

РОЛЬ МИЕЛОПЕПТИДА МП-4 В РЕГУЛЯЦИИ АНТИТЕЛОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ ПРИ СТРЕССЕ

Гаврилова Т.В.^{1,5}, Оралова Д.А.², Гейн О.Н.³, Черешнева М.В.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Пермь, Россия

⁴ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

⁵ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»,
г. Пермь, Россия

Резюме. Миелопептиды представляют собой эндогенные низкомолекулярные пептиды, обладающие иммунорегуляторной активностью. Каждый из миелопептидов обладает индивидуальной пептидной последовательностью и играет определенную роль в коррекции нарушений иммунной системы. В проведенных нами ранее исследованиях было показано иммуномодулирующее действие миелопептидов МП-3, МП-5, МП-6 на функции перитонеальных макрофагов в условиях иммобилизационного и холодового стрессов. Цель настоящей работы – исследовать влияние миелопептида МП-4 на антителогенез, продукцию активных форм кислорода, и поглотительную активность перитонеальных макрофагов мышей на фоне двух и шестичасового 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 двух- и шестичасовой иммобилизационный стресс. МП-4 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-4; 4 – введение МП-4. На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Jerne. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Оценку поглотительной активности перитонеальных макрофагов проводили стандартным методом с использованием проточно-лазерного цитометра BDFACSCalibur. В качестве объектов фагоцитоза использовали меченые *St. aureus* в конечной концентрации 10⁸ кл/мл. Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

Адрес для переписки:

Гаврилова Татьяна Валерьевна
ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ
614000, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.
Тел.: 8 (902) 471-62-08.
E-mail: gavrilova.tv@mail.ru

Address for correspondence:

Gavrilova Tatyana V.
E. Wagner Perm State Medical University
614000, Russian Federation, Perm, Petropavlovskaya str., 26.
Phone: 7 (902) 471-62-08.
E-mail: gavrilova.tv@mail.ru

Образец цитирования:

Т.В. Гаврилова, Д.А. Оралова, О.Н. Гейн, М.В. Черешнева «Роль миелопептида МП-4 в регуляции антителогенеза и функциональной активности макрофагов при стрессе» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 161-166. doi: 10.46235/1028-7221-989-ROM
© Гаврилова Т.В. и соавт., 2021

For citation:

T.V. Gavrilova, D.A. Oralova, O.N. Gein, M.V. Chereshneva "Role of MP-4 myelopeptide in regulation of antibody production and functional activity of macrophages under stress conditions", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 161-166. doi: 10.46235/1028-7221-989-ROM
DOI: 10.46235/1028-7221-989-ROM

Установлено, что двухчасовой иммобилизационный стресс не влиял на поглотительную активность перитонеальных лейкоцитов, в то время как шестичасовой стресс угнетал фагоцитоз. Введение на фоне стресса МП-4 не приводило к изменениям фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. МП-4 не корригировал стрессиндуцированное угнетение количества антителообразующих клеток в селезенке при шестичасовой иммобилизации и стрессиндуцированное усиление абсолютного количества АОК в условиях двухчасового иммобилизационного стресса. В группе животных, получавших МП-4, на фоне двухчасовой иммобилизации зафиксировано увеличение количества ЯСК по сравнению с контрольной группой. Таким образом, в отличие от ранее исследуемых миелопептидов МП-4 не проявлял выраженных иммуномодулирующих эффектов в отношении изучаемых показателей.

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

ROLE OF MP-4 MYELOPEPTIDE IN REGULATION OF ANTIBODY PRODUCTION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES UNDER STRESS CONDITIONS

Gavrilova T.V.^{a, e}, Oralova D.A.^b, Gein O.N.^c, Chereshneva M.V.^d

^a E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

^c Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

^d Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^e Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Myelopeptides are endogenous low-molecular weight peptides with immunoregulatory activity. Each of these myelopeptides has an individual sequence and plays a role in correction of immune system disorders. In our earlier studies, we have shown immunomodulatory effect of MP-3, MP-5, MP-6 myelopeptides upon functioning of peritoneal macrophages under the conditions of immobilization and cold stresses. The aim of this work was to investigate the effect of MP-4 myelopeptide upon antibody formation, production of reactive oxygen species, and absorptive activity of peritoneal macrophages in mice under the immobilization stress. Materials and methods. The *in vivo* experiments were carried out in 24 male Swiss mice weighing 17–22 g. Two- or six-hour immobilization stress was produced in the animals. MP-4 was injected intraperitoneally 30 min before the onset of stress, at a dose of 40 µg/kg. The animals were divided into 4 groups: 1, control; 2, stress; 3, stress + MP-4; 4, MP-4 injection. On day +5, cellularity and the number of antibody-forming cells (AOC) in spleen were assessed by the method of local hemolysis in an agarose gel according to Jerne. Production of reactive oxygen species by peritoneal cells was assessed using the luminol-dependent chemiluminescence (LZHL) reaction. The absorption capacity of peritoneal macrophages was assessed using a standard method using a BDFACSCalibur laser flow cytometer. Labeled *St. aureus* at a final concentration of 108 cells/ml were used as phagocytosis targets. Statistical analysis was performed using the unpaired Student's t-test. Results. It was found that two-hour immobilization stress did not affect the absorption activity of peritoneal leukocytes, whereas six-hour stress suppressed phagocytosis. Injection of MP-4 in stress-exposed animals did not lead to changes in phagocytic activity of peritoneal macrophages. MP-4 did not correct the stress-induced decrease in the number of antibody-forming cells from the spleen during six hours of immobilization, nor stress-induced increase in absolute amounts of AOC under the two-hour immobilization stress. In the group of animals receiving MP-4 and immobilized for two-hours, an increase in the number of nucleated cells was increased, as compared with the control group. Thus, in contrast to the previously studied myelopeptides, MP-4 did not show pronounced immunomodulatory effects upon these parameters.

Keywords: myelopeptides, antibody formation, cytokines, stress, macrophages, phagocytosis

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А18-118020590108-7.

Введение

Миелопептиды представляют собой эндогенные низкомолекулярные пептиды, обладающие иммунорегуляторной активностью. Известны 6 основных биологически активных миелопептидов, которые первоначально были выделены методом твердофазной экстракции с последующим разделением жидкостной хроматографией, а впоследствии были получены и синтетическим путем. Каждый из миелопептидов обладает своей индивидуальной пептидной последовательностью и играет определенную роль в коррекции нарушений иммунной системы [1, 4, 5, 7].

В проведенных нами ранее исследованиях было показано иммуномодулирующее действие отдельных миелопептидов (МП-3, МП-5, МП-6) на функции перитонеальных макрофагов в условиях иммобилизационного и холодового стрессов. Так, было установлено, что миелопептиды МП-3, МП-5 и МП-6 нивелировали вызванное двухчасовым иммобилизационным стрессом угнетение продукции активных форм кислорода и IL-1 β перитонеальными макрофагами [2, 3]. МП-5 и МП-6 также нивелировали угнетающее влияние 6 ч иммобилизационного стресса на индуцированную зимозаном продукцию АФК перитонеальными макрофагами и образование АОК в селезенке, также указанные миелопептиды (МП-5 и МП-6) отменяли усиление продукции IL-10, вызванное 10-минутным холодовым стрессом [3]. Выраженным модулирующим действием на стрессиндуцированное изменение показателей иммунной системы обладал МП-3 [2].

Однако влияние миелопептида МП-4 на антителогенез, продукцию цитокинов и активных форм кислорода перитонеальными макрофагами на фоне иммобилизационного стресса ранее не изучалось.

Цель настоящей работы – исследовать влияние миелопептида МП-4 на антителогенез, продукцию активных форм кислорода, и поглотительную активность перитонеальных макрофагов мышей на фоне двух – и шестичасового иммобилизационного стресса *in vivo*.

Материалы и методы

Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на 24 мышах-самцах породы Swiss, массой 17–22 г. В качестве стрессорного воздействия использовался двух- и шестичасовой иммобилизационный стресс. МП-4 вводили внутрибрюшинно за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 – контрольная;

2 – стресс; 3 – стресс + МП-4; 4 – введение МП-4. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия иммунизировали ЭБ внутрибрюшинно 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 [6]. Вторую половину животных после окончания стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Для получения перитонеальных макрофагов животным внутрибрюшинно 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 хемиллюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах (Greiner, Германия), каждая лунка содержала клетки в концентрации 2×10^5 клеток/0,2 мл раствора Хэнкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛЗХЛ 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 поглотительной активности в качестве объекта исследования использовали фракцию перитонеальных лейкоцитов. К 80 мкл клеток добавляли 10 мкл МП-4 и 10 мкл суспензии FITC-меченого *St. aureus* в конечной концентрации 10^8 кл/мл, пробы инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем к клеткам добавляли лизирующий раствор (0,15М NH₄Cl; 0,01М NaHCO₃; 0,0001М ЭДТА, рН = 7,2) и после 5 мин инкубации центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. После снимали супернатант, добавляли PBS-0,02% ЭДТА и снова центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. Далее вновь снимали супернатант, добавляли 400 мкл PBS-0,02% ЭДТА. После этого пробы анализировали на проточно-лазерном цитометре BD FACS Calibur.

Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что интенсивность спонтанной продукции активных форм кислорода при шестичасовой иммобилизации статистически значимо не изменялась. Эффектов МП-4 на спонтанную продукцию АФК по сравнению с контролем не зарегистрировано (данные не приводятся). Стимулированная зимозаном продукция АФК при шестичасовом стрессе угнеталась по сравнению

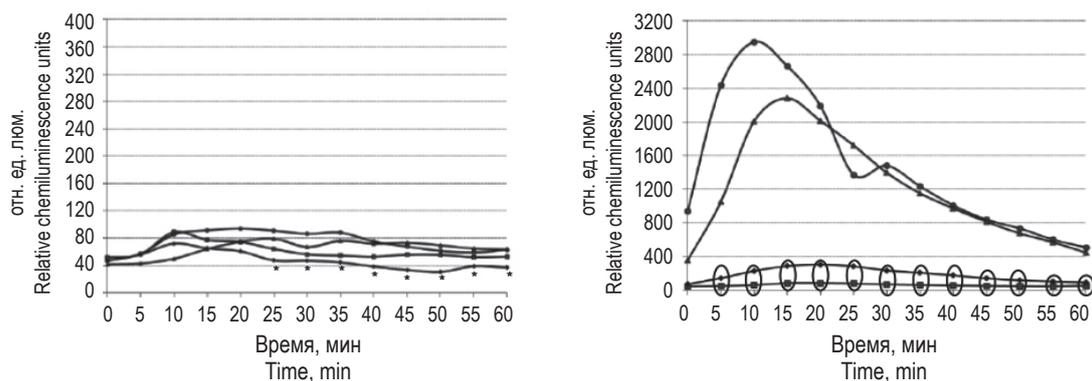


Рисунок 1. Влияние МП-4 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию АФК перитонеальными макрофагами при двухчасовом иммобилизационном стрессе *in vivo*

Примечание. ● – контроль; ■ – стресс; ◆ – стресс + МП-4; ▲ – МП-4. * и 0 – обозначены значения кривых, где $p < 0,05$ по сравнению с контролем (n = 9).

Figure 1. Influence of MP-4 on spontaneous (A) and stimulated (B) ROS production by peritoneal macrophages at 2 h *in vivo* immobilization stress

Note. ●, control; ■, stress; ◆, stress + MP-4; ▲, MP-4. * and 0, the values of the curves are indicated, where $p < 0.05$ in comparison with the control (n = 9).

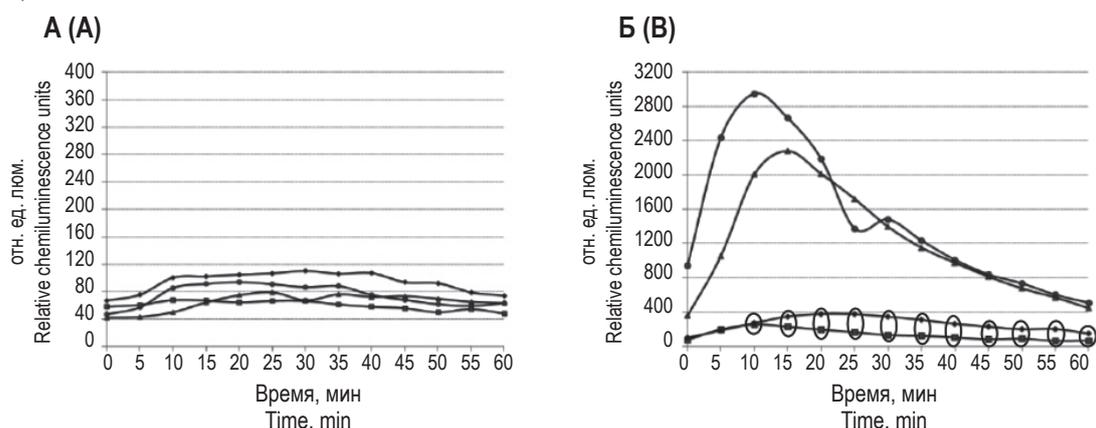


Рисунок 2. Влияние МП-4 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию АФК перитонеальными макрофагами при шестичасовом иммобилизационном стрессе *in vivo*

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Influence of MP-4 on spontaneous (A) and stimulated (B) ROS production by peritoneal macrophages at 6 h immobilization stress *in vivo*

Note. As for Figure 1.

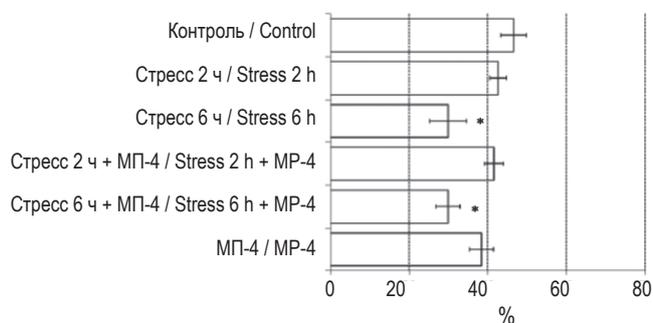


Рисунок 3. Влияние МП-4 на процент фагоцитоза клеток перитонеальной полости мышей при двух- и шестичасовом иммобилизационном стрессе *in vivo*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (n = 9).

Figure 3. Influence of MP-4 on the percentage of phagocytosis of cells of the peritoneal cavity of mice at 2 and 6 hours of immobilization stress *in vivo*

Note. *, $p < 0.05$ compared to control (n = 9).

с животными контрольной группы практически в течение всего периода наблюдений, введение мышам МП-4 на динамику респираторного взрыва влияния не оказывало. В условиях двухчасового стресса наблюдалось угнетение спонтанной продукции АФК в группе животных, получавших МП-4 на фоне стрессорного воздействия. Стимулированную продукцию АФК двухчасовой иммобилизационный стресс снижал. Как и в случае с шестичасовым стрессом, введение мышам МП-4 не проводило к изменению динамики респираторного взрыва (рис. 1, 2).

Установлено, что двухчасовой иммобилизационный стресс не влиял на поглотительную активность перитонеальных лейкоцитов, в то время как шестичасовой стресс угнетал фагоцитоз. Введение на фоне стресса МП-4 не приводило к изменениям фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (рис. 3).

При изучении влияния МП-4 на количество АОК в селезенке выявлено отсутствие корректирующего влияния данного пептида на стрессиндуцированное угнетение абсолютного и относительного количества антителообразующих клеток в селезенке при шестичасовой иммобилизации, а также на стрессиндуцированное уси-

ление абсолютного количества АОК в условиях двухчасового иммобилизационного стресса (данные не приводятся).

Как шестичасовая иммобилизация, так и введение МП-4 не приводили к изменению количества ЯСК в селезенке. Однако в группе животных, получавших МП-4, на фоне двухчасовой иммобилизации зафиксировано увеличение количества ЯСК по сравнению с контрольной группой (данные не приводятся).

Выводы

Таким образом, в отличие от ранее исследуемых миелопептидов, МП-4 не проявлял выраженных иммуномодулирующих эффектов в отношении изучаемых показателей. Возможно, особенность подобного действия связана со структурными особенностями МП-4, а именно более длинной пептидной цепочкой, не позволяющей пептиду проникать в клетку и дающей возможность реализации его эффектов только через взаимодействие с мембранными рецепторами [8]. Подобное предположение может являться предпосылкой для дальнейшего изучения молекулярных механизмов реализации эффектов миелопептидов, а именно МП-4.

Список литературы / References

1. Гаврилова Т.В., Гейн С.В. Иммунорегулирующие эффекты миелопептидов при экспериментальном проникающем ранении глаза. Екатеринбург: УрОРАН, 2004. 102 с. [Gavrilova T.M., Gein S.V. Immunoregulatory effects of myelopeptides in experimental penetrating wounds of the eye]. – Yekaterinburg: Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 2004. 102 p.
2. Гаврилова Т.В., Гейн О.Н., Гейн С.В., Черешнева М.В., Черешнев В.А. Миелопептиды в регуляции функциональной активности макрофагов при стрессе *in vivo* // Вестник Пермского федерального исследовательского центра, 2020. № 1. С. 53-60. [Gavrilova T.V., Gein O.N., Gein S.V., Cheresheva M.V., Chereshev V.A. Myelopeptides in the regulation of the functional activity of macrophages under stress *in vivo*. *Vestnik Permskogo federalnogo issledovatel'skogo tsentra = Bulletin of the Perm Federal Research Center*, 2020, no. 1, pp. 53-60. (In Russ.)]
3. Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Журавлёва Л.С., Черешнева М.В., Черешнев В.А., Кирилина Е.А. Влияние МП-3 на динамику респираторного взрыва и продукцию IL-1 β и TNF- α перитонеальными макрофагами мыши при стрессе *in vivo*. Доклады Академии наук, 2014. Т. 455, № 2. С. 232-234. [Gein S.V., Gavrilova T.M., Zhuravleva L.S., Cheresheva M.V., Kirilina E.A., Chereshev V.A. The Effect of MP-3 on Mouse Peritoneal Macrophage Respiratory Boost Activity and Production of IL-1 β and TNF- α under *in vivo* Stress. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Academy of Sciences*, 2014, Vol. 455, no. 2, pp. 232-234. (In Russ.)]
4. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М.: Наука, 2000. 181 с. [Petrov R.V., Mikhailova A.A., Fonina L.A., Stepanenko R.N. Myelopeptides]. Moscow: Science, 2000. 181 p.
5. Фомина Л.А., Трещалина Е.М., Белевская Р.Г., Азьмуко А.А., Ефремов М.А., Седакова Л.А., Кирилина Е.А. Синтез и противоопухолевые свойства миелопептида МП-1. Биоорганическая химия, 2012. Т. 38, № 4. С. 406-412. [Fonina L.A., Tretschalina E.M., Belevskaya R.G., Az`muko A.A., Efremov M.A., Sedakova L.A., Kirilina E.A. Synthesis and Anti-Tumor Properties of Myelopeptide MP-1. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*, 2012, Vol. 38, no. 4, pp. 406-412. (In Russ.)]
6. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. *Science*, 1963, Vol. 140, no. 3365, 405. doi: 10.1126/science.140.3565.405.

7. Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E., Shanurin S., Gur'yanov S., Malakhov A., Nesmeyanov V., Petrov R. Immunoregulatory properties of hexapeptide isolated from porcine bone marrow cell culture. *Regul. Pept.*, 1994, Vol. 53, Iss. 3, pp. 203-209.
8. Marinova Z., Vukojevic V., Surcheva S., Yakovleva T., Cebers G., Pasikova N., Usynin I., Hugonin L., Fang W., Hallberg M., Hirschberg D., Bergman T., Langel U., Hauser K.F., Pramanik A., Aldrich J.V., Gräslund A., Terenius L., Bakalkin G. Translocation of dynorphin neuropeptides across the plasma membrane. A putative mechanism of signal transmission. *J. Biol Chem.*, 2005, Vol. 280, no. 28, pp. 26360-26370.

Авторы:

Гаврилова Т.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Оралова Д.А. — студентка биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Гейн О.Н. — к.б.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Черешнева М.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Gavrilova T.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Ophthalmology, Perm State National Research University; Leading Research Associate, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Oralova D.A., Student, Faculty of Biology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Gein O.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Pharmacology, Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

Chereshneva M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 16.06.2021