ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДА КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ WIN-55,212-2 НА ВЫРАБОТКУ TNF-α МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Е. Г. Исаченко[1], Т. И. Виткина[1], Е. В. Бердышев[2]

Показано, что синтетический каннабиноид WIN 55,212-2 в условиях *in vitro* дозозависимо снижает выработку TNF-α мононуклеарными клетками человека, стимулированными липополисахаридом *Escherichia coli* (ЛПС). Наиболее существенное ингибирующее влияние на синтез TNF-α WIN 55,212-2 оказывает в концентрации 10 мкМ.

Ключевые слова: каннабиноиды, мононуклеарные клетки, TNF-α, липополисахарид *Escherichia coli*

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины являются одними из самых важных участников в воспалительных процессах в организме. Одним из первых при воспалительной реакции вырабатывается фактор некроза опухоли (TNF-α) [2, 7]. В ряде исследований показано, что лиганды каннабиноидных рецепторов проявляют противовоспалительный эффект, модулируя иммунный ответ *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время выделены два типа каннабиноидных рецепторов. Рецептор первого типа (CB_1) участвует в регуляции процессов движения, памяти, формировании эмоций и болевой чувствительности, а также в регуляции вегетативных функций организма, тогда как рецептор второго типа (CB_2) связан с модуляцией иммунокомпетентных клеток. CB_2 рецептор обнаружен на В-лимфоцитах, моноцитах и полиморфно-ядерных лейкоцитах, низкий уровень отмечен на CD_8 и CD_4 лимфоцитах [3, 8, 9, 13]. В то же время получены данные о том, что CB_1, так же как CB_2 рецептор, участвует в переключении Тх-1 ответа на Тх-2 посредством изменения соотношения вырабатываемых иммунокомпетентными клетками цитокинов. WIN 55,212-2 — синтетический каннабиноид, относящийся к семейству аминоалкилиндолов, демонстрирует сродство к каннабиноидным рецепторам обоих типов, с небольшим предпочтением к CB_2 [7, 8]. В литературе встречается описание как стимулирующего, так и ингибирующего действия лигандов каннабиноидных рецепторов на продукцию провоспалительных цитокинов [10, 12, 14]. По-видимому, подобные противоречия в результатах связаны с условиями проведения экспериментов, в том числе с применением различных доз веществ. Целью нашего исследования явилось изучение дозозависимого влияния агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 на выработку TNF-α мононуклеарами периферической крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали синтетический агонист каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 (R(+)-[2,3-dihy-dro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl] pyrrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-yl]-(1-naphthalenyl) methadone mesylate) фирмы SIGMA-RBI ("St. Louis", США). Эксперименты по изучению влияния WIN 55,212-2 на выработку TNF-α выполняли *in vitro* на мононуклеарах человеческой цельной крови.

Кровь отбирали из локтевой вены в стерильные силиконизированные пробирки с гепарином (150 IU/мл; "Venoject"), разбавляли (1:5) стерильной средой RPMI 1640 ("Flow Laboratories"), содержащей 30 мг/мл глутамина и 50 мкмоль/мл гентамицина ("Gibco"). За 30 мин до инкубации вносили WIN 55,212-2 в различных концентрациях (0,1 мг/мл, 1 мг/мл, 3 мг/мл, 10 мг/мл.). Клетки крови стимулировали липополисахаридом *Escherichia coli* (ЛПС) ("Sigma", США; серотип 055:B5, 10 мкг/мл) и инкубировали в течение 6 часов при слабом покачивании при 37 °С. Пробирки охлаждали, центрифугировали 10 мин при 800 g, супернатант отбирали и замораживали. Определяли базальную и стимулированную ЛПС выработку цитокинов иммунокомпетентными клетками (ИКК) с помощью иммуноферментного анализа ("Genzyme diagnostics, Cambridge", США, Duoset system) [1].

Результаты обрабатывали статистически по программе Statistica 5.5.

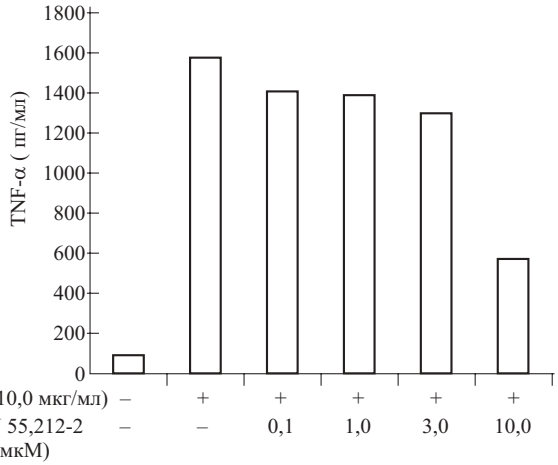
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

TNF-α продуцируется, в основном, клетками моноцитарно-макрофагального ряда. Регуляция его синтеза комплексна, активация каннабиноидных рецепторов может негативно влиять на его синтез [2, 7].

В данной работе изучена возможность ингибирования синтеза TNF-α с помощью синтетического лиганда каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2. Использование разбавленной цельной крови позволило изучить биологические свойства WIN 55,212-2 в условиях, максимально приближенных к ситуации *in vivo*. В данных условиях лейкоциты крови без стимуляции практически не синтезировали TNF-α. Стимуляция клеток ЛПС (10 мкг/мл) вела к увеличению секреции клетками TNF-α в 20 раз (таблица). WIN 55,212-2 как таковой не оказывал влияния на синтез данного цитокина в нестимулированной крови. При стимуляции ЛПС WIN 55,212-2 в концентрации 0,1 – 3 мкМ незначительно снижал синтез TNF-α, но уже в концентрации 10 мкМ эффект WIN 55,212 – 2 был значительным ($p < 0,01$), рисунок. Влияние каннабиноидов на провоспалитель-

[1] Лаборатория биомедицинских исследований (зав. — Т. П. Новгородцева) Владивостокского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания — НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения Сибирского отделение РАМН, Владивосток-105, 690105, ул. Русская, 73-г.

[2] Институт Биологии моря, Дальневосточное отделение РАН, Владивосток, 690041, ул. Пальчевского, 17.



Влияние WIN 55,212-2 на выработку TNF-α мононуклеарными клетками.

ный ответ может быть усилено при увеличении их концентрации [4, 6]. Известно, что одним из дополнительных факторов, который может вмешиваться в действие каннабиноидов, является присутствие в сравнительно высоких концентрациях в плазме эндоканнабиноидов, которые продуцируют стимулированные иммунные клетки и тромбоциты [5, 9, 11, 15]. Циркулирующие иммунные клетки и клетки в культуре постоянно подвергаются воздействию каннабиноидов. Эти данные могут объяснить тот факт, что низкие концентрации экзогенных каннабиноидов не влияют на параметры иммунного ответа *in vitro* или *in vivo*.

Таким образом, представленные эксперименты были необходимы для выяснения различия между влиянием низких и высоких концентраций лиганда каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 на каннабиноидно-индуцированную модуляцию иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Каннабиноидный лиганд WIN 55,212-2 оказывает дозозависимый игибирующий эффект на выработку TNF-α мононуклеарами периферической крови.

2. Наибольшее влияние на выработку TNF-α мононуклеарными клетками человека WIN 55,212-2 оказывает в дозе 10 мкМ.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант 98-04-48049) и INTAS (грант 97-1297).

Влияние WIN-55,212-2 на продукцию TNF-α иммунокомпетентными клетками

WIN-55,212-2, мкМ	TNF-α, пг/мл, n = 12	
	LPS (-)	LPS (+)
–	80 ± 0,14	1580 ± 28,34
0,1	82 ± 0,22	1410 ± 8,62
1,0	76 ± 0,31	1388 ± 11,09
3,0	78 ± 0,09	1305 ± 21,14
10,0	81 ± 0,19	586 ± 9,51*

Примечание. * — изменения относительно контрольной группы достоверны, $p < 0,01$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Г. Исаченко, Т И. Виткина, С. А. Геронина, и др., *Иммунол.*, № 5, 37 – 39 (1999).
2. В. И. Коненков, *Медицина и экологическая иммуногенетика*, Новосибирск (1999).
3. A. Bendelac and R. H. Schwartz, *J. Nature*, **353**, 68 – 71 (1991).
4. E. V. Berdyshev, P. C. Schmid, R. J. Krebsbach, et al., *J. Biochem*, **360**, 67 – 75, (2001).
5. N. E. Buckley, K. L. McCoy, E. Mezey, et al., *J. Pharmacl*, **396**, 141 – 149 (2000).
6. J. L. Bueb, D. M. Lambert, and E. J. Tschirhart, *Biochim Biophys Acta*, **1538**, 252 – 259 (2001).
7. N. Germain, E. Boichot, C. Advenier, et al., *International Immunopharmacology*, № 2, 537 – 543 (2002).
8. A. C. Howlett, *J. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, **33**, 607 – 634 (1995).
9. T. W. Klein, C. Newton, and H. Friedman, *Immunol Today*, **19**, 373 – 381 (1998).
10. K. L. McCoy, M. Matveyeva, S. J. Carlisle, and G. A. Cabral, *J. Pharmacol Exp Ther*, **289**, 1620 – 1625 (1999).
11. M. Rinaldi-Carmona, F. Barth, M. Heaulme, et al., *J. Life Sci*, **56**, 1941 – 1947 (1995).
12. M. Rinaldi-Carmona, F. Barth, J. Millan, et al, *J. Pharmacol Exp Ther*, **284**, 644 – 650 (1998).
13. M. Rouleau, F. Cittez, M. Bigler, et al., *J. Immunol*, **163**, 1420 – 1427 (1999).
14. S. R. Smith, C. R. Terminelli, and G. Denhardt, *J. Pharmacol Exp*, **293**, 136 – 150 (2000).
15. K. Varga, J. A. Wagner, D. T. Bridgen, and G. Kuno, *J. FASEB*, **12**, 1035 – 1044 (1998).

Поступила 14.10.02

THE EFFECT OF THE CANNABINOID RECEPTOR LIGAND WIN-55,212-2 ON THE TNF-α PRODUCTION BY HUMAN MONONUCLEAR CELLS

E. G. Isachenko[1], T. I. Vitkina[1], and E. V. Berdyshev[2]

[1] Laboratory of Biomedical Research, Vladivostok Department of the Far-Eastern Scientific Center of Breathing Physiology and Pathology; Institute of Medical Climatology and Restorative Therapy, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Russkaya 73g, Vladivostok, 690039 Russia
[2] Institute of Marine Biology, Far East Division, Russian Academy of Sciences, ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

Synthetic cannabinoid WIN-55,212-2 produces a dose-dependent decrease on the TNF-α production by LPS-stimulated human mononuclear cells *in vitro*. The most pronounced inhibition of the TNF-α synthesis was observed for a drug concentration of 10 μM.