

Ингибиторный эффект интерлейкина-1 β на сократительную деятельность гладких мышц капсулы лимфатических узлов

Лаборатория физиологии кровообращения Института физиологии им. И. П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург
e-mail: mpankova@bk.ru

Реферат

В ходе исследования получены данные, свидетельствующие о том, что IL-1 β (бета-лейкин) оказывает прямое ингибиторное действие на сократительную функцию капсулы лимфатических узлов быка. Релаксационные ответы гладких мышц капсулы лимфатических узлов на действие IL-1 β в концентрациях от $2,5 \cdot 10^{-15}$ до $2,5 \cdot 10^{-10}$ М/л носили дозозависимый характер и проявлялись в виде снижения амплитуды и частоты фазной сократительной активности гладких мышц и понижения тонуса. На фоне аспирина ингибиторные эффекты IL-1 β были значительно снижены, тогда как использование ингибитора синтазы NO L-NAME не предотвращало развития релаксационных ответов, инициированных применением IL-1 β .

Полученные данные дают основание полагать, что прямой ингибиторный эффект IL-1 β на сократительную активность гладких мышц капсулы лимфатических узлов реализуется преимущественно по простагландин-зависимому пути.

Ключевые слова: капсула лимфатических узлов, гладкая мышца, сократительная активность, интерлейкин-1 β .

Pankova M. N., Lobov G. I.

The inhibitory effect of IL-1 β on the contractile activity of smooth muscle capsule lymph nodes

Laboratory of Physiology, Institute of Physiology of the circulatory system. Pavlov Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
e-mail: mpankova@bk.ru

Abstract

Results of this investigation show that IL-1 β (Betaleukin) has a direct inhibitory effect on the contractile function of the bovine lymph nodes. Relaxation responses of smooth muscle of capsule of lymph nodes on the action IL-1 β at a concentration of $2,5 \cdot 10^{-15}$ M to $2,5 \cdot 10^{-10}$ M were dose-dependent manner and were manifested in the form of lower amplitude and phase frequency of contractile activity of smooth muscle and decrease of the tone. The inhibitory effects of IL-1 β were significantly decrease after previous adding of aspirin, whereas the use of an inhibitor of nitric NO L-NAME is not prevented the relaxation responses initiated by the action of IL-1 β .

The obtained data suggest that the direct inhibitory effect of IL-1 β on the contractile activity of smooth muscle capsule of lymph nodes is realized mainly by a prostaglandin-dependent pathway.

Keywords: lymph node capsule, smooth muscle, contractile activity, interleukin-1 β .

Введение

Ключевая роль лимфатических узлов в воспалительных и иммунологических реакциях организма предопределяет актуальность исследований, направленных на выяснение механизмов протекающих в них процессов.

За последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении функции лимфатических узлов в осуществлении иммунных реакций организма [8], в то же время вопрос о транспорте лимфы через узел, лежащему в основе реализации всех его физиологических функций, остается практически за пределами внимания исследователей.

В свою очередь, многие вещества, выделяющиеся при воспалении, могут в значительной степени влиять на этот транспорт, который обеспечивается за счет сократительной деятельности гладких мышц, входящих в состав капсулы лимфатического узла.

Обладея некоторыми особенностями [2, 5, 6], во многом сократительная активность гладкомышечных клеток капсулы сходна с таковой в стенке лимфатических сосудов и характеризуется наличием спонтанных фазных сокращений [4, 19] и высокой чувствительностью к различным химическим веществам [1, 3].

IL-1 β обладает множественными эффектами, преимущественно связанными с острофазными реакциями при воспалении [12], среди которых ряд исследователей отмечает его гипотензивное действие [17].

Задачей данного исследования было изучение влияния IL-1 β (беталейкина) на сократительную деятельность гладких мышц капсулы брыжеечных лимфатических узлов быка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал и методы исследования

Исследование было проведено на полосках капсулы изолированных брыжеечных лимфатических узлов быка ($n=67$). Длина полосок составляла 15 мм, ширина — 4 мм.

Эксперименты проводили при непрерывном потоке в рабочей камере фи-зиологического солевого раствора следующего состава (в мМ): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; CaCl_2 — 2,5; MgCl_2 — 1,2; NaH_2PO_4 — 1,2; NaHCO_3 — 15,5; глюкоза — 11,5. Раствор с целью оксигенации и поддержания стабильного pH (7,35–7,40) сатурировали газовой смесью, состоящей из 95 % O_2 и 5 % CO_2 . Температуру раствора поддерживали на уровне $37 \pm 0,2$ °C с помощью термостата BT-5-1 (Термех). Регистрацию сокращений гладких мышц капсулы лимфатических узлов осуществляли с помощью тензодатчика FORT-10 (WPI), работающего в изометрическом режиме, при достижении стабильного уровня через 45–50 минут после задания исходного натяжения препаратов.

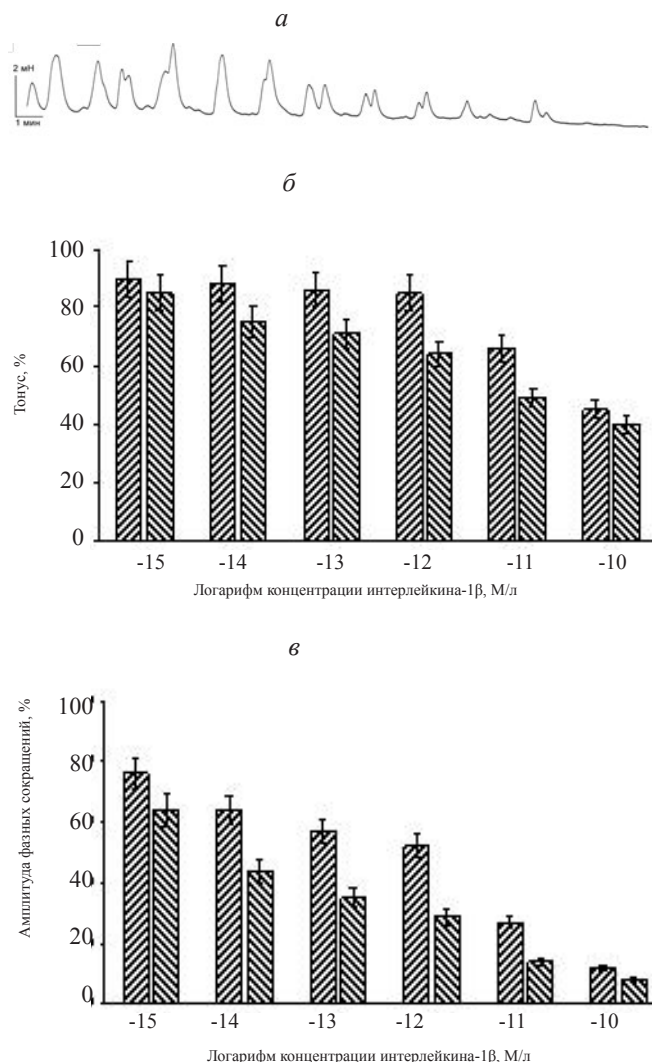


Рис. 1. Действие интерлейкина-1β на сократительную функцию капсулы лимфатических узлов: а — оригинальная кривая; б — изменения тонуса (усредненные данные); в — изменения амплитуды фазных сокращений (усредненные данные)

Запись данных, поступающих на компьютер через аналогоцифровой преобразователь (MD-155, Pavlov Institute of Physiology RAS), проводили непрерывно на протяжении всего эксперимента.

Растворы, содержащие IL-1β (беталейкин, НИИ ОЧБП), — от $2,5 \cdot 10^{-15}$ до $2,5 \cdot 10^{-10}$ М/л, acetylsalicylic acid (ICN Biomedicals) — $3 \cdot 10^{-6}$ М/л, noradrenaline hydrotartras (ICN Biomedicals) — $1 \cdot 10^{-5}$ М/л, N ω -nitro-L-arginine methyl ester — L-NAME (ICN Biomedicals) — $1 \cdot 10^{-5}$ М/л — готовили непосредственно перед экспериментами путем растворения необходимого количества указанных веществ в физиологическом растворе.

Значимость различий частоты и амплитуды фазных сокращений и уровня тонического напряжения полосок капсулы лимфатических узлов оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Регистрация сократительной деятельности капсулы лимфатических узлов в течение 1 часа после начала действия беталейкина показала, что его эффекты начинают проявляться достаточно рано. Уже к 10-й мин воздействия наблюдалось выраженное снижение параметров фазной сократительной активности (рис. 1, а). После 25–30 мин действия IL-1β в высоких концентрациях спонтанные фазные сокращения гладких мышц капсулы почти полностью исчезали. В дальнейших экспериментах в качестве контрольных точек были использованы измерения, проведенные после начала действия IL-1β на 10-й и 20-й мин воздействия.

Применение IL-1β в различных концентрациях — от $2,5 \cdot 10^{-15}$ до $2,5 \cdot 10^{-10}$ М/л — приводило к снижению параметров сократительной активности гладких мышц капсулы. Ингибиторные эффекты IL-1β частично проявлялись и в концентрациях $< 2,5 \cdot 10^{-15}$ М/л, но они носили статистически недостоверный характер. Поскольку во всех использованных концентрациях IL-1β подавлял сократительную деятельность препаратов, а физиологические и терапевтические дозы весьма низки, максимальная использованная концентрация IL-1β составила $2,5 \cdot 10^{-10}$ М/л.

Наиболее выраженным эффектом IL-1β являлось угнетение спонтанной фазной активности в виде снижения амплитуды сокращений (при использовании высоких концентраций к 20-й мин воздействия в отдельных случаях наблюдалось полное прекращение спонтанных фазных сокращений). Изменение частоты фазных сокращений было более вариабельным показателем, так как значительная редукция силы сокращений могла приводить к довольно частым мелким сокращениям, напоминающих фибрилляцию.

Статистически обработанные данные приведены на рис. 1, б, в. Введение активаторов сократительной активности гладкомышечных клеток лимфатических узлов, в частности, норадреналина ($1 \cdot 10^{-5}$ М/л), на фоне отсутствия спонтанных фазных сокращений, вызванного IL-1β, приводило к восстановлению сократительной деятельности препаратов.

Изменения тонического напряжения гладких мышц под влиянием IL-1 β были менее значительными, и для их развития требовалось больше времени. Так, применение IL-1 β ($2,5 \cdot 10^{-12}$ М/л) на 10-й мин воздействия приводило к снижению тонуса на 14,7 % от исходной величины, на 20-й мин воздействия — 35,6%, в то время как снижение амплитуды спонтанных фазных сокращений составило 48,9 и 71,4 % соответственно.

Серия экспериментов была проведена для оценки эффекта IL-1 β при экспозиции в растворе с блокатором циклооксигеназы аспирином. Введение аспирина ($3 \cdot 10^{-6}$ М/л) осуществляли за 20 мин. до начала воздействия беталейкином и продолжали в течение всего экспериментального периода. На фоне аспирина ингибиторные эффекты IL-1 β были значительно снижены (рис. 2).

Учитывая возможность участия NO, синтезируемого эндотелиальными клетками субкапсулярного синуса, в развитии релаксационных ответах капсулы лимфатических узлов [3], ряд экспериментов был проведен с применением ингибитора синтеза NO L-NAME ($5 \cdot 10^{-5}$ М/л). На его фоне беталейкин ($2,5 \cdot 10^{-12}$ М/л) к 10-й мин воздействия приводил к уменьшению амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений на 40,05 и 12,1 % соответственно и снижению тонического напряжения на 8,3 % (рис. 2).

Обсуждение результатов

Полученные данные свидетельствуют о том, что человеческий рекомбинантный IL-1 β (беталейкин) способен оказывать прямое ингибиторное действие на сократительную активность капсулы лимфатических узлов быка. Релаксационные ответы гладких мышц на действие IL-1 β , развивающиеся после многочасовой инкубации, отмечались в работах других исследователей [7, 18], однако при длительном воздействии происходит вовлечение множественных механизмов в их реализацию, включая, возможно, изменение биосинтеза белков [7]. Мы ограничили наши исследования временным диапазоном от начала воздействия до получаса. Ингибиторные эффекты IL-1 β на гладкомышечные препараты капсулы лимфатических узлов были выражены уже к 10-й мин. Существование достаточно быстрых сосудистых цитокининдуцированных ответов было продемонстрировано ранее, в том числе на изолированных кровеносных сосудах [16].

Гладкие мышцы капсулы лимфатических узлов обладают спонтанной фазной активностью, и поскольку в немногочисленных работах, проведенных на изолированных сосудистых препаратах, не способных к фазным сокращениям, регистрировали только изменение тонуса препаратов, представляет интерес изучить влияние IL-1 β на тонический и фазный компоненты сократительной деятельности. Снижение параметров спонтанных фазных сокращений происходило быстрее и было более выраженным, чем изменение тонуса, как базального, так и в условиях деполяризации, достигаемой омыванием гиперкалиевым раствором. В отдельных случаях к 20–30-й мин

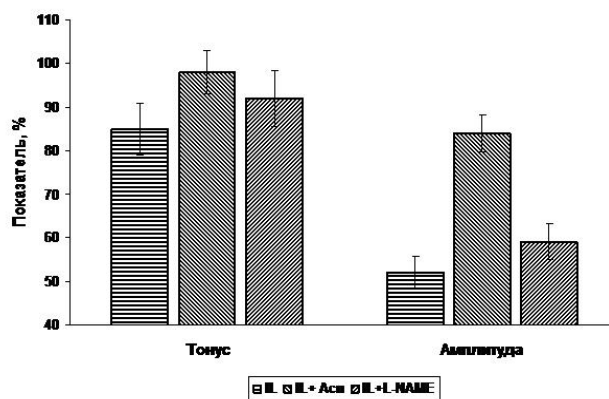


Рис. 2. Эффект интерлейкина-1 β ($2,5 \cdot 10^{-12}$ М/л) на тонус и амплитуду фазных сокращений гладких мышц капсулы лимфатических узлов на фоне аспирина и L-NAME

воздействия беталейкином фазная сократительная активность полностью прекращалась.

В дальнейшем способность норадреналина приводить к ее восстановлению свидетельствует о том, что прекращение под влиянием IL-1 β спонтанной фазной активности гладких мышц капсулы не является показателем неспособности гладких мышц к фазным сокращениям.

В ходе проведенных исследований выявлен дозозависимый характер изменений сократительных ответов гладких мышц капсулы на действие IL-1 β , проявляющийся в подавлении сократительной деятельности во всем исследованном диапазоне концентраций ($5 \cdot 10^{-15}$ до $5 \cdot 10^{-10}$ М/л).

Снижение релаксационных ответов капсулы лимфатических узлов на применение IL-1 β после предварительного введения аспирина свидетельствует о вовлечении в их развитие изменения продукции простагландинов, участвующих в релаксации.

Использование иммунореактивных методов измерения позволило установить, что в сосудистых гладких мышцах увеличение продукции PGE2 и PGI2 после стимуляции IL-1 β происходит быстро, уже к 15-й мин достигая значительного прироста [16], и хотя в дальнейшем наблюдается дальнейшее повышение их концентрации, уже этих значений достаточно для подавления сократительной активности гладкомышечных препаратов.

Известно, что характерным действием IL-1 является индукция COX-2 в некоторых клеточных типах, в то же время необходимо более длительное время, для протекания этого процесса [13].

Полученные нами быстро развивающиеся ответы могут быть объяснены возможностью стимулирующего действия IL-1 β на мобилизацию арахидоновой кислоты из клеточных липидов, приводящую к повышению уровня PGI2, до повышения экспрессии циклооксигеназы и ее активности [9, 11].

К настоящему времени хорошо известно, что многие релаксационные ответы гладкомышечных препаратов возникают вследствие действия оксида азота, выделяемого эндотелиальными клетками под влиянием разнообразных факторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интерлейкин-1 также способен стимулировать продукцию NO [10, 21] путем активации индуцибельной NO-синтазы [14, 15, 20], но вопрос о его способности влиять на активность конститутивной NOS и, таким образом, на развитие быстрых релаксационных ответов остается открытым.

В наших экспериментах использование ингибитора синтеза NO L-NAME практически не предотвращало ингибиторных эффектов IL-1 β на сократительную активность гладкомышечных клеток капсулы лимфатических узлов.

Литература

1. Булекбаева Л. Э. и др. Транспортная функция лимфатических узлов при антиортостатическом воздействии // *Росс. физиолог. журн. им. И. М. Сеченова*. 2007. Т. 93. 1. С. 39–45.
2. Лобов Г. И., Панькова М. Н. Транспорт лимфы: роль лимфатических узлов // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2012. Т. 2. 42. С. 52–56.
3. Лобов Г. И., Панькова М. Н. Транспорт лимфы по лимфатическим узлам: механизмы регуляции // *Росс. физиолог. журн. им. И. М. Сеченова*. 2012. Т. 98. 11. С. 1350–1361.
4. Мороз В. А. Сократительная активность различных участков лимфатического русла // *Лимфатический сосуд / под ред. А. В. Борисова*. Л.: ЛСГМИ, 1984. С. 65–68.
5. Петренко В. М. Структурные основы в структурной организации активного лимфооттока // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2005. Т. 2. 14. С. 5–12.
6. Петров С. В. и др. Механизмы активного транспорта лимфы // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2002. Т. 4. № 4. С. 62–67.
7. Beasley D., Cohen R. A., Levinsky N. G. Interleukin 1 Inhibits Contraction of Vascular Smooth Muscle // *J. Clin. Invest.* 1989. Vol. 83. P. 331–335.
8. Benahmed F., Ely S., Lu T. T. Lymph node vascular-stromal growth and function as a potential target for controlling immunity // *Clin. Immunol.* 2012. Vol. 144 (2). P. 109–116.
9. Breviario F. et al. Interleukin-1 stimulates prostacyclin production by cultured human endothelial cells by increasing arachidonic acid mobilization and conversion // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1990. Vol. 10. P. 129–134.
10. Busse R., Mülsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 275 (1–2). P. 87–90.
11. Camacho M., López-Belmonte J., Vila L. Rate of Vasoconstrictor Prostanoids Released by Endothelial Cells Depends on Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin I Synthase Activity // *Circ. Res.* 1998. Vol. 83. P. 353–365.
12. Dinarello C. A. et al. Multiple Biological Activities of Human Recombinant Interleukin 1 // *J. Clin. Invest.* 1986. Vol. 77. P. 1734–1739.
13. Foudi N. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition directly increases human vascular reactivity to norepinephrine during acute inflammation // *Cardiovasc. Res.* Vol. 81 (2). P. 269–277.
14. Hirokawa K. et al. Induction of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells: the role of cyclic AMP // *Br. J. Pharmacol.* 1994. Vol. 112 (2). P. 396–402.
15. Jiang B., Brecher P., Cohen R. A. Persistent Activation of Nuclear Factor- κ B by Interleukin-1 β and Subsequent Inducible NO Synthase Expression Requires Extracellular Signal-Regulated Kinase // *Arterioscl., Thrombosis. Vasc. Biol.* 2001. Vol. 21. P. 1915–1920.
16. Marceau F. et al. Human interleukin-1 induces a rapid relaxation of the rabbit isolated mesenteric artery // *Br. J. Pharmacol.* 1991. Vol. 103(2). P. 1367–1372.
17. Okusawa S. et al. Interleukin 1 Induces a Shock-like State in Rabbits // *Clin. Invest.* 1988. Vol. 81. P. 1162–1172.
18. Takizawa S., Ozaki H., Karaki H. Interleukin-1 β -induced, nitric oxide-dependent and -independent inhibition of vascular smooth muscle contraction // *Eur. J. Pharmacol.* 1997. Vol. 9 (330). P. 143–150.
19. Tümer A. et al. Spontaneous contractions and stretch-evoked responses of isolated lymph nodes // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1983. Vol. 4 (1). P. 103–113.
20. Wakabayashi I., Nakano T., Takahashi Y. Enhancement of interleukin-1 β -induced iNOS expression in cultured vascular smooth muscle cells of Goto-Kakizaki diabetes rats // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. Vol. 10 (629). P. 1–6.
21. Wen F., Watanabe K., Yoshida M. Nitric oxide enhances PGI(2) production by human pulmonary artery smooth muscle cells // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000. Vol. 62 (6). P. 369–378.
22. White L. R. et al. Cyclooxygenase inhibitors attenuate endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery // *Eur. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 448 (1). P. 51–57.

Это не исключает возможности интерференции влияний IL-1 β , опосредованных как путем усиления продукции NO, так и путем активации продукции эндотелинов [22]. Однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что NO-зависимый путь не является определяющим в осуществлении релаксации, вызванной действием беталаейкина. Таким образом, IL-1 β обладает ингибиторным действием на спонтанную фазную и тоническую сократительную активность гладких мышц капсулы лимфатических узлов, которое реализуется по простагландинзависимому пути.