

ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА-1 НА ФУНКЦИИ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА IN VITRO

Гейн С.В., Кадочникова Я.А.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия
ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

Резюме. Опиоидные пептиды являются одной из наиболее изучаемых групп регуляторных пептидов, поскольку проявляют чрезвычайно широкий спектр биологической активности и играют важную роль в регуляции гомеостаза. Эндогенная опиоидная система участвует в функционировании целого ряда органов и систем, в том числе и иммунной системы. В настоящее время наиболее подробно описано иммуномодулирующее действие трех основных семейств опиоидных пептидов: эндорфинов, энкефалинов, динорфинов. Гораздо меньше информации об иммуномодулирующих эффектах эндоморфинов. Цель настоящей работы – оценка влияния эндоморфина-1 на фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода и IL-1 β различными фракциями клеток врожденного иммунитета периферической крови *in vitro*.

В качестве объекта исследования использовались лейкоциты периферической венозной крови здоровых доноров-добровольцев в возрасте от 22 до 40 лет. Эндоморфин-1 использовали в концентрациях 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰, 10⁻¹² М. Для получения фракции лейкоцитов гепаринизированную венозную кровь отстаивали в течение 2 ч в термостате при 37 °С. Выделение фракции нейтрофилов проводили на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$) путем наслаивания верхнего слоя плазмы крови с лейкоцитами. Оценка кислородзависимой микробицидной активности лейкоцитов осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан 150 мкг/мл, в качестве маркера выраженности реакции – люминол 10⁻⁵ М. Выделение фракции мононуклеарных клеток проводили на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$). Фракцию моноцитов выделяли механическим способом. Для оценки продукции IL-1 β мононуклеары и моноциты культивировали в течение 24 ч, концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа. Для оценки поглотительной активности моноцитов и нейтрофилов использовали метод, основанный на поглощении FITC-меченого *St.aureus*. Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ и парный LSD-критерий для post-hoc сравнения, различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Установлено, что эндоморфин-1 снижал спонтанную продукцию активных форм кислорода и не влиял на стимулированную продукцию кислородных радикалов лейкоцитами. Во фракции нейтрофилов эндоморфин-1 не влиял на спонтанную кислородзависимую микробицидность и снижал интенсивность респираторного взрыва в стимулированных нейтрофилах. Пептид повышал процент фагоцитоза моноцитов и усиливал спонтанную продукцию IL-1 β мононуклеарами. Таким образом,

Адрес для переписки:

*Гейн Сергей Владимирович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (902) 831-77-05.
E-mail: gein@iegm.ru*

Address for correspondence:

*Gein Sergei V.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural
Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (902) 831-77-05.
E-mail: gein@iegm.ru*

Образец цитирования:

*С.В. Гейн, Я.А. Кадочникова «Влияние эндоморфина-1 на функции эффекторных клеток врожденного иммунитета in vitro» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 119-124.
doi: 10.46235/1028-7221-371-EAI*

© Гейн С.В., Кадочникова Я.А., 2020

For citation:

*S.V. Gein, Ya.A. Kadochnikova “Endomorphin-1 affecting innate immune cells in vitro”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 119-124.
doi: 10.46235/1028-7221-371-EAI*

DOI: 10.46235/1028-7221-371-EAI

эндоморфин-1 оказывает разнонаправленное действие на различные показатели врожденного иммунитета. Как это свойственно и другим группам регуляторных пептидов, направленность эффектов эндоморфина зависела от состава клеточной фракции и присутствия стимулирующего сигнала.

Ключевые слова: эндоморфины, эндогенная опиоидная система, иммунорегуляция, активные формы кислорода, фагоцитоз, моноциты, мононуклеары, нейтрофилы

ENDOMORPHIN-1 AFFECTING INNATE IMMUNE CELLS IN VITRO

Gein S.V., Kadochnikova Ya.A.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation
Perm State National Research University, Perm, Russian Federation*

Abstract. Opioid peptides belong to one of most studied groups of regulatory peptides due to exerting extremely wide range of biological activities and play an important role in regulating homeostasis. The endogenous opioid system is involved in the functioning of diverse organs and systems, including the immune system. Currently, an immunomodulatory effect of the three major families of opioid peptides such as endorphins, enkephalins, dinorphins has been thoroughly described. Much less data are available about the endomorphin-related immunomodulatory effects. The aim of this work was to assess effects of endomorphin-1 on phagocytosis, production of reactive oxygen species and IL-1 β by various subsets of peripheral blood innate immune cells *in vitro*.

The leukocytes of obtained from peripheral venous blood of healthy volunteer donors aged 22 to 40 years were used in the study. Endomorphin-1 was used at concentrations of 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰, 10⁻¹² M. Blood leukocyte fraction was isolated from heparinized venous blood settled for 2 hours in a thermostat at 37 °C. The neutrophil fraction was isolated by centrifuging in of Ficoll-Urographin ($\rho = 1.077$) density gradient placing the upper layer of blood plasma with leukocytes. Assessment of leukocyte oxygen-dependent microbicidal activity was carried out by using the reaction of luminol-dependent chemiluminescence (LZHL) by using opsonized zymosan at concentration of 150 $\mu\text{g/ml}$; 10⁻⁵ M luminol was used to probe reaction magnitude. The separation of the mononuclear cell fraction was carried out by centrifuging in of Ficoll-Urographin ($\rho = 1.077$) density gradient. The monocyte fraction was isolated mechanically. To assess IL-1 β production, mononuclear cells and monocytes were cultured for 24 hours followed by measuring its level with enzyme-linked immunosorbent assay. To evaluate monocytes and neutrophil phagocyte activity, FITC-labeled *St.aureus* uptake method was used. Statistical processing was performed with one-way ANOVA test and paired LSD criterion for post-hoc comparison, with significance set at $p < 0.05$.

It was found that endomorphin-1 reduced leukocyte spontaneous, but not induced production of reactive oxygen species. In the neutrophil fraction, endomorphin-1 did not affect spontaneous oxygen dependent microbicidity and reduced intensity of the respiratory burst in stimulated neutrophils. In addition, it increased the percentage of monocyte phagocytosis and enhanced spontaneous IL-1 β production by mononuclear cells. Thus, endomorphin-1 exhibited multidirectional effects on various parameters of innate immunity. Being typical to other groups of regulatory peptides, modality of endomorphin-1 related effects depended on cell fraction and presence of a stimulating cues.

Keywords: endomorphins, endogenous opioid system, immunoregulation, reactive oxygen species, phagocytosis, monocytes, mononuclear cells, neutrophils

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7.

Введение

Опиоидные пептиды являются одной из наиболее изучаемых групп регуляторных пептидов, поскольку проявляют чрезвычайно широкий

спектр биологической активности и играют важную роль в регуляции гомеостаза. Эндогенная опиоидная система участвует в функционировании целого ряда органов и систем, в том числе и иммунной системы [3]. В настоящее время показана способность опиоидов модулировать функции как врожденного, так и адаптивного иммунитета [1]. Наиболее подробно описано

иммуномодулирующее действие трех основных семейств опиоидных пептидов: эндорфинов, энкефалинов, динарфинов, имеющих общую N-концевую последовательность и образующихся при расщеплении крупных молекул-предшественников. Гораздо меньше информации об иммуномодулирующих эффектах эндоморфинов, структура которых отличается от упомянутых выше опиоидных пептидов тем, что эндоморфины не имеют общей N-концевой последовательности, а их эндогенный предшественник до сих пор не идентифицирован [5].

Цель настоящей работы — исследовать влияние эндоморфина-1 на поглотительную активность, продукцию активных форм кислорода и IL-1 β различными фракциями клеток врожденного иммунитета *in vitro*.

Материалы и методы

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови здоровых доноров-добровольцев в возрасте от 22 до 40 лет.

Фракцию лейкоцитов получали из гепаринизированной венозной крови, которую отстаивали в течение 2 ч в термостате при 37 °С. Выделение фракции нейтрофилов проводили на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$). Фракцию лейкоцитов центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин, после осевшие на дно гранулоциты собирали и дважды отмывали средой RPMI 1640 на центрифуге в течение 10 мин. Клеточную суспензию выдерживали в течение 1 ч при 4 °С в полной питательной среде для снятия активации. Продукцию кислородных радикалов проводили с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан 150 мкг/мл, в качестве маркера выраженности реакции — люминол 10^{-5} М. Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах (10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса). Результаты регистрировали с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Фракцию мононуклеаров выделяли на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$). Фракцию моноцитов выделяли механическим способом, для этого охлажденные мононуклеары наносили на стерильную стеклянную чашку Петри, которую помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Неадгезировавшиеся клетки удаляли, а адгезировавшиеся клетки снимали резиновым шпателем, дважды отмывали, выдерживали в течение 1 ч при 4 °С и использовали как моноциты. Для оценки продукции IL-1 β мононуклеары и моноциты культивировали в 24-луночных плоскодонных планшетах 24 ч

в 1×10^6 кл/мл. Среду готовили на основе RPMI 1640 (ICN, США) с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 100 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан 150 мкг/мл. Супернатанты собирали и замораживали при -20 °С. Концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «ВЕКТОР-БЕСТ» (г. Новосибирск).

Для оценки поглотительной активности в качестве объекта исследования использовали фракцию лейкоцитов периферической крови. К 80 мкл клеток добавляли 10 мкл эндоморфина и 10 мкл суспензии FITC-меченного *St. aureus* в конечной концентрации 10^8 кл/мл, пробы инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем к клеткам добавляли лизирующий раствор (0,15M NH₄Cl; 0,01M NaHCO₃; 0,0001M ЭДТА, pH = 7,2) и после 5 мин инкубации центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. После убирания супернатант, добавляли PBS-0,02% ЭДТА и снова центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. Далее удаляли супернатант, добавляли 400 мкл PBS-0,02% ЭДТА. После этого пробы анализировали на проточно-лазерном цитометре BDFACSCalibur.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ и парный LSD-критерий для post-hoc сравнения.

Результаты и обсуждение

При оценке влияния эндоморфина-1 на продукцию кислородных радикалов фракцией лейкоцитов установлено, что пептид в течение первых 30 мин наблюдений существенно угнетал образование АФК в нестимулированных пробах в концентрациях 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} М. В концентрации 10^{-6} М эндоморфин-1 на спонтанную продукцию АФК лейкоцитами влияния не оказывал. На стимулированную зимозаном продукцию АФК эндоморфин-1 статистически значимо не влиял (рис. 1).

В дальнейшем нами оценивалось влияние эндоморфина-1 на микробицидную активность фракции нейтрофилов. Пептид не влиял на спонтанную и угнетал индуцированную зимозаном продукцию АФК нейтрофилами в концентрациях 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} М (рис. 2).

При оценке влияния эндоморфина-1 на поглотительную активность клеток периферической крови методом проточной цитометрии было установлено, что пептид не влиял на поглотительную нейтрофилов, однако повышал

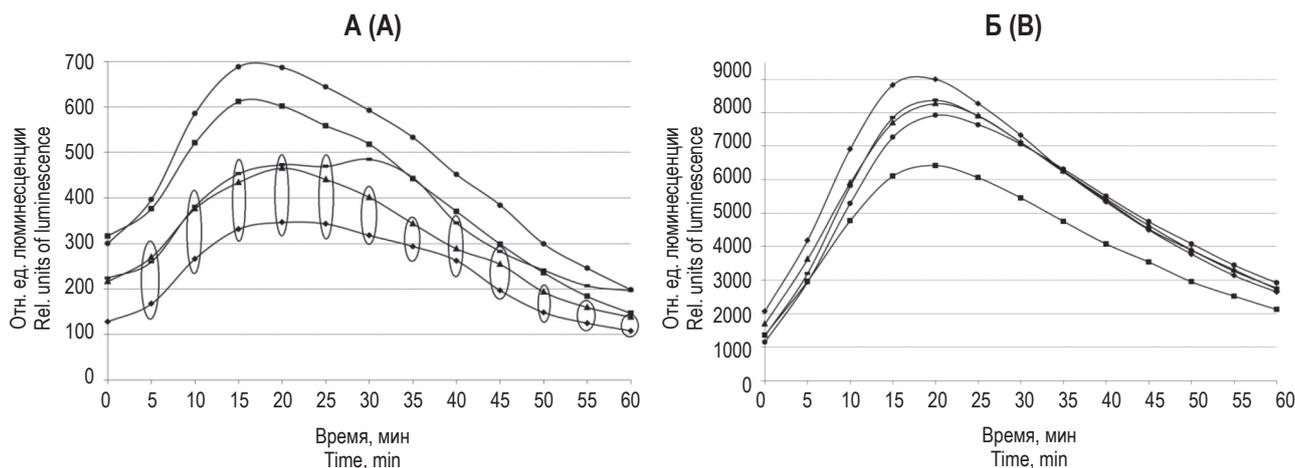


Рисунок 1. Влияние эндоморфина-1 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию активных форм кислорода фракцией лейкоцитов периферической крови

Прмечание. ● – контроль; ■ – 10^{-6} М; ▲ – 10^{-8} М; ▾ – 10^{-10} М; ◆ – 10^{-12} М; $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Figure 1. Effect of endomorphin-1 on spontaneous (A) and stimulated (B) production of reactive oxygen species by the peripheral blood leukocyte fraction

Note. ●, control; ■, 10^{-6} M; ▲, 10^{-8} M; ▾, 10^{-10} M; ◆, 10^{-12} M; $p < 0.05$ compared with control.

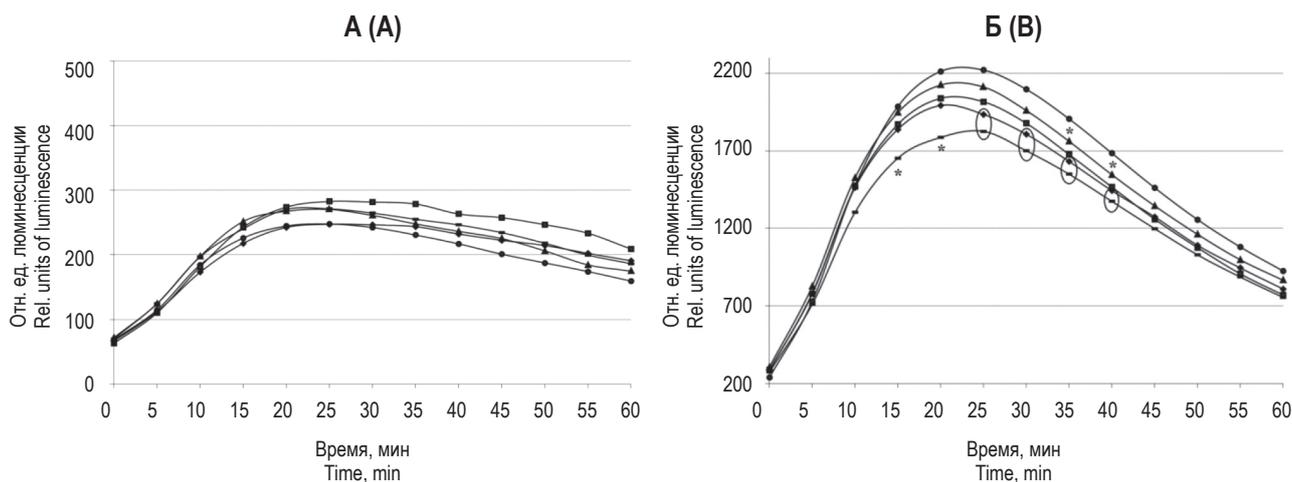


Рисунок 2. Влияние эндоморфина-1 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию активных форм кислорода фракцией нейтрофилов периферической крови

Примечание. ● – контроль; ■ – 10^{-6} М; ▲ – 10^{-8} М; ▾ – 10^{-10} М; ◆ – 10^{-12} М; $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Figure 2. Effect of endomorphin-1 on spontaneous (A) and stimulated (B) production of reactive oxygen species by the fraction of peripheral blood neutrophils

Note. ●, control; ■, 10^{-6} M; ▲, 10^{-8} M; ▾, 10^{-10} M; ◆, 10^{-12} M; $p < 0.05$ compared with control.

процент фагоцитоза моноцитов в концентрациях 10^{-6} , 10^{-8} М (табл. 1). Помимо этого, пептид в концентрациях 10^{-6} , 10^{-12} М усиливал спонтанную продукцию IL-1 β мононуклеарами. На выработку IL-1 β моноцитами эндоморфин-1 существенного влияния не оказывал (табл. 2).

Таким образом, эндоморфин-1 оказывает разнонаправленное действие на различные показатели врожденного иммунитета. Пептид угнетал продукцию АФК фракцией лейкоцитов и нейтрофилов, стимулировал фагоцитоз моноцитов и продукцию IL-1 β мононуклеарами. Как это свой-

ственно и другим группам регуляторных пептидов, направленность эффектов эндоморфинов зависит от состава клеточной фракции и присутствия стимулирующего сигнала. Ранее нами было показано наличие аналогичного влияния у эндогенного μ -агониста ν -эндорфина, который угнетал продукцию АФК и стимулировал секрецию IL-1 β *in vitro* [2, 4]. Эффекты эндоморфина-1 имеют много общего с эффектами ν -эндорфина, которые можно считать протекторным для организма, поскольку продукция АФК может оказывать двойное действие на организм: с одной сто-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА-1 НА ПОГЛОТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

TABLE 1. EFFECT OF ENDOMORPHINE-1 ON THE ABSORPTION ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Концентрация пептида Peptide concentration	% Phagocytosis percentage
Нейтрофилы / Neutrophils	
Контроль / Control	54,62
10 ⁻⁶ М	60,97
10 ⁻⁸ М	57,77
10 ⁻¹⁰ М	57,05
10 ⁻¹² М	57,13
Моноциты / Monocytes	
Контроль / Control	47,30
10 ⁻⁶ М	54,64*
10 ⁻⁸ М	52,97*
10 ⁻¹⁰ М	51,51
10 ⁻¹² М	49,85

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем по парному t-критерию.

Note. *, $p < 0.05$ compared with the control according to the paired t-test.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА 1 НА СПОНТАННЫЙ И СТИМУЛИРОВАННЫЙ ЗИМОЗАНОМ СИНТЕЗ IL-1 β МОНОНУКЛЕАРАМИ И МОНОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

TABLE 2. EFFECT OF ENDOMORPHIN 1 ON SPONTANEOUS AND ZYMOZAN-STIMULATED SYNTHESIS OF IL-1 β BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS AND MONOCYTES

Концентрация пептида Peptide concentration	пг/мл pg/ml			
	Мононуклеары / Mononuclear cells		Моноциты / Monocytes	
	Безиндуктора Without the inductor	С индуктором опсонизированный зимозан With the inductor opsonized zymosan	Без индуктора Without the inductor	С индуктором опсонизированный зимозан With the inductor opsonized zymosan
Контроль / Control	203,79175	313,59375	123,124875	267,4455
10 ⁻⁶ М	262,03125*	314,18	158,693625	266,780125
10 ⁻¹² М	232,592375*	304,0425	148,721875	275,97775

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем по парному t-критерию.

Note. *, $p < 0.05$ compared with the control according to the paired t-test.

роны – усиливается микробицидный потенциал клеток врожденного иммунитета, с другой – повышенная продукция АФК может оказывать повреждающее действие на липидные мембраны клеток и угнетать иммунный ответ [6].

Выводы

1. Установлено, что эндоморфин-1 снижал спонтанную продукцию активных форм кисло-

рода и не влиял на стимулированную продукцию кислородных радикалов лейкоцитами. Во фракции нейтрофилов эндоморфин-1 не влиял на спонтанную кислородзависимую микробицидность и снижал интенсивность респираторного взрыва в стимулированных нейтрофилах.

2. Пептид повышал процент фагоцитоза моноцитов и усиливал спонтанную продукцию IL-1 β мононуклеарами.

Список литературы / References

1. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врожденного иммунитета // Биохимия, 2011. Т. 76, № 3. С. 379-390. [Gein S.V., Baeva T.A. Endogenous opioid peptides in regulation of innate immune cells functions. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2011, Vol. 76, no. 3, pp. 379-390. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Гилева С.Г., Чижова Е.Г. Влияние β-эндорфина на микробицидную активность лейкоцитов у мужчин и женщин различных возрастных групп // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 772-773. [Gein S.V., Gileva S.G., Chizhova E.G. Effect of β-endorphin on the microbicidal activity of leukocytes in men and women of different age groups. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 772-773. (In Russ.)]
3. Bodnar R.J. Endogenous opiates and behavior: 2017. *Peptides*, 2020, Vol. 124, 170223. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170223.
4. Gein S.V., Gorshkova K.G., Tendryakova S.P. Regulation of interleukin-1beta and interleukin-8 production by agonists of mu and delta opiate receptors *in vitro*. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2009, Vol. 39, no. 6, pp. 591-595.
5. Mizusawa K. Endomorphin. In: Takei Y., Ando H., Tsutsui K., ed. Handbook of hormones: comparative endocrinology for basic and clinical research. Oxford: Academic Press; 2016. pp. 62-63.
6. Riquelme P., Tomiuk S., Kammler A., et al. Molecular therapy. *J. Am. Soc. Gene Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 2, pp. 409-422.

Авторы:

Гейн С.В. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет; заместитель директора, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Кадочникова Я.А. — студент магистратуры биологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет; сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Gein S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University; Deputy Director, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Kadochnikova Ya.A., Undergraduate Student, Faculty of Biology, Perm State National Research University; Laboratory of Biochemistry of Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 26.06.2020
Принята к печати 28.07.2020

Received 26.06.2020
Accepted 28.07.2020