

Т. В. Мартинова, І. М. Алексєєва, Т. М. Бризгіна, Л.І. Алексюк, В. С. Сухіна

## Вплив блокаторів цикло- та ліпоксигеназного шляхів метаболізму арахідонової кислоти на розвиток і супресію імунної відповіді у мишей

*Изучали влияние блокаторов циклооксигеназного и липоксигеназного путей метаболизма арахидоновой кислоты (АК) – индометацина (ИМ) и нордигидрогуаяретовой кислоты (НДГК) соответственно на развитие гуморального иммунного ответа у мышей линии СВА на гетероантиген – эритроциты барана (ЭБ), процесс формирования антигениндуцированных (толерогенной дозой ЭБ) Т-супрессоров (АИТс), и их функциональную активность. Иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток в селезенке мышей. Функциональную активность АИТс определяли в системе адоптивного переноса по интенсивности подавления иммунного ответа у мышей-реципиентов. Установлено, что оба блокатора оказывают преимущественно стимулирующий эффект на иммунный ответ, более выраженный при применении НДГК, и зависящий от фазы иммунного ответа. Стимуляция иммунного ответа связана с угнетением формирования АИТс и снижением их функциональной активности.*

### ВСТУП

Відомо, що арахідонова кислота (АК) може за участю циклооксигенази або ліпоксигенази окиснюватися двома шляхами, які призводять до утворення біологічно активних молекул-медіаторів - простагландинів (ПГ) і лейкотриснів (ЛТ) відповідно [4]. Вивчення ефектів ендогенних біорегуляторів ліпідної природи – ПГ і ЛТ нині вважається одним з перспективних напрямків, який може зробити певний внесок у розуміння механізмів регуляції міжклітинних комунікацій, в тому числі і в імунній відповіді, як в нормі так і при патології. Показано, що ПГ Е (зокрема ПГ Е<sub>2</sub>) пригнічують активацію та проліферацію Т-клітин і вироблення інтерлейкіна-2 (ІЛ-2) [8, 11], а ЛТ посилюють утворення ІЛ-2 і індукують утворення супресорних лімфоцитів [3, 9, 13]. Встановлено, що ЛТВ<sub>4</sub> дозозалежно знижує здатність сти-

мульованих фітогемаглютиніном лімфоцитів людини генерувати фактор гальмування міграції, а також помірно пригнічувати бласттрансформацію [2,14]. Потребує подальшого вивчення роль продуктів метаболізму АК у розвитку імунної відповіді в різних її ланках. Одним з підходів для з'ясування значення ПГ і ЛТ у фізіологічних процесах є застосування блокаторів їх синтезу.

Метою нашої роботи було вивчення впливу блокаторів циклооксигеназного та ліпоксигеназного шляхів метаболізму АК – індометацину (ІМ) та нордигідрогуаяретової кислоти (НДГК) відповідно – на розвиток гуморальної імунної відповіді мишей на гетероантиген – еритроцити барана (ЕБ), на рівні формування як антитілоутворюючих клітин (АУК), так і регуляторних клітин – антигеніндукованих Т-супресорів (АИТс) і їх функціональну активність.

© Т. В. Мартинова, І. М. Алексєєва, Т. М. Бризгіна, Л.І. Алексюк, В. С. Сухіна

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 250 мишах лінії СВА масою 18 – 22 г. Імунну відповідь викликали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням ЕБ в імуногенній дозі ( $2,5 \cdot 10^8$  клітин) і оцінювали за накопиченням АУК у селезінці на 1, 5 та 14-ту добу за методом локального гемолізу в гелі [5]. АІТс у селезінці мишей індукували одноразовим внутрішньоочеревинним введенням ЕБ у толерогенній дозі ( $1,5 \cdot 10^9$ ). Їх біологічну активність тестували в системі адаптивного переносу за методом Писарева та Певницького [6]. Для цього мишам-реципієнтам внутрішньовенно за 1 год до ін'єкцій імуногенної дози ЕБ вводили  $5 \cdot 10^7$  клітин селезінки. На 1, 5 та 14-ту добу в селезінці мишей-реципієнтів підраховували кількість АУК.

Для блокади циклооксигеназного шляху метаболізму АК застосовували ІМ («Sigma», США) в дозах 0,25 мг/кг (мала доза) та 5 мг/кг (велика доза) [1]. Для блокади ліпоксигеназного шляху застосовували НДГК («Sigma», США) в дозі 0,25 і 30 мг/кг (велика доза) в об'ємі 0,5 мл [10, 12]. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин.

Проведено три серії дослідів. У І серії вивчали вплив ІМ і НДГК на розвиток імунної відповіді мишей на ЕБ. Блокатори вводили внутрішньоочеревинно протягом трьох діб. Останнє введення збігалось з ін'єкцією ЕБ.

У ІІ серії вивчали вплив ІМ і НДГК на процес формування АІТс. Блокатори теж вводили протягом трьох діб, де друга ін'єкція блокаторів збігалась з введенням толерогенної дози ЕБ. На 1, 5 та 14-ту добу після

введення ЕБ мишей забивали під ефірним наркозом, видоляли селезінку, готували клітинну суспензію. Потім цю суспензію, збагачену АІТс, вводили мишам-реципієнтам для тестування активності АІТс за даними утворення АУК у селезінці у відповідь на імуногенну дозу ЕБ.

У ІІІ серії вивчали вплив ІМ і НДГК на активність зрілих АІТс. У цій серії остання ін'єкція блокаторів мишам реципієнтам збігалась з введенням їм клітин-супресорів та імуногенної дози ЕБ. На 1, 5 та 14-ту добу підраховували кількість АУК у селезінці мишей-реципієнтів. Клітини-супресори одержували на 14-ту добу (пік накопичення супресорів) після введення мишам-донорам толерогенної дози ЕБ.

Статистичну обробку результатів проводили методом різниць за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У І серії дослідів (табл. 1, 2) показано, що ІМ і НДГК впливали на інтенсивність імунної відповіді, переважно стимулюючи її. ІМ дозозалежно стимулював імунну відповідь у всі терміни досліджень. Більша доза викликала істотне накопичення АУК у селезінці: на 1-шу добу на 124%, на 5-ту добу на 20% і на 14-ту добу на 176% більше відносно контролю. При використанні меншої дози значення цих показників були нижчими, але також перевищували контрольне значення – на 84, 5 і 60% на 1, 5 та 14-ту добу відповідно.

НДГК також переважно чинив дозозалежну стимуляцію імунної відповіді. Мала доза препарату суттєво впливала на інтен-

Таблиця 1. Зміни кількості антитілоутворюючих клітин у селезінці мишей, які отримували еритроцити барана (ЕБ) та індометацин (ІМ)

Схема дослідів	1-ша доба	5-та доба	14-та доба
ЕБ (контроль)	135±46	15289±1147	254±40
ЕБ і ІМ у дозі 0,25 мг/кг	249±3*	16048±2301	407±94
ЕБ і ІМ у дозі 5 мг/кг	303±94	18323±2241	700±292

\*P<0,05

Таблиця 2. Зміни кількості антитілоутворюючих клітин у селезінці мишей, які отримували еритроцити барана (ЕБ) та нордигідрогуаяретову кислоту (НДГК)

Схема досліджу	1-ша доба	5-та доба	14-та доба
ЕБ (контроль)	25±76	20781±1314	73±15
ЕБ і НДГК у дозі 0,25мг/кг	126±24*	25925±1434*	87±7
ЕБ і НДГК у дозі 30мг/кг	46±17	15191±1879	209±38*

\*P&lt;0,05

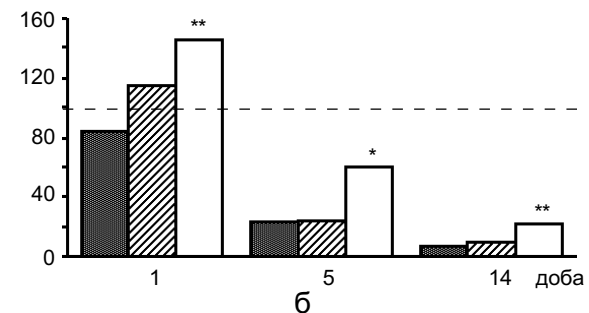
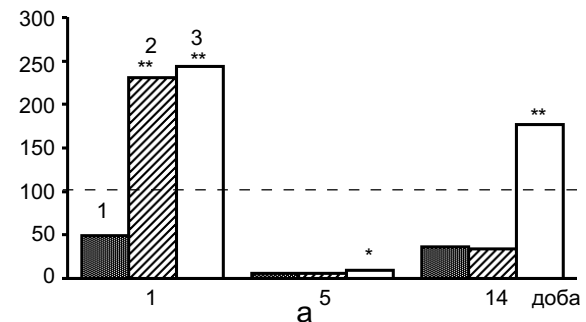
сивність імунної відповіді тільки в 1-шу добу (збільшувалася на 404% відносно контролю), на 5-ту та 14-ту добу стимуляція була незначною (на 25 і 19% перевищувала контрольне значення). Водночас велика доза НДГК викликала суттєву стимуляцію імунної відповіді на 14-ту та 1-шу добу (на 186 та 84% відповідно) і тільки в продуктивну фазу – на 5-ту добу – пригнічення імунної відповіді на 27% відносно контролю.

Отримані результати свідчать, що імунна відповідь є процесом залежним від дії ПГ і ЛТ, пригнічення їх синтезу переважно стимулює її. Стимулюючий ефект блокатора ліпоксигеназ виражений більше, ніж блокатора циклооксигенази. Внесок різних метаболітів АК неоднаковий на різних етапах імунної відповіді. Порівняння залежності активності ІМ і НДГК від дози показало, що більша доза блокаторів, то виразніша їх імуномодулююча дія. У зв'язку з цим у II і III серіях досліджень ми використовували лише великі дози: ІМ – 5мг/кг і НДГК – 30мг/кг.

Стимуляція імунної відповіді при застосуванні ІМ і НДГК навела на думку про можливий вплив цих блокаторів на утворення і функціональну активність регуляторних клітин, зокрема АІТс. Для перевірки цього припущення проведено дві наступні серії досліджень.

У II серії дослідів (рисунок, а) встановлено, що попереднє введення ІМ або НДГК мишам, у яких індукували утворення АІТс, гальмує формування цих клітин. Так, на 1-шу добу спостерігали повну відміну формування супресорів. Обидва блокатора на-

віль стимулювали імунну відповідь. Про це свідчить значне збільшення кількості АУК у селезінці мишей-реципієнтів: з 21398 ± 1911 при перенесенні їм клітин селезінки, збагачених АІТс (від донорів без блокаторів) до 29245±6220 та 37163± 2110 (від донорів з – ІМ і АІТс і НДГК і АІТс відповідно). При цьому ефект НДГК був більш вираженим – накопичення АУК при дії НДГК



Вплив індометацину (ІМ) та нордигідрогуаяретової кислоти (НДГК) на формування (а) і функціональну активність (б) антигеніндукованих Т-супресорів (АІТс) у селезінці мишей.

1 - АІТс без блокаторів; 2 - АІТс і ІМ (5 мг/кг); 3 - АІТс і НДГК (30 мг/кг). За віссю ординат: кількість АУКУ відсотках від контролю (введення ЕБ). За віссю абсцис: строки дослідження (добы).

\*P&lt;0,05; \*\*P&lt;0,001 – відносно дії АІТс.

перевищувало контрольне значення (кількість АУК на ЕБ  $25402 \pm 1449$ ) на 46%, при дії ІМ – на 15%.

У наступні строки після введення толерантної дози ЕБ – на 5-ту та 14-ту добу застосування ІМ не виявило значного впливу на формування АІТс. Водночас НДГК істотно пригнічувала формування АІТс. Так, під його впливом кількість АУК збільшувалася на 37% з  $6424 \pm 1033$  (АІТс без дії блокаторів) до  $16604 \pm 2121$  (НДГК і АІТс) відносно контролю ( $27758 \pm 1777$ ) на 5-ту добу та на 16% з  $1013 \pm 144$  до  $3993 \pm 541$  відповідно (при контролі  $18132 \pm 1035$ ) на 14-ту добу.

Таким чином, попереднє пригнічення синтезу ПГ або ЛТ за допомогою блокаторів призводить до гальмування початкового етапу формування АІТс. Участь ЛТ у модуляції формування АІТс припускається провідною.

У ІІІ серії дослідів (див. рисунок, б) встановлено, що на різних фазах імунної відповіді функціональна активність зрілих АІТс, які переносили мишам-реципієнтам, котрі одержували імуногенну дозу ЕБ, теж є чутливою до дії ІМ і НДГК. Внаслідок цього імунна відповідь змінювалася: спостерігалися періоди як збільшення, так і зниження залежно від фази її розвитку. В індуктивну фазу (1-ша доба після введення ЕБ) обидва блокатори майже паралізують функціональну активність зрілих АІТс, через те кількість АУК збільшується з  $84 \pm 13$  (АІТс без дії блокатора) до  $397 \pm 42$  при ІМ і АІТс і до  $419 \pm 116$  при НДГК і АІТс. У продуктивну фазу імунної відповіді (5-та доба) спостерігалось значне пригнічення накопичення АУК у селезінці тварин усіх груп (АІТс, ІМ і АІТс, НДГК і АІТс) порівняно з контролем. У групі тварин, яким вводили НДГК, функція супресорів дещо пригнічувалася, про що свідчило збільшення кількості АУК до  $1177 \pm 101$  щодо  $742 \pm 159$  (АІТс без дії блокатора). У фазу затухання імунної відповіді (14-та доба) застосування НДГК, призводило до повної відміни дії супресорів.

Так, кількість АУК при НДГК збільшилося до  $478 \pm 44$  щодо  $92 \pm 20$  (АІТс без дії блокатора).

Отже, при впливі блокаторів циклооксигенази або ліпоксигенази на активність зрілих АІТс ефект ІМ і НДГК відповідно в індуктивну фазу імунної відповіді був однаковим – відміна супресорної активності, а в продуктивну та фазу згасання імунної відповіді ефект цих блокаторів був різним: ІМ – посилював, а НДГК – гальмувала активність супресорів.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що продукти метаболізму АК модулюють гуморальну імунну відповідь, що позначається на одній з кінцевих ланок – формуванні АУК у селезінці. Посилення імунної відповіді при дії блокаторів метаболізму АК пов'язане з пригніченням формування антигеніндукованих клітин – супресорів і зниженням їх функціональної активності. Звичайно, взявши до уваги багатоланцюговість імунної відповіді, можна очікувати вплив зазначених речовин і на інші ланки. Оскільки супресорні клітини є суттєвим фактором регуляції імунної відповіді, зміни їх кількості і активності можуть відігравати вирішальну роль в її модуляції продуктами метаболізму АК.

Дані літератури про порівняльний вплив метаболітів АК на імунну відповідь суперечливі. Більшість з них засвідчує майже протилежний ефект ПГ і ЛТ [3, 8, 9, 11, 13]. Результати наших дослідів показали, що блокатори як циклооксигенази, так і ліпоксигенази дозозалежно стимулюють гуморальну імунну відповідь, але вплив блокатора ліпоксигеназ виражений значно більше. Така ж закономірність виявилася і в ефекті блокаторів на утворення антигеніндукованих клітин-супресорів у селезінці і їх функціональну активність: блокатор ліпоксигеназ (НДГК) більшою мірою пригнічував супресори, а інколи відміняв здатність досліджуваних клітин бути супресорами. Це дає змогу вважати, що продукти ліпокси-

геназ (ЛТ) можуть бути для Т-клітин супресорними факторами, або посередниками їх утворення. Пригнічувальний ефект ІМ виявлявся лише в індуктивну фазу імунної відповіді. За допомогою ІМ встановлено, що продукти циклооксигеназ (ПГ) не можуть повністю претендувати на роль супресорного фактора, або його індуктора для Т-клітин, бо пригнічення їх синтезу посилювало активність зрілих АІТс в окремі фази імунної відповіді (мабуть внаслідок накопичення ЛТ). Це узгоджується з даними [7] про вплив ІМ на посилення індукованої супресії.

**T. V. Martynova, I. N. Alexeyeva, T. M. Bryzgina,  
L. A. Alekseyuk, V. S. Sukhina**

**EFFECT OF INHIBITORS OF CYCLOOXYGENASE AND LYPOXYGENASE PATHWAYS OF METABOLISM OF ARACHIDONIC ACID ON THE DEVELOPMENT AND SUPPRESSION OF THE IMMUNE RESPONSE IN MICE.**

The influence of indomethacin (IM) and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) as inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism, accordingly, on the development of the immune response (IR) to sheep red blood cells (SRBC), as well as on the formation and functional activity of the antigen-induced (by the tolerogenous dose of SRBC) T-suppressors (AITs) was studied. Investigation was carried out on mice of line CBA. The IR was estimated by quantity of antibody-forming cells in the mouse spleen. The functional activity of AITs was determined in the transfer adopting system by the intensity of IR suppression in mice - recipients. The data obtained have demonstrated, that both inhibitors mainly stimulated the IR which was more expressed at NDGA application and depended on a phase of the IR. The stimulation of the IR was related with a suppression of AITs and a decrease in their functional activity.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology,*

*National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Александрова Г.М., Рожкова В.Н., Борисова Л.Н. Сравнительная характеристика иммуноотропной

активности натрия диклофенака, индометацина и натрия салицилата // Фармакология и токсикология. – 1981. – №4. – С.450–453.

2. Беклемишев Н.Д. Роль лейкотриенов в иммунитете и иммунорегуляции // Иммунология. – 1989. – №4. – С.14–18.
3. Калинин А.Г., Карсонова М.И. Ингибиторный анализ участия продуктов окисления арахидоновой кислоты в феномене В-супрессии иммунного ответа // Там же. – №3. – С.40–43.
4. Пархомец В.П., Донченко Г.В. Метаболизм арахидоновой кислоты и витамин Е // Укр. биохим. журн. – 1992. – 64, №6. – С.3–11.
5. Певницкий Л. А., Соловьев В. В., Фонталин Л. Н. Исследование действия оснований нуклеиновых кислот на иммуногенез методом Эрне // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1965. – 68, №8. – С.85–89.
6. Писарев В. М., Певницкий Л. А. Изучение феномена специфической супрессии иммунного ответа в системе адоптивного переноса // Там же. – 1977. – 83, №5. – С.571 – 573.
7. Badger A.M., Griswold D.E., Walz D.T. Augmentation of concanavalin A-induced immunosuppression by indomethacin // Immunopharmacology. – 1982. – 4, №2. – P. 149 – 162.
8. Chouaib S., Welte K., Mertelsmann R., Dupont B. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression // J. Immunol. – 1985. – 135, №2. – P.1172 – 117.
9. Farrar W.L., Humes J.I. The role of arachidonic acid metabolism in the activities of interleukin 1 and 2 // Ibid. – 1985. – 135, №2. – P.1153 – 1159.
10. Madrigal-Bujaidar E., Diaz Barriga S., Cassani M. et al. In vivo and in vitro induction of sister – chromatid exchanges by nordihydroguaiaretic acid // Mutat. Res. – 1998. – 412, №2. – P.139 – 144.
11. Payan D.G., Goetzl E.J. Specific suppression of human T lymphocyte function by leukotriene B4 // J. Immunol. – 1983. – 131, №2. – P.551 – 553.
12. Perez- Alvarez V., Bobadilla- Lugo R., Muriel P. et al. Effects of leukotriene synthesis inhibition on acute liver damage induced by carbon tetrachloride // Pharmacology. – 1993. – 47, №2. – P.330 – 336.
13. Rola-Pleszczynski M., Borgeat P., Sirois P. Leukotriene B4 induces human suppressor lymphocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1982. – 108, №4. – P.1531 – 1537.
14. Rola-Pleszczynski M. Differential effects of leukotriene B4 on T4+ and T8+ lymphocyte phenotype and immunoregulatory functions // J. Immunol. – 1985. – 135, №2. – P.1357 – 1360.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,  
Київ*

*Матеріал надійшов  
до редакції 4.01.2003*