

УДК 616:612.017.1

Цепелев В.Л., Степанов А.В.

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. Пептиды из сумки Фабрициуса птиц - Tyr-Glu-Gly, Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu, Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu, из костного мозга млекопитающих - Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala и из тимуса - Lys-Glu не влияют на продукцию провоспалительных цитокинов в неактивируемых мононуклеарах. Стимуляция липополисахаридом мононуклеаров приводит к увеличению выработки провоспалительных цитокинов. Пептид Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu вызывает снижение уровня IL-1 β и TNF α . Пептид Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu уменьшает продукцию IL-1 β и IL-8. Пептид Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala приводит к снижению уровня IL-1 β , IL-8 - и TNF α .

Ключевые слова: пептиды сумки Фабрициуса, костного мозга и тимуса, цитокины.

Tsepelev V.L., Stepanov A.V.

THE IMPACT OF REGULATORY PEPTIDES ON THE PROINFLAMMATORY CYTOKINES PRODUCTION

Summary. The Peptides from the Bursa of birds Fabricius - Tyr-Glu-Gly, Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu, Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu, from the bone marrow of mammals - Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala and of thymus - Lys-Glu, pro-inflammatory cytokines in mononuclear cells for the products is not affected. The lipopolysaccharide mononuclear cells stimulation leads to increased cytokine production. The peptide Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu causes a decrease in IL-1 β and TNF α . The peptide Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu reduces the production of IL-1 β and IL-8. The peptide Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala reduces the level of IL-1 β , IL-8 and TNF α .

Key words: peptides from the Bursa of Fabricius, bone marrow and thymus, cytokines.

В настоящее время синтезировано достаточно большое количество веществ, обладающих различными биологическими эффектами. В частности, весьма активно изучаются пептидные регуляторы из центральных органов иммунитета – вилочковой железы, сумки Фабрициуса у птиц, её аналога у человека – костного мозга. Известно, что эти соединения активируют различные субпопуляции лимфоцитов [10, 14], регулируют антигеннезависимую дифференцировку Т-лимфоцитов [1, 7] и В-лимфоцитов [3, 5, 13], стимулируют активность макрофагов [11]. Также *in vivo* они улучшают течение экспериментального перитонита и ожоговой болезни у крыс [7], нормализует иммунный статус после химиотерапии [6] и обладают антипролиферативную активность при опухолях [12]. При этом был показан выраженный противоэкссудативный эффект данных пептидов [6, 7, 14].

Предыдущие исследования поставили перед нами вопрос о возможном механизме противоэкссудативного эффекта изучаемых биологически активных соединений при патологических состояниях. С одной стороны, их регулирующее влияние на иммунитет, а также на прокоагулянтную активность мононуклеаров может косвенно отражаться на экссудации. С другой стороны известно, что важную роль в изменении проницаемости сосудистой стенки и ее стабилизации играют провоспалительные цитокины. Так, IL-1 является главным медиатором местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма. При ответе на внедрение патогенов продукция IL-1 начинается в зоне первого контакта клеток-продуцентов с микроорганизмами. За счет конститутивной экспрессии своих рецепторов IL-1 очень быстро активирует практически все типы клеток, участвующих в формировании локальной воспалительной реакции, включая фибробласты, эндотелий, резидентные макрофаги и все типы лейкоцитов крови. Интерлейкин-8 также относится к группе провоспалительных цитокинов и обладает способностью активировать хемотаксис и дегрануляцию лейкоцитов. Внутрикожное введение IL-8 уже через 30 минут вызывает локальное накопление нейтрофилов и экссудацию плазмы. Цитокин TNF α

вызывает воспалительные сосудистые реакции, индуцирует секрецию белков острой фазы и активирует нейтрофилы [2].

Цель исследования: изучить влияние синтетических аналогов пептидов тимуса, костного мозга и бursы Фабрициуса на продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-8 и TNF α) мононуклеарами крови здоровых доноров.

Материал и методы исследования. Пептиды из ткани бursы Фабрициуса цыплят и костного мозга выделяли оригинальной методикой, включающей уксуснокислую экстракцию с последующим фракционированием с помощью помощью гель-фильтрации и обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. На каждом этапе полученные фракции тестировали на наличие иммуностимулирующей активности. Дальнейшая работа велась только с наиболее активными фракциями. В результате последовательного разделения иммуноактивных фракций экстракта бursы Фабрициуса и костного мозга, нами были выделены пептиды, обладающие по результатам скрининговых исследований наибольшей иммуностимулирующей активностью, и установлена на газофазном секвенаторе (Model 477A, Applied Biosystems) их первичная структура. Из сумки Фабрициуса птиц – пептид 1 - Tyr-Glu-Gly (YEG), пептид 2 – Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu (WTAEEXQL), пептид 3 – Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu (KEELNE). Из костного мозга – пептид Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala. Данное исследование активности пептидов на продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-8 и TNF α) проводили с использованием их синтетических аналогов. Пептиды синтезировали на твердой фазе с использованием Boc схемы, структуру синтезированного пептида подтверждали масс спектрометрическим анализом. Исследования проведены как на базе Читинской государственной медицинской академии, так и в Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Также исследования проводили с синтетическим соединением из тимуса – вилоним (Lys-Glu), который был синтезирован в лаборатории академика РАН В.Х. Хавинсона.

Мононуклеарные клетки выделяли из крови центрифугированием на градиенте фикола-верографина (d=1,077 г/мл). Клетки отмывали средой RPMI 1640 с гентамицином (150 мкг/мл), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой, 15мМ глутамин (Sigma, США) [4]. При изучении индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов в качестве стимулятора в культуральную среду добавляли липополисахарид (ЛПС) в концентрации 5 мкг/мл. При исследовании как спонтанного, так и индуцированного синтеза цитокинов в культуральную среду в момент засева клеток вносили исследуемые пептиды: Tyr-Glu-Gly (опыт 1), Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu (опыт 2), Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu (опыт 3), Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala (опыт 4), Lys-Glu (опыт 5) в концентрации 0,1 мкг/мл, в контрольные пробы добавляли физиологический раствор в соответствующем объеме. Инкубация мононуклеаров осуществлялась в течение 24 часов при температуре 37 $^{\circ}$ C. Содержание цитокинов в супернатантах определяли твердофазным иммуноферментным анализом [4].

Полученные данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica, версия 6,0. При сравнении групп использовался критерий Манна-Уитни. Числовые данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала. Различия между сравниваемыми вариационными рядами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что уровень секреции всех изучаемых цитокинов мононуклеарами значительно варьировал у разных доноров. Нами зарегистрировано незначительное повышение продукции TNF α нестимулированными мононуклеарами под действием пептида Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu и IL-1 β под влиянием пептида Lys-Glu. Другие изучаемые пептиды тимуса, костного мозга и бursы Фабрициуса не оказывали влияние на выработку провоспалительных цитокинов нестимулированными мононуклеарами (табл. 1).

Таблица 1

Влияние пептидов тимуса, костного мозга и бурсы Фабрициуса на спонтанную продукцию цитокинов в суточной культуре мононуклеаров здоровых людей, (пг/мл).

Исследуемые цитокины	IL-1 β	IL-8	TNF α
Физ. раствор (контроль) (n = 14)	98,4 (87,7-109,3)	375,6 (311,4-442,8)	147,1 (124,8-172,5)
Пептид Tyr-Glu-Gly (опыт 1) (n = 14)	94,7 (80,2-108,4)	415,1 (366,3-455,7)	168,4 (127,2-207,8)
Пептид Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu (опыт 2) (n=14)	111,0 (97,4-124,8)	425,3 (374,4-477,6)	135,4 (102,2-170,6)
пептид Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu (опыт 3) (n = 14)	103,9 (91,7-115,3)	431,7 (376,2-476,0)	233,5* (202,8-265,6)
Пептид Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala (опыт 4) (n = 14)	126,4 (100,2-132,8)	351,9 (300,3-406,5)	178,1 (141,1-219,7)
Пептид Lys-Glu (опыт 5) (n = 14)	147,1* (128,6-163,9)	397,7 (345,7-451,5)	184,7 (153,6-215,8)

* – статистически значимые различия между опытными и контрольной группами

Стимуляция клеток липополисахаридом приводит к повышению продукции провоспалительных цитокинов в культуре мононуклеаров. Внесение Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu в культуру стимулированных клеток вызывает снижение уровня IL-1 β на 40,7% и TNF α – на 55,6%. Под влиянием пептида Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu в культуре стимулированных мононуклеаров уменьшается продукция IL-1 β на 35,5% и IL-8 – на 43,7%. Инкубация стимулированных мононуклеаров с пептидом Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala приводит к снижению уровня IL-1 β на 36,7%, IL-8 – на 54,6% и TNF α – на 48,4% (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние пептидов тимуса, костного мозга и бурсы Фабрициуса на стимулированную ЛПС продукцию цитокинов в суточной культуре мононуклеаров здоровых людей, (пг/мл).

Исследуемые цитокины	IL-1 β	IL-8	TNF α
Физ. раствор (контроль) (n = 14)	392,4 (336,2-448,8)	1438,8 (1308,2-1552,3)	934,1 (792,4-1087,5)
Пептид Tyr-Glu-Gly (опыт 1) (n = 14)	416,0 (375,8-467,4)	1570,7 (1435,5-1702,1)	956,1 (834,8-1074,0)
Пептид Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu (опыт 2) (n=14)	232,6* (192,6-270,9)	1312,5 (1188,2-1434,5)	414,8* (311,3-612,9)
пептид Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu (опыт 3) (n = 14)	253,2* (210,4-295,0)	810,4* (711,8-903,5)	756,5 (651,4-860,9)
Пептид Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala (опыт 4) (n = 14)	287,1* (251,7-319,1)	930,7* (821,9-1015,3)	629,4* (531,1-721,6)
Пептид Lys-Glu (опыт 5) (n = 14)	397,6 (352,2-437,5)	1294,4 (1162,8-1422,2)	814,7 (682,3-945,0)

* – статистически значимые различия между опытными и контрольной группами

Принципиально важным отличительным свойством изучаемых пептидов как биологически активных соединений является их способность оказывать выраженное действие только на клетки с резко измененными параметрами их метаболической и функциональной активности. Так, регуляторные пептиды, выделенные из центральных иммунных органов, не оказывают влияние на выработку провоспалительных цитокинов нестимулированными мононуклеарами, в то же время в культуре стимулированных липополисахаридом клеток изучаемые соединения вызывают снижение продукции медиаторов воспаления.

Таким образом, одним из возможных механизмов противоэкссудативного эффекта регуляторных пептидов является снижение секреции провоспалительных цитокинов.

Известно, что при многих тяжелых патологических процессах: шоках [8], острых повреждениях легких [9], полиорганной недостаточности развивается выраженная воспалительная реакция, важную роль при которой играют провоспалительные цитокины [2]. Применение пептидов Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu, Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu, Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala в качестве дополнительного метода лечения, возможно, может значительно улучшить клинический прогноз. Одним из эффективных методов доставки этих соединений до органов мишеней может быть использование липосом с пептидами [15].

Выводы.

1. Изучаемые пептидные соединения практически не влияют на продукцию провоспалительных цитокинов в неактивируемых мононуклеарах.
2. При стимуляции липополисахаридом мононуклеаров происходит увеличение выработки провоспалительных цитокинов. Пептид Trp-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu в культуре таких клеток вызывает снижение уровня IL-1 β и TNF α . Пептид Lys-Glu-Glu-Leu-Asn-Glu уменьшает продукцию IL-1 β и IL-8. Пептид Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala приводит к снижению уровня IL-1 β , IL-8 - и TNF α .

Литература:

1. Влияние полипептидов из вилочковой железы, костного мозга и сумки Фабрициуса на иммуногенез и гемостаз у неонатально тимэктомированных и эмбрионально бурсэктомированных цыплят / Б.И. Кузник [и др.] // Бюл. экспер. биологии и медицины. – 1987. – Т. 103, № 4. – С. 449-451.
2. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев – М.: Фолиант, 2008. – 552 с.
3. Коррекция иммунитета и гемостаза пептидами из сумки Фабрициуса и костного мозга у эмбрионально бурсэктомированных цыплят / Б.И. Кузник [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1987. – Т. 51, №1. – С.53-55.
4. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. проф. А.И. Карпищенко. – СПб : Интермедика, 2002. – 600 с.
5. Степанов А.В. Пептидные регуляторы гуморального иммунитета / А.В.Степанов, В.Л.Цепелев, С.Л.Цепелев. – Чита : Книжное изд-во "Поиск", 2002. – 160 с.
6. Результаты исследования эффективности синтетического иммуностимулятора нового поколения / А.В. Степанов [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – №12 (1). – С.142-145.
7. Степанов А.В. Пептидные регуляторы из сумки Фабрициуса / А.В. Степанов // Забайкальский медицинский вестник. – 2004. – №4. – С.97-101.
8. Степанов А.В. Интенсивная терапия шоковых состояний / А.В.Степанов. – Чита : ИИЦ ЧГМА, 2006. – 24 с.
9. Острая дыхательная недостаточность / А.В.Степанов. – Чита : ИИЦ ЧГМА, 2008. – 48 с.
10. Степанов А.В. Иммуностимулятор из центрального органа гуморального иммунитета — сумки Фабрициуса / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Мельникова // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – №2. – С. 32-34.
11. Степанов А.В. Влияние синтетических пептидов сумки Фабрициуса на функциональную активность макрофагов / А.В. Степанов, В.Л.Цепелев // Забайкальский медицинский вестник [Электронный ресурс] - 2014. – № 2. – С. 44-47. Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv>
12. Identification and characterization of novel immunomodulatory bursal-derived pentapeptide-II (BPP-II) / Feng X.L. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 3. – P. 801-807.
13. Immunomodulatory activities of a new pentapeptide (Bursopentin) from the chicken bursa of Fabricius / Li D.Y. [et al.] // Journal: Amino Acids. – 2011. – Vol. 40 (2). – P. 505-515.
14. Isolation, modulatory functions on murine B cell development and antigen-specific immune responses of BP11, a novel peptide from the chicken bursa of Fabricius / Liu X.D. [et al.] // Peptides. – 2012. – Vol. 35(1). – P. 107-113.
15. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalites / Belogurov A.A. [et al.] // FASEB Journal. – 2013. – Т. 27. № 1. – С. 222-231.