

## ЭФФЕКТЫ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2019 г. А. Ю. Артамонов<sup>1\*</sup>, М. С. Сухарева<sup>1,2</sup>, П. М. Копейкин<sup>1</sup>,  
А. Н. Сухачев<sup>1</sup>, Т. А. Филатенкова<sup>1</sup>, Д. С. Орлов<sup>1</sup>, О. В. Шамова<sup>1</sup>

\*E-mail: auartamonov@bk.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Политехнический Университет им. Петра Великого, Санкт Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

Исследованы эффекты пептидов, имеющих высокое содержание остатка пролина в составе молекулы – пролин-богатых пептидов (ПБП) слюны человека (фрагменты катионного пролин-богатого белка слюны 1 (Basic salivary proline-rich protein 1) – P-H (37–51), P-F (43–61), IB6 (98–116), p1932, а также ряда ПБП нейтрофилов животных (бактенецины ChVac3.4, ChVac5, mini-ChVac7.5Nα), на клетки, участвующие в функционировании иммунной системы. Показано, что в присутствии почти всех исследованных ПБП снижается интенсивность дыхательного взрыва фагоцитов крови человека *in vitro*, инициированного введением *Escherichia coli* (эффект более выражен для ПБП слюны). Установлено, что при инкубации пептидов с мононуклеарами периферической крови человека, стимулированными липополисахаридом, наблюдается угнетение высвобождения цитокинов ИЛ-1β, ФНОα при введении в культуральную среду пептидов ChVac3.4, mini-ChVac7.5Nα, p1932, при неизменном уровне ИЛ-10 (для остальных ПБП эффект не выявлен). Таким образом, получены результаты, подтверждающие противовоспалительное действие ПБП и позволяющие предположить, что катионные пролин-богатые белки и пептиды слюны, могут участвовать в регуляции воспалительных процессов в ротовой полости.

**Ключевые слова:** пролин-богатые пептиды, слюна, противовоспалительная активность, дыхательный взрыв

DOI: 10.31857/S102872210006763-4

**Адрес:** 197376, ул. Академика Павлова, д. 12, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Отдел общей патологии и патофизиологии, Артамонов Александр Юрьевич. Тел./факс: +7(812)2340764

**E-mail:** auartamonov@bk.ru

**Авторы:**

**Артамонов А. Ю.**, к.б.н., научный сотрудник Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»), Санкт-Петербург, Россия;

**Сухарева М. С.**, лаборант-исследователь Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», студент магистратуры Политехнического университета им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;

**Копейкин П. М.**, младший научный сотрудник Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия;

**Сухачев А. Н.** к.б.н., научный сотрудник Отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия;

**Филатенкова Т. А.**, научный сотрудник Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия;

**Орлов Д. С.**, к.м.н., заведующий лабораторией иммунопатофизиологии Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ»;

**Шамова О. В.**, д.б.н., заведующий Отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Пролин-богатые пептиды (ПБП) содержатся в фагоцитирующих клетках некоторых видов животных и играют важную роль в функционировании системы врожденного иммунитета, проявляя выраженную антимикробную активность, а некоторые, также и ранозаживляющее, иммуномодулирующее действие. В нейтрофилах человека ПБП не выявлены, но известно, что такие пролин-богатые белки и пептиды составляют одну из основных белковых фракций слюны человека, содержатся и в других биологических жидкостях, однако биологическая

значимость этих ПБП остается выясненной не до конца. Известно, что ПБП слюны связывают танины, но их роль в обеспечении защитных функций мало изучена [1]. Однако можно предположить, что эти пептиды могут модулировать свойства клеток, участвующих в функционировании иммунной системы.

**Целью** данной работы явилось изучение эффектов ПБП слюны человека (фрагментов катионного пролин-богатого белка слюны 1 (Basic salivary proline-rich protein 1) – P-H (37–51), P-F (41–63), IB6 (98–116), p1932), а также ряда ПБП нейтрофилов домашней козы *Capra hircus* (бактенецинов ChVac3.4, ChVac5, mini-ChVac7.5N $\alpha$ ) на функциональную активность лейкоцитов крови человека (интенсивность дыхательного взрыва фагоцитов, инициированного внесением *E. coli*, а также выделение цитокинов мононуклеарами периферической крови (МКПК), стимулированными липополисахаридом (ЛПС).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе пептиды были получены с помощью твердофазного химического синтеза с применением Fmoc/tBu-стратегии [2] в автоматическом пептидном синтезаторе Symphony X (Protein Technologies, США). Мононуклеары периферической крови человека получали из крови здоровых доноров по стандартной методике. Оценку влияния пептидов на интенсивность респираторного взрыва в ответ на стимуляцию клеток крови микроорганизмом *E. coli in vitro* осуществляли с использованием набора FagoFlowEx (EXBIO, Чехия) методом проточной цитометрии. При поглощении бактерий фагоцитом активируется NADPH оксидаза, что ведет к продукции активных форм кислорода, детектируемых с помощью дигидрорадамина 123. В гепаринизированную кровь (50 мкл) вносили по 10 мкл суспензии *E. coli* и 5 мкл пептидов или 5 мкл среды в контрольных пробах, инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Дополнительные контроли: положительный – стимуляция форбол 12-миристаном 13-ацетатом, отрицательный – кровь без добавления бактерии. После инкубации осуществляли лизис эритроцитов и проводили анализ на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Для анализа эффектов ПБП на выброс цитокинов МКПК человека клетки инкубировали с пептидами, взятыми в разных концентрациях, в присутствии или в отсутствие ЛПС 20 ч при 37 °С и 5%

СО<sub>2</sub>. После осаждения клеток уровень цитокинов ИЛ-1, ФНО и ИЛ-10 в супернатанте определяли с помощью наборов для ИФА (ООО Цитокин, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В присутствии исследованных катионных ПБП слюны (P-H (37–51), P-F(43–61), IB6 (98–116) и p1932) существенно снижается интенсивность дыхательного взрыва фагоцитов крови человека *in vitro*, стимулированных введением *Escherichia coli*. При использовании их в концентрации 5 мкМ – на 36–53%, в концентрации 10 мкМ – на 26–37% ( $p < 0.05$  по сравнению с контролем – клетки с бактерией, без пептидов, U-критерий Манна-Уитни). Бактенецины в концентрации 1 и 5 мкМ не оказывали выраженного эффекта, но в концентрации 10 мкМ ChVac3.4 и ChVac 5 подавляли реакцию респираторного взрыва фагоцитов крови человека. Пептид mini-ChVac7.5N подобным действием в концентрации 1, 5 и 10 мкМ не обладал. По данным литературы, ПБП нейтрофилов свиньи – PR-39 обладает противовоспалительным эффектом – этот пептид имеет в составе молекулы последовательности, связывающиеся с рядом пролин-распознающих участков, присутствующих в SH3 (Src homology 3), WW, GYF, EVH1 и др. доменах, что определяет его взаимодействие с различными белками и опосредует регуляторное действие пептида. В частности, PR-39 связывается с SH3 доменом p47phox субъединицы NADPH оксидазы в нейтрофилах, что приводит к ингибированию сборки каталитически активного фермента, в результате чего блокируется продукция супероксидного аниона [3]. Можно предположить, что исследуемые нами ПБП, в состав молекул которых тоже входят такие последовательности, имеют сходный механизм действия. При инкубации пептидов с МКПК человека, стимулированными липополисахаридом, наблюдалось угнетение высвобождения цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$  при введении в культуральную среду пептидов ChVac3.4, mini-ChVac7.5N $\alpha$  и p1932: при введении ChVac3.4 (1 мкМ и 5 мкМ) уровень ФНО $\alpha$  снижался в 1.5 и 1.2 раза, соответственно, mini-ChVac7.5N $\alpha$  – в 2 раза (1 и 5 мкМ пептида), p1932 (20 мкМ) – в 1.2 раза; уровень ИЛ-1 $\beta$  уменьшался в 1.5–2 раза при использовании ChVac3.4, mini-ChVac7.5N $\alpha$  (5 мкМ) или p1932 (20 мкМ);  $p < 0.05$  по сравнению с МКПК, стимулированными ЛПС без пептидов; при не-

изменном уровне ИЛ10 (для остальных ПБП эффект не выявлен).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены результаты, подтверждающие противовоспалительное действие ПБП и позволяющие предположить, что катионные пролин-богатые белки и пептиды слюны, могут участвовать в регуляции воспалительных процессов в ротовой полости.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17–04–02177а.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Вавилова Т. П., Янушев О. О., Островская И. Г.* Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Издательство БИНОМ. 2014. 312 с.
2. *Merrifield R. B., Barany G.* Solid-phase peptide synthesis. In: *The peptides: analysis, synthesis, biology*. 1980, New York: Academic Press, No 2, P. 3–284.
3. *Shi J., Ross C.R., Leto T.L., Blecha F.* PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(12), 6014–8.

## EFFECTS OF PROLINE-RICH PEPTIDES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF HUMAN LEUKOCYTES *IN VITRO*

© 2019 A. Yu. Artamonov<sup>1\*</sup>, M. S. Sukhareva<sup>1,2</sup>, P. M. Kopeykin<sup>1</sup>, A. N. Sukhachev<sup>1</sup>, T. A. Filatenkova<sup>1</sup>, D. S. Orlov<sup>1</sup>, O. V. Shamova<sup>1</sup>

\*E-mail: auartamonov@bk.ru

<sup>1</sup>FSBSI Institute of Experimental Medicine, St-Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>Peter the Great Polytechnic University, St-Petersburg, Russia;

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

The effects of peptides with a high content of proline (Proline-Rich Peptides, PRPs) of human saliva (fragments of Basic salivary proline-rich protein 1 – P-H (37–51), P-F (43–61), IB6 (98–116), p1932), as well as of several animal's neutrophilic PRPs (bactenecins ChBac3.4, ChBac5, mini-ChBac7.5Na), towards cells involved in the functioning of the immune system have been explored. In the presence of each of the investigated PRPs the intensity of the respiratory burst of human blood phagocytes *in vitro*, challenged by *Escherichia coli*, was reduced (the effect was more pronounced in the case of salivary PRPs). Administration of ChBac3.4, mini-ChBac7.5Na, p1932 to human peripheral blood mononuclear cells, stimulated with lipopolysaccharide, caused a decrease of LPS-mediated release of cytokines IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , without affecting a level of IL10 (for other PRPs the effects were not significant). Thus, the results confirm the anti-inflammatory action of PRPs and point to the suggestion that cationic proline-rich proteins and peptides of saliva may be involved in regulation of inflammation in the oral cavity.

*Key words:* proline-rich peptides, saliva, anti-inflammatory activity, respiratory burst

#### Authors:

**Artamonov A. Yu.**, ✉ PhD, Research Scientist of the Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute for Experimental Medicine (IEM), Saint-Petersburg, Russia. **E-mail:** auartamonov@bk.ru;

**Sukhareva M. S.**, Technician of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM; Student of Peter the Great Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia;

**Kopeykin P. M.**, Junior Research Scientist of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

**Sukhachev A. N.**, PhD, Research Scientist of the Department of Immunology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

**Filatenkova T. A.**, Research Scientist of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

**Orlov D. S.**, PhD, Head of the Laboratory of Immunopathophysiology of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

**Shamova O. V.**, PhD, Dr. of Sci, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia.