

УДК 612.617.087.843

И. К. Варданян, Н. Н. Голубева
Л. С. Сеславина, М. В. Ситковский

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ НОРАДРЕНАЛИНА И АЛЬФА-АДРЕНОБЛОКАТОРОВ С ЛИМФОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ

В периодической литературе последних лет появились экспериментальные данные об участии нейромедиаторов в иммуногенезе: прослежена динамика изменений содержания катехоламинов в крови и лимфоидных органах при первичном иммунном ответе [2], в опытах *in vitro* обнаружены рецепторы к норадреналину на лимфоцитах периферической крови [10, 16] и подтверждена роль адренергической регуляции метаболизма лимфоцитов [11]. Кроме того, выявлена адренергическая иннервация лимфоидных органов [3, 4, 8]. Однако характер влияния норадреналина на иммуногенез и, в частности, на иммунокомпетентные лимфоидные клетки остается не выясненным.

Целью настоящей работы была попытка выяснить некоторые стороны взаимодействия норадреналина и его антагонистов, близких друг другу по структуре альфа-адреноблокаторов пирроксана [6] и бутироксана [5] с лимфоидными клетками в условиях *in vitro*, для чего были использованы методические подходы, позволяющие определить влияние вещества на поверхностные рецепторные структуры клетки, некоторые пути обмена и реализацию этих влияний на функциональную активность лимфоцитов.

Методика исследований

Опыты проведены на мышах-самцах линии СВА, весом 18—20 г, которых поделили на две группы: I — интактные животные, II — иммунные (на шестой — седьмой день после однократной антигенной стимуляции). В части экспериментов (определение митостатического и лимфотоксического действия препаратов) использовали мышей F₁ (СВА×С57В1).

Для исследований использовали норадреналин, гидротартрат, пирроксан и бутироксан. Конканавалин А (ФРГ) меченый изотиоцианатом флюоресценна; кроличью сыворотку против иммуноглобулинов мышей (США), меченую изотиоцианатом флюоресценна.

Антигеном служили эритроциты барана (0,2 мл 25% взвеси для однократной внутрибрюшинной иммунизации).

Для определения взаимодействия препаратов с поверхностными мембранами лимфоцитов пользовались методиками: а) образования кепок «шапочек» — кеппинг рецепторов Конканавалина А (Кон А), б) кеппинг поверхностных Ig, индуцированных кроличьей антимышиной сывороткой. Обе реакции ставили по [13] в присутствии норадреналина в двух концентрациях (1 мг/мл и 0,1 мг/мл), а также пирроксана и бутироксана в концентрации 0,1 мг/мл. Контролем служил раствор Хенкса. Проведено по 10 экспериментов с клетками тимусов и селезенки от интактных и иммунных животных. Микроскопические исследования проведены на микроскопе Люмам И-3.

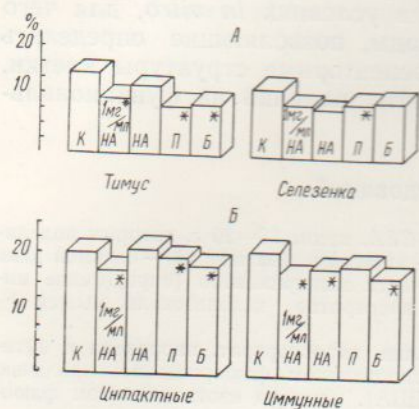
Для изучения влияния норадреналина и альфа-адреноблокаторов на метаболизм лимфоцитов исследовали митохондриальные дегидрогеназы: сукцинатдегидрогеназу (сукцинат: (акцептор)-оксидоредуктаза 1.3.99.1), определяющую активность цикла Кребса; альфа-глицерофосфатдегидрогеназу (альфа-глицерол-3-фосфат: (акцептор)-оксидоредуктаза 1.1.99.5), характеризующую взаимосвязь гликолиза и дыхания и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Д-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза 1.1.1.49), основной фермент пентозо-фосфатного пути, который служит в клетке главным поставщи-

ком рибозофосфатов, связанных в свою очередь с синтезом нуклеиновых кислот. Активность ферментов изучали по [7], контролем служила среда Игла.

Действие норадреналина и альфа-адреноблокаторов на функцию иммуокомпетентных клеток изучали на модели [9, 14], позволяющей одновременно отдифференцировать митостатическое действие препарата (подавление пролиферации стволовых клеток-предшественников клеток крови и В-лимфоцитов) от лимфотоксического, то есть непосредственного действия на Т-лимфоциты истинного иммуносупрессивного действия. Клетки лимфоузлов и костного мозга доноров обрабатывали в течение часа норадреналином (1,25 и 30 мг/мл), пирроксаном или бутироксаном 1,25, 50, 100 и 130 мг/мл *in vitro* при 37°С (контролем служила среда 199) перед введением их в организм реципиента. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента и *U* — Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты исследований

Взаимодействие норадреналина и альфа-адреноблокаторов с поверхностной мембраной лимфоцитов изучали в экспериментах по определению кеппинга (латеральной диффузии) рецепторов Кон А, представляющих собой интегральные мембранные гликопротеиды с маннозидными остатками в углеводных цепях. Об изменении состояния поверхностных мембран под действием норадреналина, пирроксана и бутироксана судили по изменению параметров лектин-индуцированного перераспределения рецепторов Кон А. После мечения клеток лектином и инкубации при 37°С, то есть в температурных условиях, способствующих латеральной диффузии компонентов биологических мембран [12] на периферии клеточной оболочки появляются большие скопления рецепторов — «кластеры», которые затем собираются на одном из полюсов клетки и образуют так называемые «шапки» — кепы. Как



Влияние норадреналина и альфа-адреноблокаторов (мг/мл) на кеппинг рецепторов Кон А и поверхностных Ig.

А — кеппинг рецепторов Кон А на лимфоцитах intactных мышей, Б — кеппинг поверхностных Ig на клетках селезенки intactных и иммунных мышей. К — контроль, НА — норадреналин, П — пирроксан, Б — бутироксан, * — $p < 0,05$.

видно из рисунка, обнаружено достоверное снижение кеппинга рецепторов Кон А в клетках тимуса intactных животных под действием норадреналина (1 мг/мл), пирроксана и бутироксана (0,1 мг/мл); пирроксан также снижал кеппинг рецепторов Кон А в селезенке intactных животных. В клетках тимуса и селезенки иммунных животных параметры кеппинга рецепторов Кон А после контакта с норадреналином, пирроксаном и бутироксаном не отличались от контроля. Таким образом, установлено изменение состояния поверхностных мембран лимфоидных клеток тимуса и отчасти селезенки intactных животных под действием норадреналина, пирроксана и бутироксана. В экспериментах по определению анти-Ig индуцированного кеппинга поверхностных иммуноглобулинов было установлено (см. рисунок), что в клетках селезенки intactных животных латеральная диффузия Ig поверхностных

мембран снижается только при действии высокой дозы норадреналина (1 мг/мл), а также обоих альфа-адреноблокаторов. В клетках селезенки иммунных животных параметры кеппинга в контроле достоверно ниже, чем в контроле у интактных животных. В этой группе (иммунных мышей) было отмечено снижение кеппинга под действием обеих доз норадреналина (1 и 0,1 мг/мл), а также бутироксана. Следовательно, норадреналин и альфа-адреноблокаторы вызывают физико-химические изменения поверхностных мембран лимфоцитов, что выражается в снижении кеппинга рецепторов Кон А только в клетках интактных животных, тогда как при кеппинге поверхностных Ig снижение параметров наблюдается также в клетках иммунных животных.

Таблица 1

Действие норадреналина и альфа-адреноблокаторов на активность митохондриальных дегидрогеназ лимфоцитов

Препарат	Клетки интактных животных						Клетки иммунных животных					
	тимус			селезенка			тимус			селезенка		
	СДГ	α-ГФДГ	ГЛ-6-ФДГ	СДГ	α-ГФДГ	ГЛ-6-ФДГ	СДГ	α-ГФДГ	ГЛ-6-ФДГ	СДГ	α-ГФДГ	ГЛ-6-ФДГ
Норадреналин	↑	↓	0	0	↓	0	0	0	↑	0	0	0
Пирроксан	0	0	0	0	↓	0	↓	↓	0	↓	↑	0
Бутироксан	↓	↓	0	0	0	0	↓	0	↑	0	↑	0

Примечание. ↑ — достоверное увеличение, ↓ — достоверное снижение, 0 — без изменений.

Влияние норадреналина и альфа-адреноблокаторов на метаболизм лимфоцитов. В этой серии экспериментов все препараты применяли в концентрации 10 мкг/мл. Как видно из табл. 1, норадреналин вызывает разобщение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (α-ГФДГ) в клетках тимуса и, в меньшей степени, селезенки интактных животных; подобный же эффект проявляет пирроксан в клетках селезенки интактных животных, тогда как бутироксан ингибирует активность СДГ и α-ГФДГ, не изменяя ее в клетках селезенки. Иной характер изменений активности митохондриальных дегидрогеназ при контакте с норадреналином и альфа-адреноблокаторами выявлен в клетках иммунных животных. Норадреналин не оказывал влияния на СДГ и α-ГФДГ клеток тимуса и селезенки, тогда как пирроксан ингибировал активность этих ферментов в тимусе, а в селезенке вызывал их разобщение; бутироксан разобщал активность СДГ и α-ГФДГ в клетках тимуса и селезенки. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГЛ-6-ФДГ) увеличивалась только в клетках тимуса иммунных животных как посредством норадреналина, так и бутироксана. Таким образом, выявлено разнонаправленное действие норадреналина и его блокаторов в клетках интактного тимуса, а также иммунной селезенки.

Влияние норадреналина и альфа-адреноблокаторов на функцию лимфоидных клеток. Обработка донорских клеток лимфоузлов и костного мозга норадреналином и альфа-адреноблокаторами в течение одного часа с последующим введением их в организм реципиента с целью культивирования *in vitro* позволила установить (табл. 2), что норадреналин в дозе 25 мг/мл обладает стимулирующим действием на митогенез, тогда как пирроксан, напротив, его угнетает. Оба альфа-

Таблица 2
Определение митостатического и лимфотоксического действия норадреналина и альфа-адреноблокаторов при обработке клеток *in vitro*

Препарат	Дозы, в мг/мл	Среднее число экзогенных колоний в селезенке летально облученных мышей при трансплантации клеток костного мозга 1×10^5 (митостатическое действие)	<i>p</i>	Среднее число эндоколоний в селезенках сублетально облученных мышей при трансплантации клеток лимфоузлов 1×10^5 (лимфотоксическое действие)	<i>p</i>
Контроль без введения клеток и препаратов					
Контроль клеток		$27,7 \pm 1,4$		$2,7 \pm 1,4$	
Норадреналин				$0,4 \pm 0,2$	
	1	$25,8 \pm 3,2$			
	25	$33,6 \pm 2,3$		$1,0 \pm 0,47$	
	30	$29,2 \pm 2,9$	0,05	$0,6 \pm 0,27$	
Пирроксан	1	$3,7 \pm 0,7$		$2,3 \pm 1,99$	
	25	$0,13 \pm 1,13$	0,01	$4,1 \pm 1,2$	0,02
	50	$1,5 \pm 1,2$	0,01	$3,9 \pm 1,2$	0,01
	100	0 ± 0	0,01	$4,2 \pm 1,6$	0,05
	130	0 ± 0	0,01	$3,1 \pm 0,9$	0,02
Бутироксан	1	$27,6 \pm 2,5$	0,01	$8,7 \pm 3,7$	0,01
	25	$23,2 \pm 3,1$		$2,9 \pm 0,86$	0,05
	50	$28,7 \pm 1,9$		$1,9 \pm 0,77$	
	100	$31,7 \pm 2,6$		$2,5 \pm 0,98$	0,1
	130	$23,0 \pm 9,45$		$3,0 \pm 1,64$	
				$2,6 \pm 0,69$	0,02

Примечание. значения *p* проставлены только при достоверных изменениях.

адреноблокатора оказывали цитотоксическое действие на лимфоциты. Таким образом, в этой серии экспериментов, как и при изучении метаболизма получена разнонаправленность действия норадреналина и, по крайней мере одного из альфа-адреноблокаторов.

Обсуждение результатов исследований

Наши данные по изучению действия норадреналина и альфа-адреноблокаторов позволяют считать, что взаимодействие этих препаратов с поверхностными мембранами лимфоидных клеток реализуется посредством изменения некоторых сторон метаболизма на функциональном уровне. (табл. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что норадреналин как и альфа-адреноблокаторы снижает параметры кеппинга рецепторов Кон А и поверхностных Ig, причем этот эффект проявляется не во всех концентрациях норадреналина, а только в дозе 1 мг/мл и не во всех сериях экспериментов. Так, в клетках тимуса интактных животных наблюдается ингибция параметров кеппинга рецепторов Кон А всеми препаратами и отсутствие этого эффекта на тимоцитах иммунных животных.

В клетках селезенки интактных животных только пирроксан ингибировал кеппинг рецепторов Кон А, тогда как в клетках селезенки группы иммунных животных ни один из препаратов не изменял величину кеппинга по сравнению с контролем. Совершенно иные изменения выявлены при изучении кеппинга поверхностных Ig. Отмечалось снижение параметров латеральной диффузии Ig поверхностной мембраны под действием норадреналина (1 мг/мл), пирроксана и бутироксана в клетках интактных селезенки, тогда как в клетках селезенки

Таблица 3

Суммарные данные по влиянию норадреналина и альфа-адреноблокаторов на поверхность, обмен и функцию лимфоцитов

Препараты, в мг/мл	Поверхностные мембраны		Обмен		Функция по эффекту
	Рецепторы к Кон А	Ig	СДГ	α-ГФДГ	
Тимоциты интактных животных					
Норадреналин					цитотоксическо-
1	↓	—	—	—	му
0,1	0	—	0 ↑	0 ↓	0
Пирроксан	↓	—	0 ↓	0 ↓	—
Бутироксан	↓	—	0 ↓	0 ↓	↑
Тимоциты иммунных животных					
Норадреналин					
1	0	—	—	—	0
0,1	0	—	0 ↓	0 ↓	—
Пирроксан	0	—	0 ↓	0 ↓	↑
Бутироксан	0	—	0 ↓	0 ↓	↑
Лимфоциты селезенки интактных животных					
Норадреналин					митостатическо-
1	0	↓	—	—	му
0,1	0	0	0 ↓	—	—
Пирроксан	↓	↓	0 ↓	0	0 ↓
Бутироксан	0	↓	0 ↓	0	0 ↓
Лимфоциты селезенки иммунных животных					
Норадреналин					
1	0	↓	—	—	↑
0,1	0	0	0 ↓	0 ↑	0
Пирроксан	0	0	0 ↓	0 ↑	0 ↓
Бутироксан	0	↓	0 ↓	0 ↑	0 ↓

Примечание. ↑ — достоверное повышение по сравнению с контролем, ↓ — достоверное снижение по сравнению с контролем, 0 — отсутствие эффекта, «—» — эксперимент не ставили, ↑↑ — тенденция к повышению по сравнению с контролем, ↓↓ — тенденция к снижению по сравнению с контролем.

группы иммунных животных отмечено ингибирующее действие обеих доз норадреналина и бутироксана. Согласно модели строения клеточной мембраны [15], снижение латеральной диффузии таких интегральных белков поверхностной мембраны как Ig и рецепторы Кон А-гликопротеиды, указывает на определенные физико-химические изменения ее свойств, а именно, снижение «жидкости». Полученные результаты свидетельствуют о том, что как норадреналин, так и оба альфа-адреноблокатора взаимодействуют с поверхностными мембранами разных лимфоидных органов, оказывая однонаправленное влияние. Вместе с тем, вероятно, рецептивные участки Кон А и Ig поверхностных мембран не являются идентичными с точки зрения их различного поведения при взаимодействии с норадреналином и альфа-адреноблокаторами. Следует также отметить, что при достаточно высоких концентрациях норадреналина вызываемые им эффекты могут быть следствием стимуляции β-адренорецепторов [1]. Изменения, вызванные норадреналином и альфа-адреноблокаторами в метаболизме не являются однонаправленными, как и в рецепторах поверхностных мембран.

Показано, что норадреналин разобщает метаболизм в клетках интактного тимуса, активируя СДГ и снижая активность α -ГФДГ. Такого типа разобщения альфа-адреноблокаторы ни в одной серии экспериментов не дают. В клетках иммунного тимуса норадреналин не вызывает разобщение гликолиза и дыхания, но активирует ГЛ-6-ФДГ, то есть пентозо-фосфатный путь. Анализируя изменения метаболизма под действием альфа-адреноблокаторов, следует обратить внимание на тот факт, что в клетках тимуса и селезенки интактных мышей они, в основном, обладали однонаправленным эффектом, снижая активность одного или обоих ферментов или проявляя тенденцию к этому снижению. В то же время в клетках селезенки иммунных животных пирроксан и бутироксан разобщали (более выражено при применении пирроксана) активность гликолиза и дыхания вследствие активации гликолиза. Бутироксан, как и норадреналин, повышал активность ГЛ-6-ФДГ. Таким образом, модификация норадреналином, пирроксаном и бутироксаном физико-химических свойств поверхностных мембран лимфоцитов (так называемый «трансмембранный сигнал») по-разному реализуется на метаболическом уровне. Эта разнонаправленность метаболических изменений сказывается на функциональной активности клеток. Так, если норадреналин не обладал цитотоксическим эффектом на *T*-клетки, то пирроксан и бутироксан оказывали на них достоверное лимфотоксическое действие. То же самое следует отметить и в отношении действия на митогенез клеток предшественников *B*-лимфоцитов и клеток крови. Если норадреналин стимулировал митогенез, то пирроксан достоверно снижал этот процесс, а бутироксан вызывал тенденцию клеток к снижению митогенеза. Полученные данные свидетельствуют о сложных механизмах взаимодействия норадреналина и альфа-адреноблокаторов с поверхностными мембранами лимфоцитов, что находит свое отражение в различном их действии на метаболизм и функцию иммунокомпетентных клеток, свидетельствуя о различии в структуре их активных центров.

Выводы

1. Норадреналин и альфа-адреноблокаторы изменяют физико-химическую структуру поверхностных мембран лимфоцитов лимфоидных органов.
2. Норадреналин и альфа-адреноблокаторы оказывают разнонаправленное влияние на метаболизм клеток тимуса и селезенки интактных и иммунных животных.
3. Норадреналин и альфа-адреноблокаторы разнонаправленно изменяют функциональные свойства лимфоцитов: норадреналин стимулирует митогенез и не обладает цитотоксическим действием на *T*-лимфоциты; альфа-адреноблокаторы снижают митогенез стволовых клеток предшественников *B*-лимфоцитов и обладают лимфотоксическим действием.

Литература

1. Авакян О. М. Симпато-адреналовая система.— Ленинград: Наука, 1977.—286 с.
2. Васина И. Г., Полосина О. Б., Цыпин А. Б., Шальнев Б. И. Особенности содержания катехоламинов в органах иммуногенеза при антигенной нагрузке.—В кн.: Физиология иммунного гомеостаза. Ростов н/Дону, 1977, с. 54—55.
3. Гордон Д. С., Зеленова И. Г., Леонова Л. К., Сергеева В. Е., Михеева З. И. Адренергические структуры лимфоидной ткани, зобной железы, нервных ганглиев, надпочечников.—В кн.: Тезисы VIII Всес. съезда анатомов, гистологов, эмбриологов. Ташкент, 1974, с. 106.

4. Зеленова И. Г. Адренергическая иннервация селезенки кошки.— Архив анат. гистол. и эмбриол., 1971, 60, № 2, с. 38—41.
5. Крылов С. С., Старых Н. Т., Кузнецов С. Г., Чигарев А. Г. А. с. 513699 (СССР). Лекарственное средство, обладающее адреноблокирующим действием.—Опубл. Б. И., 1976, № 18, (15 мая).
6. Крылов С. С., Старых Н. Т. Фармакологическая характеристика пирроксана.—Фармакол. и токсикол., 1973, 36, № 4, с. 396—399.
7. Нарциссов Р. П. Применение п-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека.— Архив анатом., гистол. и эмбриол., 1969, 56, № 5, с. 85—91.
8. Сергеева В. Е., Дзамашвили К. С., Тимофеева Г. М. Внутриорганный иннервация тимуса с дифференцированным выявлением вегетативных компонентов.— Архив анатом., гистол. и эмбриол., 1974, 96, № 6, с. 56—64.
9. Петров Р. В., Манько В. М., Хаитов Р. М., Сеславина Л. С. Экспериментальная модель одновременного определения митостатического и лимфотоксического действия цитостатиков и иммунодепрессоров.— Цитология, 1972, 14, № 1, с. 121—127.
10. Hadden J. W., Hadden E. M., Middleton E. Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes.— Cell. Immunol., 1970, N 1, p. 583—595.
11. Hadden J. W., Hadden E. M., Good R. A. Adrenergic mechanisms in human lymphocyte metabolism.— Biochim. et biophysica acta, 1971, 237, p. 339—347.
12. Nicolson G. L. Temperature-dependent mobility of Concanavalin A sites on tumor cell surfaces.— Nature (New Biol.), 1973, 243, p. 218—220.
13. de Petris S. Concanavalin A receptors, immunoglobulins and O antigen of the lymphocyte surface. Interactions with Concanavalin A and with cytoplasmic structures.— Cell Biol., 1975, 65, p. 123—146.
14. Petrov R. V., Manyo V. M., Khaitov R. M., Seslavina L. S. An experimental system for simultaneous estimation of mitostatic and lymphotoxic effects of immunosuppressants and cytostatics.— J. Exper. med., 1971, 133, p. 640—648.
15. Singer S. J. The molecular organisation of biological membranes.—In: Structure and function of biological membranes. N. Y., 1971, p. 145—222.
16. Weinstein V., Melmon K. L., Bourne H. R., Sela M. Specific leucocyte receptor for small endogeneous hormones. Detection by cell binding to insolubilised hormone preparations.— J. Clin. Invest., 1974, 52, N 6, p. 1349—1361.

Лаборатория по пересадке органов
и тканей АМН СССР, Москва

Поступила в редакцию
2.II 1979 г.

I. K. Vardanyan, N. N. Golubeva, L. S. Seslavina, M. V. Sitkovsky

ON THE PROBLEM OF INTERACTION OF NOREPINEPHRINE AND α -ADRENOBLOCKING AGENTS WITH LYMPHOID CELLS

Summary

An attempt is made to find out the effect of norepinephrine and alpha-adrenoblocking agents on the lymphocyte surface membranes and realization of a transmembrane signal at the metabolic and functional level of the immunocompetent cells. It is shown that unidirectional inhibitory effect of the above drugs provokes different changes in metabolism, which results in various functional changes of immunocompetent cells.

Laboratory of Organ and Tissue Transplantation,
Academy of Medical Sciences, USSR, Moscow