

# РОЛЬ ЭНДОКАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Лобанова Е.Г.

Владивостокский филиал Учреждения РАМН Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток

**Резюме.** Изучена экспрессия эндоканнабиноидных рецепторов (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>) на иммунокомпетентных клетках при стимуляции иммунной системы *in vivo*. Для стимуляции иммунной системы использовали интракорпоральное облучение крови и обогащение крови озоно-кислородной смесью. Установлено, что в норме содержание мононуклеарных лейкоцитов (МЛ), экспрессирующих на своей поверхности дифференцирующий антиген к рецептору CB<sub>2</sub>, составило более 90%. Мононуклеарных лейкоцитов, имеющих дифференцирующий антиген к рецептору CB<sub>1</sub>, не выявлено. Стимуляция иммунной системы *in vivo* приводит к подавлению экспрессии эндоканнабиноидного CB<sub>2</sub>-рецептора на поверхности МЛ, что является прямым доказательством участия эндоканнабиноидной системы в регуляции иммунного ответа.

**Ключевые слова:** мононуклеарные лейкоциты, эндоканнабиноидные рецепторы CB<sub>1</sub> и CB<sub>2</sub>, иммунный ответ.

Lobanova E.G.

## ROLE OF ENDOCANNABINOID RECEPTORS IN IMMUNE RESPONSE REGULATION

**Abstract.** Expression of endocannabinoid receptors (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>) in immunocompetent cells was studied under the conditions of *in vivo* stimulation of immune system. Intracorporeal blood irradiation and enrichment of peripheral blood by ozone/oxygen mixture were used to stimulate immune system. It was revealed that normal amounts of mononuclear leukocytes (MLs) expressing a differentiating surface antigen for CB<sub>2</sub> receptor exceeded 90%. We have not detected MLs with a differentiating antigen to CB<sub>1</sub> receptor. *In vivo* stimulation of immune system caused a suppressed endocannabinoid CB<sub>2</sub> receptor expression on ML surface. The data provide a direct proof for involvement of endocannabinoid system in immune response regulation. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 3, pp 189-194)

**Keywords:** mononuclear leukocytes, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> endocannabinoid receptors, immune response.

## Введение

В последние годы достигнут большой прогресс в изучении физиологической роли и механизмов функционирования в организме эндоканнабиноидной системы (ЭКС) [9, 10]. Эндоканнабиноидная система является эндогенной сигнальной системой, принимающей участие в поддержании энергетического, метаболического, иммунного баланса организма. Эндоканнабиноидная система включает в себя G-протеин (удвоенный), каннабиноидные рецепторы 1 и 2 типов, эндоканна-

биноиды и ферменты, ответственные за их синтез и разрушение [15, 17]. Показано, что рецепторы 1 типа (CB<sub>1</sub>) преимущественно экспрессируют в области головного и спинного мозга, отвечают за двигательные и когнитивные функции, развитие положительных эмоциональных реакций, температуру тела, сон и бодрствование и т.д. Каннабиноидные рецепторы 2 типа (CB<sub>2</sub>) локализируются главным образом в клетках иммунной системы, в связи с чем предполагается их участие в регуляции иммунных реакций [10, 12].

В настоящее время известно, что эндоканнабиноиды способны регулировать различные физиологические процессы: поддержание тонуса гладкой мускулатуры сосудов и половых органов, агрегацию и адгезию тромбоцитов, свертываемость крови, высвобождение биологически

### Адрес для переписки:

Лобанова Елена Григорьевна  
690105, г. Владивосток – 105, ул. Русская, 73г.  
Тел./факс: (4232) 34-55-02.  
E-mail: isachenko1@yandex.ru

активных веществ – медиаторов воспаления – цитокинов, эйкозаноидов, CO, NO и т.д. Эндоканнабиноиды участвуют в иммунном ответе: определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность иммунного ответа [13, 14].

В исследованиях, проведенных в Научно-исследовательском институте медицинской климатологии и восстановительного лечения СО РАМН (НИИ МКВЛ СО РАМН), установлена роль лигандов каннабиноидных рецепторов в регуляции иммунного ответа. Показано *in vitro*, что синтетические лиганды каннабиноидных рецепторов – WIN-55,212-2 и анандамид проявляют дозозависимое иммуносупрессорное действие на клетки иммунной системы через подавление экспрессии провоспалительных цитокинов [4]. В литературе встречаются сведения о том, что агонисты каннабиноидных рецепторов способны подавлять выработку медиаторов воспаления, взаимодействуя с СВ<sub>2</sub>-рецепторами или блокируя их экспрессию [16]. Однако до конца не определена роль СВ<sub>2</sub>-рецепторов в регуляции иммунного ответа, данный вопрос остается открытым до сих пор.

**Цель исследования:** изучить экспрессию эндоканнабиноидных рецепторов (СВ<sub>1</sub>, СВ<sub>2</sub>) на иммунокомпетентных клетках при стимуляции иммунной системы *in vivo*.

## Материалы и методы

Работу проводили на базе лаборатории биомедицинских исследований (руководитель – профессор, д.б.н. Т.П. Новгородцева) НИИ МКВЛ СО РАМН. Исследование было одобрено этическим комитетом, все добровольцы подписали форму добровольного информированного согласия.

В исследовании принимали участие 28 здоровых добровольцев в возрасте 23-55 лет (32,2±8,2 лет) (из них 9 мужчин [32%] и 19 женщин [68%]).

Гематологические параметры периферической крови определяли на анализаторе Абакус (Австрия). Фенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили с помощью моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, CD25, HLA-DR (Беларусь). Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по методу Д.Н. Маянского и соавт [7]. Для оценки кислородзависимых механизмов бактерицидности нейтрофилов использовали тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), определяли НСТ-спонтанный, НСТ резерв, индекс активации нейтрофилов (ИАН) и резерв индекса активации нейтрофилов по методу Park в модификации У.В. Шмелева. Уровень провос-

палительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-8) определяли иммуноферментным методом (тест-система фирмы INVITROGEN, Бельгия).

Для стимуляции иммунной системы проводили нагрузочные тесты *in vivo*. В качестве нагрузочного теста *in vivo* применяли два метода иммуностимуляции: интракорпоральное облучение крови и внутривенное введение озонированного физиологического раствора. Интракорпоральное облучение крови проводили путем введения одноразового стерильного катетера через пункционную иглу непосредственно в кровеносное русло. Облучение крови проводили однократно с помощью аппарата «Иволга – ОМС-01», использовали спектральный диапазон 650-2000 нм с экспозицией 20 мин. Озонирование физиологического раствора осуществляли на аппарате «Медозон». Раствор в количестве 200 мл предварительно озонировали, пропуская через него озono-кислородную смесь до достижения концентрации озона в жидкости – 6 мкг/мл, после чего вводили внутривенно капельно.

В зависимости от метода стимуляции были сформированы две группы. В первую группы вошли лица, получавшие световую иммуностимуляцию: 15 человек (из них 6 мужчин и 9 женщин). Лица, получавшие озонотерапию, составили вторую группу: 13 человек (из них 3 мужчин и 10 женщин).

Забор периферической крови проводили дважды до облучения крови или введения озono-кислородной смеси и через три часа после процедур. Ранее было показано [3], что при стимуляции *in vivo* увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в крови наступает через 3 часа. Кровь отбирали из локтевой вены в стерильные силиконизированные пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА – 0,1М 0,02 мл/мл крови; «Venoject»). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего 0,83% раствора NH<sub>4</sub>CL [5]. Цельную кровь разбавляли 1:10 лизирующим раствором, тщательно перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Взвесь клеток осаждали центрифугированием при 600 g и температуре 20 °С. Клетки дважды отмывали средой 199. Отмытые клетки разводили средой RPMI-1640 (Sigma, США) до рабочей концентрации 1 × 10<sup>5</sup> кл/мл. Определение экспрессии поверхностных маркеров эндоканнабиноидных рецепторов проводили при помощи соответствующих антител (Santa Cruz Biotechnology, США), результаты учитывали методом проточной цитофлуорометрии на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). На мононуклеарных лейкоцитах (МЛ) исследовали уровень эндоканнабиноидных ре-

цепторов (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10 000 клеток в гейте. Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WinMDI 2,8.

## Результаты и обсуждение

Для выявления иммуностимулирующих свойств физических методов была проведена оценка иммунологических и гематологических параметров периферической крови у здоровых доноров до и после воздействия интракорпоральным облучением крови и внутривенным введением озонированного физиологического раствора. Выявлено повышение уровня провоспалительных цитокинов, количества клеток белой крови и фагоцитирующих нейтрофилов (табл. 1). Следовательно, общая направленность изменений иммунологических показателей характеризовалась повышением эффективности защитных реакций.

Проведенный цитометрический анализ мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров показал, что процентное содержание клеток, экспрессирующих на своей поверхности дифференцирующий антиген к рецептору CB<sub>2</sub>, составило более 90% от всех исследуемых клеток (рис. 1). Число МЛ, имеющих дифференцирующий антиген к рецептору CB<sub>1</sub>, не выявлено (рис. 1). Данный факт подтверждают литературные данные о том,

что эндоканнабиноидный рецептор CB<sub>2</sub> экспрессируется на поверхность МЛ, а эндоканнабиноидный рецептор CB<sub>1</sub> – нет [12]. Следовательно, наличие эндоканнабиноидных CB<sub>2</sub>-рецепторов на МЛ является маркером лейкоцитарного пула клеток.

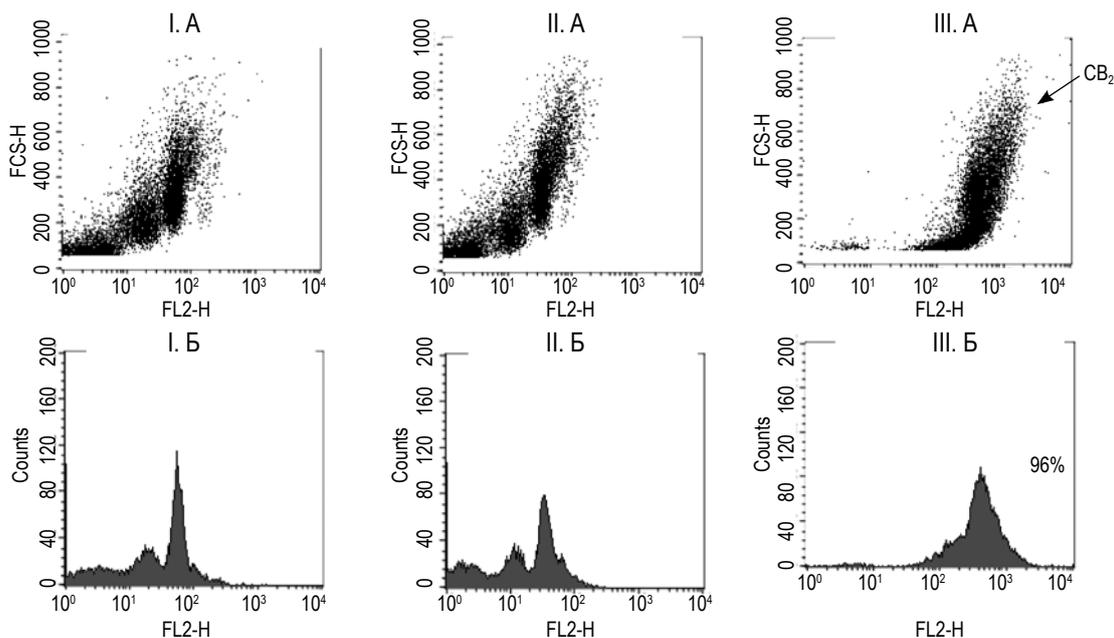
Ранее нами выявлено, что синтетические лиганды каннабиноидных рецепторов (WIN55,212-2 и анандамид) модулируют сигнальную функцию клеток иммунной системы через эндоканнабиноидный рецептор CB<sub>2</sub>, подавляющий выработку провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-8, TNF $\alpha$ ) [4, 11]. Возможно, что интенсивность иммунного ответа опосредована через активность экспрессии эндоканнабиноидного рецептора CB<sub>2</sub>. Отсутствие данных об особенностях выработки CB<sub>2</sub>-рецептора при различных состояниях иммунного ответа побудила нас изучить активность экспрессии CB<sub>2</sub>-рецептора на иммунокомпетентных клетках в норме и при стимуляции иммунной системы нагрузочными тестами *in vivo* физическими методами.

Из совокупности современных методов, стимулирующих иммунный ответ, было выбрано два физических метода: интракорпоральное облучение крови и обогащение крови озono-кислородной смесью. По данным литературы [6, 8] и ранним исследованиям НИИ МКВЛ СО РАМН [1], оба метода влияют на изменение секреции цитокинов, активность клеток эндотелия микрососудов, сосудистых макрофагов, внутрисосудистых

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ДО И ПОСЛЕ СТИМУЛЯЦИИ

Параметры	До воздействия физических методов	После воздействия физических методов	
		Интракорпоральное облучение крови	Внутривенное воздействие озono-кислородной смеси
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,0 $\pm$ 0,28	7,1 $\pm$ 0,36	6,6 $\pm$ 0,18
Лимфоциты, %	27,5 $\pm$ 1,34	29,5 $\pm$ 1,58***	28,5 $\pm$ 1,04**
CD3, %	45,0 $\pm$ 4,9	49,77 $\pm$ 1,57*	46,81 $\pm$ 1,2
CD4, %	40,0 $\pm$ 3,13	44,08 $\pm$ 1,89	42 $\pm$ 1,11
CD8, %	22 $\pm$ 1,21	20,82 $\pm$ 1,07	20,0 $\pm$ 1,81
CD4/CD8, у.е.	1,8 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,05	2,1 $\pm$ 0,01
CD22, %	24,85 $\pm$ 1,3	26,5 $\pm$ 1,47	25,45 $\pm$ 2,3
CD16, %	17,5 $\pm$ 1,06	19,28 $\pm$ 1,26	18,9 $\pm$ 2,12
CD25, %	9 $\pm$ 0,8	12,55 $\pm$ 1,05***	11,04 $\pm$ 0,08**
HLA-DR, %	11,2 $\pm$ 0,5	13,18 $\pm$ 0,65**	12,2 $\pm$ 0,15*
Фагоцитоз, %	60,2 $\pm$ 1,41	88,5 $\pm$ 1,46***	78,2 $\pm$ 1,81***
ФР, у.е.	1,04 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,03***	1,22 $\pm$ 0,02***
TNF $\alpha$ , пг/мл	23 $\pm$ 1,6	64,2 $\pm$ 8,1***	43 $\pm$ 4,6***
IL-8, пг/мл	115 $\pm$ 12,6	218 $\pm$ 22,8***	188 $\pm$ 32,4***

**Примечание.** Достоверность в сравнении с группой до воздействия физических методов; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .



**Рисунок 1. Цитофлуориметрическое определение эндоканнабиноидных рецепторов до стимуляции**

**Примечание.** А – гистограмма МЛ; Б – распределение МЛ по популяциям; I. Анализ проводился без использования гейтирования по рецепторам (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>); II. Анализ проводился с использованием гейтирования по CB<sub>1</sub>-рецептору; III. Анализ проводился с использованием гейтирования по CB<sub>2</sub>-рецептору.

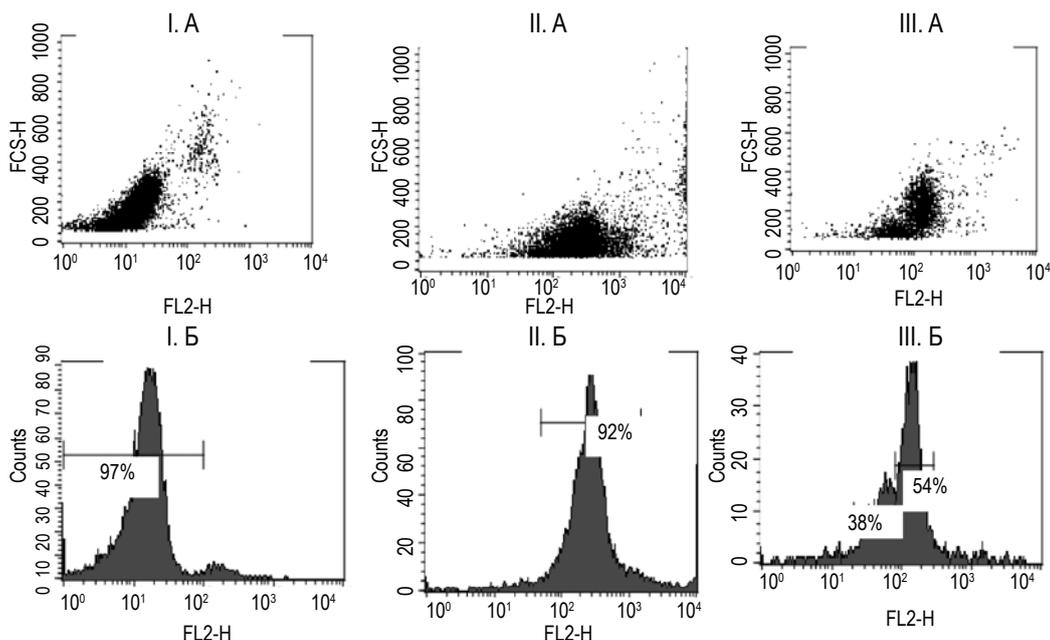
лейкоцитов и тромбоцитов, различных стромальных клеток в зоне микроциркуляторного русла.

Иммуностимулирующий эффект интракорпорального облучения крови проявляется в поглощении клетками фотонов и переходе их в возбужденное состояние как в результате прямого взаимодействия энергии кванта с веществом клетки, так и в результате изменения структуры липидного бислоя цитомембраны, увеличения биосинтеза нуклеиновых кислот, сигнальных молекул, активности экспрессии ферментов. Кроме того, образующиеся в крови фрагменты разрушенных и вновь синтезируемых белков могут играть роль антигенов, вызывая соответствующие иммунные реакции в организме [2, 6].

Внутривенное введение озono-кислородной смеси сопровождается повышением содержания озонидов в крови, способствующих окислению макромолекул (белки, липиды, ДНК), образованию пероксидов, которые и участвуют в развитии воспалительного процесса. В свою очередь, стимуляция клеток иммунной системы озонидами приводит к активации синтеза провоспалительных медиаторов (лейкотриены, простагландины), которые также обеспечивают формирование воспаления [8]. Следовательно, выбранные нами два метода, независимо от механизма их действия, имеют однонаправленный эффект на реактивность иммунокомпетентных клеток, что позволяет использовать их в установлении роли CB<sub>2</sub>-рецептора в иммунном ответе.

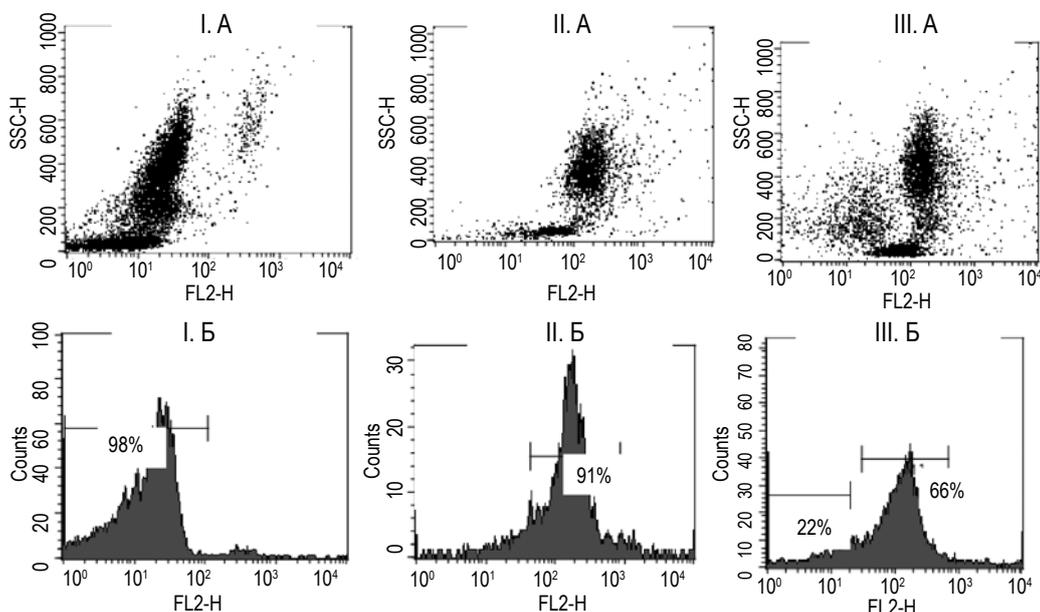
Проведенные исследования по индуцированию клеток иммунной системы *in vivo* показали, что в первой группе после интракорпорального облучения крови количество клеток, имеющих CB<sub>2</sub>-рецепторы, составило менее 60% (рис. 2). Сравнительный анализ до воздействия интракорпорального облучения и после показал достоверное снижение CB<sub>2</sub>-рецептора на 30% ( $p < 0,001$ ). Полученные результаты свидетельствуют о блокаде экспрессии эндоканнабиноидного CB<sub>2</sub>-рецептора на поверхности МЛ. Во второй группе после введения внутривенно озono-кислородной смеси количество клеток, содержащих CB<sub>2</sub>-рецептор (рис. 3), также снизилось и не превышало 70%, что имело достоверное различие до воздействия данного физического фактора ( $p < 0,001$ ). Таким образом, в двух группах наблюдения отмечается снижение числа клеток, экспрессирующих эндоканнабиноидный CB<sub>2</sub>-рецептор. Вероятно, что такая однонаправленная реакция иммунной системы, независимо от механизма действия фактора, свидетельствует об универсальности механизма иммунного ответа на флогген и формирование воспалительной реакции.

Установленное подавление экспрессии эндоканнабиноидного CB<sub>2</sub>-рецептора на поверхности МЛ при нагрузочных тестах *in vivo* является прямым доказательством того, что ЭКС участвует в регуляции иммунного ответа. Учитывая, что CB<sub>2</sub>-рецепторы обладают иммунодепрессивным действием на синтез провоспалительных медиаторов, снижение их экспрессии под дей-



**Рисунок 2.** Цитофлуориметрическое определение эндоканнабиноидных  $CB_2$ -рецепторов после интракорпорального облучения крови

**Примечание.** А – гистограмма МЛ; Б – распределение МЛ по популяциям; I. Анализ проводился без использования гейтирования по рецептору  $CB_2$ ; II. Анализ проводился с использованием гейтирования по  $CB_2$ -рецептору; III. Анализ проводился с использованием гейтирования по  $CB_2$ -рецептору после интракорпорального облучения крови.



**Рисунок 3.** Цитофлуориметрическое определение эндоканнабиноидных  $CB_2$ -рецепторов после введения внутривенно озono-кислородной смеси

**Примечание.** А – гистограмма МЛ; Б – распределение МЛ по популяциям; I. Анализ проводился без использования гейтирования по рецептору  $CB_2$ ; II. Анализ проводился с использованием гейтирования по  $CB_2$ -рецептору; III. Анализ проводился с использованием гейтирования по  $CB_2$ -рецептору после введения внутривенно озono-кислородной смеси.

ствием экзогенных иммуностимуляторов является первичной реакцией организма, которая запускает воспалительную реакцию и активирует иммунную систему. Возможно, гиперреактивность иммунного ответа обусловлена активацией

синтеза эндоканнабиноидов, обладающих блокирующим действием на экспрессию  $CB_2$ -рецепторов.

Полученные данные свидетельствуют о значимой роли ЭКС в регуляции иммунного ответа

и могут быть использованы для целенаправленного воздействия на воспалительную реакцию организма через СВ<sub>2</sub>-рецептор.

## Список литературы

1. Виткина Т.И., Хмелева Е.В., Антоноук М.В., Новгородцев А.Д. Влияние медицинского озона на иммунометаболический статус больных хроническим бронхитом и артериальной гипертензией // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – № 40. – С. 81-86.
2. Иванов Е.М., Эндакова Э.А. Аутотрансфузия ультрафиолетом облученной крови. – Владивосток: Дальнаука, 1993. – 103 с.
3. Исаченко Е.Г., Виткина Т.И., Геронина С.А. Потапов В.Н., Бердышев Е.В. Спонтанный и липополисахарид индуцированный синтез цитокинов клетками крови человека в норме и при аллергопатологиях // Иммунология. – 1999. – № 5. – С. 37-39.
4. Исаченко Е.Г., Виткина Т.И., Бердышев Е.В. Влияние лигандов каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 и анандамида на выработку TNF-а и ИЛ-8 лейкоцитами крови здоровых лиц и больных с аллергопатологией // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2003. – Т. 2. – С. 86-91.
5. Клауса Дж. Лимфоциты: методы. – М.: Мир, 1990. – 395 с.
6. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Башкуева Т.Ю., Модестова Т.М., Стеклова Л.С., Владимиров Ю.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональный потенциал лейкоцитов // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1997. – Т. 123 (4). – С. 395-398.
7. Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций / Под ред. А.Н. Маянского. – Горький: Изд-во Горьк. мед. института, 1989. – 242 с.
8. Техника озонотерапии: Методич. рекомендации / С.П. Перетягин, Г.А. Бояринов, Д.М. Зеленов и др. – Н. Новгород, 1991. – 15 с.
9. Чурюканов М.В., Чурюканов В.В. Функциональная организация и терапевтический потенциал эндогенной каннабиноидной системы // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2004. – Т. 67 (2). – С. 70-78.
10. Devane W.A., Hanu L., Breuer A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor // Science. – 1992. – Vol. 258. – P. 1946-1949.
11. Galiegue S., Mary S., Marchand J. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations // Eur. J. Biochem. – 1995. – Vol. 232. – P. 54-61.
12. Han K.H., Lim S., Ryu J., Lee C.-W., Kim Y., Kang J.-H., Kang S.-S., Ahn Y.K., Park C.-S., Kim J.J. CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages // J. Cardiovasc Res. December 1. – 2009. – Vol. 84 (3). – P. 378-386.
13. Kurihara R., Tohyama Y., Matsusaka S. et al. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 12908-12918.
14. Márquez L., Abanades S., Andreu M. Endocannabinoid system and bowel inflammation // Med. Clin. (Barc). – 2008. – Vol. 131 (13). – P. 513-517.
15. Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids // Nature. – 1993. – Vol. 365. – P. 61-65.
16. Orgado J.M., Fernández-Ruiz J., Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states // Int. Rev. Psychiatry. – 2009. – Vol. 21 (2). – P. 172-180.
17. Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands // Cur. Med. Chem. – 1999. – Vol. 6. – P. 635-664.

*поступила в редакцию 14.08.2011*

*отправлена на доработку 28.09.2011*

*принята к печати 04.10.2011*