

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНА ЭПИФИЗА МЕЛАТОНИНА НА ИММУНОСУПРЕССИЮ, ВЫЗВАННУЮ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ *in vitro*

И. В. Ширинский, В. С. Ширинский, В. А. Козлов¹

Изучали влияние гормона эпифиза мелатонина (МЛТ) на кортизол-индуцированное снижение КонА-стимулированной пролиферации мононуклеаров периферической крови (МНК ПК) и вызванные кортизолом изменения продукции цитокинов профиля Th₁-лимфоцитов — γ -интерферона (IFN- γ) и Th₂-лимфоцитов — интерлейкина-4 (IL-4). Показано, что кортизол угнетает продукцию IFN- γ КонА-стимулированными МНК ПК и не влияет на содержание IL-4 в супернатантах культур. МЛТ в физиологических концентрациях частично ослаблял вызванное кортизолом снижение КонА-индуцированной пролиферации МНК ПК. Этот эффект МЛТ не был сопряжен с изменением продукции IL-4 и IFN- γ .

Ключевые слова: мелатонин, иммунная система, глюкокортикоиды, цитокины, Th₁ и Th₂-лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Большой интерес к гормону эпифиза мелатонину (МЛТ) в настоящее время обусловлен широким спектром его биологических эффектов, включающим регуляцию циркадных ритмов, цикла сон-бодрствование, настроения, влияние на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую и иммунную системы, опухолевый рост и репродуктивную функцию [3]. Однако сфера применения зарегистрированного в России синтетического аналога МЛТ (Мелаксен, “Unifarm”, США) в клинической практике пока ограничена лишь нарушениями сна. Более глубокое знание механизмов действия МЛТ могло бы быть основанием для расширения показаний к использованию МЛТ. Одним из свойств МЛТ является антагонизм по отношению к гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе. Так, в эксперименте *in vivo* показано, что МЛТ способен предотвращать стресс и глюкокортикоид-индуцированную иммуносупрессию *in vivo* [7]. Одним из механизмов, лежащих в основе этого феномена, может быть ингибирующее действие МЛТ на продукцию и выброс глюкокортикоидов надпочечниками [8]. Однако влияние МЛТ на действие глюкокортикоидов непосредственно на клетки иммунной системы до сих пор остается малоизученным. Исследования, посвященные этому вопросу, отличаются противоречивыми результатами [5, 9].

Целью исследования являлось изучение влияния МЛТ на вызванное глюкокортикоидами подавление пролиферации мононуклеаров периферической крови (МНК ПК) и изменение синтеза ими интерлейкина-4 (IL-4) и γ -интерферона (IFN- γ) *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали гепаринизированную венозную кровь 20 здоровых доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности ($\rho = 1,077$) фиколла-верографина. Собранные с интерфазы МНК трижды отмывали средой RPMI 1640 и готовили клеточную суспензию в культуральной среде с добавлением 10 % пулированной сыворотки АВ (IV), 5 мМ Нерес, 2 мМ L-глутамин, 0,004 % гентамицина. Выход МНК ПК в среднем составил 20 миллионов на 1 мл крови. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом трипанового синего, была не менее 95%. Для оценки пролиферации МНК ПК были помещены в 96 луночные планшеты триплетами в количестве 100 тысяч клеток на лунку. Для определения цитокинов в надосадке культур, МНК ПК культивировались триплетами в шестилуночных планшетах в концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток в лунке. Конконовалин А добавлялся в культуры в концентрации 5 мкг/мл. Для оценки пролиферации в каждую лунку за 18 ч до конца инкубации вносилось 1 μ Cu ³H-тимидина. Харвестрование проводили через 72 ч после начала культивирования, радиоактивность подсчитывали на β -счетчике. Супернатанты КонА-стимулированных культур МНК ПК собирали через 72 ч после начала культивирования и замораживали при температуре -50°C .

МЛТ (N-ацетил-5-метокситриптамин, ICN, США) вносился в культуру на 30 мин, затем проводилась однократная отмывка средой RPMI 1640. Использовались следующие дозы МЛТ: минимальная — соответствующая концентрации эндогенного МЛТ в сыворотке днем, средняя — соответствующая максимальной концентрации *in vivo* в ночное время, максимальная доза — наиболее высокой концентрации МЛТ в сыворотке после приема внутрь 1 – 5 мг МЛТ [3]. Кортизол (ICN, США) в концентрации 10^{-6} М добавляли одно-

¹ Лаборатория иммунофармакологии (зав. — проф. В. С. Ширинский) ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14.

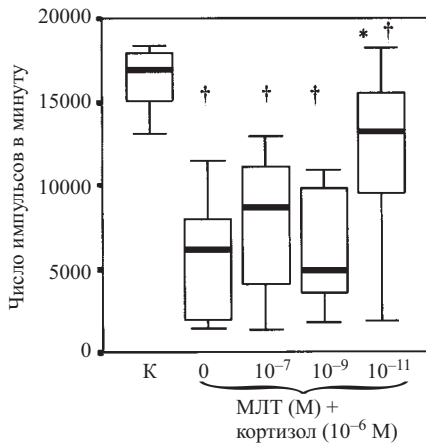


Рис. 1. Митогенстимулированная пролиферация МНК периферической крови в контроле (К) и при добавлении 10^{-6} М кортизола и преинкубацией с мелатонином в различных концентрациях.

Здесь и на рис. 2 представлены медиана, межквартильный интервал и крайние значения изменений. * — $p < 0,05$ по сравнению с пролиферацией после преинкубации с 0 М мелатонина, † — $p < 0,05$ по сравнению с пролиферацией в контроле.

временно с КонА (5 мкг/мл). Определение содержания IL-4 и IFN- γ проводилось с помощью наборов, выпускаемых фирмой ООО “Цитокин” (Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией производителя.

При статистической обработке результатов использовался критерий Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценивались влияние гидрокортизона на КонА-индуцированную пролиферацию МНК ПК здоровых людей (рис. 1) и способность МЛТ предотвращать изменения пролиферации, вызванные гидрокортизоном. Как видно из рис. 1, добавление кортизола в концентрации 10^{-6} М в культуры МНК ПК, стимулированные КонА, снижало уровень пролиферации в 2,5 раза. МЛТ в концентрации 10^{-11} М достоверно ослаблял ингибирующее действие кортизола, не угнетая его полностью.

Было ли связано ослабление ингибирующего пролиферацию действия кортизола МЛТ с изменением баланса активности Th₁/Th₂-лимфоцитов? Для ответа на этот вопрос проводилось измерение концентрации IL-4 и IFN- γ в супернатантах МНК ПК, которые преинкубировались с МЛТ в концентрации 10^{-11} М, и в которые затем добавлялся кортизол в концентрации 10^{-6} М (рис. 2). Из рис. 2 видно, что кортизол в значительной степени подавлял синтез IFN- γ *in vitro* и не влиял на продукцию IL-4. Влияния МЛТ на вызванное кортизолом снижение синтеза IFN- γ не было зарегистрировано. Отношение IL-4/IFN- γ после преинкубации с МЛТ также не изменялось.

В работе выявлено антистрессорное действие физиологических концентраций МЛТ *in vitro*, характеризовавшееся тем, что МЛТ частично ослаблял вызван-

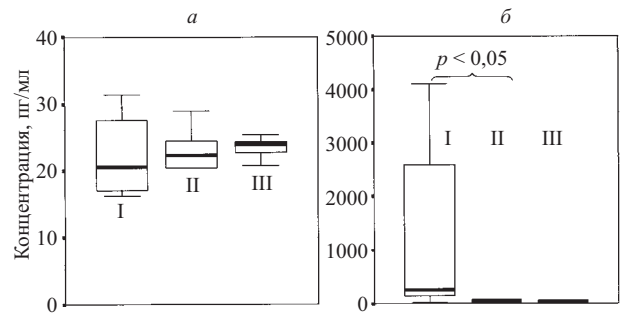


Рис. 2. Концентрации IL-4 (а) и IFN- γ (б) в супернатантах МНК ПК, культивированных с добавлением КонА (I), Кон А и кортизола (II), митогена и кортизола с преинкубацией мелатонином (III).

Обозначения те же, что на рис. 1.

ное кортизолом подавление пролиферации МНК ПК здоровых людей. Это противоречит данным единственного исследования, в котором изучалось влияние МЛТ на ингибицию дексаметазоном спонтанной пролиферации МНК ПК человека *in vitro* [5]. Авторами не было выявлено повышения пролиферации при добавлении в культуру различных концентраций МЛТ. Это противоречие можно объяснить различием экспериментальных моделей, концентраций МЛТ, которые в нашем случае колебались от 10^{-7} М до 10^{-11} М. Угнетение действия глюкокортикоидов на пролиферацию МНК ПК при добавлении МЛТ в нашем исследовании не сопровождалось изменением синтеза IL-4 и IFN- γ . Данные литературы, касающиеся влияния МЛТ на продукцию цитокинов *in vitro*, противоречивы. Так, S. Garcia-Maurino и соавт. [4] показали, что физиологические концентрации МЛТ повышали синтез IL-2, IFN- γ и IL-6, а E. S. Arzt и соавт. зарегистрировали снижение продукции IFN- γ при добавлении МЛТ в культуру МНК ПК [1]. Интерес представляют данные E. Kuhlwein и соавт. [6], в которых продемонстрировано снижение синтеза IL-10 в культурах с добавлением МЛТ, ассоциированное с повышением пролиферации МНК ПК. При этом внутриклеточная концентрация IL-10 в лимфоцитах не изменялась. Авторами была высказана гипотеза о том, что МЛТ тормозит синтез IL-10 моноцитами [6]. Известно, что моноциты могут быть более чувствительными к действию МЛТ, чем лимфоциты [2]. Исходя из этих данных, можно предположить, что в нашей модели стресса *in vitro* МЛТ повышал пролиферацию МНК ПК посредством воздействия на синтез IL-10 моноцитами.

ВЫВОДЫ

1. В условиях *in vitro* кортизол угнетает продукцию IFN- γ КонА-стимулированными МНК и не влияет на содержание IL-4 в супернатантах культур.

2. МЛТ в физиологических концентрациях частично ослаблял вызванное кортизолом снижение КонА-индуцированной пролиферации МНК ПК. Этот

эффект МЛТ не сопряжен с изменением продукции IL-4 и IFN- γ .

ЛИТЕРАТУРА

1. E. S. Arzt, S. Fernandez-Castelo, L. M. Finocchiaro, et al., *J. of Clinical Immunol.*, **8**(6), 513 – 20 (1988).
2. M. J. Barjavel, Z. Mamdouh, N. Raghbate, et al., *J. of Immunol.*, **160**(3), 1191 – 7 (1998).
3. A. Brzezinski, *New England Journal of Medicine*, **336**(3), 186 – 95 (1997).
4. S. Garcia-Maurino, M. G. Gonzalez-Haba, J. R. Calvo, et al., *J. of Immunol.*, **159**(2), 574 – 81 (1997).
5. G. Hajak, A. Rodenbeck, H. D. Ehrental, et al., *Psychopharmacol.*, **133**(4), 313 – 22 (1997).
6. E. Kuhlwein and M. Irwin, *J. of Neuroimmunol.*, **117**(1–2), 51 – 7 (2001).
7. E. Mocchegiani, L. Perissin, L. Santarelli, et al., *International J. of Immunopharmacol.*, **21**(1), 27 – 46 (1999).
8. P. Rebuffat, G. Mazzocchi, G. Gottardo, et al., *J. of Submicroscopic Cytol.*, **19**(3), 415 – 21 (1987).
9. N. Rogers, C. van den Heuvel, and D. Dawson, *J. of Pineal Research*, **22**(2), 75 – 80 (1997).

Поступила 05.09.03

EFFECT OF MELATONIN ON THE GLUCOCORTICOID-INDUCED IMMUNITY SUPPRESSION STUDIED *in vitro*

I. V. Shirinsky, V. S. Shirinsky, and V. A. Kozlov

Laboratory of Immunopharmacology, Institute of Clinical Immunology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Yadrintsevskaya ul 14, Novosibirsk, 630099 Russia

The effect of epiphyseal hormone melatonin on the cortisole-induced decrease in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation and changes in T-helper type 1 cytokine (IFN- γ) and type 2 cytokine (IL-4) expression was studied *in vitro* in cell culture supernatants. Cortisol (10^{-6} M) decreased PBMC proliferation, suppressed IFN- γ production, and did not influence IL-4 production. Melatonin in physiological concentrations (10^{-11} M) partly reduced the cortisol-induced PBMC proliferation. This effect was not associated with changes in the IFN- γ and IL-4 production in the cell culture.