

УДК 577.171.59.175.3/7

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ПОВЫШАЮТ  
АНТИГЕНПРЕДСТАВЛЯЮЩУЮ ФУНКЦИЮ МАКРОФАГОВ

АПРИКЯН В. С., ГАЛОЯН К. А.

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

Исследовали влияние гипоталамических пептидов на антигенпредставляющую функцию мышинных перитонеальных макрофагов.

Установили, что исследуемые пептиды потенцируют данный иммунологический феномен. Они повышают антигенспецифическую, макрофагзависимую Т-клеточную пролиферацию *in vitro*, а также продукцию и секрецию фактора роста Т-клеток — интерлейкина-2 в культуре клеток CTLL-2. Наиболее активные дозы действовали в физиологических концентрациях  $10^{-8}$ — $10^{-12}$  мкг.

Антигенпредставляющая функция макрофагов является одной из основных иммунологических функций данного класса иммунокомпетентных клеток [1, 2]. Эффективность этого феномена, как известно, зависит от процесса переработки антигенных детерминант и их представления в соединении с продуктами главного комплекса гистосовместимости (МНС) Т-клеткам [3, 4]. Однако до настоящего времени, как сигналы, так и их инициаторы, модулирующие процессы переработки и представления антигена, индуцированные и запущенные в макрофагах, остаются в большей степени неизвестными. Для выяснения механизмов активации макрофагов были использованы иммуномодуляторы из различных источников, такие как продукт ферментативного расщепления иммуноглобулинов, фрагмент тяжелой цепи IgG, тетрапептид тафтени [5, 6], представители семейства полипептидов, выделенных из тимозина фракции 5, тимозины  $\alpha_1$  и  $\beta_1$  [7]. Интересным, на наш взгляд, представлялось, в этой связи, изучение участия в феномене представления антигена макрофагами нейропептидов. Из работ последних лет в области нейроиммунных взаимодействий известна активность нейропептидов в отношении клеток системы мононуклеарных фагоцитов [8—11].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния представителей нового класса гипоталамических пептидов [12, 13] на антигенпредставляющую функцию мышинных перитонеальных макрофагов.

В экспериментах использовали инбредных мышей линии BALB/c (H-2<sup>d</sup>), свободных от специфического бактерионосительства. Использовали гипоталамические пептиды (НП), полученные нами, которые применяли в дозах  $10^{-16}$ —1,0 мкг в 0,9%-ном изотоническом растворе хлористого натрия. Использовали ответные перитонеальные макрофаги (ПМФ), полученные на 5-е сутки после внутрибрюшинной инъекции 3 мл 10% тиаглицолята (Abbott Lab., Montreal, Quebec, Canada), методом перитонеального лаважа [14]. Полученные клетки центрифугировали 10 мин при 400 g и ресуспензировали в среде DMEM (Flow Lab. Inc., Virginia, USA). В полученной клеточной суспензии МФ, проверенные на неспецифическую эстеразную активность [15], составляли более 90%. Антигенпредставляющую функцию макрофагов оценивали методом антигенспецифической макрофагзависимой Т-клеточной пролиферации *in vitro* [16]. МФ насаивали в чашках Петри (Costar, Pack. Corp., Cambridge, MA, USA), инкубировали 12 ч при 37° в атмосфере 7% CO<sub>2</sub>. Неприкрепленные клетки удаляли 3-кратным интенсивным промыванием монослоя, после чего добавляли одновременно в 5,0 мл среды растворимый глобулярный белковый антиген (гемоцианин крылатого моллюска фиссулярии (KLH) (Ag) Becton-Diskinson, Mountain View, CA, USA) по 30 мкг/мл и НП в различных концентрациях. В контрольные пробы взамен НП вводили 0,9%-ный изотонический раствор хлористого натрия в аналогичных объемах. Спустя 4 ч свободный Ag и НП удаляли 3-кратным интенсивным промыванием монослоя среды. Затем в пробы вносили спленоциты, полученные по методу [17], которые извлекали через 18 ч, обрабатывали митомицином С (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) в концентрации 35 мкг/мл, 45 мин при 37°, промывали и ресуспензировали в среде по  $10^8$  клеток/мл. Затем  $5 \times 10^6$  клеток в 50 мкл среды инъецировали подкожно в подушечки задних лап сингенных мышей. На 7-е сутки извлекали подколенные лимфатические узлы (л/у) гомогенизировали и ресуспензировали в среде RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N. Y., USA), содержащей 1% свежеприготовленной сыворотки сингенной мыши, 40 мкг/мл гентамицина (Flow Lab. Inc., N. Y., USA) и  $5 \times 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанол (Calbiochem Behring Diagnostics, La Jolla, CA, USA). Затем  $5 \times 10^5$  клеток в 100 мкл среды культивировали в 96 луночных микроплетках (Costar, Pack. Corp., Cambridge MA, USA) в присутствии 0,05 мкг/мл Ag при 37° в атмосфере 7% CO<sub>2</sub>. Через 72 ч после начала культивирования в пробы вносили [<sup>3</sup>H] тимидин (В/О „Изотоп“) по 1,0 мкКи/мл. Спустя 16 ч клетки харвестировали (Scatron A5, Flow Lab. Inc UK) и подсчитывали включение метки по костимуляции синтеза ДНК в сцинтилляционном счетчике TASC (Packard Instruments, Caversham, UK). Результаты выражали как число имп/мин  $\times 10^{-3}$ .

Для более полного представления об участии НП в антигенпредставляющей функции макрофагов исследовали также способность НП модулировать продукцию и секрецию ИЛ-2. С этой целью в культуру ИЛ-2-зависимой линии клеток CTLL2 (АКК, С.-Петербург) вносили испытуемые супернатанты, харвестированные через 24, 48 и 72 ч культивирования основных проб, или супернатанты, содержащие стандартный ИЛ-2, полученный культивированием спленоцитов ( $2 \times 10^6$  мл) с конканавалином А („Sigma“ Chem. Co., St. Louis, MO, U S A) (10 мкг/мл), 48 ч при  $37^\circ$  в атмосфере 7%  $\text{CO}_2$ . Результаты оценивали в сравнении со стандартным ИЛ-2, величину активности которого принимали за 1000 ед/мл.

С целью исключения секреции под действием НП ИЛ-4, который тоже способен индуцировать пролиферацию CTLL-2 [18], секрецию ИЛ-2 оценивали и в присутствии анти-ИЛ-4 моноклональных антител ИВН (АКК, С.-Петербург). Данные антитела добавляли к CTLL-2 в начале культивирования в концентрации 900 ед/мл, которая полностью блокирует пролиферацию клеток, индуцированную мышинным рекомбинантным ИЛ-4.

Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования оценивали влияние НП на пролиферативный ответ клеток л/у к Аг, обработанному и представленному ПМФ-ми сингенным спленоцитам. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 1. Как следует из таблицы, НП в широком диапазоне доз от 1,0 до  $10^{-14}$  мкг повышали Аг-специфический пролиферативный ответ клеток л/у в 1,6—5,1 ( $p < 0,001$ ) раза. Фармакокинетически наиболее высокий уровень ответа инициировали НП в дозах  $10^{-8}$ — $10^{-12}$  мкг.

Таблица 1.  
Влияние гипоталамических пептидов (НП)  
на АГ-представляющую функцию МФ.

Дозы НП (мкг)	Захват [ $^3\text{H}$ ] тимидина (имп/мин)
К	17,8 ± 0,6
1,0	30,1 ± 1,0
$10^{-2}$	42,1 ± 1,1
$10^{-4}$	54,6 ± 1,3
$10^{-6}$	66,8 ± 1,3
$10^{-8}$	79,9 ± 1,4
$10^{-10}$	91,8 ± 1,6
$10^{-12}$	68,4 ± 1,3
$10^{-14}$	44,8 ± 1,1
$10^{-16}$	22,7 ± 0,7

На следующем этапе исследования оценивали влияние НП на продукцию и секрецию ИЛ-2 сенсебилизированными клетками л/у в ответ на Ag. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 2, из которой следует, что НП повышали как продукцию, так и секрецию ИЛ-2. Продукция ИЛ-2 повышалась под влиянием НП уже через 24 ч после начала культивирования культур клеток. Максимальное повышение секреции ИЛ-2 наблюдалось через 48 ч культивирования и было выше таковой в пробах, не содержащих НП, в 2,0—5,8 ( $p < 0,001$ ) раза. Данная активность НП сохранялась в пробах и после их 72-часового культивирования. В этом случае повышение секреции ИЛ-2 имело также статистическую достоверность. Максимально повышенная секреция ИЛ-2 под влиянием НП наблюдалась при применении их в дозах  $10^{-8}$ — $10^{-12}$  мкг.

Таблица 2.  
Влияние гипоталамических пептидов (НП) на  
продукцию и секрецию ИЛ-2

Дозы НП (мкг)	Активность ИЛ-2 (ед/мл)		
	время инкубации (ч)		
	24	48	72
Контроль	9,8±0,3	28,8±1,6	19,2±0,7
1	17,6±0,8	56,2±3,1	34,2±2,1
$10^{-2}$	25,0±1,1	84,6±5,4	49,5±2,3
$10^{-4}$	32,4±1,7	112,9±8,1	65,7±3,8
$10^{-6}$	42,5±2,1	135,7±8,8	80,9±5,8
$10^{-8}$	48,2±2,4	167,3±9,8	96,9±6,9
$10^{-10}$	39,9±2,6	133,7±9,6	79,7±4,8
$10^{-12}$	30,4±2,1	100,2±8,7	62,4±3,5
$10^{-14}$	23,1±1,6	66,1±4,7	43,9±2,3
$10^{-16}$	13,9±0,6	32,4±1,8	26,2±1,3

Заключительный этап исследования включал в себя оценку под влиянием НП секреции ИЛ-2 в присутствии анти-ИЛ-4 моноклональных антител. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 3. Как следует из таблицы, НП повышали продукцию ИЛ-2 в широком диапазоне доз в 1,7—3,7 ( $p < 0,001$ ) раза. Максимальный эффект НП проявлялся в дозах  $10^{-6}$ — $10^{-12}$  мкг. Аналогичный эффект повышения продукции ИЛ-2 НП наблюдали и в присутствии анти-ИЛ-4 моноклональных антител. Данный факт свидетельствует, что обнаруженный эффект НП повышать продукцию ИЛ-2 не связан с присутствием в супернатантах обнаруживаемого количества ИЛ-4.

Основной задачей настоящего исследования явилось установление факта участия гипоталамических пептидов в антигенпредставляющей функции макрофагов. Было установлено, что НП обладают способностью повышать данную иммунологическую функцию МФ. Это

продемонстрировано в методе Ag-специфической МФ-зависимой Т-клеточной пролиферации *in vitro*. Монослой ПМФ культивировались с растворимым глобулярным белковым Ag в присутствии или в отсутствие НП, промывались и культивировались с клетками селезенки. Затем, собранные и обработанные митомином С спленоциты инъецировали сингенным мышам. Клетки л/у, дренирующие область введения Ag, тестировались на специфический ответ к Ag, пролиферацией и секретцией фактора роста Т-клеток—ИЛ-2. Данная тест-система позволяет судить о начальном этапе первичного ответа к Ag популяцией непримированных клеток и характеризует раннюю фазу представления Ag. С помощью этой тест-системы ранее были установлены повышающие Ag-представляющую функцию МФ свойства у таких иммуномодуляторов, как тафтсин и синтетические тимические пептиды из тимозина фракции 5—тимозинов  $\alpha_1$  и  $\beta_1$  [6, 7]. Известно, что эти два пептида являются единственными, выделенными в чистом виде и синтезированными из семейства 40—60 пептидов, входящих в состав тимозина фракции 5 [19]. Известно также, что они принимают участие в регуляции секреторных функций гипоталамуса, гипофиза, надпочечников и осуществляют взаимодействие между ними [20]. Обнаружение нами активности НП, аналогичной тимозинам, представляется интересной и перспективной в плане приближения объяснений механизмов нейрониммунных взаимодействий. Актуально значимой представляется изучение их роли в ободозависимой регуляции.

Таблица 3

Влияние гипоталамических пептидов (НП) на секретрию ИЛ-2 в присутствии анти-ИЛ-4 Мон АТ.

Дозы НП (мкг)	Активность ИЛ-2 (ед мл)	
	без Мон АТ	с Мон АТ
контр. (без Ag)	2,8±0,83	21,3±0,6
контр. (с Ag)	4,0±0,06	19,2±0,9
1	31,0±0,6	32,8±1,1
10 <sup>-2</sup>	41,2±0,8	40,1±2,2
10 <sup>-4</sup>	49,1±1,1	48,2±2,6
10 <sup>-6</sup>	56,4±3,1	55,7±3,1
10 <sup>-8</sup>	63,8±3,6	63,2±4,4
10 <sup>-10</sup>	71,6±4,1	70,8±4,8
10 <sup>-12</sup>	52,9±3,2	52,0±2,5
10 <sup>-14</sup>	35,0±2,6	32,7±1,8
10 <sup>-16</sup>	16,1±0,8	14,0±0,9

Показанное нами повышение Ag-представляющей функции МФ НП-ми являлось иммунологически специфическим и сопровождалось повышенной продукцией ИЛ-2. Известно, что индуцировать пролиферацию мышинных ИЛ-2 зависимых клеточных линий, включая и

использованную нами CTLL, способен также и ИЛ-4 (фактор роста В-клеток). В этой связи возникла необходимость выяснить сопровождается ли модуляция НП-ми секреции ИЛ-2 повышенной секрецией ИЛ4, приводящего к повышению пролиферации CTLL. Нам было установлено, что добавление нейтрализующих концентраций анти-ИЛ-4 мышинных моноклональных антител (ИВН) к супернатантам, содержащим ИЛ-2, не отменяло пролиферацию CTLL. Так было подтверждено участие в исследуемом феномене именно фактора роста Т-клеток.

Так как НП удалялись из культур интенсивным промыванием до внесения в культуры спленоцитов, можно предположить, что Аг-представляющая функция МФ повышается ими непосредственно. Однако возможно, что остаточное количество НП все же присутствовало в течение периода сенсибилизации *in vitro*. В любом случае остается фактом, что НП повышали раннюю фазу представления Аг. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого феномена изучаются. Можно предположить, что механизмы, посредством которых НП модулируют МФ-Т-клеточные взаимодействия, могут быть вовлечены в повышение эффективности захвата, обработки и представления Аг МФми и/или содействие взаимодействию или переносу информации Т-клеткам. Эти эффекты могут отражаться на повышении продукции ИЛ-2 и других цитокинов, а также экспрессии их рецепторов на лимфоцитах, приводящих к повышению их пролиферации. Примечательным является тот факт, что наивысшая активность НП проявлялась в дозах  $10^{-8}$ — $10^{-12}$  мкг, что соответствует области физиологической активности большинства пептидных гормонов.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что гипоталамические пептиды потенцируют Аг-представляющую функцию МФ. Они повышают Аг-специфическую МФ-зависимую Т-клеточную пролиферацию, а также продукцию и секрецию фактора роста Т-клеток—ИЛ-2.

## HYPOTHALAMIC PEPTIDES ENHANCE THE ANTIGEN-PRESENTING FUNCTION OF MACROPHAGES.

APRIKIAN V. S., GALOYAN K. A.

H. Kh. Buniatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of a new class of hypothalamic peptides (HP) on the antigen-presenting function of mouse peritoneal macrophages (MO) was investigated. It was determined that HP potentiated the given immunological phenomenon. HP in physiological concentrations enhanced antigen-specific MO-dependent T-cell proliferation *in vitro* and IL-2 production and secretion in CTLL-2 cell culture.

1. *Unanue E. R.* Ann. Rev. Immunol., v. 2, p. 395—428, 1984.
2. *Austyn J. M.* Antigen-presenting cells. IRI. Press. Oxford Univ., N. Y., 1982.
3. *Grey H. M., Chesnut R.* Immunol. Today., v. 6, p. 101, 1985.
4. *Austyn J. M., Wood K. J.* Principles of cellular and molecular immunity. Oxford Univ., Press. Oxford, N. Y., p. 608, 1992.
5. *Trehoval E., Segal S., Stabinsky Y., Fridkin M., Spirer Z., Feldman M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 75, p. 3100—3404, 1978.
6. *Dagan S., Trehoval E., Fridkin M., Feldman M. J.* Biol. Response Mod., v. 6, p. 625—636, 1987.
7. *Trehoval E., Srteln M., Goldstein A. L.* Immunopharmacol., v. 18, p. 107—113, 1989.
8. *Niethammer D.* Neuroendocr. Lett., v. 9, p. 274—280, 1987.
9. *Koff W. C., Duncgan M. A. J.* Immunol., v. 135, p. 350—354, 1985.
10. *O'Dorisio M. S., O'Dorisio T. M., Calland S., Balcerzak S. J.* Lab. Clin. Med., v. 96, p. 662—672, 1980.
11. *Kavejaars A., Ballieux R. E., Heijnen C. J. J.* Immunol., v. 142, p. 1338—1342, 1989.
12. *Galoyan A. A.* Ergebnisse der Experimentellen Medizin., v. 29, p. 99—115, 1978.
13. *Galoyan A. A.* Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
14. *Unanue E. R., Kiely J. M., Calderon J. J.* Exp. Med., v. 144, p. 155, 1976.
15. *Sonne O., Pedersen K., Kudahl K., Fisker S.* Scand. J. Immunol., v. 33, p. 231—235, 1991.
16. *Steinman L., Trehoval E., Cohen I. R., Segal S., Glickman E.* Eur. J. Immunol., v. 8, p. 29—34, 1978.
17. *Julius M. H., Simpson E., Herrenberg L. W.* Eur. J. Immunol., v. 3, p. 645, 1973, 1986.
18. *Smith C. A., Rennick D. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 83, p. 1857—1861, 1986.
19. *Goldstein A. L., Low T. L. K., Zatz M. M., Hall N. R., McGlure J. E., Hu S., Sohulof R. S.*—In: Mihlick E. (ed.) Immunological approaches to cancer therapeutics, N. Y., John Wiley 137, 1982.
20. *Koutabb N.* (ed.) Tlymich hormones: immunologic mechanism and therapeutic action, N. Y., Marcel Dekker, 1985.

Поступила 18. III, 1992.