

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-1-КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Осиков М.В.*, Кривохижина Л.В.*, Макаров Е.В.*,
Ахматов В.Ю.**

* Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению
и социальному развитию», кафедра патологической физиологии

** Государственное муниципальное лечебное учреждение здравоохранения
«Челябинская областная клиническая больница», отделение диализа

Резюме. Альфа-1-кислый гликопротеин (орозомукоид) — полифункциональный белок семейства липокалинов альфа-2-глобулиновой фракции плазмы крови, относящийся к группе реактантов острой фазы. В настоящей работе изучено влияние различных доз орозомукоида на секрецию интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4 мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров. Мононуклеары выделяли методом градиентного центрифугирования и инкубировали с орозомукоидом в дозах 250 мкг/мл, 500 мкг/мл и 1000 мкг/мл (малая, средняя и большая доза соответственно) в течение 24 часов, после чего определяли содержание цитокинов методом иммуноферментного анализа. Продукция IL-1 β и IL-4 под влиянием орозомукоида увеличивалась, а продукция IL-3, напротив, тормозилась. Продукция IL-2 изменялась неоднозначным образом: угнеталась под воздействием малых доз и увеличивалась под влиянием средних и высоких доз орозомукоида. Эффект альфа-1-кислого гликопротеина на продукцию IL-2, IL-3 и IL-4 носил дозозависимый характер. Таким образом, установлено, что орозомукоид изменяет секрецию IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4 мононуклеарами периферической крови.

Ключевые слова: альфа-1-кислый гликопротеин, цитокины, мононуклеары.

Osikov M.V., Krivohizhina L.V., Makarov E.V., Akhmatov V. Yu.

INFLUENCE OF ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN UPON PRODUCTION OF CYTOKINES BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS

Abstract. Alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid) is a multifunctional acute phase reactant belonging to the family of lipocalines from plasma alpha-2 globulin fraction. In present study, we investigated dose-dependent effects of orosomucoid upon secretion of IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4 by mononuclear cells from venous blood of healthy volunteers. Mononuclear cells were separated by means of gradient centrifugation, followed by incubation for 24 hours with 250, 500, or 1000 mcg of orosomucoid per ml RPMI-1640 medium (resp., low, medium and high dose). The levels of cytokine production were assayed by ELISA technique. Orosomucoid-induced secretion of IL-1 β and IL-4 was

Адрес для переписки:

Осиков Михаил Владимирович
454092, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64,
ЧелГМА, кафедра патофизиологии
Тел./факс: (351) 232-74-68.
E-mail: mvo2003@list.ru

increased, whereas IL-3 secretion was inhibited. IL-2 production was suppressed at low doses of orosomucoid, and stimulated at medium and high doses. The effect of alpha-1-acid glycoprotein upon production of IL-2, IL-3 and IL-4 was dose-dependent. Hence, these data indicate that orosomucoid is capable of modifying IL-1 β , IL-2, IL-3, and IL-4 secretion by blood mononuclear cells. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 1, pp 47-52)

Введение

Белки острой фазы представляют собой наиболее древний в филогенетическом аспекте компонент системы иммунобиологического надзора и иммунного гомеостаза в организме. В настоящее время к этой группе относят более 30 различных белков [3]. Значительная часть белков острой фазы образуется в гепатоцитах и макрофагах под влиянием глюкокортикоидов, IL-1 и IL-6 в ответ на действие повреждающих факторов различного генеза. Представителем семейства острофазовых белков является альфа-1-кислый гликопротеин (КГП, орозомукоид, серомукоид) — отрицательно заряженный кислый гликопротеин семейства липокалинов с молекулярной массой 44100 Da [13, 16]. Концентрация КГП в плазме возрастает в 2-4 раза через 24 часа после повреждающего воздействия, что позволяет отнести его к группе белков острой фазы второго эшелона [14]. Интерес к КГП обусловлен широким спектром функциональной активности белка. Показано, что КГП оказывает влияние на функциональное состояние эндотелия, клеток крови, гемореологические параметры, проявляет антиоксидантные и антиапоптотические свойства [4, 7, 12, 17, 19]. Кроме этого, КГП участвует в механизмах неспецифической и специфической резистентности. Установлено, что КГП ингибирует миграцию лейкоцитов и продукцию кислородных радикалов фагоцитами [8, 15], тормозит активацию комплемента по альтернативному пути [21], способен как стимулировать, так и подавлять пролиферативный ответ лимфоцитов [5]. Многие из отмеченных свойств КГП могут быть опосредованы его влиянием на синтез цитокинов, вмешательством и непосредственным участием КГП в цитокиновой регуляторной сети. В частности, изменения функциональной активности фагоцитов могут быть вызваны IL-1, изменения пролиферации лимфоцитов и реализации ключевых событий клеточного и гуморального звеньев иммунитета зависят от IL-2 и IL-4. Проводимые в настоящее время исследования на кафедре патофизиологии ЧелГМА позволили установить регуляторный

характер влияния КГП на количественный состав клеток периферической крови в условиях нормы и патологии, что может быть опосредовано мультипотентными гемопоэтическими эффектами IL-3.

Цель работы — исследовать в условиях *in vitro* влияние КГП на продукцию IL-1 β , IL-2, IL-3 и IL-4 в культуре мононуклеарных клеток.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием цельной крови 40 практически здоровых людей-доноров Челябинской областной станции переливания крови в возрасте 18-55 лет. Периферическую кровь забирали из локтевой вены в асептических условиях, в качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 50 ЕД/мл крови.

Мононуклеарные клетки выделяли из свежей гепаринизированной крови доноров в градиенте плотности урографина-фиккола [11]. Для формирования среды плотностью 1,077 г/см³ использовали 9% (масса/объем) раствор фиккола-400 («ДиаМ», Москва) и 60% официальный урографин («Schering», Германия). Полученную клеточную взвесь трижды отмывали средой RPMI-1640 («ПанЭко», Москва) и готовили суспензию с концентрацией клеток 2×10^6 /мл. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах без добавления каких-либо митогенов во влажной атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 ч при 37°C. В качестве питательной среды для клеток использовали RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. Каждую пробу мононуклеарных клеток культивировали как в присутствии КГП (опытная группа, КГП растворяли в среде RPMI-1640), так и без него (контрольная группа, с добавлением эквивалентного количества среды RPMI-1640). Продукция цитокинов мононуклеарами в контрольной пробе принималась за 100%, исходя из этого, рассчитывалось значение в опытной пробе. Нами использован КГП в форме препарата «Орозин» (производства Челябинской областной станции переливания крови), любезно предоставленный кафедрой биохимии ЧелГМА.

Согласно технологии, препарат получали из отходов производства альбумина [2]. КГП использовали в концентрациях 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, что составляет 100%, 50%, 25% от его физиологического уровня в сыворотке соответственно. В супернатантах клеточных культур определяли содержание цитокинов методом иммуноферментного анализа на «Multiscan plus» («Labsystems», Финляндия) при длине волны 450 нм и выражали в пкг/мл. Для определения IL-2 и IL-3 использовали тест-системы фирмы «Протеиновый контур» (ГНЦ НИИ ОЧБ, Санкт-Петербург), серия 201006 и 230806 соответственно. Для определения IL-1 β и IL-4 – тест-системы «Цитокин» (ГНЦ НИИ ОЧБ, Санкт-Петербург), серия 271006 и 051 соответственно. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistica v. 6.0 for Windows» [1, 6]. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрического парного критерия Вилкоксона. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки силы влияния фактора использовали однофакторный дисперсионный анализ. Для анализа дозозависимого эффекта КГП применяли метод непараметрического корреляционного анализа Спирмена.

Результаты

Результаты исследований представлены в таблице. Установлено, что КГП в низких и средних концентрациях (250 кг/мл, 500 мкг/мл) увеличивает продукцию IL-1 β мононуклеарными клетками. Причем, наиболее значи-

тельный прирост количества IL-1 β отмечен на дозе КГП 250 кг/мл. Максимальная доза КГП (1000 мкг/мл) не оказывала статистически значимого влияния на синтез IL-1 β . Дисперсионный однофакторный анализ позволил установить, что влияние КГП на продукцию IL-1 β может составить ($p < 0,05$) не менее 31,14% и не более 82,78% от общего влияния всей суммы факторов. Однако дозозависимый характер влияния КГП на продукцию IL-1 β отсутствует (коэффициент корреляции Спирмена $R = -0,19$ при $p = 0,43$).

КГП оказывал неоднозначное влияние на продукцию мононуклеарными клетками IL-2: в высоких концентрациях (1000 мкг/мл и 500 мкг/мл) – стимулировал, в низких (250 мкг/мл) – подавлял. Таким образом, КГП может включаться в регуляцию клеточного звена иммунитета с возможностью его стимуляции или подавления в зависимости от исходной концентрации белка в среде. По данным однофакторного дисперсионного анализа, влияние КГП на продукцию IL-2 составляет ($p < 0,05$) не менее 43, 15% и не более 85,77% от общего влияния всей суммы факторов. Причем, установлена прямая положительная корреляция влияния КГП от его дозы (коэффициент корреляции Спирмена $R = 0,69$ при $p < 0,001$).

Что касается влияния КГП на продукцию IL-4, то только доза 1000 мкг/мл (100% от физиологической концентрации) статистически значимо усиливала синтез его в культуре мононуклеарных клеток, в других концентрациях этот эффект КГП проявлялся на правах тенденции. Дисперсионный однофакторный анализ позволил установить, что влияние КГП на продукцию IL-4 может составить ($p < 0,05$)

ТАБЛИЦА. ВЛИЯНИЕ КГП НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРАМИ (% ОТ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ, $M \pm m$)

Цитокин/доза КГП	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4
Контроль (n = 7)	100	100	100	100
250 мкг/мл (n = 7)	198,06 \pm 31,95 $p < 0,05$	72,02 \pm 11,11 $p < 0,05$	194,09 \pm 102,16	111,22 \pm 18,97
500 мкг/мл (n = 7)	134,62 \pm 19,29 $p < 0,05$	218,24 \pm 36,68 $p < 0,05$	46,65 \pm 25,45	121,05 \pm 11,49
1000 мкг/мл (n = 7)	78,44 \pm 12,42	243,65 \pm 39,06 $p < 0,05$	4,11 \pm 2,34 $p < 0,05$	147,70 \pm 17,33 $p < 0,05$

Примечание: p – показатель различия с контрольной группой по критерию Вилкоксона.

не менее 14,33% и не более 41,39% от общего влияния всей суммы факторов. Кроме этого, влияние КГП напрямую зависело от его концентрации в среде культивирования мононуклеарных клеток (коэффициент корреляции Спирмена $R = 0,57$ при $p = 0,009$). Поскольку IL-4 является сигналом пролиферативной активности для В-лимфоцитов, можно с определенной долей вероятности констатировать, что КГП в физиологических концентрациях способен оказывать стимулирующий эффект на гуморальный иммунный ответ.

Установлено, что КГП существенно снижал продукцию IL-3 мононуклеарами, в дозе 1000 мкг/мл отмеченный эффект имел статистическую значимость, а продукция IL-3 уменьшалась до 4,11% от исходного уровня. Причем, собственный вклад КГП составляет, по данным дисперсионного однофакторного анализа, ($p < 0,05$) не менее 18,33% и не более 44,11% от общего влияния всей суммы факторов. В данном случае имел место дозозависимый характер влияния КГП на продукцию IL-3 (коэффициент корреляции Спирмена $R = -0,67$ при $p < 0,001$).

Итак, результаты проведенного исследования позволили установить факт влияния КГП на продукцию IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 мононуклеарными клетками периферической крови. Показано, что КГП стимулирует продукцию IL-1, IL-2, IL-4 мононуклеарами, но подавляет синтез IL-3.

Обсуждение

Полученные результаты согласуются с некоторыми данными других исследователей. Так, Boutten A. et al. показали, что КГП в дозе 250 мкг/мл – 500 мкг/мл усиливает синтез IL-1, IL-6 и TNF человеческими моноцитами, альвеолярными и перитонеальными макрофагами, но только в присутствии липополисахарида *E. coli* [10]. В то же время, Su S.J. et al. опровергают факт опосредованной стимуляции моноцитов КГП и сообщают о его способности самостоятельно увеличивать продукцию TNF человеческими моноцитами [20]. Кроме этого, КГП повышает продукцию перитонеальными макрофагами фактора, ингибирующего активность IL-1 [9]. По всей видимости, это отражает феномен отрицательной обратной связи на уровне аутокринной и паракринной регуляции продукции IL-1 клетками.

Необходимо отметить, что в самих лейкоцитах, в частности, моноцитах и лимфоцитах, происходит синтез КГП. IL-1 β и TNF при введении их в культуру мононуклеаров через 18-24 часа вызывают экспрессию мРНК, ответственной за синтез КГП [18]. Таким образом, можно высказать предположение о том, что КГП является не только самостоятельным регулятором продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови, но и замыкает *circuitus vitiosus* в системе повреждающий фактор – лейкоциты – печень – белки острой фазы – лейкоциты в рамках острой фазового ответа.

В патофизиологическом аспекте полученные результаты могут быть связаны с реализацией эффектов КГП в динамике событий ответа острой фазы. Максимальная концентрация КГП в крови наблюдается через 24 часа от воздействия повреждающего фактора, когда необходима мобилизация защитных факторов организма. В этом ключе КГП через повышение концентрации IL-1 может участвовать в преиммунном ответе организма. В частности, увеличивая количество лейкоцитов в периферической крови за счет выхода из костномозгового депо и демаргинации, стимуляции функциональной активности фагоцитирующих клеток, перестройки терморегуляции организма на другой, более высокий уровень. Кроме этого, повышая концентрацию IL-2 и IL-4, КГП вмешивается в реализацию специфических защитных механизмов через активацию и повышение пролиферативного потенциала иммунокомпетентных клеток.

Ингибирующий характер влияния КГП на продукцию IL-3 в ходе рассматриваемой проблемы, по-видимому, связан с необходимостью уменьшения пролиферативного потенциала кроветворных клеток-предшественниц миелоидного ряда, затухания проявлений острофазового ответа и включения репаративных механизмов.

Кроме этого, необходимо учитывать, что продуцентами цитокинов являются не только мононуклеары периферической крови, но и нейтрофилы, эндотелиальные клетки, фибробласты и другие, а сами цитокины образуют регуляторную сеть, в которой отдельные элементы обладают синергическим и/или антагонистическим действием. Поэтому полученные результаты можно лишь с определенной долей вероятности экстраполировать на организм в целом.

Таким образом, влияние КГП на продукцию IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4 мононуклеарными клетками периферической крови человека носит разнонаправленный характер и определяется видом цитокина и концентрацией КГП.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 438 с.
2. Лютов А.Г., Алешкин В.А., Еникеева С.А., Осипенко А.М., Воробьева Е.Н., Холчев Н.В. Получение альфа-1-кислого гликопротеина из отходов производства альбумина // Гематология и трансфузиология. — 1987. — Т. 32, № 5. — С. 58-61.
3. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. — СПб.: Наука, 2001. — 423 с.
4. Осиков М.В., Кривожижина Л.В., Макаров Е.В. Роль альфа-1-кислого гликопротеина в коррекции нарушений гемореологии при экспериментальном перитоните // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. — 2006. — № 5. — С. 249-256.
5. Пухальский А.Л., Шмарина Г.В., Лютов А.Г., Новикова Л.И., Шемякин И.Г., Алешкин В.А. α 1-кислый гликопротеин обнаруживает *in vitro* как про-, так и противовоспалительную активность // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2001. — Т. 131, № 5. — С. 564-567.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Медиасфера, 2006. — 312 с.
7. Саломатин В.В., Лютов А.Г., Холодов А.Ю., Соболевская Т.М., Лифшиц Р.И. Влияние альфа-1-кислого гликопротеина на реологические показатели крови при экспериментальных термических ожогах // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1992. — № 1. — С. 35-37.
8. Саломатин В.В., Лютов А.Г., Еникеева С.А., Чарная Л.Ф., Зурочка А.В., Долгушин И.И. Влияние альфа-1-кислого гликопротеина на хемилюминесценцию нейтрофилов и перекисное окисление липидов при экспериментальной термической травме // Вопросы медицинской химии. — 1993. — Т. 39, № 3. — С. 24-25.
9. Bories P.N., Feger J., Benbernou N., Rouzeau J.D., Agneray J., Durand G. Prevalence of tri- and tetraantennary glycans of human alpha 1-acid glycoprotein in release of macrophage inhibitor of interleukin-1 activity // Inflammation. — 1990. — Vol. 14. — P. 315-323.
10. Boutten A., Dehoux M., Deschenes M., Rouzeau J.D., Bories P.N., Durand G. Alpha 1-acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages // Eur. J. Immunol. — 1992. — Vol. 22. — P. 2687-2695.
11. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. — 1968. — Vol. 97. — P. 77-87.
12. Daemen M.A., Heemskerk V.H., van't Veer C., Denecker G., Wolfs T.G., Vandenabeele P., Buurman W.A. Functional protection by acute phase proteins α 1-acid glycoprotein and α -antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation // Circulation. — 2000. — Vol. 102. — P. 1420-1426.
13. Fournier T., Medjoubi N., Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein // Biochim. Biophys. Acta. — 2000. — Vol. 1482, № 1-2. — P. 157-171.
14. Gabay C., Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation // N. Engl. J. Med. — 1999. — Vol. 340, № 6. — P. 448-454.
15. Laine E., Couderc R., Roch-Arveiller M., Vasson M.P., Giroud J.P., Raichvarg D. Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein // Inflammation. — 1990. — Vol. 14, № 1. — P. 1-9.
16. Matsumoto K., Nishi K., Tokutomi Y., Irie T., Suenaga A., Otagiri M. Effects of α -1-acid glycoprotein on erythrocyte deformability and membrane stabilization // Biol. Pharm. Bull. — 2003. — Vol. 26, № 1. — P. 123-126.
17. Molle W., van, Libert C., Fiers W., Brouckaert P. Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice // J. Immunol. — 1997. — Vol. 159. — P. 3555-3564.
18. Nakamura T., Board P.G., Matsushita K., Tanaka H., Matsuyama T., Matsuda T. Alpha 1-acid glycoprotein expression in human leukocytes: possible correlation between alpha 1-acid glycoprotein and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis // Inflammation. — 1993. — Vol. 17, № 1. — P. 33-45.

19. Sorensson J., Ohlson M., Bjornson A., Haraldsson B. Orosomucoid has a cAMP-dependent effect on human endothelial cells and inhibits the action of histamine // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2000. – Vol. 278. – P. H1725-H1731.

20. Su S.J., Yeh T.M. Effects of alpha 1-Acid glycoprotein on tissue factor expression and tumor necrosis factor secretion in monocytes // Immunopharmacology. – 1996. – Vol. 34. – P. 139-145.

21. Williams J.P., Weiser M.R., Pechet T.T., Kobzik L., Moore F.D. Jr, Hechtman H.B. Alpha 1-Acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 273. – P. G1031-G1035.

поступила в редакцию 09.01.2007

отправлена на доработку 15.01.2007

принята к печати 19.01.2007