

УДК 577.171.59.175.317

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ПОВЫШАЮТ ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 МЫШИНЫМИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ

АПРИКЯН В. С., ГАЛОЯН К. А., ГАЛОЯН А. А.

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

Исследовали влияние гипоталамических пептидов на продукцию ИЛ-1 ЛПС стимулированными мышинными перитонеальными макрофагами.

Обнаружили, что гипоталамические пептиды интенсифицируют выработку ИЛ-1, повышая раннюю стадию активации макрофагов ЛПС *in vitro*, в физиологических концентрациях.

Проблема нейропептидной регуляции иммунного ответа приобретает все большую актуальность благодаря значительному прогрессу в области нейрониммунотуляции, достигнутому в последние годы [1—5]. Известно, что передача сигналов между разными типами иммунокомпетентных клеток в процессе их взаимодействия при развитии иммунных реакций осуществляется медиаторами иммунной системы. Эти молекулярные субстанции эндогенного происхождения — лимфокины и монокины, секретируются специфическими клетками лимфоидного и моноцитарного ряда. Они обеспечивают созревание, дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность иммуноцитов, регулируют развитие отдельных этапов иммуногенеза, опосредуют кооперативные процессы межклеточных взаимодействий, необходимых для реализации их эффекторных функций [6—7]. Большинство эндогенных биорегуляторных факторов не имеют родства к антигенам. Следовательно, они не специфичны и не обладают избирательным действием в отношении лимфоидных клеток и имеют белковую или полипептидную природу. Их функциональная активность в основном связана с определенными пептидными фрагментами, входящими в состав цельной молекулы. Эндогенные пептидные регуляторные факторы претендуют на роль универсальных регуляторов, участвующих в развитии многих биологических процессов. Они обладают способностью взаимодействовать с различными клетками мишенями, в связи с чем оказывают влияние на различные аспекты жизнедеятельности организма, участвуя в реализации межсистемных взаимодействий. В этой связи интересным представлялось изучение взаимодействия гипоталамических пептидов и иммунокомпетентных

клеток, в частности макрофагов. Одной из основных иммунологических функций данного класса иммуноцитов является их способность вырабатывать интерлейкин-1 (лимфоцитактивирующий фактор), являющийся в настоящее время одним из наиболее изученных медиаторов иммунной системы.

Целью настоящего исследования было изучение влияния нового класса гипоталамических пептидов, обнаруженных и охарактеризованных Галояном [8—9], на изменение выработки интерлейкина-1 мышинными перитонеальными макрофагами.

Материалы и методы

Использовали свободных от специфического бактерионосительства инбредных мышей линий BALB/c (H-2^d) и C3H/HeI, 8-недельного возраста. Гипоталамические пептиды (НП), полученные нами, применяли в дозах 10^{-16} —1,0 мкг в 0,9%-ном изотоническом растворе хлористого натрия. Ответные перитонеальные макрофаги (МФ) получали на 5-е сутки после внутрибрюшинной инъекции 3 мл 10% тиюглоколята (Abbott Lab., Montreal, Quebec, Canada) в перитонеальный лаваж [10]. В полученной клеточной суспензии МФ, тестируемые на неспецифическую эстеразную активность [11], составляли более 90%. Культуры МФ стимулировали к продукции интерлейкина-1 (ИЛ-1) по методу [12] в модификациях. Так, монослой МФ инкубировали в бессывороточной среде RPMI-1640 (Gibco, Grand Isl., N. Y., USA) при 37° в атмосфере 7% CO₂. Продукцию ИЛ-1 индуцировали добавлением в культуры МФ липополисахарида (ЛПС) из *S. Typhosa* 0901 (Difco Lab., Detroit, Mich., USA) 10 мкг/мл. НП вносили в культуры МФ одновременно с ЛПС. Через различные сроки инкубации—2—4—6—12—24—48 ч супернатанты (с/н) культур МФ собирали и хранили при —20°. Жизнеспособность МФ определяли с помощью трипанового синего. Адгезивные свойства МФ оценивали по количеству адгерентных клеток. В каждой пробе подсчитывали 500 клеток. Активность ИЛ-1 в с/н определяли по влиянию на изменение пролиферации тимоцитов мышей C3H/HeI в присутствии субмитогенных доз фитогемагглютинина (ФГА) („Sigma“ Chem. Co., St. Louis, MO, USA)—1 мкг/мл. Постановку теста осуществляли в 96-луночных микроплейтах (Costar, Pack. Corp., Cambridge, MA, USA). Клетки суспензировали в питательной среде, содержащей RPMI-1640 (Gibco). 10% термoinактивированной фетальной телячьей сыворотки (Gibco Grand Island, N. Y. USA), 2 mM L-глутамина (Flow Lab. Inc. Virg., USA) 5×10^{-5} M 2-меркаптоэтанол (Calbiochem Behring), Diagnostics, La Jolla, CA, USA) 2×10^{-5} в объеме 0,2 мл. Активность с/н тестировали в различных разведениях 1:2, 1:4, 1:8 и т. д.). Продолжительность культивирования составляла 72 ч при 37° в атмосфере 7% CO₂. В последние 24 ч в культуры вносили [³H] тимидин по 0,5 мКи/луноку (В.О. Изо-

топ"). Затем клетки харвестировали (Scatron A5, Flow Lab. Inc., UK) и измеряли количество включившегося [^3H] тимидина по кинестимуляции синтеза ДНК в культуре тимоцитов на сцинтилляционном счетчике β -радиоактивности (TASC, Packard Instruments, Caversham, UP). Результаты выражали в имп/мин, а также в ед/активности. За единицу активности ИЛ-1 в каждом с/н принимали такое его разведение, которое давало 50% от максимального включения [^3H] тимидина в тимоциты. Активность с/н сравнивали со стандартным, с удельной активностью 100 ед/мл. Все с/н проверяли на активность, подобную интерлейкину-2 (ИЛ-2) по их способности поддерживать пролиферацию ИЛ-2 зависимой линии цитотоксических Т-клеток CTLL-2 (АКК, С.-Петербург). С этой целью клетки CTLL (2×10^4 /100 мкл) в присутствии 5%-ной фетальной телячьей сыворотки и $2,5 \times 10^{-5}$ 2-МЭ инкубировали со 100 мкл с/н, либо с аналогичным количеством стандартного ИЛ-2 при 37° в атмосфере 7% CO_2 24 ч. В последние 6 ч инкубации в культуру вносили [^3H] тимидин по 0,5 мКи. Результаты оценивали в сравнении со стандартным ИЛ-2, полученным культивированием спленоцитов (2×10^6 /мл) с 10 мкг/мл конкавалина А („Sigma“ Chem. Co., St. Louis, MO, USA), величину активности которого принимали за 1000 ед/мл.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования изучали наличие активности, подобной ИЛ-1 в с/н культур МФ, стимулированных ЛПС, в сравнении со стандартным ИЛ-1. Так, было установлено, что активность стандартного ИЛ-1 в разведении 1:2 составила 20153 ± 526 имп/мин. Активность испытуемых с/н культур МФ составила 16121 ± 364 имп/мин. Затем изучали наличие активности, подобной ИЛ-2 в с/н культур МФ. Было установлено, что активность стандартного ИЛ-2 составляет 23265 ± 658 имп/мин, активность с/н МФ культур была недостоверной и составила 270 ± 22 имп/мин, активность питательной среды 142 ± 12 имп/мин. Таким образом, было установлено наличие в с/н исследуемых культур МФ активности, подобной ИЛ-1, и отсутствие активности, подобной ИЛ-2.

Следующий этап исследования был посвящен изучению действия НП на продукцию ИЛ-1. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 1. Как следует из таблицы, НП в широком диапазоне доз потенцировали ЛПС-стимулированную продукцию ИЛ-1 МФ-ми в 1,3 ($p < 0,05$)—3,3 ($p < 0,001$) раза. Наилучший эффект под влиянием НП проявлялся в дозах 10^{-8} — 10^{-12} мкг. Потенцирование НП выработки ИЛ-1 не сопровождалось повышением количества жизнеспособных МФ и их адгезии. Данные показатели находились в пределах, установленных для контрольных культур МФ, не обработанных НП. В табл. 2 представлены результаты исследования кинетики продукции ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ в отсутствие НП. Как следует из таблицы, ИЛ-1 появлялся в с/н МФ культур уже

спустя 2 ч после начала инкубирования МФ с ЛПС. Концентрация ИЛ-1 достигала максимума к 24 ч. Данное положение согласуется с результатами исследований других авторов [13—14]. Интенсивность выработки ИЛ-1 между 24 и 48 ч инкубации была статистически недостоверной. Результаты кинетического исследования потенцирующего выработку ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ действия НП, добавленных в различные сроки инкубации после ЛПС, также представлены в табл. 2. НП применяли в дозе 10^{-10} мкг. Культуральные с/н исследовали на ИЛ-1 подобную активность после 48 ч инкубации. Как следует из таблицы, НП потенцировали выработку ИЛ-1 в начальном периоде инкубации. Наивысшая активность НП проявлялась в убывающем порядке: при одновременном с ЛПС введении в культуры МФ—0 ч, затем 2 и 4 ч. Таким образом, НП проявляют активность не только при введении в культуры МФ одновременно с ЛПС. Данный факт свидетельствует, что потенцирующий эффект НП связан с их действием именно на МФ, а не с пролиферацией тимоцитов. Результаты кинетического анализа указывают также на тот факт, что действие НП проявляется еще до секретиции ИЛ-1 в культуральный с/н, то есть в период ранней фазы синтеза мРНК. Можно предположить, что их действие наиболее эффективно в период синтеза ИЛ-1, хотя может распространяться и на начальный период секретиции.

Таблица 1

Действие НП на продукцию ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ через 48 ч инкубации

Дозы НП (мкг)	Активность ИЛ-1 (ед/мл)	
	НП без ЛПС	НП с ЛПС
контроль ЛПС без НП	5.0 ± 0.1	75.0 ± 3.2
1	5.4 ± 0.1	105.2 ± 7.6
10^{-2}	6.1 ± 0.2	137.0 ± 8.7
10^{-4}	5.7 ± 0.2	162.7 ± 9.8
10^{-6}	7.0 ± 0.3	193.7 ± 9.9
10^{-8}	8.1 ± 0.3	222.2 ± 9.7
10^{-10}	8.6 ± 0.4	250.0 ± 9.1
10^{-12}	7.3 ± 0.3	176.0 ± 9.0
10^{-14}	5.4 ± 0.1	111.1 ± 9.3
10^{-16}	4.6 ± 0.1	74.9 ± 6.3

Таблица 2

Кинетика продукции ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ в отсутствие НП и в присутствии НП, добавленных в различные время после ЛПС

Время инкуба- ции (ч)	Активность ИЛ-1 (ед/мл)	
	без НП	НП (10^{-10} мкг)
К	—	82.1 ± 6.6
0	—	228.8 ± 9.8
2	10.5 ± 0.8	145.5 ± 9.8
4	21.3 ± 1.5	118.8 ± 7.7
6	48.9 ± 2.1	93.9 ± 8.1
12	76.9 ± 5.4	87.7 ± 6.7
24	104.4 ± 8.6	82.6 ± 6.1
48	89.6 ± 6.6	—

Результаты настоящего исследования показали, что НП потенцируют раннюю стадию активации МФ ЛПС-ом *in vitro*, приводящую к повышению продукции ИЛ-1. НП проявляют данный эффект в физиологических концентрациях 10^{-8} — 10^{-12} мкг. Значение данного эффекта НП остается невыясненным. В настоящее время известны лишь некоторые механизмы обратной ИЛ-1 обусловленной связи. Так, известна способность α -меланоцитстимулирующего гормона ингибиро-

вать биологический ответ, индуцируемый ИЛ-1 [3]. Известно также, что ИЛ-1 стимулирует секрецию гипоталамического кортикотропин-рилизинг фактора [4]. Вероятно, присутствие ИП необходимо в ранней фазе активации МФ. В пользу данного предположения свидетельствует обнаруженный факт наибольшей эффективности ИП в период биосинтеза ИЛ-1. Основываясь на результатах проведенного исследования, можно предположить, что ИП могут потенцировать следующие ИЛ-1-зависимые процессы: Т-клеточная активация—индукция Т-клеточной пролиферации, активация Т-клеток в период представления антигена, индукция выработки лимфокинов и экспрессия рецепторов Т-хелперами; В-клеточная активация—повышение пролиферации и дифференцировки В-клеток; хемотаксис полиморфно-ядерных нейтрофилов; воспаление; мышечный протеолиз; острая фаза синтеза протеинов; пролиферация фибробластов; продукция протеолитических ферментов, коллагеназы и ПГЕ₂ синовиальными клетками, активатора плазминогена и др.

HYPOTHALAMIC PEPTIDES ENHANCE THE INTERLEUKIN-1 PRODUCTION BY MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES

APRIKIAN V. S., GALOYAN K. A., GALOYAN A. 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 IL-1 production by LPS stimulated mouse peritoneal macrophages (MO) was investigated. It was found that HP in physiological concentrations potentiated the IL-1 production as well as the early stage of MO activation by LPS *in vitro*.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Niehmer D. Neuroendocr. Lett., v. 9, p. 274—280, 1987.
2. Blalock J. E., Harhour D., McMenain, Smith E. J. Immunol., v. 135, p. 858—861, 1985.
3. Robertson B., Dostal K., Daynes R. A. J. Immunol., v. 140, p. 4300—4307, 1988.
4. Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G., Plotzky P., Vale W. Science, v. 238, p. 522—524, 1987.
5. Berkenbosch F., Van Oers J., Del Rey A., Tilders F., Besedovsky H. Science, v. 238, p. 524—525, 1987.
6. Fenichel R. L., Chirigos A. (eds) Immune modulators agents and their mechanisms. Marcel Dekker, N. Y., 1984.
7. Nelson D. S. Natural immunity. Sydney etc., 1989.
8. Galoyan A. A. Ergebnisse der Experimentellen Medizin, v. 29, p. 99—115, 1978.
9. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
10. Unanue E. H., Kiely J. M., Calderon J. J. Exp. Med., v. 144, p. 155, 1976.
11. Sonne O., Pederson K., Kudahl K., Fisker S. Scand. J. Immunol., v. 33, p. 231—235, 1991.
12. Bradley L. M. In: Selected Methods in Cellular Immunology (eds. B. B. Mishell, S. M. Shigti). San Francisco, p. 156—160, 1980.
13. Windle J. J., Shir H. S., Morrow J. F. J. Immunol., v. 132, p. 1317—1322, 1984.
14. Brandwein S. R. J. Biol. Chem., v. 261, p. 8624—8632, 1986.

Поступила 18. III. 1992