

ВЛИЯНИЕ БЕТА-ЭНДОРФИНА И ДИНОРФИНА А НА АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Южанинова С.В., Гилёва С.Г.

*ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия*

Резюме. Наряду с функционированием в ткани нервной системы эндогенные опиоидные пептиды — агонисты мю-, дельта- и каппа-опиоидных рецепторов — оказывают разнообразное регулирующее влияние на клетки иммунной системы. Кроме того, существуют экспериментальные доказательства того, что экзогенный агонист мю-опиоидных рецепторов — морфин — оказывает влияние на жизнеспособность клеток иммунной системы. Данные эффекты обнаружены в экспериментах как с клеточными культурами, так и на лабораторных животных. Поэтому мы исследовали влияние эндогенных опиатов — динорфина А и бета-эндорфина — на жизнеспособность мононуклеаров периферической крови человека. В наших экспериментах была использована периферическая венозная кровь 14 условно здоровых добровольцев, каждый из которых перед забором биоматериала подписывал информированное согласие и имел возможность задать все интересующие его вопросы. Мононуклеарные клетки получали из гепаринизированной венозной крови методом разделения на градиенте плотности по стандартной методике. Для оценки пролиферации мононуклеары культивировали во влажной атмосфере в течение 72 часов. За 18 часов до окончания культивирования в каждую лунку вносили по 2 мКи ³H-метилтимидина. Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике “Guardian” (Wallac, Финляндия) и выражали в имп/мин. Для оценки развития апоптоза клетки культивировали в течение суток в тех же условиях, за исключением добавления радиоактивной метки. Затем клетки окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя и регистрировали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии. Исследование апоптоза клеток проводили на проточных цитофлюориметрах BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Гейт лимфоцитов (гейтировали по параметрам прямого и бокового светорассеяния) отображали на гистограмме Annexin V-FITC/7-AAD и подсчитывали долю (в процентах) живых клеток, связывающих аннексин (Annexin V-FITC⁺/7-AAD⁻). Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента. Было установлено, что агонисты мю- и каппа-опиоидных рецепторов бета-эндорфин и динорфин соответственно в физиологических концентрациях

Адрес для переписки:

*Южанинова Светлана Вадимовна
ФГБУН «Институт экологии и генетики
микроорганизмов» Уральского отделения Российской
академии наук
614002, Россия, г. Пермь, ул. Ленина, 11.
Тел.: 8 (902) 806-44-82.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: ecolimmlab@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Yuzhaninova Svetlana V.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614002, Russian Federation, Perm, Lenin str., 11.
Phone: 7 (902) 806-44-82.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: ecolimmlab@yandex.ru*

Образец цитирования:

*С.В. Южанинова, С.Г. Гилёва «Влияние бета-эндорфина и динорфина А на апоптоз лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 175-180.
doi: 10.46235/1028-7221-318-EOB
© Южанинова С.В., Гилёва С.Г., 2020*

For citation:

*S.V. Yuzhaninova, S.G. Gileva “Effects of beta-endorphin and dynorphin A on *in vitro* apoptosis in human peripheral blood lymphocytes”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 175-180.
doi: 10.46235/1028-7221-318-EOB
DOI: 10.46235/1028-7221-318-EOB*

(10^{-10} М и 10^{-8} М) оказывают разнонаправленное влияние на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека. Так, динорфин А стимулирует спонтанную пролиферацию и пролиферацию, вызванную субоптимальным воздействием митогена. Бета-эндорфин усиливает эффект субоптимальной концентрации митогена и значительно угнетает пролиферацию при максимальной активации клеток. Модулирующие эффекты бета-эндорфина и динорфина А *in vitro* на пролиферацию не связаны с усилением гибели клеток путем апоптоза.

Ключевые слова: бета-эндорфин, динорфин А, пролиферация, апоптоз, опиоидные пептиды, лимфоциты

EFFECTS OF BETA-ENDORPHIN AND DYNORPHIN A ON IN VITRO APOPTOSIS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Yuzhaninova S.V., Gileva S.G.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Along with functioning in the nerve system, the endogenous opioid peptides as the ligands of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors exert multiple effects on immune cells. Moreover, experimental evidence showed that morphine as an exogenous agonist of mu-opioid receptors affects immune cell viability. Such effects were discovered in experiments with cultured cells and laboratory animals. Hence, we studied effects of endogenous opioid peptides dynorphin A and beta-endorphin on viability of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. For this, we used samples of peripheral blood cells collected from the fourteen healthy volunteers, who provided with signed informed consent and might request any information regarding the research. Mononuclear cells were collected from the heparinized blood samples according to standard protocol and cultivated in the humid atmosphere for 72 hours. Two μ Ci 3 H-Methyl-thymidine was added into each test tube at 18 hours before the end of the cultivation period. Scintillation counting was performed by using Guardian liquid scintillation analyzer (Wallac, Finland) expressing the data as count per minute. To assess apoptosis, the cells were cultured for 24 hours in similar conditions except for adding radioactive probe. Next, the cells were stained with Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, USA) according to the manufacturer's instructions for further recording apoptotic cells in flow cytometers BD FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) or CytoFLEX S (Beckman Coulter, USA). The lymphocyte gate set by light scatter parameters was shown in typical Annexin V-FITC vs 7-AAD plot followed by counting Annexin V⁺/7-AAD⁻ cells. All data were expressed as means \pm S.E. Statistical significance was assessed by using Student's t-test. It was found that physiologic concentrations of mu- and kappa-opioid receptor agonists beta-endorphin and dynorphin A exerted multidirectional effects on proliferation of human peripheral blood lymphocytes. In particular, dynorphin A increased basal proliferation and proliferation in response to suboptimal mitogen stimulation. Moreover, beta-endorphin enhanced effects of mitogen stimulation at suboptimal concentration but profoundly suppressed proliferation in maximally activated cells. The modulating effects of beta-endorphin and dynorphin A on *in vitro* proliferation are not associated with augmented cell apoptosis.

Keywords: beta-endorphin, dynorphin A, proliferation, apoptosis, opioid peptides, lymphocytes

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

Введение

Эндогенные опиоидные пептиды — это небольшие по размеру (в среднем 10-30 аминокис-

лот) молекулы, которые являются лигандами μ -, δ - и κ -опиатных рецепторов и функционируют в центральной и периферической нервной системе. Помимо этого, опиоидные пептиды оказывают регуляторное влияние на клетки иммунной системы, затрагивая почти все известные стороны их функционирования: пролиферацию, диф-

ференцировку, синтез и секрецию цитокинов, цитотоксичность, фагоцитоз и другие эффектор-ные реакции. Иммуномодулирующие эффекты опиоидных пептидов главным образом рассма-триваются в рамках нервной регуляции функций иммунной системы при стрессе [1, 2].

Известно, что хронический стресс вызывает угнетение иммунных реакций [8]. С этим утверж-дением хорошо согласуется факт наличия апопто-зиндуцирующего влияния на клетки иммунной системы у агониста мю-опиоидных рецепторов – морфина [4, 5, 6, 7, 9, 10]. Однако морфин – это экзогенная молекула. А данных, указывающих на наличие апоптозиндуцирующего влияния у эн-догенных опиоидных пептидов крайне мало [7]. Учитывая, что системный ответ на хронический стресс (в виде секреции кортикостерона) зависит от стимуляции каппа- и мю-, но не дельта-опио-идных рецепторов (Wang, 2002), мы исследовали прямое апоптозиндуцирующее влияние соот-ветствующих агонистов – динорфина А и бета-эндорфина – на лимфоциты периферической крови человека. Тестирование апоптозиндуци-рующих свойств выбранных пептидов проводили на фоне поликлональной стимуляции лимфоци-тов как модели иммунного ответа *in vitro*.

Материалы и методы

В исследованиях была использована перифе-рическая венозная кровь 14 условно здоровых добровольцев (3 мужчин и 11 женщин), средний возраст 22-45 лет. Перед забором крови с каждым донором заключался письменный договор о со-гласии на забор биоматериала. Затем 10 мл кро-ви, полученной путем венепункции, смешивали с 25 ЕД/мл гепарина («Эльфа Лабораториз», Ин-дия) и немедленно использовали в эксперименте.

Выделение и культивирование клеток

Мононуклеарные клетки получали из гепари-низированной венозной крови методом разделе-ния на градиенте плотности 1,077 г/см³ фиколла («ДИАЭМ», Россия) по стандартной методике [3]. Для оценки пролиферации мононуклеары куль-тивировали в 96-луночных круглодонных план-шетах. Каждая культура содержала 2 · 10⁵ клеток в 0,2 мл полной питательной среды, которую гото-вили на основе среды RPMI-1640 с добавлением 10 mM HEPES (Sigma, США), 2 mM L-глутамина (Sigma, США), 100 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения) и 10% эмбриональной телячьей сыво-ротки (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, США). Культивирование осуществляли во влажной ат-мосфере с 5% CO₂ при 37 °С в течение 72 часов в присутствии различных концентраций фито-гемагглютинина (ФГА). За 18 часов до оконча-

ния культивирования в каждую лунку вносили по 2 мкКи ³H-метилтимидина в объеме 10 мкл. Радиоактивность проб определяли на жидкост-ном сцинтилляционном счетчике “Guardian” (Wallac, Финляндия). β-эндорфин (Sigma, США) и динорфин А (Sigma, США) использовали в ко-нечных концентрациях 10⁻¹⁰ и 10⁻⁸ М, наиболее соответствующих физиологическим, и вносили в культуры сразу с момента их постановки.

Оценка апоптоза

После суточной инкубации клетки однократ-но отмывали раствором DPBS (Sigma, США) и окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) со-гласно инструкции производителя и регистри-ровали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии.

Исследование апоптоза клеток проводили на проточных цитофлюориметрах BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Для оценки развития апоптоза лимфоциты гейтировали по параме-трам прямого и бокового светорассеяния. Гейт лимфоцитов отображали на гистограмме Annexin V-FITC/7-AAD и подсчитывали долю живых кле-ток, связывающих аннексин (Annexin V-FITC⁺/7-AAD⁻). Доля некротизированных клеток была по-стоянна (данные не представлены).

Статистическая обработка результатов прово-дилась в программе Excel с использованием пар-ного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Данные о влиянии пептидов на пролифера-тивный ответ мононуклеарных клеток перифе-рической крови человека приведены в таблице 1. Обнаружено, что динорфин А оказывает стиму-лирующее влияние на спонтанную пролифера-цию, так как увеличение захвата радиоактив-ной метки интактными клетками произошло в присутствии обеих концентраций динорфина А (p < 0,05). Также можно отметить некоторую тен-денцию к увеличению радиоактивности культур с ростом концентрации пептида.

Стимулирующее влияние динорфина А про-должается на фоне слабой митогенной активаци-и. Однако статистически значимый эффект достигается только при большой (10⁻⁸М) концен-трации пептида (табл. 1). При дальнейшем уси-лении митогенной активации стимулирующий эффект пептида исчезает.

Таким образом, динорфин в целом усили-вает пролиферацию мононуклеаров человека, действуя на интактные и слабо активированные клетки.

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ДИНОРФИНА А И β-ЭНДОРФИНА НА ВКЛЮЧЕНИЕ ³H-МЕТИЛТИМИДИНА* В ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СТИМУЛИРОВАННЫЕ ФГА

TABLE 1. EFFECTS OF DYNORPHIN A AND β-ENDORPHIN ON THE INCORPORATION OF ³H-METHYL THYMIDINE* INTO HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES STIMULATED BY PHA

Концентрация пептида Peptide concentration	Концентрация ФГА (мкг/мл) PHA concentration (mkg/ml)		
	Без митогена No mitogen	2,5	20
Контроль Control	175,5±31,2	3860,7±1298,8	32076,0±8091,0
Динорфин А 10 ⁻¹⁰ М Dynorphin A 10 ⁻¹⁰ M	294,7±44,0**	5081,3±1601,0	29908,8±8681,3
Динорфин А 10 ⁻⁸ М Dynorphin A 10 ⁻⁸ M	352,9±98,5**	5913,0±1712,4**	29320,5±7982,8
Контроль Control	833,4±134,8	3412,2±751,3	19326,9±3928,8
β-эндорфин 10 ⁻¹⁰ М β-Endorphin 10 ⁻¹⁰ M	1188,0±290,9	3803,5±838,2	7175,9±1585,8**
β-эндорфин 10 ⁻⁸ М β-Endorphin 10 ⁻⁸ M	1306,7±375,3	6796,1±1974,0**	17401,9±4837,5

Примечание. * – приведены значения М±m для значений имп/мин; ** – p < 0,05 по сравнению с контролем по парному t-критерию.

Note. *, M±m values for imp/min values are given; **, p < 0.05 compared with control by paired t-test.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ДИНОРФИНА А И β-ЭНДОРФИНА НА ДОЛЮ (В ПРОЦЕНТАХ) ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗЫВАЮЩИХ АННЕКСИН* И СТИМУЛИРОВАННЫХ ФГА

TABLE 2. EFFECTS OF DYNORPHIN A AND β-ENDORPHIN ON THE PROPORTION OF ANNEXIN BINDING HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES* STIMULATED BY PHA

Концентрация пептида Peptide concentration	Концентрация ФГА (мкг/мл) PHA concentration (mkg/ml)		
	Без митогена No mitogen	2,5	20
Контроль Control	30,5±1,9	34,0±2,6	60,7±3,4
Динорфин А 10 ⁻¹⁰ М Dynorphin A 10 ⁻¹⁰ M	31,0±2,2	33,2±2,3	61,5±3,4
Динорфин А 10 ⁻⁸ М Dynorphin A 10 ⁻⁸ M	31,4±2,2	32,9±2,3	61,5±3,3
β-эндорфин 10 ⁻¹⁰ М β-Endorphin 10 ⁻¹⁰ M	32,6±2,6	33,3±2,2	61,1±2,9
β-эндорфин 10 ⁻⁸ М β-Endorphin 10 ⁻⁸ M	32,9±2,4	33,0±2,3	59,0±2,8

Примечание. * – приведены значения М±m.

Note. *, M±m values are given.

Несколько по-иному пролиферацию мононуклеарных клеток человека модулирует бета-эндорфин (табл. 1). Во-первых, пептид проявляет активность только в отношении стимулированных клеток. Во-вторых, его эффекты имеют разную направленность. Так, подобно динорфину А, бета-эндорфин усиливает пролиферацию на фоне слабой митогенной стимуляции. Но при ее усилении пептид обнаруживает противоположное действие: в присутствии небольшой концентрации бета-эндорфина происходит почти трехкратное угнетение пролиферации. Однако этот эффект исчезает с ростом концентрации пептида.

Таким образом, бета-эндорфин оказывает разнонаправленное модулирующее влияние на пролиферацию, вектор которого зависит от интенсивности стимулирующего фактора и концентрации самого пептида.

Чтобы определить, не связано ли ингибирующее действие бета-эндорфина с усилением гибели клеток, мы оценили один из признаков апоптоза – экспрессию фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны клеток.

Как следует из таблицы 2, бета-эндорфин (в обоих использованных концентрациях, а равно и динорфин А) не оказал влияния на долю мононуклеарных клеток, связывающих аннексин и, соответственно, не влиял на процессы апоптоза в лимфоцитах.

Результаты нашей работы показывают, что в отношении лимфоцитов крови человека динорфин и бета-эндорфин обладают иммуномодулирующими эффектами, которые носят индивидуальный характер. В частности, динорфин А преимущественно поддерживает, тогда как бета-эндорфин поддерживает слабую и угнетает

выраженную пролиферацию клеток. Также нам удалось обнаружить, что оба пептида лишены апоптозиндуцирующего действия *in vitro*. Это дает основания утверждать, что у естественных агонистов мю- и каппа-опиоидных рецепторов отсутствует прямое апоптозиндуцирующее действие на лимфоциты человека.

Такое утверждение в отношении бета-эндорфина не согласуется с данными, полученными при исследовании свойств другого агониста мю-опиоидных рецепторов [4, 9, 10] – морфина. Инкубируя тот же объект исследования, что и в наших экспериментах, с морфином, авторы обнаружили появление у мононуклеаров надежных признаков апоптоза: фрагментации ДНК [4] и экспрессии Fas [9]. Морфин также индуцирует апоптоз у других клеток иммунной системы – макрофагов [7]. Однако в этом случае его влияние гораздо сильнее по сравнению с бета-эндорфином [7]. Суммируя данные литературы и собственные результаты, можно предположить, что апоптозиндуцирующее влияние бета-эндорфина на клетки иммунной системы выражено слабо по сравнению с морфином и проявляется избирательно.

Сведения об отсутствии у динорфина А прямого апоптозиндуцирующего действия в отношении лимфоцитов человека получены впервые.

1. Бета-эндорфин и динорфин А в зависимости от концентрации и интенсивности митогенного воздействия модулируют пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro*.

2. Бета-эндорфин и динорфин А не влияют на спонтанный и ФГА индуцированный апоптоз лимфоцитов *in vitro*.

Список литературы / References

1. Гейн С.В. Динорфины в регуляции функций иммунной системы // Биохимия, 2014. Т. 79, № 5. С. 509-519. [Gein S.V. Dynorphins in regulation of immune system functions. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 5, pp. 509-519. (In Russ.)]
2. 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 immunity cell functions. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2011, Vol. 76, no. 3, pp. 379-390. (In Russ.)]
3. Лимфоциты: методы / Под ред. Дж. Клауса; Пер. с англ. А.Н. Маца, А. А. Фельдшеровой. М.: Мир, 1990. 395 с. [Lymphocytes: Methods. Ed. by J. Klaus; Transl. from Engl. A.N. Matz, A.A. Feldsherova]. Moscow: Mir, 1990. 395 p.
4. Nair M.P., Schwartz S.A., Polasani R., Hou J., Sweet A., Chadha K.C. Immunoregulatory effects of morphine on human lymphocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997, Vol. 4, no. 2, pp. 127-132.
5. Singhal P.C., Kapasi A.A., Franki N., Reddy K. Morphine-induced macrophage apoptosis: the role of transforming growth factor-beta. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 57-62.
6. Singhal P.C., Reddy K., Franki N., Sanwal V., Gibbons N. Morphine induces splenocyte apoptosis and enhanced mRNA expression of cathepsin-B. *Inflammation*, 1997, Vol. 21, no. 6, pp. 609-617.
7. Singhal P.C., Sharma P., Kapasi A.A., Reddy K., Franki N., Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 4, pp. 1886-1893.

8. Wang J., Charboneau R., Barke R.A., Loh H.H., Roy S. Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 7, pp. 3630-3636.
9. Yin D., Mufson R.A., Wang R., Shi Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature*, 1999, Vol. 397, no. 6716, 218. doi: 10.1038/16612.
10. Yin D., Woodruff M., Zhang Y., Whaley S., Miao J., Ferslew K., Zhao J., Stuart C. Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/NF-kappaB pathways. *J. Neuroimmunol.*, 2006, Vol. 174, no. 1-2, pp. 101-107.

Авторы:

Южанинова С.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Гилёва С.Г. — к.м.н., инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Yuzhaninova S.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Biochemistry of the Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Gileva S.G., PhD (Medicine), Engineer, Laboratory of Biochemistry of the Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 08.06.2020
Отправлена на доработку 12.07.2020
Принята к печати 01.08.2020

Received 08.06.2020
Revision received 12.07.2020
Accepted 01.08.2020