

МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДОВ КОРНЯ СОЛОДКИ ПРИ КОНТАКТНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У МЫШЕЙ: УГНЕТЕНИЕ ФУНКЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ- ЭФФЕКТОРОВ ОПОСРЕДУЕТСЯ НЕЭФФЕКТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ

Павлова С.И.^{1,2}, Албегова Д.З.¹, Кягова А.А.¹, Козлов И.Г.^{1,2}

¹ ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва

² ФГУ ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава, Москва

Резюме. В основе патогенеза контактной чувствительности лежит Т-клеточный иммунный ответ, вызываемый гаптенами, которые образуют полный антиген, связываясь с белками. Эта реакция проявляется в виде воспаления в месте повторного попадания в организм антигена (обычно в коже). В нашей лаборатории модель контактной чувствительности воспроизводилась на мышах линии СВА, путем накожной сенсибилизации 2,4-динитрофторбензолом. Целью исследования стало выявление механизмов иммуносупрессорного действия флавоноидов корня солодки, используя метод адоптивного переноса контактной чувствительности различными популяциями спленоцитов. Было показано, что флавоноидов корня солодки подавляют адоптивный перенос контактной чувствительности с той или иной силой, в зависимости от популяции клеток с которой взаимодействуют, не вызывая апоптоза клеток-эффекторов.

Ключевые слова: флавоноиды, контактная чувствительность, адоптивный перенос.

Pavlova S.I., Albegova D.Z., Kyagova A.A., Kozlov I.G.

MECHANISMS OF IMMUNOSUPPRESSIVE ACTION OF LICORICE ROOT FLAVONOIDS IN CONTACT SENSITIVITY IN MICE: INHIBITION OF T LYMPHOCYTE EFFECTOR FUNCTION MEDIATED BY NON-EFFECTOR CELLS

Abstract. Contact sensitivity is a classical T cell-mediated, clinically important phenomenon elicited by small molecular weight molecules (haptens) that bind to host proteins to form a complete antigen. In our model experiments, contact sensitivity was produced in CBA mice, by means of cutaneous sensitization with 2,4-dinitrofluorobenzene. We used an adoptive transfer of contact sensitivity with different populations of splenocytes, in order to detect immunosuppressive effects of licorice (*Glycyrrhizae*) root flavonoids. Suppression of adoptive transfer of contact sensitivity in mice-recipients to different degree was found, when applying the flavonoids. It was revealed, that this effect depends on the type of target population interacting with flavonoids. We have also demonstrate, that licorice root flavonoids do not induce apoptosis of effector cells. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 6, pp 503-510)

Адрес для переписки:

Павлова Светлана Ивановна,
Кафедра фармакологии РГМУ
117997, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: (495) 434-44-92.
E-mail: pharma-3@yandex.ru

Keywords: licorice root flavonoids, contact sensitivity, adoptive transfer.

Введение

Флавоноиды — многочисленная группа растительных полифенолов, структурно представляющих собой гетероциклические кислородсодержащие соединения. Исследования последних лет продемонстрировали широкий спектр биологических эффектов флавоноидов как в норме, так и при различных патологических состояниях. Биологическая активность флавоноидов в основном обусловлена их способностью проникать внутрь клеток и блокировать ферменты сигнальных путей и факторы транскрипции.

Влияние флавоноидов различных классов на иммунную систему показано во многих работах [1, 2, 6]. В нашей лаборатории обнаружено выраженное антипролиферативное действие флавоноидов корня солодки (ФКС) по отношению к активированным лимфоцитам человека и лабораторных животных *in vitro* [1]. С привлечением модели контактной чувствительности (КЧ) к 2,4-динитрофторбензолу (ДНФБ) нами показано, что ФКС эффективно подавляют развитие этой реакции у мышей. При этом ингибирование КЧ зависит от способа введения ФКС и максимально проявляется при внутривенном способе введения [1]. В дальнейшем в этой же модели были предприняты попытки выяснения деталей механизмов действия ФКС. Выявлено, что угнетение КЧ при введении ФКС на начальных этапах фазы сенсибилизации может быть следствием блокирования пролиферации антигенспецифических Т-лимфоцитов-эффекторов КЧ, а также изменения направленности иммунного ответа за счет активации клеток с иммуносупрессорным потенциалом [2].

Целью данной работы являлось исследование возможного влияния ФКС на функциональную активность зрелых иммунокомпетентных клеток и их субпопуляций, участвующих в реализации КЧ. Для реализации поставленной цели был использован хорошо известный метод адоптивного переноса, в основе которого лежит индукция КЧ при введении несенсибилизированному животному зрелых Т-лимфоцитов-эффекторов от сенсибилизированного сингенного донора.

Материалы и методы

Тестируемый агент. В экспериментах использован препарат ФКС, выделенный методом колонной хроматографии на полиамидном сорбенте (Fluka, Германия) с использованием этанола в качестве экстрагента. Спектрофотометрический анализ образца ФКС показал наличие полос поглощения в области 250–280 и 300–380 нм, характерных для соединений фенольного ряда. Экспериментальный препарат ФКС стандарти-

зировали фотометрическим методом в цветной реакции с галловой кислотой (AcrosOrganics, Германия) [11].

В культуру клеток вносили раствор ФКС в этаноле (рабочая концентрация 20 мкг/мл), так чтобы финальная концентрация этанола в лунке не превышала 1%. В качестве контроля использовали соответствующие объемы растворителя. Во всех экспериментах после 30-минутной инкубации (37 °С, 5% CO₂) с препаратом клетки отмывали от тестируемого агента и медленно вводили внутривенно мышам в объеме 0,5 мл раствора Хенкса с 10 mM HEPES-буфера.

Лабораторные животные. В экспериментах были использованы мыши линии СВА (Н-2k) (самцы весом 18–20 г, возраст 8–10 недель), полученные из питомника РАМН (Крюково, Московская область). Животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к воде и пище.

Модель КЧ. Инициацию реакции КЧ к ДНФБ у мышей проводили согласно общепринятому экспериментальному подходу с незначительными модификациями [8]. Животных сенсибилизировали путем аппликации на выбритую кожу брюшка 50 мкл 0,3% раствора ДНФБ в ацетоне на 0 день. Через 6 суток после сенсибилизации на внутреннюю поверхность правого уха наносили разрешающую дозу ДНФБ (5 мкл 0,2% раствора). На левое ухо наносили аналогичный объем растворителя (ацетона). Отрицательным контролем (К-) служила группа интактных (несенсибилизированных) мышей, получивших только аппликацию разрешающей дозы ДНФБ. Через 24 ч после повторного нанесения ДНФБ оценивали интенсивность реакции КЧ по разнице отека правого и левого ушей (специфическое локальное воспаление). Толщину ушей измеряли в миллиметрах специальным микрометром, снабженным световым индикатором (Россия).

Адоптивный перенос КЧ. У сенсибилизированных ДНФБ мышей-доноров через 6 суток после сенсибилизации выделяли клетки селезенки. Суспензию спленцитов (3×10^7 кл/мышь, 0,5 мл) или их отдельные популяции (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), выделенные из того же количества клеток селезенки, медленно внутривенно вводили в хвостовую вену интактным мышам-реципиентам. В опытной группе клетки инкубировали с ФКС в течение 30 мин при 37 °С и 5% CO₂, в контрольной — с соответствующим объемом растворителя. Через 1 ч после переноса клеточной суспензии мышам-реципиентам, включая интактных мышей (К-, отрицательный контроль), наносили разрешающую дозу ДНФБ на внутреннюю поверхность уха. На внутреннюю поверхность другого уха в качестве контроля наносили такой

же объем ацетона. Еще через 24 ч регистрировали интенсивность реакции КЧ мышей-реципиентов вышеописанным методом.

Иммуномагнитная сепарация. Для получения отдельных популяций спленоцитов использовали метод негативной селекции и набор реактивов Dynal Mouse Negative Isolation Kit (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). Фракции клеток, не относящихся к интересующей популяции, удаляли, обрабатывая спленоциты коктейлем моноклональных антител (IgG высокоспецифичные к поверхностным популяционным маркерам) и связывающими их парамагнитными полимерными микрочастицами Dynalbeads. Сепарацию проводили в магнитном поле штатива DynalMag-2 (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). Очищенную популяцию, не прикрепившуюся к полимерным микрочастицам (в составе супернатанта), отмывали и после подсчета использовали для обработки ФКС *in vitro*, а затем вводили внутривенно экспериментальным животным.

Контроль чистоты популяции осуществляли методом проточной цитометрии на цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman-Coulter, США) с использованием флуорохром-меченых моноклональных антител к CD3, CD4, CD8 антигенам мышей (Invitrogen, США).

Оценка жизнеспособности и «раннего» апоптоза. Количественные исследования жизнеспособности и апоптоза клеток при воздействии изучаемого агента проводили методом проточной цитофлуориметрии, используя Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter, США). Для анализа использовали аликвоты, содержащие 106 клеток.

Оценка продукции цитокинов. Паховые лимфатические узлы выделяли на 4 день после двукратной (с интервалом 24 ч) сенсibilизации мышей ДНФБ. Выделенные лимфоциты культивировали 24 и 48 ч в 96-луночных планшетах при 37 °C и 5% CO₂ в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культуры дополнительно стимулировали 15 мкг/мл конканавалина А (КонаА). Супернатанты клеточных суспензий опытных проб и последовательные разведения стандартов инкубировали с флуоресцирующими бусами, покрытыми антителами, специфически реагирующими с каждым из аналитов. Далее добавляли биотин-конъюгированные антицитоклиновые антитела и стрептавидин, меченый флуорохромом (фикоэритрин). Концентрации цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α) определяли цитофлуориметрическим методом, используя программное обеспечение FlowCytomix Pro и набор ре-

активов Mouse Th1/Th2 FlowCytomix Multiplex (Bender MedSystems, Австрия).

Статистическая обработка. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего значения. Достоверность различий между опытными и контрольными группами в экспериментах определяли по критерию Стьюдента с использованием пакета анализа данных программы Excel для Windows XP. Различия считались достоверными при $p < 0,05$, где p — уровень значимости.

Результаты

Результаты экспериментов по адоптивному переносу КЧ спленоцитами сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам представлены на рисунке 1. Как демонстрирует гистограмма, в группе отрицательного контроля (К⁻) аппликация разрешающей дозы ДНФБ не вызывала развития реакции: разница толщины ушей составляла $0,010 \pm 0,004$ мм. Напротив, перенос спленоцитов от сенсibilизированных ДНФБ доноров интактным мышам-реципиентам приводил к иммунизации последних, что проявлялось в развитии у мышей-реципиентов реакции КЧ уже при первичной аппликации ДНФБ на ухо. У мышей данной группы отек составил $0,099 \pm 0,008$ мм, что было сравнимо с интенсивностью КЧ в группе положительного контроля (К⁺) без адоптивного переноса. Однако в том случае, когда спленоциты предварительно (до введения мышам-реципиентам) инкубировали в течение 30 мин с 20 мкг/мл ФКС, адоптивный перенос КЧ не наблюдался. Отек уха в этой группе мышей составлял в среднем $0,016 \pm 0,006$ мм, что достоверно не различалось с таковыми значениями в группе отрицательного контроля ($p < 0,05$).

Параллельно был оценен апоптогенный эффект ФКС по отношению к спленоцитам мышей, сенсibilизированных ДНФБ. Клетки инкубировали 0,5; 2; 6; 12 ч в присутствии ФКС, затем красили аннексин-ФИТЦ и пропидий иодиодом. Ни в одном из образцов не наблюди повышения доли аннексин-положительных клеток при инкубации с ФКС в сравнении с контрольными пробами (результаты не показаны). При этом следует отметить тот факт, что через 30 мин более 95% клеток оставались аннексин- и пропидий-отрицательными как в контроле, так и при обработке ФКС.

Следующим экспериментальным шагом стала иммуномагнитная сепарация Т-лимфоцитов из суспензии спленоцитов мышей, сенсibilизированных ДНФБ, с целью их адоптивного переноса интактным мышам. Результаты эксперимен-

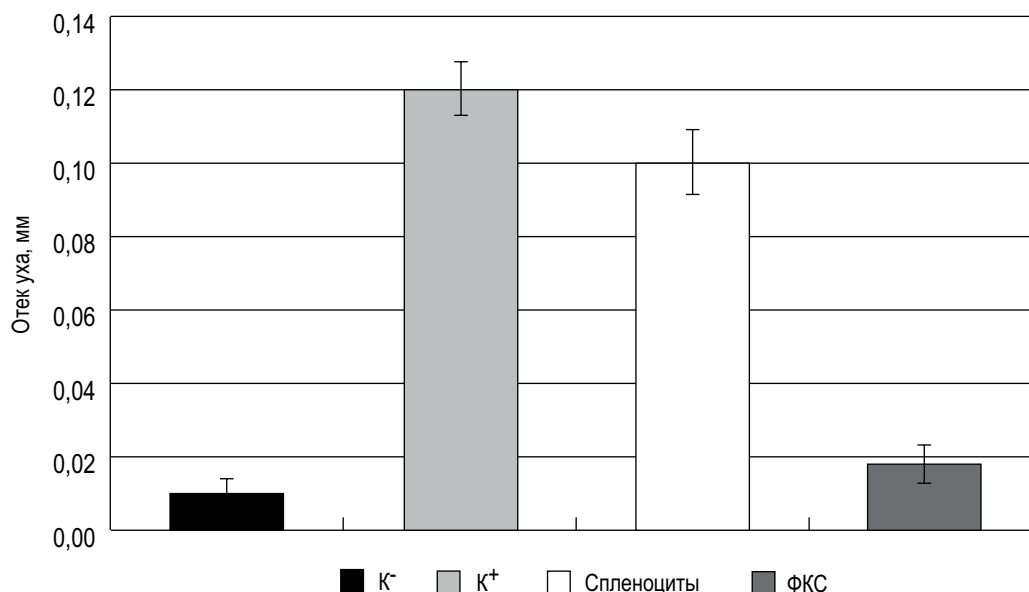


Рисунок 1. Интенсивность реакции при адоптивном переносе КЧ спленоцитами сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам

Примечание. K⁻ – отрицательный контроль; K⁺ – положительный контроль без адоптивного переноса; Спленоциты – адоптивный перенос КЧ спленоцитами (3 × 10⁷/мышь); ФКС – адоптивный перенос спленоцитов, инкубированных с ФКС.

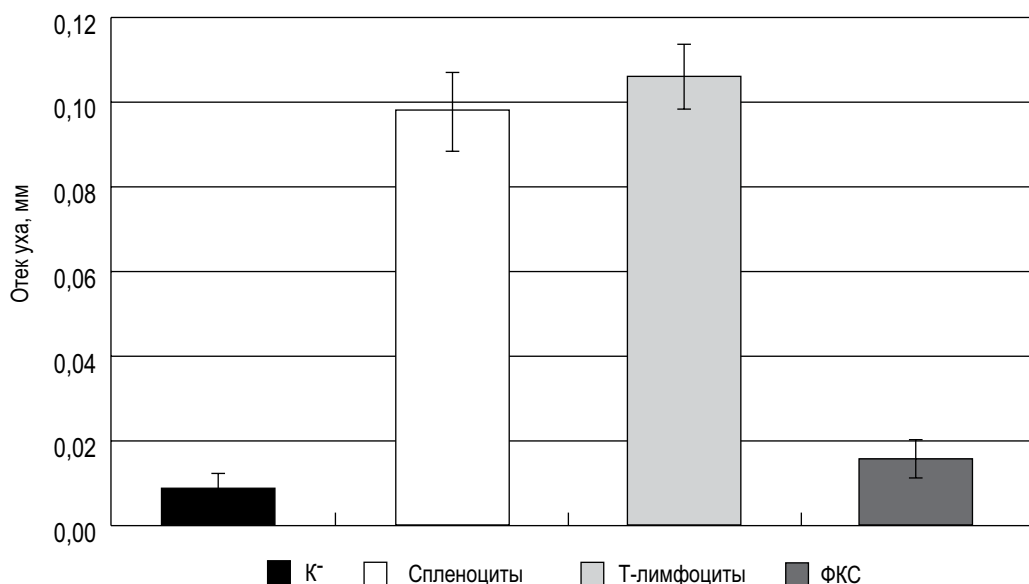


Рисунок 2. Интенсивность реакции при адоптивном переносе КЧ популяциями спленоцитов сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам

Примечание. K⁻ – отрицательный контроль; Спленоциты – адоптивный перенос КЧ спленоцитами; Т-лимфоциты – адоптивный перенос КЧ Т-лимфоцитами; ФКС – адоптивный перенос Т-лимфоцитов, инкубированных с ФКС.

тов по изучению влияния ФКС на адоптивный перенос КЧ Т-лимфоцитами представлены на рисунке 2. Как и предполагалось, Т-лимфоциты сенсibilизированных мышей эффективно переносили КЧ несенсibilизированным реципиентам. Выраженность реакции статистически не была отличима от группы с адоптивным переносом суммарной фракции спленоцитов. Обработка *in vitro* сепарированных Т-лимфоцитов ФКС заблокировала способность этих клеток

адоптивно переносить КЧ интактным мышам. Отек уха составил $0,017 \pm 0,007$ мм, что совпадало с аналогичным показателем в группе отрицательного контроля ($p < 0,05$).

На рисунке 3 представлены результаты по адоптивному переносу КЧ основными субпопуляциями Т-лимфоцитов. Иммуномагнитной сепарацией из 3×10^7 спленоцитов были выделены CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоциты, при проведении цитометрического контроля чистота субпопу-

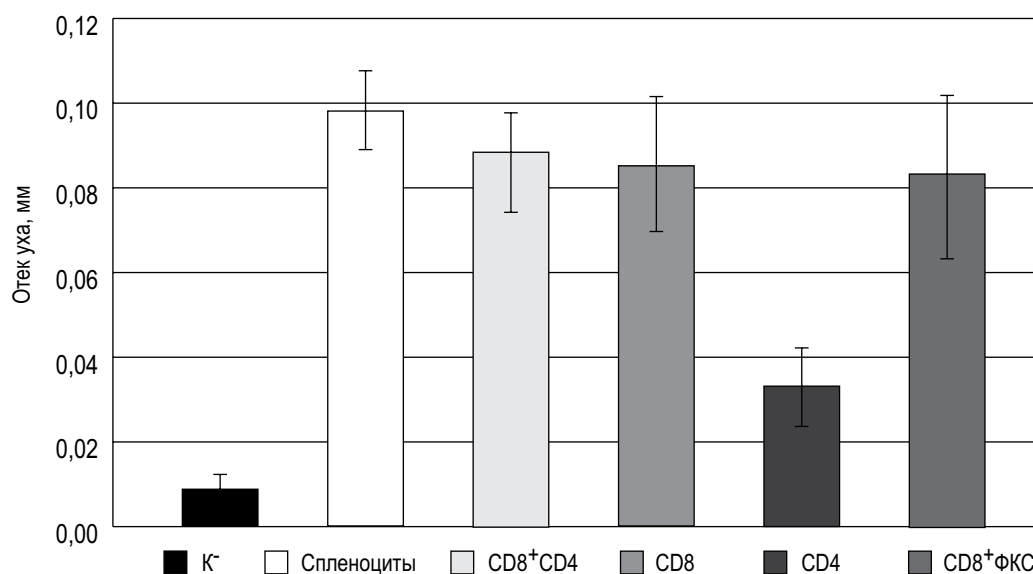


Рисунок 3. Интенсивность реакции при адоптивном переносе КЧ популяциями спленоцитов сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам

Примечание. К⁻ – отрицательный контроль; Спленоциты – адоптивный перенос КЧ спленоцитами; CD8⁺CD4 – адоптивный перенос КЧ смесью CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов; CD8 – адоптивный перенос КЧ CD8⁺ лимфоцитами; CD4 – адоптивный перенос КЧ CD4⁺ лимфоцитами; CD8⁺ФКС – адоптивный перенос КЧ CD8⁺ лимфоцитами, инкубированными с ФКС.

ляций составляла $90,0 \pm 1,0\%$. Положительными контролями служили группы мышей, которым адоптивно переносили все спленоциты или смесь CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов, выделенных из такого же количества спленоцитов. Как видно на гистограмме, перенос спленоцитов, смеси CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов и чистой популяции CD8⁺ вызывал адоптивный перенос КЧ интактным мышам-реципиентам. Среднее значение отека ушей составило в двух последних группах соответственно $0,087 \pm 0,01$ мм и $0,086 \pm 0,014$ мм, что статистически не различалось между собой и группой с переносом спленоцитов ($p < 0,05$). У мышей, которым перенесли сепарированные CD4⁺, отек был значительно меньше ($0,034 \pm 0,008$ мм). Однако, к нашему удивлению, обработка выделенных CD8⁺ лимфоцитов ФКС не вызвала подавления развития отека ушей ($0,080 \pm 0,020$ мм), т.е. реакция КЧ была «успешно» адоптивно перенесена.

После обсуждения полученных результатов было решено провести модифицированный эксперимент с выделением тех же популяций спленоцитов от сенсibilизированных ДНФБ мышей (результаты представлены на рисунке 4). Перед адоптивным переносом сепарированная субпопуляция CD4⁺ лимфоцитов была *in vitro* обработана ФКС, после чего в эту систему добавляли сепарированные CD8⁺ лимфоциты, отмывали от исследуемого агента и затем вводили внутривенно интактным мышам-реципиентам. На рисунке 4 видно, что в контрольной группе, которой переносили субпопуляции Т-лимфоцитов, прошедшие те же этапы инкубации без ФКС, ин-

тенсивность реакции КЧ статистически не отличалась от группы с адоптивным переносом спленоцитов ($p < 0,05$). В свою очередь инкубация CD4⁺ с ФКС, с последующим добавлением CD8⁺, привела к супрессии реакции КЧ на 83% по сравнению с соответствующим контролем. Отек уха в этой группе мышей составил $0,020 \pm 0,010$ мм, что достоверно не отличалось от значений отека ушей в группе отрицательного контроля (интактные мыши).

Дополнительно было проведено исследование уровня секреторных цитокинов в супернатантах клеточных суспензий из лимфоузлов, эксплантированных на 4 сутки после сенсibilизации мышей ДНФБ (рис. 5). Концентрация цитокинов измерялась через 24 и 48 ч после культивирования клеток *in vitro*. В контрольных пробах пиковые концентрации IL-2, IL-4, IFN γ наблюдались через 24 ч, а IL-6, IL-10, IL-17, TNF α через 48 ч культивирования *in vitro*. IL-1 и IL-5 ни в одной из серий экспериментов на этих сроках не определялись.

Анализ уровня цитокинов показал, что добавление 20 мкг/мл ФКС в культуру лимфоцитов приводило к небольшому, но статистически значимому ($p < 0,5$) уменьшению концентрации IL-2 ($3202,5 \pm 340,3$ пг/мл) и TNF α ($216,5 \pm 8,4$ пг/мл) соответственно на 21% и 20% по сравнению с контролем. Напротив, уровни IL-10 ($1287,0 \pm 304,3$ пг/мл), IL-4 ($708,0 \pm 68,7$ пг/мл) и IL-6 ($2320,0 \pm 226,3$ пг/мл) достоверно ($p < 0,05$) повышались под влиянием ФКС на 30%, 66% и 28% соответственно. Среднее значение концентрации IL-17 ($4520,0 \pm 692,8$ пг/мл) досто-

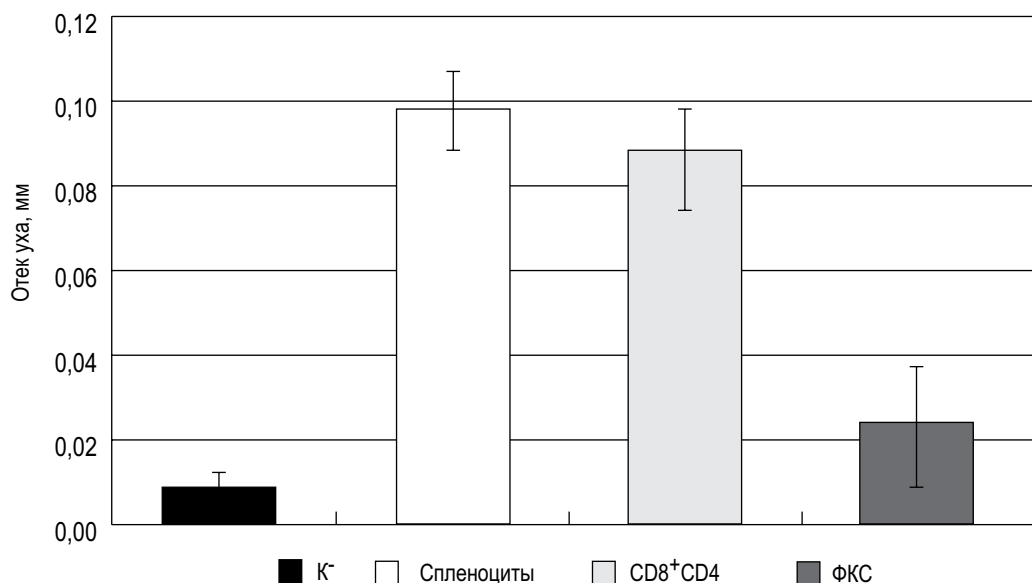


Рисунок 4. Интенсивность реакции при адоптивном переносе КЧ различными популяциями спленоцитов сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам

Примечание. K⁻ – отрицательный контроль; Спленоциты – адоптивный перенос КЧ спленоцитами; CD8⁺CD4 – адоптивный перенос КЧ смесью CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов; ФКС – адоптивный перенос CD4⁺ лимфоцитов, инкубированных с ФКС, с последующим добавлением CD8⁺ лимфоцитов.

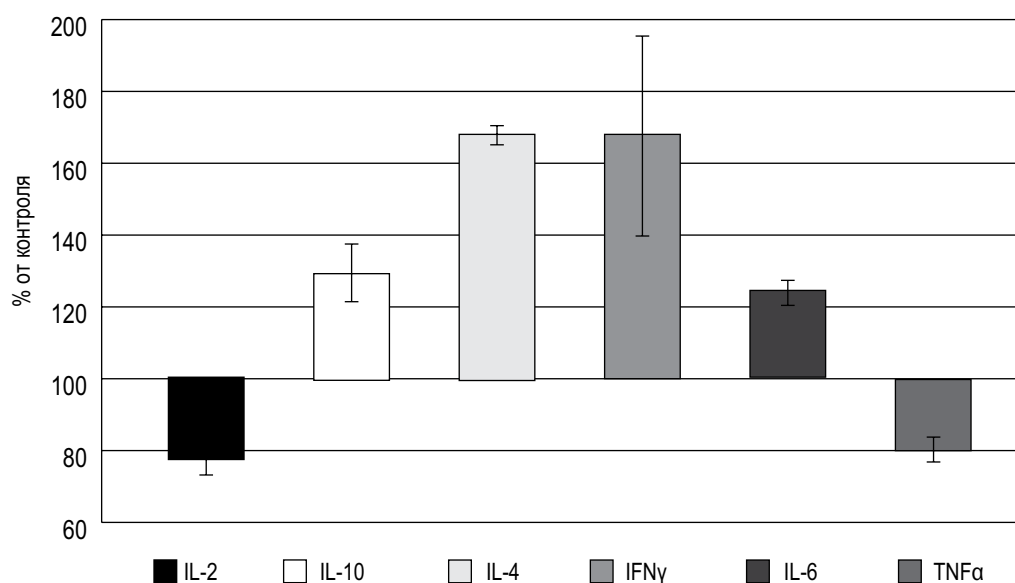


Рисунок 5. Изменения уровня цитокинов в супернатанте лимфоцитов лимфоузлов (120-144 ч) после сенсibilизации ДНФБ) при обработке ФКС *in vitro*

Примечание. Уровень 100% соответствует контрольным значениям каждого из анализируемых цитокинов.

верно не отличалось от контрольного значения. Уровень IFN γ был подвержен значительным колебаниям: от значений, сравнимых с контролем, до уровней превышающих контрольные значения, так что средняя ошибка среднего арифметического имеет достаточно большой размах ($41000,0 \pm 7100,5$ пг/мл).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют сделать следующие выводы:

1) Сенсibilизация ДНФБ мышей линии СВА в условиях нашего эксперимента приводит к генерации эффекторных клеток КЧ, имеющих преимущественно фенотип CD8⁺.

2) ФКС в дозе 20 мкг/мл не индуцируют апоптоза сенсibilизированных ДНФБ спленоцитов мышей, но подавляют способность этих клеток адоптивно переносить реакции КЧ сингенным мышам-реципиентам.

3) ФКС не обладают прямым ингибиторным влиянием на функциональную активность $CD8^+$ лимфоцитов-эффекторов КЧ.

4) ФКС подавляют адоптивный перенос КЧ за счет влияния на функциональную активность $CD4^+$ лимфоцитов, которые не являются клетками-эффекторами КЧ в условиях описываемого эксперимента.

5) Добавление ФКС в систему *in vitro*, содержащую зрелые иммунокомпетентные клетки, участвующие в иммунном ответе при КЧ у мышей, приводит к достоверному повышению секреции IL-4, IL-6, IL-10.

Обсуждение

В настоящей работе мышинная модель реакции КЧ к ДНФБ использовалась для детального изучения механизмов иммуносупрессивного действия ФКС. КЧ к ДНФБ является классической моделью Т-клеточного иммунного ответа, воспроизводящей заболевание — контактный дерматит у человека, ключевым этапом развития которого считается активация и созревание в сенсibilизированном организме клона антиген-специфических Т-лимфоцитов. Ранее уже обсуждался тот факт, что при парентеральном введении ФКС эффективно ингибируют КЧ на ранних этапах развития [1], а также, что в основе иммуносупрессорного действия ФКС может лежать нарушение пролиферации клона ДНФБ-специфических Т-лимфоцитов [2]. Вопрос о возможности воздействия ФКС на функции зрелых клеток-эффекторов КЧ оставался открытым.

Одним из экспериментальных методов оценки действия различных агентов на антиген-специфические эффекторы КЧ являются опыты по их адоптивному переносу сингенным животным. Данный подход был использован нами для изучения прямого влияния ФКС на суммарную фракцию спленоцитов мышей, полученную спустя 6 суток после сенсibilизации ДНФБ, а также на Т-лимфоциты и отдельные популяции Т-клеток, выделенных из суспензии лимфоцитов селезенки с помощью иммуномагнитной сепарации.

Реакция КЧ достоверно переносилась спленocyтaми ДНФБ-сенсibilизированных мышей-доноров сингенным интактным мышам-реципиентам при внутривенном введении их в количестве свыше 2×10^7 клеток в расчете на 1 мышью. При этом адоптивный перенос 108 клеток/мышью вызывал отек уха такой же выраженности (результаты не приведены), как в группе мышей K^+ (инициация КЧ и ее разрешение в одном и том же животном). В том случае, когда переносили меньшее количество спленocyтa, наблюдалась незначительная тенденция

к снижению интенсивности реакции (рис. 1). С целью экономии дорогостоящих реактивов для иммуномагнитной сепарации в данной работе для адоптивного переноса КЧ использовали 3×10^7 клеток в расчете на 1 мышью, сепарация и перенос отдельных популяций клеток проводились из такого же количества спленocyтa.

Как показали проведенные исследования, обработка антиген-специфических спленocyтa ФКС перед переносом полностью отменяла развитие КЧ у сингенных мышей, при этом данный эффект не был связан с гибелью клеток вследствие индукции их апоптоза или цитотоксичности.

Представленные в литературе сведения, касающиеся фенотипа клеток, являющихся эффекторами КЧ противоречивы. Предполагается, что фенотип индуцированных клеток-эффекторов КЧ зависит прежде всего от вида гаптена, а также от генетических особенностей сенсibilизированного организма. Тем не менее большинство исследований показывают, что сенсibilизация мышей ДНФБ приводит к генерации клеток-эффекторов КЧ, имеющих фенотип $CD8^+$ клеток [4, 7].

Наши результаты соответствовали данным литературы: реакция КЧ переносилась как выделенной из суспензии спленocyтa сенсibilизированных мышей суммарной фракцией Т-лимфоцитов (рис. 2), так и их $CD8^+$ субпопуляцией (рис. 3). В то же время антиген-специфические $CD4^+$ лимфоциты не были способны в достаточной степени переносить КЧ. Прямое воздействие ФКС на Т-лимфоциты сенсibilизированных мышей, подобно обработке всех антиген-специфических спленocyтa, полностью блокировало адоптивный перенос КЧ. Однако в отличие от цельной фракции Т-клеток обработка $CD8^+$ субпопуляции ФКС с последующим адоптивным переносом их интактным мышам не вызывала ингибирования реакции КЧ, что свидетельствует об отсутствии прямого подавляющего эффекта флавоноидов на клетки-эффекторы. При этом кратковременная преинкубация $CD4^+$ субпопуляции спленocyтa сенсibilизированных мышей ФКС и смешивание ее с $CD8^+$ эффекторами приводила при адоптивном переносе к угнетению КЧ (рис. 4). Данный факт позволил сделать заключение, что именно регуляторные $CD4^+$ лимфоциты приобретают в процессе обработки флавоноидами супрессорный потенциал и инактивируют клетки-эффекторы КЧ.

К настоящему времени накоплен обширный материал о существовании регуляторных популяций клеток, способных вызвать подавление иммунного ответа на разных его стадиях и индуцировать толерантность к антигену. Исследования, проведенные с использованием модели КЧ, демонстрируют, что у мышей, сенсibilизирован-

ных ДНФБ, роль подобных клеток-регуляторов могут выполнять различные субтипы CD4⁺ лимфоцитов, включая Th2 [3-5, 12]. Негативная регуляция иммунного ответа иммуно-регуляторными клетками возможна как путем непосредственного контакта с эффекторными клетками [9], так и с помощью секреции ингибиторных цитокинов — IL-10 и TGF- β [10]. Поэтому была проведена оценка влияния ФКС на профиль цитокинов, секретируемых иммунокомпетентными клетками, реализующими КЧ.

Выделяя лимфоциты на пике пролиферативной активности и культивируя их в течение 24-48 ч, мы изучали влияние ФКС на секрецию цитокинов уже практически зрелыми иммунокомпетентными клетками, участвующими в КЧ (120-144 ч после сенсibilизации) [2]. Активированные Т-лимфоциты характеризовались богатым репертуаром секретируемых цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α) (рис. 5). В этом ряду находились цитокины как способствующие развитию реакции КЧ (IL-17, IFN γ , TNF α), так и ингибирующие ее (IL-10). Прямая обработка флавоноидами эффекторов КЧ *in vitro* снижала секрецию TNF α , но не влияла значительно на продукцию IL-17. Наблюдалась также тенденция к повышению уровня IFN γ . Источником IFN γ и IL-17 могли являться CD8⁺ лимфоциты [7, 12], эффекторную функцию которых ФКС в опытах по адоптивному переносу КЧ прямо не ингибировали. Обработка клеток ФКС *in vitro* приводила к статистически значимому повышению уровня IL-4, IL-6, IL-10, которые, как известно, секретируются Th2 типа. Наиболее эффективно возрастало среднее значение IL-4, который считается главным Th2-поляризующим фактором. С точки зрения устоявшихся представлений, при развитии реакции КЧ антагонистически взаимодействуют два типа CD4⁺ клеток: Th1 и Th2 лимфоциты. По-видимому, ФКС потенцируют функции Th2 клеток, которые способны негативно регулировать функции эффекторов КЧ [12].

Таким образом, флавоноиды корня солодки угнетают функцию клеток-эффекторов КЧ к ДНФБ, что опосредуется регуляторными CD4⁺ лимфоцитами, а также повышением секреции интерлейкинов Th2-профиля (IL-4, IL-6, IL-10). Это позволяет свидетельствовать о том, что иммуносупрессивный механизм действия ФКС основан на отрицательной регуляции иммунного ответа без цитотоксического влияния на клетки-эффекторы.

Список литературы

1. Павлова С.И., Гладков И.В., Кягова А.А., Козлов И.Г. Флавоноиды корня солодки пода-

вляют индуцированную *in vitro* и *in vivo* пролиферацию лимфоцитов // Рос. иммунол. журнал. — 2007. — Т. 1 (10), — № 3-4. — С. 279-282.

2. Павлова С.И., Албегова Д.З., Кягова А.А., Козлов И.Г. Механизмы иммуносупрессивной активности флавоноидов корня солодки при контактной чувствительности у мышей // Рос. иммунол. журнал. — 2010. — Т. 4 (13), № 3. — С. 239-244.

3. Cavani A. Immune regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis and contact sensitization // Chem. Immunol. Allergy. — 2008. — Vol. 94. — P. 93-100.

4. Gober M.D., Gaspari A.A. Allergic contact dermatitis // Curr. Dir. Autoimmun. — 2008. — Vol. 10. — P. 1-26.

5. Gorbachev A.V., Fairchild R.L. Regulatory role of CD4⁺ T cells during the development of contact hypersensitivity responses // Immunol. Res. — 2001. — Vol. 24. — P. 69-77.

6. Hsu S.D., Dickinson D.P., Qin H., Borke J., Ogbureke K.U., Winger J.N., Camba A.M., Bollag W.B., St ppler H.J., Sharawy M.M., Schuster G.S. Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF-alpha-induced cytotoxicity // Autoimmunity. — 2007. — Vol. 40, N 2. — P. 138-147.

7. Kehren J., Desvignes C., Krasteva M., Ducluzeau M.T., Assossou O., Horand F., Hahne M., Kägi D., Kaiserlian D., Nicolas J.F. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity // J. Exp. Med. — 1999. — Vol. 189, N 5. — P. 779-786.

8. Kim T.Y., Kripke M.L., Ullrich S.E. Immunosuppression by factors released from UV-irradiated epidermal cells: selective effects on the generation of contact and delayed hypersensitivity after exposure to UVA or UVB radiation // J. Invest. Dermatol. — 1990. — Vol. 94. — P. 26-32.

9. Paust S., Lu L., McCarty N., Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 101, N 28. — P. 10398-10403.

10. Taylor A., Verhagen J., Blaser K., Akdis M., Akdis C.A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells // Immunology. — 2006. — Vol. 117, N 4. — P. 443-442.

11. Vermerris W., Nicholson R. Isolation and identification of phenolic compounds // Phenolic Compound Biochemistry. — Springer, the Netherlands, 2006. — P. 152-153.

12. Vocanson M., Hennino A., Rozi res A., Poyet G., Nicolas J.F. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis // Allergy. — 2009. — Vol. 64, N 12. — P. 1699-1714.

поступила в редакцию 06.09.2010
принята к печати 04.10.2010