

УДК 577.171.59.175.3.7

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ В ПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРИОД ИММУННОГО ОТВЕТА НА РАЗЛИЧНЫЕ АНТИГЕНЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ *IN VITRO*

АПРИКЯН В. С., ГАЛОЯН К. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Буянтяна НАН Армении, Ереван

В последние годы достигнут значительный прогресс в нейрониммунологии, благодаря расширению представлений о взаимосвязи между нейроэндокринной и иммунной системами. Развиваются исследования в области изучения участия отдельных структур нервной ткани в функционировании иммунной системы [1—10], обнаружены рецепторы к ним на иммунокомпетентных клетках [11—13], а также их способность замещать функции иммуномедиаторов [14], выявлены иммунореактивные структуры нервной ткани, обнаружена способность самих структур их индуцировать [15—18], изучается их роль в иммунопатологиях [19, 20]. Исследуются механизмы обратной связи. Интересным представляется изучение влияния на функционирование иммунной системы обнаруженного А. А. Галояном нового класса гипоталамических пептидов (НП) [21, 22].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния НП на антителообразование в продуктивный период иммунного ответа на различные антигены *in vitro*.

## Материалы и методы

Использовали свободных от специфического бактерионосительства мышей-гибридов первого поколения (СВА×С57В1/6J) F<sub>1</sub>. С этой целью выборочно из органов забитых цервикальной дислокацией мышей делались мазки-отпечатки на дифференциальные питательные среды. Использовали НП, очистку и выделение которых проводили из вторичного порошка гипоталамуса с помощью метода зонального электрофореза свободного потока на аппарате фирмы Bender-Hobein ELPHOR—VAP—22 (Германия). Среди полученных нейропептидных фракций были обнаружены как коронарорасширяющие, так и коронаросуживающие фракции. НП применяли в дозах от 10<sup>3</sup> мкг до 10<sup>-16</sup> мкг в 0,9%-ном изотоническом растворе хлористого натрия. Исследовали влияние НП на антителообразование в продуктивный период иммунного ответа на поликлональный, тимуснезависимый и тимусзависимый антигены. В качестве антигенов

использовали: липополисахарид (ЛПС, из *Salmonella typhosa* 0901, Difco Lab. Detroit, Mich.) для модуляции поликлонального иммунного ответа; динитрофенил—фиколл (ДНФ-фиколл), приготовленный с использованием CNBr-фиколла (Мм 400 000, «Sigma Chem. Co», США) и 2,4-динитрофенилсина («Sigma Chem. Co», США) по методу Klaus и соавт. [23], для модуляции тимуснезависимого иммунного ответа; эритроциты барана (ЭБ)—для модуляции тимусзависимого иммунного ответа. Антигены применяли в концентрациях: ЛПС—100 мкг/мл, ЭБ— $1 \times 10^7$ /мл, ДНФ-фиколл—10 нг/мл, субкутанно, в область задней стопы.

Мышей забивали первичальной дислокацией на 1-, 2- и 4-е сутки вторичного иммунного ответа на ЛПС, ДНФ-фиколл и ЭБ соответственно. Получали клетки регионарных лимфатических узлов, которые суспензировали в среде, содержащей RPMI—1640 (Flow Lab., Inc. Virginia, США), 10%-н а телячьей сыворотки (Gibco Lab., Inc. N. Y., США), 2 мМ хепес-буфера (Flow Lab., Inc. Virginia, США), 2 мМ L-глутамина (Gibco Lab., Inc. N. Y., США). Жизнеспособность клеток оценивали периодически на разных этапах исследования с помощью трипанового синего.

Суспензии клеток готовили из расчета:  $5 \times 10^6$ /мл при ЛПС-ответе, и по  $1 \times 10^7$ /мл при ответе на ДНФ-фиколл и ЭБ. По 0,5 мл клеточной суспензии и НП переносили в 48-луночные планшеты (Corning, Pack. Corp, Cambridge), которые инкубировали при покачивании 10 в мин на аппарате Bellco (Bellco Biotechnology, Nineland, N. J.) при 37° в стальных культуральных боксах в атмосфере 10% CO<sub>2</sub>.

Количество антителообразующих клеток (АОК) определяли спустя сутки, в модифицированном методе непрямого локального гемолиза [24], и выражали как количество АОК/ $10^6$  клеток. В качестве индикаторных клеток для ответа на ЛПС и ДНФ-фиколл, использовали выдержанные в растворе Олсвера ЭБ, соединенные с тринитрофенилом по методу Rittenberg и соавт. [25]. Вычисляли коэффициент стимуляции антителообразования как отношение количества АОК в опытных пробах к таковым в контрольных. Коэффициент угнетения антителообразования вычисляли как обратную стимуляции величину. Коэффициент стимуляции/угнетения обозначали как К. В контрольных пробах вместо НП применяли 0,9%-ный изотонический раствор хлористого натрия в аналогичных количествах. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

В процессе исследования среди различных НП были обнаружены НП с выраженной антителостимулирующей или антителоугнетающей активностями, условно обозначенные нами как НП-α и НП-β

соответственно. Данные по влиянию НП на формирование АОК к различным антигенам, представлены на рисунке. Можно видеть, что в случае с ЛПС антигеном стимулирующие НП (рис. А, а) проявляли активность в диапазоне доз 1 мкг— $10^{-12}$  мкг. Указанные дозы повышали выработку АОК в 1,26 ( $p < 0,05$ )—2,8 ( $p < 0,001$ ) раза. Так, дозы 1,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  мкг повышали продукцию АОК соответственно в 1,26 ( $p < 0,05$ ), 1,4, 1,6, 1,9, 2,34, 2,3, 1,5 ( $p < 0,001$ ) раза. Остальные дозы— $10^3$ —10 мкг и  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  мкг не оказали существенного влияния на антителообразование ( $p > 0,05$ ).

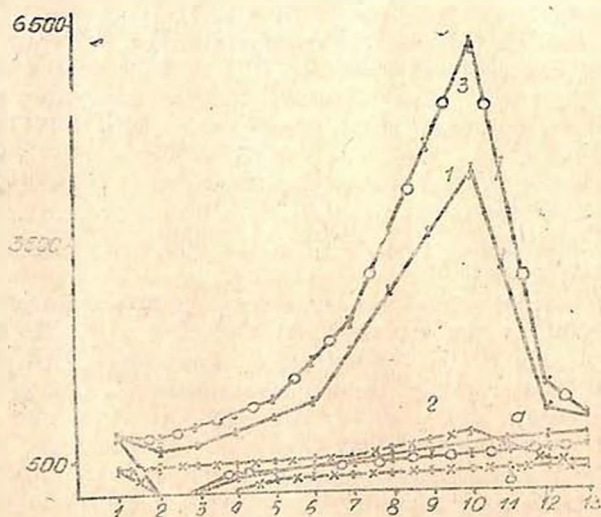


Рисунок. Влияние нового класса гипоталамических пептидов на формирование антителообразующих клеток в продуктивный период иммунного ответа к различным антигенам: линополисахариду (1), динитрофенил-фиколлу (2), эритроцитам барана (3). По оси абсцисс — дозы нового класса гипоталамических пептидов (в мкг): 1 — контроль, 2— $10^3$ , 3— $10^2$ , 4—10, 5—1,0, 6— $10^{-2}$ , 7— $10^{-4}$ , 8— $10^{-6}$ , 9— $10^{-8}$ , 10— $10^{-10}$ , 11— $10^{-12}$ , 12— $10^{-14}$ , 13— $10^{-16}$ , а — новый класс гипоталамических пептидов  $\alpha$ , б — новый класс гипоталамических пептидов  $\beta$ . По оси ординат — количество антителообразующих клеток  $\times 10^6$ .

Антителогнетающие НП (рис., А, б) проявляли активность в диапазоне доз 1— $10^{-12}$  мкг. Они угнетали выработку АОК в 1,3 ( $p < 0,05$ )—2,4 ( $p < 0,001$ ) раза. Так, дозы 1,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  мкг угнетали антителообразование в 2,4, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5 ( $p < 0,001$ ), 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Дозы  $10^8$ —10 мкг отменяли формирование АОК. Дозы  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  мкг не изменяли контрольный уровень выработки АОК ( $p > 0,05$ ).

Аналогичная активность имела место и при исследовании влияния НП на антителообразование в иммунном ответе на ДНФ-фиколл (рис., Б). Так, стимулирующий эффект НП- $\alpha$  (рис., Б, а)



проявлялся в диапазоне доз  $10^{-2}$ — $10^{-12}$  мкг и был на уровне 1,3 ( $p < 0,05$ )—2,6 ( $p < 0,001$ ). Дозы  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  мкг повышали продукцию АОК соответственно в 1,4, 1,6, 1,7, 2,0, 2,6 ( $p < 0,001$ ), 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза. Остальные дозы— $10^3$ —1 мкг и  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  мкг существенного влияния на изменение уровня выработки АОК не оказывали ( $p > 0,05$ ).

Антителогнетающий эффект НП-β (рис., Б, б) проявлялся в дозах  $10^{-2}$ — $10^{-12}$  мкг. Данные дозы угнетали выработку АОК в 1,2 ( $p < 0,05$ )—2,2 ( $p < 0,001$ ) раза. Дозы  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  мкг угнетали продукцию АОК соответственно в 2,2, 1,8, 1,6, 1,5, 1,3 ( $p < 0,001$ ), 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза. Дозы  $10^3$ —1 мкг отменяли формирование АОК. Дозы  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  мкг не оказывали существенного влияния на изменение контрольного уровня выработки АОК ( $p > 0,05$ ).

Результаты исследования влияния НП на антителообразование в иммунном ответе на ЭБ представлены на рисунке (В), из которого следует, что антителостимулирующие НП (рис., В, а) проявили активность в диапазоне доз  $10^{-2}$ — $10^{-12}$  мкг. Они повышали выработку АОК в 1,3 ( $p < 0,05$ )—4,1 ( $p < 0,001$ ) раза. Так, дозы  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  мкг стимулировали продукцию АОК соответственно в 1,3 ( $p < 0,05$ ), 1,7, 2,6, 3,4, 4,1, 2,5 ( $p < 0,001$ ) раза. Остальные дозы— $10^3$ —1 мкг и  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  мкг существенно не изменяли уровень выработки АОК ( $p > 0,05$ ).

Антителогнетающие НП (рис., В, б) проявили свою активность также в диапазоне доз  $10^{-2}$ — $10^{-12}$  мкг. Они угнетали выработку АОК в 1,3 ( $p < 0,05$ )—2,6 ( $p < 0,001$ ) раза. Так, дозы  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  мкг угнетали выработку АОК в 2,6, 2,18, 1,85, 1,6 ( $p < 0,001$ ), 1,45 ( $p < 0,01$ ), 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Дозы  $10^3$ —1 мкг полностью отменяли формирование АОК. Дозы  $10^{-14}$ — $10^{-16}$  мкг существенно не изменяли уровень выработки АОК ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, в результате проведенного исследования обнаружено, что в составе пептидной фракции гипоталамуса имеются как антителостимулирующие НП, так и антителогнетающие. Данные свойства НП проявлялись в продуктивном периоде иммунного ответа на различные антигены: поликлональный, тимуснезависимый, тимусзависимый. Изменение антителообразования под влиянием как стимулирующих, так и угнетающих НП носило выраженный, зависящий от дозы характер. Данные фармакокинетического анализа свидетельствуют, что величина силы стимулирующего действия НП достигала максимума в диапазоне доз  $10^{-8}$ — $10^{-10}$  мкг. В условиях проведенного исследования *in vitro* указанные дозы явились наиболее оптимальными.

# THE CHANGES OF ANTIBODY FORMATION AT THE PRODUCTIVE PERIOD OF IMMUNE RESPONSE TO DIFFERENT ANTIGENS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC PEPTIDES IN VITRO

APRIKIAN V. S., GALOYAN K. A.

II. Ch. Buntatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

It was studied the effect of hypothalamic peptides on antibody formation at the productive period of immune response to polyclonal, T-independent, T-dependent antigens in vitro.

There are different antibody stimulating, as well as antibody inhibiting neuropeptides. The activity appeared at all cases investigated, and was of dose-dependent character.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Blalock J. E., Johnson H. M., Smith E. M., Torres B. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* v. 125, p. 30—34, 1985.
2. Kruger T. K., Blalock J. E. *Biochem. and Biophys. Res., Commun.* v. 137, p. 197—200, 1986.
3. Johnson H. M., Smith E. H., Torres B. A., Blalock J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 79, p. 41—74, 1982.
4. Brooks K. M., Uhr J. W., Vitella E. S. *J. Immunol.*, v. 133, p. 3133—3137, 1984.
5. Pawlikowsky M., Zelazowsky P., Stepien H., Skally A. V. *Peptides*, v. 8, p. 951—952, 1987.
6. Stanisiz A. M., Befus D., Bienaslock J. J. *Immunol.*, v. 136, p. 152—156, 1986.
7. Payan D. G., Hess C. A., Goetzl E. J. *Cell. Immunol.* v. 84, p. 433—439, 1984.
8. Fals S., Annibale B., Fournier M., Santoro A., Palloae F., Delle Fave G. *J. Neuroimmunol.* v. 31, p. 211—219, 1991.
9. O. Dorisio M. S., Wood C. L., O. Dorisio T. M. *J. Immunol.*, v. 135, Suppl. v. 2, p. 791—796, 1985.
10. Strom J. B., Bangs J. D. *J. Immunol.*, v. 128, p. 1555—1559, 1982.
11. Scicchitano R., Dazin P., Bienaslock J., Payan D. G., Stanisiz A. M. *Brain. Behav. Immunol.* v. 1, p. 173, 1987.
12. Huruma K., Koike T., Nakamura H., Sumida T., Maeda T., Tomidaka H., Yoshida S., Fujita T. *Immunology*, v. 71, p. 480—485, 1990.
13. Nakamura H., Koike T., Hiruma K., Sato T., Tomidaka H., Yoshida S. *Immunology*, v. 62, p. 665, 1987.
14. Torres B. A., Johnson H. M. *J. Neuroimmunol.*, v. 17, № 1, p. 85, 1987.
15. Smith E. M., Morril A. C., Meyer W. J., Blalock J. E. *Nature*, v. 322, p. 881—882, 1986.
16. Kavalaars A., Pallieux R. E., Heijnen C. J. *J. Immunol.*, v. 142, p. 1338—1342, 1989.
17. O. Dorisio M. S., O. Dorisio T. M., Catland S., Balcerzak S. J. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 96, p. 662—672, 1980.
18. Blalock J. E. *Physiol. Rev.*, v. 69, № 1, p. 1—32, 1989.
19. Vohemayer K., Shuff-Warnar P., Nagel G. A. *Clin. Immunol. Immunopathol.* v. 41, p. 290—294, 1986.

- K., Mutt V. Int. Arch. Allergy. Appl. Immun., v. 81, p. 363, 1985.*  
21. *Galoyan A. A. Ergebnisse der Experimentelle Medizin, v. 29, p. 99—115, 1978.*  
22. *Galoyan A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.*  
23. *Klaus G. G., Phillips J. M., Hymphrey J. H., Presser D. W., Cross A. M.*  
*Eur. J. Immunol., v. 6, p. 429—433, 1976.*  
24. *Jerne N. K., Nordin A. A. Science, v. 140, p. 405, 1963.*  
25. *Rittenberg M. B., Pratt K. L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 137, p. 575—581,*  
*1969.*

Поступила 22. V. 1992