

РОЛЬ МИЕЛОПЕПТИДОВ МП-5 И МП-6 В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

© 2018 г. С. В. Гейн^{1,3}, Т. В. Гаврилова¹, О. Н. Гейн⁵, Я. А. Кадочникова³, М. В. Черешнева², В. А. Черешнев², Е. А. Кирилина⁴

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

²ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

³ФГБОУ ВПО Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия

⁴ФГБУН Институт биоорганической химии им. М. М. Шемакина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁵ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ, Пермь, Россия

Поступила: 07.05.2018. Принята: 11.06.2018

В работе приведены результаты исследования влияния миелопептидов МП-5 и МП-6 на анти-телогенез, продукцию активных форм кислорода, IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами мышей на фоне 6 ч иммобилизационного стресса *in vivo*. Было выявлено стимулирующее влияние МП-5 и МП-6 на продукцию активных форм кислорода и IL-1 β перитонеальными макрофагами через 6 ч после их введения. Миелопептиды также нивелировали угнетающее влияние 6 ч иммобилизационного стресса на индуцированную зимозаном продукцию АФК перитонеальными макрофагами и образование АОК в селезенке.

Ключевые слова: миелопептиды, антителообразование, цитокины, стресс, макрофаги

DOI: 10.31857/S102872210002387-0

Адрес: 614081 Пермь, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Гейн Сергей Владимирович
Тел.: +83422108759. E-mail: gein@iegm.ru

Авторы:

Гейн С. В., д.м.н., профессор, заместитель директора Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия;

Гаврилова Т. В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия;

Гейн О. Н., к.б.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ, Пермь, Россия;

Кадочникова Я. А., студентка биологического факультета ФГБОУ ВПО Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия

Черешнева М. В., д.м.н., профессор, в.н.с. Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Черешнев В. А., академик РАН, д.м.н., г.н.с. Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Кирилина Е. А., к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий, ФГБУН Институт биоорганической химии им. М. М. Шемакина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия.

Миелопептиды представляют собой группу короткоцепочечных биорегуляторных пептидов

костномозгового происхождения, обладающих иммунорегуляторной активностью в отношении клеток адаптивного и врожденного иммунитета. В настоящее время описано шесть биологически активных миелопептидов (МП-1, МП-2, МП-3, МП-4, МП-5, МП-6), первоначально выделенных из супернатантов культур клеток костного мозга, которые отличаются друг от друга по аминокислотному составу, направленности действия и точкам приложения [1].

Известно, что МП-1 имеет центры специфического связывания на CD4⁺ Т-лимфоцитах, восстанавливает нарушенный баланс регуляторных субпопуляций. МП-2 корригирует нарушенные функции Т-лимфоцитов при опухолевых заболеваниях. МП-3 преимущественно модулирует функции клеток моноцитарно-макрофагального ряда, МП-4 и МП-6 стимулируют дифференцировку перевиваемой клеточной линии миеломонобластного лейкоза человека HL-60 [2], в то же время иммунорегуляторные эффекты МП-5 и МП-6 изучены недостаточно полно. Ранее нами было показано, что двухчасовой

иммобилизационный стресс угнетал индуцированную зимозаном продукцию кислородных радикалов и цитокина IL-1 β макрофагами. Введение мышам миелопептидов МП-3, МП-5 или МП-6 приводило к отмене стрессиндуцированного угнетения продукции активных форм кислорода (АФК) и IL-1 β . Пептид МП-5 стимулировал спонтанную продукцию АФК макрофагами и снижал продукцию IL-10 на фоне стресса [3, 4].

Цель настоящей работы — исследовать влияние миелопептидов МП-5 и МП-6 на антителогенез, продукцию активных форм кислорода, IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами мышей на фоне 6 ч иммобилизационного стресса *in vivo*.

Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на 24 мышах-самцах породы Swiss, массой 17–22 г. В качестве стрессорного воздействия использовался 6 ч иммобилизационный стресс. МП-5 или МП-6 вводили внутривентриально за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 — контрольная; 2 — стресс; 3 — стресс + МП-5 или МП-6; 4 — введение МП-5 или МП-6. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия иммунизировали ЭБ внутривентриально однократно (10^8 клеток в 0,2 мл 0,9% NaCl). На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Jerne [5]. Вторую половину животных после окончания стрессорного воздействия выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом.

Для получения перитонеальных макрофагов животным внутривентриально вводили 2 мл раствора Хэнкса с добавлением гепарина 20 ед/мл и ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) 50 мкл/мл. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах (“Greiner”, Германия), каждая лунка содержала клетки в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/0,2 мл р-ра Хэнкса. В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол 10^{-5} М. Регистрация результатов велась в течение часа с интервалом в 5 минут с помощью многофункционального спектрофотометра (“Tecan Trading AG”, Швейцария).

Для оценки продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в 24-луночных планшетах (“Costar”, США) 10^6 клеток в 1 мл полной культуральной среды, которую готовили *ex tempore* на основе среды RPMI 1640 (Gibco), с добавлением 10 mM HEPES (Sigma), 2 mM L-глутамин (“Sigma-Aldrich”), 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% ЭТС (“Биолот”, Россия). В качестве индуктора продукции провоспалительных цитокинов использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. Супернатанты 24-часовых культур собирали, замораживали и хранили при -20°C . Количественное определение IL-1 β и IL-10 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов

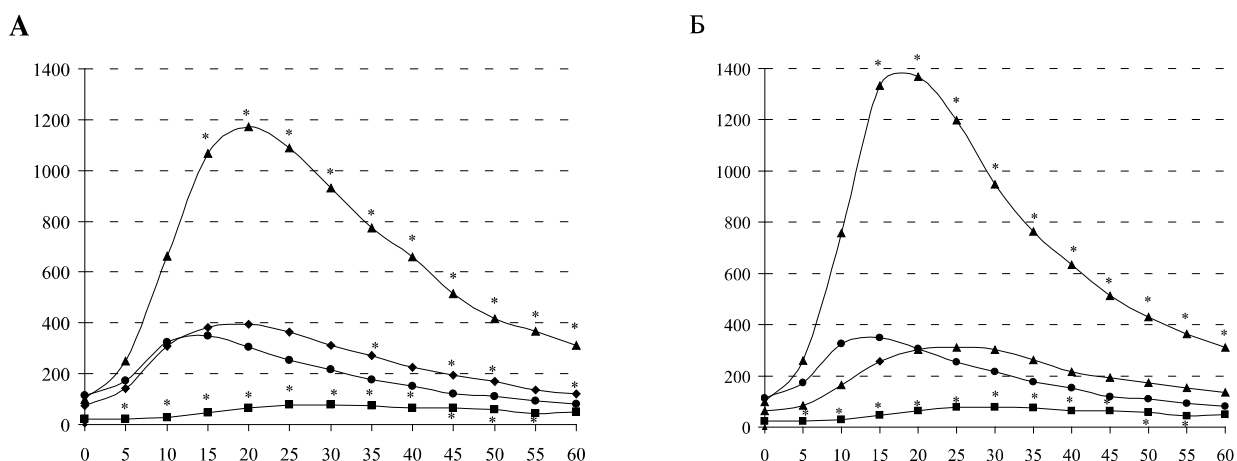


Рис. 1. Влияние МП-5 (А) и МП-6 (Б) на стимулированную продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами при 6 ч иммобилизационном стрессе *in vivo*. Здесь и далее: ● — контроль; ■ — стресс; ○ — стресс+МП; ▲ — МП. * — $p < 0,05$ к контролю ($n=12$)

Таблица 1. Влияние 6 ч иммобилизационного стресса на продукцию IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами мышей на фоне введения МП-5 и МП-6

Группа	Индуктор	IL-1 β , пг/мл	IL-10, пг/мл
Контроль	Без индуктора	95,11 \pm 32,40	222,15 \pm 57,27
	Зимозан	660,61 \pm 58,96	712,17 \pm 118,70
Стресс	Без индуктора	130,91 \pm 48,74	292,70 \pm 17,39
	Зимозан	700,47 \pm 133,03	715,86 \pm 49,19
Стресс + МП-5	Без индуктора	72,46 \pm 22,90	283,51 \pm 22,55
	Зимозан	607,44 \pm 25,31	857,03 \pm 101,80
Стресс + МП-6	Без индуктора	66,08 \pm 15,22	230,85 \pm 18,97
	Зимозан	749,17 \pm 58,08	799,57 \pm 23,61
МП-5	Без индуктора	295,11 \pm 91,99*	350,78 \pm 77,29
	Зимозан	1053,89 \pm 147,23*	761,26 \pm 72,84
МП-6	Без индуктора	104,18 \pm 30,83	332,82 \pm 67,99
	Зимозан	1145,47 \pm 62,42*	965,33 \pm 148,57

Примечание: результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$), число животных (n) $n = 8$ для каждой группы, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

(“R&D”, США) согласно методике, предложенной производителем.

Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

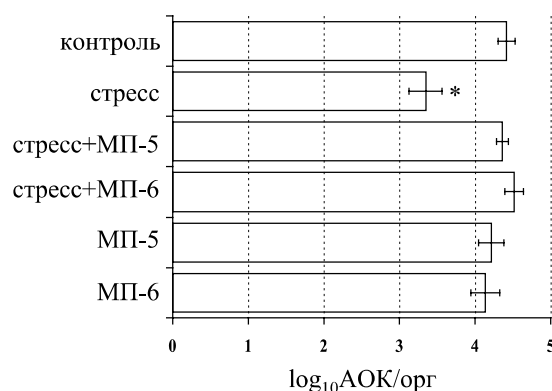
Установлено, что интенсивность спонтанной продукции активных форм кислорода при 6 ч иммобилизации статистически значимо не изменялась. Эффектов МП-5, МП-6 через 6 ч после введения на спонтанную продукцию АФК по сравнению с контролем не зарегистрировано (данные не приводятся). Стимулированная зимозаном продукция АФК при стрессе угнеталась по сравнению с животными контрольной группы практически в течение всего периода наблюдений. Изолированное введение как МП-5, так и МП-6 выражено усиливало продукцию АФК перитонеальными макрофагами с 15 по 60 мин наблюдений. Введение животным МП-5 на фоне стресса отменяло стрессиндуцированное угнетение продукции АФК, причем на 35, 45, 50 и 60 мин наблюдений значение этого показателя было несколько выше контрольного. МП-6 на фоне стресса так же отменял стрессиндуцированную супрессию продукции АФК, однако, без стимуляции по сравнению с животными контрольной группы (рис. 1).

Шестичасовой иммобилизационный стресс не приводил к изменениям продукции IL-1 β и IL-10. Введение на фоне стресса миелопептидов также не изменяло продукцию IL-1 β и IL-10. Однако через 6 ч после изолированного ведения миелопептидов отмечена стимуляция спонтанной и стимулированной продукции IL-1 β под

воздействием МП-5, и активация стимулированной продукции данного цитокина под воздействием МП-6. Статистически значимых изменений продукции IL-10 выявлено не было (таб. 1).

Оценка влияния МП-5 и МП-6 на количество АОК показало отмену стрессиндуцированного угнетения абсолютного количества антителлообразующих клеток в селезенке при введении миелопептидов. В большей степени это явилось результатом влияния на количество ЯСК, которое под воздействием 6 ч иммобилизационного стресса выражено снижалось (рис. 2).

Таким образом, МП-5 и МП-6 через 6 ч после введения стимулировали продукцию АФК и продукцию IL-1 β перитонеальными макрофагами. Миелопептиды нивелировали угнета-

**Рис. 2.** Влияние МП-5 и МП-6 на количество АОК в селезенке при 6 ч иммобилизационном стрессе *in vivo*

ющее влияние 6 ч иммобилизационного стресса на индуцированную зимозаном продукцию АФК макрофагами перитонеальной полости и образование АОК в селезенке. Ранее было показано, что миелопептиды МП-5 и МП-6 способны модулировать продукцию АФК и цитокинов при более коротком двухчасовом иммобилизационном стрессе [3]. Выраженное модулирующее действие на стрессиндуцированное изменение показателей иммунной системы оказывал и МП-3 [4]. Полученные данные указывают на однонаправленное действие миелопептидов (МП-3, МП-5 и МП-6). Возможно, схожесть эффектов данных миелопептидов обусловлена их общими мишенями и механизмами иммунорегуляторного действия. Ранее установлено, что к миелопептидам на мембране клеток могут существовать рецепторы низкой или средней аффинности [6, 7]. В то же время, короткие пептидные молекулы могут проникать в клетку без участия специфических рецепторов, путем транслокации через мембрану [8, 9].

Таким образом, полученные нами данные указывают на перспективность исследования иммуномодулирующих свойств миелопептидов МП-5 и МП-6 и механизмов их действия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16–44–590156-р-а и в рамках темы № АААА-А18–118020590108–7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. *Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E. et al. // Regulatory Peptides, 1994, 53, 203–209.*
2. *Петров Р. В., Михайлова А. А., Фомина Л. А. и др. Миелопептиды. – М.: Наука, 2000, 181. [Petrov R. V., Mikhailova A. A., Fonina L. A. et al. Myelopeptides. – М.: Science, 2000, 181].*
3. *Гейн С. В., Гаврилова Т. В., Журавлёва Л. С. и др. // Доклады Академии наук, 2014, 455(2), 232–234. [Gein S. V., Gavrilova T. M., Zhuravleva L. S. et al. // Doklady Academy of Sciences, 2014, 455(2), 232–234].*
4. *Гейн С. В., Гаврилова Т. В., Гейн О. Н. и др. // Доклады Академии наук, 2017, 475(6), 710–713. [Gein S. V., Gavrilova T. M., Gein O. N. et al. // Doklady Academy of Sciences, 2017, 475(6), 710–713].*
5. *Jerne N. K., Nordin A. A. // Science. 1963. V. 140, N3365. P. 405–405.*
6. *Фомина Л. А., Трещалина Е. М., Белевская Р. Г. и др. // Биоорганическая химия, 2012, 38(4), 406–412. [Fonina L. A., Tretschalina E. M., Belevskaya R. G. et al. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2012, 38(4), 406–412].*
7. *Гущин И. С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. М.: ФармарусПринт, 1998, 252. [Guschin I. S. Allergic inflammation and its pharmacological control. – М.: FarmarusPrint, 1998, 252].*
8. *Marinova Z., Vukojevic V., Surcheva S. et al. // J. Biol. Chem., 2005, 280, 26360–26370.*
9. *Хавинсон В. Х., Соловьев А. Ю., Тарновская С. И. и др. // Успехи современной биологии, 2013, 133(3), 310–316. [Havinson V. H., Soloviev A. Yu., Tarnovskaya S. I. et al. // Biology Bulletin Reviews, 2013, 133(3), 310–316].*

THE ROLE OF MIELOPEPTIDES MP-5 AND MP-6 IN REGULATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES UNDER IMMOBILIZATIONAL STRESS

© 2018 S. V. Gein^{1,3}, T. V. Gavrilova¹, O. N. Gein⁵, Ya. A. Kadochnikova³, M. V. Cheresheva², V. A. Chereshev², E. A. Kirilina⁴

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia;*

²*FGBUN Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;*

³*Perm State Research University Perm State Medical University, Perm, Russia;*

⁴*FGBUN Institute of Bioorganic Chemistry. M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov RAS, Moscow, Russia;*

⁵*FGBOU VO Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia*

Received: 07.05.2018 Accepted: 11.06.2018

The results of the study of the effect of MP-5 and MP-6 myelopeptides on the antibody response, production of reactive oxygen species, IL-1 β and IL-10 by peritoneal macrophages of mice against a background of 6 hours of immobilization stress *in vivo* are presented. The stimulating effect of MP-5 and MP-6 on the production of reactive oxygen species and IL-1 β by peritoneal macrophages was stimulated 6 hours after their administration. Myelopeptides also neutralized the inhibitory effect of immobilization stress on zymosan-induced production of reactive oxygen species by peritoneal macrophages and the antibody formation in the spleen.

Key words: myelopeptides, antibody formation, cytokines, stress, macrophages

Authors:

Gein S. V., ✉ MD, professor, deputy director of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia; E-mail: gein@iegm.ru,

614081 Perm, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms. Phone: +83422108759. **E-mail:** gein@iegm.ru;

Gavrilova T. V., MD, professor, leading researcher of the institute of ecology and genetics of microorganisms, ural branch of the russian academy of sciences, Perm, Russia;

Gein O. N., Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology, Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia;

Kadochnikova Y. A., a student of the Biology Faculty of the Perm State Research University, Perm, Russia;

Chereshneva M. V., MD, Professor, Research Fellow, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Chereshnev V. A., Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, Chief Researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Kirilina E. A., Ph.D., Senior Researcher, Laboratory of Cellular Interactions, FGBUN Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.