

М.А. Чейдо, М.М. Геворгян

ФГБУ «Научно-исследовательский институт физиологии» Сибирского отделения РАН, Новосибирск

# Роль дофаминовых D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторов в дельта<sub>1</sub>-опиоидергической иммуностимуляции

На мышцах линии CBA, иммунизированных эритроцитами барана ( $5 \times 10^8$ ), обнаружен выраженный иммуноактивирующий эффект высокоэффективного пептидного агониста дельта<sub>1</sub>-опиоидных рецепторов DPDPE (100 мкг/кг). Сопоставление результатов, полученных с введением DPDPE на фоне предварительной блокады постсинаптических дофаминовых D<sub>1</sub>- (SCH-23390, 1 мг/кг) или D<sub>2</sub>- (галоперидол, 1 мг/кг) типов рецепторов, позволило установить более значимый вклад D<sub>1</sub>-рецепторов в процесс дельта<sub>1</sub>-опиоидергической иммуностимуляции.

**Ключевые слова:** дельта<sub>1</sub>-опиоидные рецепторы, DPDPE, D<sub>1</sub>-, D<sub>2</sub>-дофаминовые рецепторы, IgM-иммунный ответ.

## Введение

Дельта-опиоидные рецепторы (дельта-ОР) привлекают внимание клиницистов и экспериментаторов в связи с их включением в регуляцию многих биологических (ноцицепция, когнитивные функции, настроение, эмоциональное состояние, двигательная активность и т.д.) [1] и патологических (развитие тревожности, депрессии) [2] процессов. Установлено также модулирующее влияние синтетических дельта-агонистов на функцию иммунной системы [3–6], и на сегодняшний день перспектива их использования в качестве иммуномодуляторов стала актуальной проблемой. Согласно результатам радиорецепторных исследований, из большого числа дельта-лигандов пептидной природы самыми эффективными являются DPDPE и DSLET, действующие, соответственно, на дельта<sub>1</sub>- и дельта<sub>2</sub>-подтипы ОР [7]. В настоящее время наиболее полно освещена иммуномодулирующая роль гексапептида DSLET, который обладает выраженным супрессирующим влиянием на иммунитет [3 – 6]. В наших работах было показано, что данный эффект является серотонинзависимым (5-НТ-зависимым) и реализуется преимущественно через пресинаптические 5-НТ<sub>1A</sub>-ауторецепторы и постсинаптические 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторы [3]. В то же время в условиях избирательной блокады

дельта-ОР ICI-174864 [8] так же, как при активации  $\mu$ -ОР DAGO [9], у мышей и крыс наблюдается усиление иммунной реакции, которое обеспечивается иммуностимулирующими дофаминовыми механизмами. Что же касается изучения модулирующего влияния агониста дельта<sub>1</sub>-ОР DPDPE на иммунную функцию, то подобных исследований *in vivo* было проведено очень мало.

В связи с вышеизложенным в качестве цели настоящего исследования можно обозначить выяснение роли DPDPE в контроле иммунного ответа и нейрохимического обеспечения этого процесса.

## Материалы и методы

Работа выполнена на 97 мышцах-самцах линии CBA (22–24 г) в возрасте 2,0–2,5 мес (виварий НИИ физиологии СО РАН), которых содержали в стандартных условиях. Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАН.

Специфический агонист дельта<sub>1</sub>-ОР DPDPE — [D-Pen 2,5]-enkephalin (Sigma, Германия) (100 мкг/кг), а также блокаторы постсинаптических дофаминовых D<sub>1</sub>-

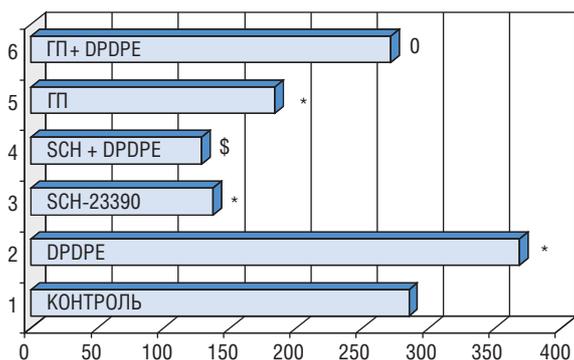
М.А. Cheido, M.M. Gevorgian

Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Physiology» under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

## Role of dopamine D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-receptors in the delta<sub>1</sub>-opioidergic immunostimulation

The study has shown that activation of delta<sub>1</sub>-opioid receptors by a highly selective peptide agonist DPDPE (100  $\mu$ g/kg) results in a significant increase of the immune response to antigen (SRBC,  $5 \times 10^8$ ) in CBA mice. SCH-23390 (1 mg/kg), a selective antagonist of the postsynaptic dopamine D<sub>1</sub>-receptors, and selective D<sub>2</sub>-blocker haloperidol (1 mg/kg) prevented immunostimulating effect of DPDPE. Comparison of effects of the antagonists suggests that delta<sub>1</sub>-opioidergic immunostimulation has more significant impact due to involvement of dopamine D<sub>1</sub>-receptors.

**Key words:** delta<sub>1</sub>-opioid receptors, DPDPE, D<sub>1</sub>-, D<sub>2</sub>-dopamine receptors, IgM-immune response.



**Рис. 1.** Влияние DPDPE на иммунный ответ мышей линии СВА в условиях блокады постсинаптических дофаминовых D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторов.

По оси абсцисс — относительное число IgM-AOK в селезенке животных на 5-й день после иммунизации эритроцитами барана (5×10<sup>8</sup>). По оси ординат — группы животных, получавших DPDPE (100 мкг/кг) на фоне предварительного введения SCH-23390 (1 мг/кг) или галоперидола (ГП) (1 мг/кг) за 30 мин до введения антигена.

\* — p < 0,001 по сравнению с контролем; \$ — p > 0,05 по сравнению с введением SCH-23390; o — p < 0,02 по сравнению с галоперидолом.

56

[R-(+)-SCH-23390, Sigma, Германия] и D<sub>2</sub>-рецепторов (галоперидол, Гедеон Рихтер А.О., Венгрия) вводили мышам в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно в физиологическом растворе за 30 мин до иммунизации эритроцитами барана (ЭБ, 5×10<sup>8</sup>) в хвостовую вену. При комбинированном использовании препаратов интервал между введениями составлял 5–10 мин. Контрольные животные получали соответствующий объем растворителя по той же схеме, что и препараты. В каждой серии было не менее 10 мышей.

Интенсивность гуморального иммунного ответа оценивали в селезенке мышей на 5-й день после иммунизации по количеству IgM-антителообразующих клеток (IgM-AOK) [10].

На проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США) определяли процентное содержание CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- и CD16/32<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови и селезенке иммунизированных мышей с введением DPDPE. Для иммунофенотипирования клеток использовали моноклональные антитела к CD3, меченные флуоресцеином-5-изотиоцианатом (FITC), к CD4 и CD16/32 — меченные фикоэритрином, и антитела к CD8, меченные перидинин-хлорофилл протеином (PerCP). Удаление эритроцитов в исследуемых пробах периферической крови и селезенки осуществляли раствором BD FASC Lysin Solution «Becton Dickinson» (США) с последующим 3-разовым отмыванием клеток. По соотношению числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (CD4/CD8) вычисляли индекс иммунореактивности. Математический анализ (сбор и обработку данных) проводили с применением программного обеспечения «CellQuest Pro». В каждой пробе анализировали не менее 3000 лимфоцитов.

Достоверность различий между сравниваемыми группами определяли посредством однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием статистического пакета Statistica Advanced for Windows v. 10,0 и парного сравнения по t-критерию Стьюдента.

## Результаты

Избирательная активация дельта<sub>1</sub>-ОР высокоспецифичным агонистом DPDPE в дозе 100 мкг/кг вызывает по сравнению с контрольной группой статистически достоверное нарастание числа IgM-AOK [F<sub>1,39</sub>=5,75; p < 0,02] в селезенке мышей линии СВА, иммунизированных Т-зависимым антигеном — ЭБ (5×10<sup>8</sup>) (рис. 1).

При этом анализ субпопуляционного состава клеток показал, что при иммуностимулирующем действии DPDPE в селезенке животных наблюдается накопление Т-клеток с маркером CD3 (с 39,4±1,95 до 45,9±2,3) [F<sub>1,13</sub>=4,71; p < 0,05] по сравнению с их количеством в группе животных без введения препарата (контроль). Одновременно здесь намечается незначительная тенденция к повышению содержания CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [F<sub>1,13</sub>=3,53; p < 0,08] и происходит уменьшение числа CD16/32<sup>+</sup>-клеток (с 50,0±0,74 до 46,2±1,36) [F<sub>1,11</sub>=6,43; p < 0,03], обладающих киллерной активностью. Под влиянием опиоида в результате увеличения содержания CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (с 26,01±1,1 до 30,5±1,3) [F<sub>1,13</sub>=6,51; p < 0,02] в селезенке повышается индекс иммунореактивности (соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) [F<sub>1,13</sub>=7,73; p < 0,02]. В периферической крови не было обнаружено достоверных изменений субпопуляционного состава лимфоцитов.

В ходе экспериментов также было продемонстрировано, что системное введение мышам избирательных антагонистов D<sub>1</sub>-рецепторов SCH-23390 (1 мг/кг) [F<sub>1,25</sub>=42,15; p < 0,001] и D<sub>2</sub>-рецепторов галоперидола (1 мг/кг) [F<sub>1,25</sub>=10,23; p < 0,001] приводит к одностороннему эффекту — выраженному уменьшению числа IgM-AOK относительно контроля (см. рис. 1). Подобное снижение иммунной функции под действием обоих антагонистов было обнаружено и ранее, на мышах другой линии (C57BL/6J) и крысах линии Вистар.

Кроме того, установлено, что предварительная блокада D<sub>1</sub>-рецепторов SCH-23390 (1 мг/кг) предотвращает иммуностимулирующее действие DPDPE (см. рис. 1). Это выражается в сохранении числа IgM-AOK на уровне, наблюдаемом при использовании самого блокатора [F<sub>1,26</sub>=0,29; p > 0,05], и свидетельствует о включении D<sub>1</sub>-рецепторов в эффект дельта<sub>1</sub>-агониста. Из рис. 1 также видно, что содержание IgM-секретирующих клеток в данных условиях эксперимента значительно снижено как по сравнению с контрольной (без препарата) [F<sub>1,21</sub>=33,79; p < 0,001], так и с опытной (введение DPDPE) [F<sub>1,34</sub>=58,88; p < 0,001] группой мышей.

Иной результат был получен при комбинированном применении галоперидола (1 мг/кг) и DPDPE (100 мкг/кг). В этом случае число IgM-AOK, хотя и превышает таковое у животных, обработанных антагонистом [F<sub>1,16</sub>=5,96; p < 0,03], однако не достигает значений при введении только DPDPE, а соответствует контрольному уровню [F<sub>1,19</sub>=0,14; p > 0,05] (см. рис. 1).

## Обсуждение

В настоящем исследовании установлено участие дельта<sub>1</sub>-агониста DPDPE в иммуностимулирующих механизмах. Также показано, что ключевым нейрхимическим механизмом эффекта DPDPE является допаминергический с дифференцированным вкладом постсинаптических D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторов, роль которых известна в развитии ряда дегенеративных заболеваний и психических расстройств. В пользу полученных данных свиде-

тельствует ряд фактов. Так, особенность нейрохимической организации дельта<sub>1</sub>-ОР заключается в их локализации в ряде дофаминсодержащих структур мозга. К ним прежде всего относятся хвостатое (*nucleus caudatus*) и прилежащее (*nucleus accumbens*) ядро головного мозга крыс [11], в которых сосредоточены в высокой концентрации D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторы, играющие важную роль в контроле иммунной функции [12, 13]. Кроме того, по данным современных исследований, установлено, что под влиянием DPDPE (в отличие от DSLET) происходит усиление выделения дофамина в прилежащем ядре крыс [14].

Результаты сравнительного анализа иммуностимулирующего влияния DPDPE, зафиксированного на фоне блокады D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторов, соответственно, SCH-23390 и галоперидолом, показали, что, несмотря на установленное включение обоих типов дофаминовых рецепторов

в DPDPE-индуцированную иммуностимуляцию, роль D<sub>1</sub>-рецепторов в этом процессе более значима по сравнению с вкладом D<sub>2</sub>-рецепторов.

Интересно отметить, что дофаминергические механизмы также лежат в основе μ-опиоидной иммуностимуляции, однако в этом случае эффект обусловлен включением только постсинаптических D<sub>2</sub>-рецепторов [9, 15]. Одним из возможных объяснений дифференцированного участия дофаминовых рецепторов во взаимодействии с различными типами ОР в иммуномодуляции могут служить ультраструктурные доказательства ко-локализации дельта-ОР и D<sub>1</sub>-рецепторов в отличие от сосуществования μ-ОР с D<sub>2</sub>-рецепторами в некоторых структурах мозга крыс [16]. Более того, ранее нами были получены данные о неравноценном вовлечении D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-рецепторов в процесс нейроиммуностимуляции [13].

#### REFERENCES

- Coop A., Rice K.C. Role of δ-opioid receptors in biological processes. *Drug News Perspect.* 2000; 13 (13): 481–487.
- Varona A., Gill J., Saracibar G. et al. Effects of imipramine treatment on delta-opioid receptors of the rat brain cortex and striatum. *Arzneimittelforschung.* 2003; 53 (1): 21–25.
- Chei'do M.A., Idova G.V. Rol' serotoninov'kh retseptorov v del'ta-opioidnoi' immunosupressii. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M.Sechenova.* 2010; 96 (2): 1234–1240.
- Husted T.L., Govindaswami M., Oeltgen P.R. et al. A delta2-opioid agonist inhibits p38 MARK and suppresses activation of murine macrophages. *J Surg Res.* 2005; 128 (1): 45–49.
- Rahim R.T., Meissier J.J., Cowan A. et al. Administration of mu-, kappa- or delta2-receptor agonists via osmotic minipumps suppresses murine splenic antibody responses. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (11): 2001–2009.
- Smakhtin M.Y., Konoplya A.I., Sever'yanova L.A., Shveinov I.A. DSLET and ACTH(4-10) increase mitotic activity of hepatocytes and suppress antibody production. *Bull Exp. Biol. Med.* 2003; 135 (5): 428–429.
- Kim K.W., Kim S.J., Shin B.S., Choi H.J. Ligand binding profiles of delta-opioid receptor in human cerebral cortex membranes: evidence of delta-opioid receptor heterogeneity. *Life Sci.* 2001; 68 (14): 1649–1656.
- Cheido M.A., Idova G.V., Devoino L.V. Involvement of delta-opioid receptors in immunosuppression. *Inter. J. Neurosci.* 1996; 84: 195–203.
- Devoino L., Cheido M., Alperina E., Idova G. Evidence for a role of dopaminergic mechanisms in the immunostimulating effect of μ-opioid receptor agonist DAGO. *Intern. J. Neurosci.* 2003; 113: 1381–1394.
- Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells. *Nature.* 1965; 207: 1106–1107.
- Hiller J.M., Fan L.Q., Simon E.J. Autoradiographic comparison of [3]DPDPE and [3]DSLET binding: evidence for distinct delta 1 and delta 2 opioid receptor populations in rat brain. *Brain Res.* 1996; 719 (1–2): 85–95.
- Nistico G., Caroleo M.C., Arbitrio M., Pulvirenti L. Evidence for involvement of dopamine D1 receptors in the limbic system in the control of immune mechanisms. *Neuroimmunomodulation.* 1994; 1 (3): 174–180.
- Devoi'no L.V., Al'perina E.L., Gevorgian M.M., Chei'do M.A. Uchastie v immunostimuliatcii dofaminov'kh D1- i D2-retseptorov prilozhashchego iadra u qry's. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M.Sechenova.* 2005; 91 (11): 1281–1287.
- Hirose N., Murakawa K., Takada K. et al. Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2- opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience.* 2005; 135 (1): 213–225.
- Chei'do M.A., Idova G.V. Differentirovanny'i' velad dofaminov'kh D1- i D2-retseptorov v μ-opioidergicheskuiu immunomoduliatcii. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M.Sechenova.* 2006; 92 (5): 546–551.
- Ambrose L.M., Gallagher S.M., Unterwald E.M., Van Bockstaele E.J. Dopamine D1 and delta-opioid receptors co-exist in rat striatal neurons. *Neurosci. Lett.* 2006; 399 (3): 191–196.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Чейдо Маргарита Александровна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов нейрохимической модуляции ФГБУ «Научно-исследовательский институт физиологии» Сибирского отделения РАН

**Адрес:** 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 4

**Тел.:** (383) 335-98-58

**Факс:** (383) 335-98-54

**E-mail:** cheido@physiol.ru

**Геворган Маргарита Машиловна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов нейрохимической модуляции ФГБУ «Научно-исследовательский институт физиологии» Сибирского отделения РАН

**Адрес:** 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 4

**Тел.:** (383) 335-98-58

**Факс:** (383)335-98-54

**E-mail:** gevorgyanmm@ngs.ru