продукции TNF α и IL-8, а также установление механизмов его регуляции осуществляли *in vitro* с использованием цельной крови. Клетки крови индуцировали липополисахаридом (ЛПС) Escherichia coli (Sigma, MO, USA; серотип 055:B5) в дозе 10 мкг/мл. Определяли спонтанный и индуцированный ЛПС-уровень продукции цитокинов TNF α и IL-8 ИКК с помощью иммуноферментного анализа (Genzyme diagnostics, Cambridge, MA, USA, DuoSet system) [1].

Статистическую обработку результатов проводили в программе «Statistica 6.0» для Windows 98. Вероятность различий показателей средних в группах определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование спонтанного уровня продукции цитокинов показало, что WIN-55,212-2 в дозах 0,1; 1,0; 3,0 и 10 мкМ не оказывал воздействия на синтез TNF α и IL-8 у здоровых лиц (табл. 1). В группе больных с аллергопатологией WIN-55,212-2 в малых дозах (0,1 и 1,0 мкМ) также не оказывал достоверного влияния на уровень продукции TNF α и IL-8. В дозе 3,0 мкМ выявлена тенденция к ингибированию синтеза TNF α и снижению уровня продукции IL-8

на 21% ($p < 0,01$). Максимальное уменьшение выработки цитокинов ИКК обнаружено при воздействии WIN-55,212-2 в концентрации 10 мкМ – уровень продукции TNF α и IL-8 снизился ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно). В индуцированных ЛПС-клетках здоровых лиц при добавлении низких доз WIN-55,212-2 (0,1 и 1,0 мкМ) уровень продукции TNF α и IL-8 не изменялся (табл. 1). Под воздействием WIN-55,212-2 в дозе 3,0 мкМ наблюдалось ингибирование продукции уровня TNF α на 33% и IL-8 на 21%, а в дозе 10,0 мкМ – на 63% и 40% соответственно. У больных с аллергопатологией, так же как и у здоровых лиц, малые дозы каннабиноида не влияли на выработку цитокинов. В дозе 3,0 мкМ эффект от применения WIN-55,212-2 проявлялся снижением уровня продукции TNF α на 30% ($p < 0,01$), IL-8 – на 17% ($p < 0,01$). При воздействии WIN-55,212-2 в дозе 10 мкМ уровень продукции TNF α снизился на 43% ($p < 0,001$). Сравнивая действие WIN-55,212-2 на выработку ИКК продукции TNF α , IL-8 у здоровых людей и лиц с аллергопатологией, можно отметить, что в обеих группах наблюдался ингибирующий эффект. При этом влияние WIN-55,212-2 более выражено у лиц с аллергическими заболеваниями: в дозе 10,0 мкМ в группе с аллергопатологией уровень продукции TNF α снижался в 3,5 раза, а в группе контроля – в 2,7 раза. Продукция IL-8 в обеих группах при влиянии WIN-55,212-2 в дозах 1,0-3,0 мкМ снизилась в 1,2 раза, а в дозе 10,0 мкМ – в 1,7 раза. Влияние WIN-55,212-2 в индуцированной ЛПС крови не было связано с наличием аллергического процесса, а зависело от уровня продукции цитокинов.

Анандамид в малых дозах (0,1 и 1,0 мкМ) не оказывал воздействия на синтез спонтанного уровня продукции TNF α и IL-8 у здоровых лиц. В дозах 3,0 и 10 мкМ выявлена тенденция к снижению выработки цитокинов под воздействием анандамида (табл. 2). У больных с аллергопатологией при воздействии анандамида в дозах 0,1 и 1,0 мкМ на ИКК

уровень спонтанной продукции цитокинов TNF α и IL-8 не изменилась. При использовании анандамида в дозе 3,0 мкМ наблюдалась тенденция к снижению уровня продукции TNF α , а продукция IL-8 ИКК снижалась на 15% ($p < 0,05$). Анандамид в дозе 10,0 мкМ на спонтанный уровень продукции цитокинов уменьшал синтез TNF α на 25% ($p < 0,01$), а IL-8 – на 43% ($p < 0,001$). Сравнительный анализ влияния обоих каннабиноидов (WIN-55,212-2 и анандамида) показал одностороннее ингибирующее действие на спонтанный уровень продукции цитокинов ИКК в группах наблюдения. В индуцированных ЛПС-клетках крови здоровых лиц влияние анандамида в дозах 0,1 и 1,0 мкМ на уровень продукции TNF α и IL-8 не выявлено (табл. 2). Действие анандамида в концентрации 3,0 мкМ на ИКК здоровых лиц проявлялось в ингибирующем эффекте: индуцированный уровень TNF α снизился на 26% ($p < 0,01$), IL-8 – на 24% ($p < 0,01$). В дозе 10,0 мкМ выявлено снижение индуцированного уровня TNF α на 49% ($p < 0,001$), IL-8 – на 56% ($p < 0,001$). В группе с аллергопатологией также не выявлено влияние анандамида в малых дозах на индуцированный уровень цитокинов. В дозе 3,0 мкМ наблюдалось снижение уровня продукции TNF α на 30% ($p < 0,01$) и IL-8 – на 27% ($p < 0,01$). Наибольшее ингибирующее воздействие анандамида на синтез цитокинов в индуцированной ЛПС крови больных с аллергопатологией в дозе 10,0 мкМ – зафиксировано снижение уровня продукции TNF α на 62% и IL-8 – на 66% ($p < 0,001$). Исследование действия анандамида на ИКК на индуцированный уровень цитокинов здоровых лиц и больных с аллергопатологией показало, что максимальный эффект анандамида наблюдается в дозе 10,0 мкМ. В контрольной группе снижение уровня продукции TNF α произошло в 1,9 раза, в группе больных с аллергопатологией – в 2,6 раза. Проявлялось аналогичное действие анандамида и на индуцированный уровень IL-8 у здоровых и больных. Выявлено снижение

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ WIN 55,212-2 НА ВЫРАБОТКУ TNF α И IL-8 В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ С АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ

Доза WIN – 55,212-2, мкМ		Здоровые лица		Больные с аллергопатологией	
		Уровень цитокинов, пг/мл			
		TNF α	IL-8	TNF α	IL-8
ЛПС (-)	0	80 \pm 14	115 \pm 18	541 \pm 29	382 \pm 29
	0,1	82 \pm 22	112 \pm 11	534 \pm 18	379 \pm 18
	1,0	76 \pm 31	101 \pm 11	504 \pm 24	373 \pm 24
	3,0	78 \pm 19	103 \pm 12	441 \pm 28	318 \pm 28*
	10,0	72 \pm 16	100 \pm 15	324 \pm 12**	232 \pm 12***
ЛПС (+)	0	1600,0 \pm 28,3	980,0 \pm 12,6	1518,0 \pm 18,4	382,0 \pm 29,1
	0,1	1549,0 \pm 8,6	968,0 \pm 15,2	1480,0 \pm 12,0	379,0 \pm 18,1
	1,0	1416,0 \pm 11,0	897,0 \pm 25,0	1300,0 \pm 22,1	373,0 \pm 24,1
	3,0	1070,0 \pm 21,1***	774,0 \pm 22,1**	1053,0 \pm 14,4**	318,0 \pm 28,2*
	10,0	592,0 \pm 9,2***	588,0 \pm 16,4***	428,0 \pm 7,1***	232,0 \pm 12,1***

Примечания: * – достоверно в сравнении с синтезом цитокина без влияния каннабиноида $p < 0,05$;

** – достоверно в сравнении с синтезом цитокина без влияния каннабиноида $p < 0,01$;

*** – достоверно в сравнении с синтезом цитокина без влияния каннабиноида $p < 0,001$.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ АНАДАМИДА НА ВЫРАБОТКУ TNF α И IL-8 В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ С АЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ

Доза анандамида, мкМ		Здоровые лица		Больные с аллергопатологией	
		Уровень цитокинов, пг/мл			
		TNF α	IL-8	TNF α	IL-8
ЛПС (-)	0	80 \pm 14	115 \pm 18	541 \pm 29	382 \pm 29
	0,1	80 \pm 8	114 \pm 8	532 \pm 16	378 \pm 27
	1,0	79 \pm 7	108 \pm 9	499 \pm 8	364 \pm 21
	3,0	76 \pm 12	96 \pm 19	457 \pm 22*	307 \pm 25*
	10,0	67 \pm 23	82 \pm 14	409 \pm 12**	217 \pm 11***
ЛПС (+)	0	1600,0 \pm 28,3	980,0 \pm 12,6	1518,0 \pm 18,4	382,0 \pm 29
	0,1	1564,0 \pm 12,7	962,0 \pm 12,4	1472,0 \pm 10,7	377,0 \pm 27
	1,0	1431,0 \pm 28,5	880,0 \pm 18,2	1326,0 \pm 20,2	380,0 \pm 21
	3,0	1177,0 \pm 32,0**	743,0 \pm 15,1**	1055,0 \pm 18,2**	324,0 \pm 25*
	10,0	805,0 \pm 16,4***	426,0 \pm 18,5***	568,0 \pm 6,4***	217,0 \pm 11***

Примечания: * – достоверно в сравнении с синтезом цитокина без влияния каннабиноида $p < 0,05$;

** – достоверно в сравнении с синтезом цитокина без влияния каннабиноида $p < 0,01$;

*** – достоверно в сравнении с синтезом цитокина без влияния каннабиноида $p < 0,001$.

уровня продукции IL-8 в контрольной группе в 2,3 раза, в группе с аллергопатологией – в 2,9 раза.

Провоспалительный эффект каннабиноидов может быть опосредован через их взаимодействия с эндоканнабиноидными рецепторами типа CB₁ и CB₂. Для установления механизма провоспалительного действия изучаемых веществ была проведена активация каннабиноидных рецепторов *in vitro*. Действие селективных антагонистов CB₁-рецептора SR141716A и CB₂-рецептора SR144528 показало, что антагонист CB₁-рецептора SR141716A не проявлял рецепторопосредованный эффект к WIN-55,212-2 и анандамиду. В то же время антагонист CB₂-рецептора SR144528 полностью устранял выявленный ингибирующий эффект анандамида и WIN-55,212-2. Следовательно, провоспалительный эффект анандамида и WIN-55,212-2 связан с активацией CB₂-рецепторов.

Таким образом, исследование механизмов регуляции веществ каннабиноидной природы показало, что лиганды каннабиноидных рецепторов WIN-55,212-2 и анандамид оказывают однонаправленный дозозависимый эффект на синтез цитокинов в цельной крови человека. Действие изучаемых каннабиноидов зависит от исходного уровня вырабатываемых цитокинов, что обусловлено общим механизмом регуляции реактивности ИКК через рецепторы CB₂-типа. Максимальное ингибирующее воздействие лигандов каннабиноидных рецепторов на выработку цитокинов иммунокомпетентными клетками установлено в дозе 10 мкМ. Полученные знания об ингибирующем действии синтетических каннабиноидов WIN-55,212-2 и анандамида на рецепторы второго типа, их дозозависимых эффектах могут быть использованы при разработке фармакологических препаратов направленных на регуляцию воспаления.

Список литературы

- Исаченко Е. Г. Способ оценки резервных возможностей иммунокомпетентных клеток для прогноза развития аллергопатологий // Аллергология. – 2006. – № 2. – С. 44-47.
- Исаченко Е.Г. Перспективные применения веществ группы каннабиноидов в медицине // Клиническая фармакология и терапия. – 2007. – № 2. – С. 69-73.
- Медуницин Н.В. Цитокины и аллергия // Иммунология. – 1999. – №5. – С. 5-9.
- Чурюканов М.В., Чурюканов В.В. Функциональная организация и терапевтический потенциал эндогенной каннабиноидной системы // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – № 2. – С. 70-78.
- Berdyshev E.V. Cannabinoid receptors and the regulation of the immune response // Chem. Phys. Lipids. – 2000. – N 108. – P. 169-190.
- Bueb J.L., Lambert D.M., Tschirhart E.J. Receptor-independent effects of natural cannabinoids in rat peritoneal mast cells *in vitro* // J. Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – N 1538. – P. 252-259.
- Hillard C.J., Jarrhian A. The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes // Chem. Phys. Lipids. – 2000. – N 108. – P. 123-134.
- Pertwee R.G. Pharmacological actions of cannabinoids. In: Cannabinoids // J. Handbook of Experimental Pharmacology. – 2005. – N 168. – P. 1-51.
- Rodriguez de Fonseca F., Del Arco I., Bermudez-Silva F.J., Bilbao A., Cippitelli A., Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology // J. Alcohol. – 2005. – N 40. – P. 2-14.

поступила в редакцию 05.11.2008

отправлена на доработку 25.11.2008

принята к печати 03.12.2008