

**ИММУНОКОРРИГИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ПОЛИПЕПТИДА ПРИ МАКРОФАГ-
АССОЦИИРОВАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДИСФУНКЦИЯХ****В.С.Априкян, А.А.Галоян***/Институт биохимии им.Г.Х.Бунятына НАН РА/
375014 Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: гипоталамические полипептиды, бактерии, дисфункции макрофагов, иммунокоррекция

Вопросы проявления дисфункций макрофагов (МФ) и их иммунокоррекция остаются наиболее значимыми как для фундаментальной, так и прикладной иммунологии [7,12]. Известно, что дисфункции МФ, помимо системных расстройств, могут приводить как к непрямым тканевым повреждениям через резистентность к инфекционным и неинфекционным агентам окружающей среды, так и через прямые тканевые повреждения самими МФ и их клеточными продуктами [1]. МФ обладают рядом уникальных особенностей: они вырабатывают множество различных биоактивных веществ, в том числе большую часть цитокинов; они филогенетически и функционально являются первыми клетками в системе защиты организма от нарушений баланса жизнедеятельности, постоянства внутренней среды; МФ являются той клеткой, где концентрируются основные события и решения, приводящие к указанию, по какому пути будет происходить иммунный ответ, форма иммунного реагирования [5,7]. В этой связи чрезвычайно важным представляется поиск средств, направленно воздействующих на МФ и регулирующих их активность. В настоящее время известен ряд иммуномодуляторов: костномозговые цитокины [11], факторы тимуса [8], интерлейкины [19] интерфероны [24] и многие другие [18]. Однако они не в полной мере удовлетворяют требования современной медицины [18]. В последние годы важное значение приобретают пептидные гормоны и гормоноподобные вещества ЦНС как регуляторы активности иммунной системы [10]. К их числу относят соматостатин [6], тиреотропин [22], адренокортикотропин [26], аргинин-вазопрессин [28], окситоцин [14], нейротензин

[21], опиоидные пептиды [25] и другие. К ним принадлежит и обнаруженный А.А.Галояном новый класс нейропептидов гипоталамуса с выраженным кардиоактивным действием [9]. Установлено их иммуномодулирующее действие на гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ [1,4,6], активность МФ [13], секрецию цитокинов: интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) [2,3,6]. Важным представлялось исследование влияния гипоталамических полипептидов (ГП) на иммунные реакции МФ при бактериальных дисфункциях.

Целью настоящего исследования явилось изучение иммунокорригирующих свойств вновь открытого пролин-обогащенного полипептида (PRP) гипоталамуса [13] при дисфункциях МФ, вызванных бактериальными патогенами.

Материал и методы

В экспериментах использовали 6–8-недельных самок беспатогенных мышей-гибридов первого поколения (СВАхС57BL/6J) F_1 из питомника "Столбовая" РАМН, предварительно проверенных на специфическое бактерионосительство. С этой целью делали мазки-отпечатки из органов выборочно умерщвленных мышей на дифференциальные питательные среды Плоскирева и Эндо. Для моделирования бактериальной патологии мышей инфицировали 18 ч культурой микроорганизмов *Salmonella typhimurium* в логарифмической фазе роста, культивированных в стандартных условиях. Штамм бактерий был высоковирулентен, типичен по культуральным, морфологическим и ферментативным свойствам. Летальные дозы инъецированных бактериальных взвесей определяли стандартным способом [20]. ГП получали из фракций низкомолекулярных белков и пептидов гипоталамуса крупного рогатого скота [9,10]. Этиотропное действие ГП оценивали как непосредственное их влияние на рост бактерий в культуре *in vitro*. МФ получали методом перитонеального лаважа [5]. МФ извлекали на льду в 5,0 мл раствора холодной питательной среды RPMI 1640 (ICN, США) в силиконизированные пробирки, центрифугировали 4 мин при 4°C и 110 g, суспензировали в 48 луночных микропланшетах Linbro (ICN, США). Идентификацию МФ проводили цитохимически по активности α -нафтилацетатэстеразы [27] и морфологически [32].

Влияние ГП на синтез ИЛ-1 МФ у инфицированных мышей определяли использованием клеточной линии Т-хелперных лимфоцитов D 10.G.4.1. [33] в нашей модификации. Через 1 ч после внутрибрюшинной (в/б) инъекции ГП мышей заражали сублетальной дозой *S.typhimurium* тем же способом. Спустя 1 ч МФ, полученные от каждой мыши, фиксировали в 0,5 мл 0,5% параформальдегида в растворе фосфатного буфера (РФБ) 15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 3,0 мл 0,2 М глицина в РФБ в течение 10 мин. Клетки дважды промывали в 0,5 мл РФБ центрифугированием 10 мин при 800 g и добав-

ляли к 5×10^5 МФ в 1,0 мл RPMI 1640-Д 10 клеток. По 100 мкл фиксированных МФ вносили в три отдельные лунки микротитрационных планшетов и проводили серию двукратных разведений в 6 лунках. Затем в каждую лунку вносили по 2×10^4 Д 10.G.4.1. клеток в 100 мкл RPMI 1640-Д 10, содержащей 5,0 мкл/мл конканавалина А. Клеточные культуры инкубировали 48 ч при 37° С в 5% атмосфере CO₂. Затем культуры метили добавлением по 1,0 мкКи [³H] тимидина в течение 18 ч и харвестировали на стекловолокнистых фильтрах с использованием PhD Cell Harvester (СТ, Cambridge, MA, США). Радиоактивность измеряли на бета-сцинтилляционном счетчике и выражали в имп/мин. За 1 ЕД активности ИЛ-1 принимали его количество, необходимое для индукции 50,0% от максимальной стимуляции пролиферации клеток Д 10. Для нейтрализации активности ИЛ-1 использовали кроличью антимышиную ИЛ-1α и ИЛ-1β антисыворотку (ICN, США).

Влияние ГП на антиген-представляющую функцию МФ исследовали с использованием сальмонелла-иммунных Т-клеток [17]. Мышей инфицировали в/б сублетальной дозой живых сальмонелл за 4 дня до инъекции ГП тем же способом. Сальмонелла-иммунные Т-клетки получали из клеток перитонеального экссудата мышей с помощью двойного пассажа через волокнистые нейлоновые фильтры (ICN, США). Различные количества МФ в 0,2 мл RPMI 1640, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ICN, США) и 5×10^{-5} 2 МЕ (ICN, США), инкубировали в микротитрационных планшетах (Falcon, США) 2 ч при 37° С и удаляли неадгерентные клетки интенсивным промыванием RPMI 1640. Инактивированные нагреванием сальмонеллы (1×10^6) и сальмонелла-иммунные Т-клетки (2×10^4) добавляли в объеме 0,2 мл к культурам МФ. Затем культуры инкубировали 4 дня при 37°С в 5% атмосфере CO₂. По 20,0 мкл среды, содержащей 10,0 мкКи/мл [³H] тимидина, вносили в каждую пробу за 18 ч до харвестирования клеток и измерения включения радиоактивной метки в ДНК на сцинтилляционном счетчике, указанном выше. Результаты выражали в имп/мин $\times 10^3$.

Влияние ГП на аккумуляцию МФ в брюшной полости инфицированных *S.typhimurium* мышей исследовали по их способности количественного пополнения в опытных и контрольных (без ГП) группах. Влияние ГП на жизнеспособность МФ у инфицированных мышей оценивали с помощью трипанового синего [32]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Известно, что в период ранней стадии воспалительного ответа, индуцированного бактериальными антигенами (АГ), МФ секретируют различные полипептиды, ответственные за воспаление [29]. Центральным из них является провоспалительный цитокин ИЛ-1 [15]. В предыдущих исследованиях нами было показано, что одна из фракций ГП потенци-

рует раннюю стадию активации МФ, приводящую к повышению продукции ИЛ-1 [3]. ИЛ-1 является регуляторным агентом в генерации ряда кульминационных действий в клеточном и гуморальном звеньях иммунного ответа. Разностороннее биологическое действие ИЛ-1 включает стимуляцию различных процессов: Т-клеточный рост и пролиферацию через способность секреции ИЛ-2 и экспрессии рецепторов ИЛ-2 Т-клетками; В-клеточную пролиферацию, дифференцировку и продукцию АТ; хемотаксис и дегрануляцию нейтрофилов; воспаление; мышечный протеолиз; продукцию коллагеназы и простагландина класса E_2 хондроцитами; синтез сывороточного амилоидного белка класса А гепатоцитами; продукцию прокоагулянтной активности эндотелиальными клетками; пролиферацию фибробластов; гломерулярных мезангиальных и астроглиальных клеток; активатора плазминогена; синтез цитокинов; активацию Т-клеток в период представления АГ МФ; ингибцию опухолевых клеток и др. [15,18]. Очевидно, что недостаток выработки ИЛ-1 МФ при их дисфункции способен приводить к непредсказуемым последствиям на уровне целого организма.

Проведенное нами исследование выявило наличие блокады МФ на уровне секреции ими ИЛ-1 и способность ГП устранять данную бактерия-индуцированную дисфункцию. Так, бактерии, введенные мышам в сублетальных дозах, блокировали синтез ИЛ-1 МФ в 2,64 ($p < 0,001$) раза (табл.1). ГП, инъецированные в дозе 10^{-8} г/мышь, не только повышали синтез ИЛ-1 в 3,6 ($p < 0,001$) раза, но и стимулировали в 1,36 ($p < 0,001$) раза его выработку относительно первоначального уровня. Данный факт свидетельствует о выраженной иммунокорректирующей активности ГП, способности проявлять наилучший эффект при дефиците иммунной функции. В нашем исследовании среди общего ИЛ-1 77,3–79,6% составляла популяция ИЛ-1 α и соответственно 20,4–22,7% популяция ИЛ-1 β . Необходимо отметить, что специфичность полученных эффектов подтверждалась в присутствии анти-ИЛ-1 антисывороток. Так, применение анти-ИЛ-1 α и анти-ИЛ-1 β антисывороток полностью отменяло наличие ИЛ-1 в данной тест-системе.

Таблица 1

Влияние ГП на синтез ИЛ-1 перитонеальными МФ мышей, инфицированных *S.typhimurium* в сублетальной дозе

Стимуляторы	Синтез ИЛ-1, ЕД		
	без антисыворотки	+ анти-ИЛ-1 β	+ анти-ИЛ-1 α + анти-ИЛ-1 β
Контроль (инактивиров. бактерий)	40,1 $\pm$ 3,6	8,2 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 0,08
Контроль (без ГП)	15,2 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,05
ГП (10^{-8} г/мышь)	54,7 $\pm$ 6,3	12,4 $\pm$ 1,1	0,9 $\pm$ 0,1

Известно, что МФ играют ключевую роль в инициации и развитии иммунного ответа [30]. Для реализации этой роли, как известно, МФ после фагоцитоза и переваривания АГ необходимо передать “информацию” о нем Т-клеткам, т.е. осуществить АГ-представляющую функцию. Дефект на уровне данной функции приводит к “сбою” во всей цепи и иммунодефициту. В нашем исследовании методом МФ-зависимой пролиферации сальмонелла-иммунных Т-клеток было установлено, что инфицирование мышей бактериями в сублетальных дозах приводило к недостаточности АГ-представляющей функции МФ (табл. 2). Так, бактерии в $1,38-2,2$ ($p < 0,001$) раза, в зависимости от количества МФ в пробе, угнетали проявление данной их функции. Однако применение ГП в дозе 10^{-8} г/мышь способствовало не только устранению данного дефекта — активность функции повышалась в $1,8-4,2$ ($p < 0,001$) раза, но и стимулировало проявление АГ-представляющей функции МФ относительно первоначального уровня в $1,32-1,9$ ($p < 0,001$) раза. Интересно отметить, что обнаруженный эффект ГП имел место независимо от концентрации МФ в пробах, что указывает на выраженную корригирующую их способность.

Таблица 2

Влияние ГП на антиген-представляющую функцию перитонеальных МФ, инфицированных *S.typhimurium* в сублетальной дозе

Стимуляторы	Количество МФ в пробе			
	10^3	5×10^3	10^4	5×10^4
	Число импульсов в минуту $\times 10^3$			
Контроль (инактивиров. бактерий)	$15,1 \pm 0,7$	$25,6 \pm 1,6$	$41,7 \pm 2,8$	$51,7 \pm 3,3$
Контроль (без ГП)	$6,8 \pm 0,6$	$12,2 \pm 0,8$	$25,3 \pm 1,8$	$37,3 \pm 2,4$
ГП (10^{-8} г/мышь)	$28,5 \pm 2,1$	$41,6 \pm 3,2$	$58,8 \pm 4,1$	$68,3 \pm 4,8$

Известно, что исследованные нами обе функции МФ: АГ-представляющая и ИЛ-1 секретирующая, взаимодополняют друг друга в передаче информации Т-лимфоцитам и их активации в иммунном ответе [31]. В частности, Т-клеткам после получения и распознавания АГ структур, переданных МФ на своей плазматической мембране, необходима дополнительная стимуляция для их дальнейшего функционирования. Роль такого стимула выполняет ИЛ-1, вырабатываемый опять же МФ [34]. Таким образом, выявление способности ГП корригировать дефекты данных иммунологических функций МФ представляется в значительной мере важной и практически значимой.

Известно, что бактериальные патологии сопровождаются локальным притоком и аккумуляцией МФ [23]. В этой связи представлялось инте-

ресным исследовать процесс аккумуляции МФ под действием ГП. Исследование проводилось в экспериментальной модели на брюшной полости мышей как интактных, так и инфицированных различными сублетальными дозами бактерий (табл. 3). Было выявлено, что ГП, инъецированные животным в дозе 10^{-8} г/мышь, повышают аккумуляцию воспалительных сальмонелла-индуцированных, но не резидентных (предварительно не культивированных и не стимулированных или инфицированных) МФ. При этом величина силы эффекта ГП находилась в прямой зависимости от количества примененных бактерий. Так, при инфицирующих дозах 10 и 10^2 бактерий в мл, ГП стимулировали аккумуляцию МФ соответственно в 1,82 и в 2,3 ($p < 0,001$) раза.

Таблица 3

Влияние ГП на аккумуляцию перитонеальных МФ в брюшной полости мышей, инфицированных *S.typhimurium* в сублетальных дозах

Стимуляторы	Количество МФ в мл ($\times 10^2$)		
	резидентные	бактерии в дозе 10/мл	бактерии в дозе 10^2 /мл
Контроль (без ГП)	2,3 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 0,6
ГП (10^{-8} г/мышь)	3,1 $\pm$ 0,2	10,2 $\pm$ 0,4	21,3 $\pm$ 1,3

Таблица 4

Влияние ГП на жизнеспособность МФ мышей, инфицированных *S.typhimurium* в сублетальных дозах

Стимуляторы	Количество жизнеспособных МФ (%)		
	резидентные	бактерии в дозе 10/мл	бактерии в дозе 10^2 /мл
Контроль (без ГП)	72,6 $\pm$ 1,3	51,4 $\pm$ 0,6	38,2 $\pm$ 0,3
ГП (10^{-8} г/мышь)	90,5 $\pm$ 1,2	91,2 $\pm$ 1,4	92,8 $\pm$ 1,4

ГП повышали также и жизнеспособность МФ, но в большей степени у инфицированных мышей, т.е. при непосредственной необходимости (табл. 4). Так, ГП стимулировали жизнеспособность резидентных МФ в 1,25 ($p < 0,001$) раза. Эффект повышения жизнеспособности МФ, обработанных бактериями, как и в предыдущем тесте, находился в прямой зависимости от инфицирующей дозы бактерий. Так, при дозах 10 и 10^2 бактерий в мл жизнеспособность МФ под действием ГП повышалась соответственно в 1,77 и в 2,42 ($p < 0,001$) раза.

Таким образом, проведенное исследование выявило, что ГП обладают выраженной иммунокорректирующей активностью при МФ-ассоцииро-

ванных бактериальных дисфункциях. ГП при сальмонелла-индуцированной недостаточности МФ повышают синтез ИЛ-1, АГ-представляющую функцию, аккумуляцию МФ в очаге воспаления и их жизнеспособность. В настоящее время при наличии синдрома дисфункции фагоцитоза МФ в клинике (а это, к сожалению, единственный существующий тест) применяют левамизол, диуцифон, нуклеинат натрия, пиримидиновые производные: пентоксил, метилурацил, бактериальные липополисахариды, а также бестатин, зиксорин, тафтсин, катерген и др. [5]. Однако остается очевидным факт отсутствия или малочисленности реально применяемых МФ-модулирующих средств, отвечающих современным иммунофармакологическим требованиям. Часть из упомянутых препаратов устарела, другие малоэффективны, третьи — производятся в недостаточных количествах или обладают побочными эффектами. В этой связи можно предположить, что ГП имеют реальные перспективы быть использованными в качестве иммунокорректирующих средств при МФ-ассоциированных бактериальных дисфункциях в практической медицине.

Поступила 14.01.99

ՀԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԱՅԻՆ ՆՈՐ ՊՈԼԻՊԵՊՏԻԴԻ ԻՄՈՒՆՈԿՐԵԿՏԻՎ ՎԵՐԱԿՈՐԵԿՏՈՐ ԷՄԵՍԻԱՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԴԻՍԴՈՒՆԿՆԵՐԸ ՄԱԿՐՈՖԱԳ-ՁՈՒԳՈՐԴՎԱԾ ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԴԻՍԴՈՒՆԿՆԵՐԻ ԴԵՊՐԵՍԻԱ

Վ.Ս.Ապրիկյան, Ա.Ա.Գալոյան

Ուսումնասիրվել են հիպոթալամուսային նոր պոլիպեպտիդի (ՀՊ) իմունակարգավորիչ հատկությունները մակրոֆագ (ՄՖ)-զուգորդված դիսֆունկցիաների ժամանակ *S.typhimurium* միկրոօրգանիզմներով վարակված մկների մոտ:

Հայտնաբերել ենք, որ ՀՊ ունեն ցայտուն արտահայտված իմունակարգավորիչ հատկություն: ՀՊ վերացնում են ՄՖ իմունային ֆունկցիաների պաշարումը, արագացված բակտերիաների ախտաբանությունից: ՀՊ խթանում են ինտերլեյկին-1 սինթեզը ՄՖ ու նրանց հակազեն-ներկայացնող ֆունկցիան, ուժեղացնում են ՄՖ կուտակումը բորբոքային օջախում ու բարձրացնում ՄՖ կենսունակությունը:

IMMUNOCORRECTING PROPERTIES OF A NOVEL HYPOTHALAMIC POLYPEPTIDE AT MACROPHAGES-ASSOCIATED BACTERIAL DYSFUNCTIONS

V.S.Aprikyan, A.A.Galoyan

The immunocorrecting activity of the novel hypothalamic proline-rich polypeptide (HP) at macrophages (MF) dysfunctions caused by *Salmonella typhimurium* infection in mice was studied.

It was established that HP possesses a pronounced correcting effect. Thus, HP abolishes the blockade of MF immunogenic functions and enhances the interleukin-1 synthesis, their antigen-presenting function, increases MF accumulation in peritoneal cavity and their viability.

1. Априкян В.С., Галоян К.А. Нейрохимия, 1992, 11, 2, с. 212.
2. Априкян В.С., Галоян К.А. Нейрохимия, 1992, 11, 3-4, с. 27.
3. Априкян В.С., Галоян К.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 1992, 11, 3-4, с. 34.
4. Априкян В.С., Галоян К.А. Нейрохимия, 1995, 12, 3, с. 14.
5. Априкян В.С. Дис.докт., М., 1996.
6. Априкян В.С., Галоян К.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 1998, 15, 2, с. 189.
7. Априкян В.С., Петров Р.В. Доклады РАН, 1997, 357, 4, с. 564.
8. Арион В.Я. Итоги науки и техники. Сер. Иммунология, 1981, 9, с. 10.
9. Галоян А.А. Медицинская наука Армении, 1996, XXXV, 1-2, с. 130.
10. Захарова Л.А. Дис.докт. М., 1987.
11. Петров Р.В., Априкян В.С., Сергеев Ю.О. и др. Ж.микробиол., 1988, 5, с. 62.
12. Adams D.O., Hamilton T.A. Annu.Rev.Immunol., 1984, 2, p. 283.
13. Aprikyan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A. Neurochem.(RAS and NAS RA), 1998, 15, 1, p. 80.
14. Blalock J.E. Physiol.Rev., 1989, 69, 1, p. 1.
15. Dinarello C.A. Adv.Immunol., 1989, 44, p. 153.
16. Fais S., Annibale B., Boirivant M. et al. J.Neuroimmunol., 1991, 31, p. 211.
17. Farr A.G., Kiely J.M., Unanue E.R. J.Immunol., 1979, 122, p. 2395.
18. Georgiev V. TIPS, 1990, 11, p. 373.
19. Henderson B., Blake S. TIPS, 1992, 152, 13, 4, p. 145.
20. Kerber G. Arch.Exp.Path.Pharmakol., 1931, Bd., 162, p. 480.
21. Koff W.C., Dunegan M.A. J.Immunol., 1985, 135, p. 150.
22. Kruger T.K., Blalock J.E. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1986, 137, p. 197.
23. Kurlander R.J., Hoffman M., Kratz S.S., Gates J. Cell.Immunol., 1989, 123, p. 9.
24. Muller U., Steinhoff U., Reis F.L. et al. Science, 1994, 264, p. 1918.
25. Nordlind K., Mutt V. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol., 1985, 81, p. 368.
26. Pawlikowsky M., Zelazowsky P., Stepien H. et al. Peptides, 1987, 8, p. 951.
27. Sonne O., Pedersen K., Kudahl K. et al. Scand.J.Immunol., 1991, 33, 2, p. 231.
28. Torres B.A., Johnson H.M. J.Neuroimmunol., 1987, 17, 1, p. 85.
29. Unanue E.R., Calderon J. Fed.Proc., 1975, 34, 8, p. 1737.
30. Unanue E.R. Immunol.Rev., 1978, 40, p. 227.
31. Unanue E.R. Ann.Rev.Immunol., 1984, 2, p. 395.
32. Van Furth R., Diesselhoff-den Dulk M.M.C. Scand.J.Immunol., 1980, 12, p. 265.
33. Virgin H.W., Kurt-Jones E.A., Wittenberg G.F., Unanue E.R. J.Immunol., 1985, 135, p. 3744.
34. Yoshikai Y., Ohga S., Takeda Y., Nomoto K. Immunobiology, 1990, 180, p. 124.