РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ

Васильева Г.И., Иванова И.А., Беспалова И.А.,
Омельченко Н.Д., Киселева А.К., Дорошенко Е.П.,
Тюкавкина С.Ю.

ФГУЗ Ростовский научно-исследовательский противочумный институт, лаборатория иммунологии особо опасных инфекций, г. Ростов-на-Дону

Резюме. В работе представлены результаты экспериментального изучения регуляторного влияния хелперных фракций нейтрофилокинов на функциональную активность макрофагов в процессе формирования противочумного иммунитета. Установлено, что эти фракции содержат биологически активные низкомолекулярные пептиды, усиливающие киллинг макрофагов, активирующие слияние лизосом с фагосомами в этих клетках, способствующие трансформации моноцитов периферической крови в макрофаги и вызывающие перераспределение субпопуляций макрофагов в общем пуле этих клеток. При этом хелперный эффект нейтрофилокинов в отношении функциональной активности фагоцитов более выражен при вторичном иммунном ответе.

Ключевые слова: фракции регуляторных пептидов, нейтрофилы, макрофаги, функциональная активность.

Vasilieva G.I., Ivanova I.A., Besspalova I.A., Omeltchenko N.D., Kiseleva A.K., Doroschenko E.P., Tyukavkina S.Yu.

IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITY OF REGULATORY PEPTIDE FRACTIONS SYNTHESIZED BY NEUTROPHILS, AS TESTED IN A MACROPHAGE MODEL

Abstract. The article presents experimental data on regulatory effect of neutrophilokine helper fractions on the macrophage (Mph) functional activity in the course of antip plague immunity formation. It has revealed that these fractions content biologically active, low-molecular weight peptides. They stimulate Mph killing activity by increasing phagosome-lysosome fusion, thus boosting transformation of monocytes to Mph, and causing redistribution of macrophage subpopulations in the total cellular pool. The helper effect of neutrophilokine fractions upon functional activity of MPh is more pronounced during secondary immune response. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 305-310)

Keywords: regulatory peptide fractions, neutrophils, macrophages, functional activity.

Введение

Долгое время считали, что значение нейтрофилов (Нф) ограничено, главным образом, эф-

фекторной функцией [5, 6]. В начале 90-х годов появились публикации, свидетельствующие о том, что Нф продуцируют растворимые биологически активные низкомолекулярные пептидные факторы, способные регулировать функции ряда клеток, в том числе и системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) [3]. Эти факторы называют нейтрофилокинами и относят к гетерогенной группе регуляторных пептидов — цитокинам.

Ранее нами [2] установлено, что Нф экспериментальных животных под действием вакцинного штамма чумного микроба синтезируют пул

Адрес для переписки:

Васильева Галина Ивановна
ФГУЗ Ростовский научно-исследовательский
противочумный институт, лаборатория иммуно-
логии особо опасных инфекций
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117.
Тел.: (863) 234-23-11.
Факс: (863) 234-13-76.
E-mail: plague@aaanet.ru

нейтрофилокинов (НфК), обладающих регуляторной активностью в отношении иммунокомпетентных клеток.

В рамках данной работы мы выделили с помощью гель-хроматографического разделения их суммарного пула отдельные фракции нейтрофилокинов (ФНфК) с целью выявления наиболее активно воздействующих на функциональные свойства макрофагов.

Материалы и методы

В работе использовали 50 интактных и 50 иммунных беспородных мышей массой 15–20 г. Животных иммунизировали подкожно вакцинным штаммом чумного микроба (EV-76) линии НИИ-ЭГ в дозе 1 млн. микробных клеток (м.к.).

Для получения пула нейтрофилокинов белым мышам вводили внутривентриально 0,1% раствор гликогена на стерильном забуференном физиологическом растворе (рН 7,2). Через 4 часа животных усыпляли хлороформом, Нф вымывали из брюшной полости средой 199, содержащей 20% сыворотки крови крупного рогатого скота и 5 ед/мл гепарина. В полученном экссудате по морфологическим данным Нф составляли от 90% до 96%. Жизнеспособность клеток, оцененная в тесте с трипановым синим, составляла 96–98%. Средой 199 доводили концентрацию Нф до 10^6 кл/мл, разливали в пластиковые чашки Петри по 3 мл и инкубировали при комнатной температуре 1 час. Затем экссудат сливали и монослой обрабатывали убитой нагреванием при 100 °С 2-х суточной культурой *Y.pestis EV*, выращенной на агаре Хоттингера с кукурузным экстрактом при 28 °С (25 м.к. на Нф). Чашки помещали в термостат и инкубировали 4 часа при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 . По окончании срока инкубации супернатанты (СН), содержащие комплекс нейтрофилокинов, получали центрифугированием культуральных жидкостей при 1000 об/мин 10 мин с последующим фильтрованием через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм [5].

Для получения отдельных фракций нейтрофилокинов проводили гель-хроматографическое разделение их суммарного пула на оборудовании фирмы LKB (Швеция), состоящем из колонки, соединенной с фракционирующим коллектором и автоматическим самописцем (Uvicord II, LKB, Швеция). На колонку с сефадексом G-75 (Pharmacia), упакованную и уравновешенную в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя, с помощью перистальтического насоса наносили препарат нейтрофилокинов, суспендированных в забуференном фосфата-

ми физиологическом растворе (ЗФР) (рН 7,1), из расчета 7–8 мг белка. Элюцию проводили ЗФР со скоростью потока 0,8 мл/мин, элюент собирали в пробирки по 15 мл.

Определение химического состава полученных препаратов нейтрофилокинов и их фракций проводили по общепринятым методикам. Содержание белка в препаратах оценивали по методу Lowry [13]; количество общих гексоз — реакцией с фенолом и серной кислотой [10]; количество суммарных нуклеиновых кислот — по Спирину [7].

Электрофоретическое разделение нейтрофилокинов проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с добавлением 0,1 % додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) по методу Laemmli [12] с окрашиванием раствором Кумасси R-250 (Serva). Для определения молекулярной массы полученных фракций нейтрофилокинов использовали белковые маркеры с известной молекулярной массой фирмы Serva.

Постановку реакции фагоцитоза осуществляли по ранее описанной методике [1]. Фагоцитоз оценивали по следующим показателям: проценту активных фагоцитов (ПАФ) — отношению активных фагоцитов с захваченными микробами к числу подсчитанных; фагоцитарному индексу $ФИ_1$ и $ФИ_4$ — числу микробов в одном фагоците через 1 и 4 ч инкубаций, соответственно; индексу завершенности фагоцитоза (ИЗФ) — отношению разности между $ФИ_1$ и $ФИ_4$ к $ФИ_1$ и по индексу активации киллинга (ИАК), который определяли по формуле: $ИАК = ИЗФ_0 - ИЗФ_к$, где $ИЗФ_0$ и $ИЗФ_к$ соответствуют ИЗФ в опыте (с добавлением нейтрофилокинов) и контроле.

Активность лизосом оценивали в однослойной культуре клеток по их способности включать флюоресцирующий краситель акридиновый оранжевый [9]. Мазки изучали в люминесцентном микроскопе МБИ-15 (источник света — ртутная лампа ДРШ-250-3, светофильтр ФС-1-4, запирательный фильтр ЖС-18, увеличение 90×10). В каждом варианте экспериментов просматривали по 300 клеток в опыте и контроле (с добавлением нейтрофилокинов и без них). Учитывали процент клеток, содержащих ярко-оранжевые гранулы — лизосомы. Количество лизосом в клетках выражали в условных единицах (у.е.) [11].

Действие нейтрофилокинов на дифференцировку клеток СМФ оценивали по их влиянию на макрофагальную трансформацию моноцитов периферической крови [4]. У подопытных животных стерильно брали 0,1–0,2 мл крови из хвостовой вены, добавляли 25 ед/мл гепарина и сразу вносили в стерильные пенициллиновые флаконы под лежащие на дне покровные стекла.

Флаконы заполняли 2 мл среды 199, содержащей 20% сыворотки человека, и нейтрофилокины (опыт) или 0,15 М раствор хлорида натрия (контроль), плотно закрывали резиновыми пробками и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Покровные стекла промывали в растворе Хенкса, фиксировали в смеси Никифорова, окрашивали по Романовскому–Гимзе, просматривали 400-мagnifying стеклом в световом микроскопе под иммерсией и определяли показатель макрофагальной трансформации моноцитов (ПМТМ) – процентное содержание Мф в культуре клеток крови после 24-часовой инкубации *in vitro*.

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью статистических таблиц для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала [10]. Определяли значения доверительных интервалов L, среднеарифметического M для уровня достоверности P = 95%.

Результаты

Характеристика выделенных фракций нейтрофилокинов

Гель-хроматографическим разделением на колонке с сефадексом G-75 суммарных пулов НфК,

полученных от интактных и иммунизированных животных, были выделены по 14 фракций нейтрофилокинов. Проведенный химический анализ полученных препаратов показал, что суммарные пулы и ФНфК не содержали углеводов и нуклеиновых кислот, а являлись продуктами полипептидной природы. Фракции различались по количеству входящих в их состав белков: от 3,4 мкг/мл до 58,6 мкг/мл. Нами обнаружено, что большинство ФНфК, полученных от иммунных животных, по количеству белков превосходили таковые, выделенные от интактных мышей.

Для определения молекулярных масс (м.м.) ФНфК мы провели их электрофоретическое разделение. Обработка окрашенного кумасси голубым ПААГ с помощью лицензионной компьютерной программы Quantity One показала снижение м.м. белков, входящих в состав ФНфК, по мере увеличения их порядкового номера (от м.м. 85,9 в 1-й фракции до 9,94 кДа в 14-й фракции).

Регуляторное влияние фракций нейтрофилокинов на функциональную активность макрофагов

Исследование регуляторного влияния отдельных фракций нейтрофилокинов на фагоцитарную активность Мф показало, что поглощательная способность Мф при их добавлении не изменялась (ПАФ и ФИ1 оставались на уровне

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА КИЛЛЕРНУЮ СПОСОБНОСТЬ МАКРОФАГОВ ИНТАКТНЫХ И ИММУНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ В ОТНОШЕНИИ *Y. PESTIS EV*

№ фракции	Мф интактных мышей		Мф иммунных мышей	
	ИЗФ	ИАК	ИЗФ	ИАК
1	+0,40±0,08	+0,30	+0,60±0,04	+0,18
2	-0,30±0,07	-0,40	-0,10±0,06	-0,52
3	-0,50±0,01	-0,60	-0,22±0,05	-0,64
4	-0,29±0,02	-0,39	-0,09±0,01	-0,51
5	-0,21±0,04	-0,31	0	-0,42
6	-0,11±0,01	-0,21	+0,09±0,01	-0,33
7	+0,31±0,066	+0,21	+0,44±0,02	+0,02
8	+0,25±0,02	+0,15	+0,50±0,07	+0,08
9	-0,9±0,02	-1,0	-0,6±0,08	-1,02
10	-0,51±0,01	-0,61	-0,08±0,02	-0,50
11	+0,59±0,05	+0,49	+0,78±0,03	+0,36
12	+0,68±0,04	+0,58	+0,89±0,01	+0,47
13	+0,58±0,07	+0,48	+0,81±0,02	+0,39
14	+0,15±0,005	+0,05	+0,45±0,06	+0,03
Контроль ИЗФ	+0,10±0,05		+0,42±0,02	

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ СТИМУЛИРУЮЩИХ ФРАКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ НА ЛИЗОСОМНЫЙ АППАРАТ МАКРОФАГОВ ИНТАКТНЫХ И ИММУНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Индукторы нейтрофилокинов	Клетки, содержащие лизосомы, %		Количество лизосомных гранул, у.е.	
	Интактные мыши	Иммунные мыши	Интактные мыши	Иммунные мыши
<i>Y. pestis</i> EV	90±2,6	94±1,8	+2,80±0,2	+2,63±0,4
0,15 М раствор хлорида натрия (контроль)	91±1,9	95±1,8	+2,84±0,5	+2,92±0,4

контроля). В то же время ряд фракций нейтрофилокинов модулировали киллерную активность Мф: усиливали (№ 1, 7, 8, 11-14) или ингибировали ее (№ 2, 3, 6, 9, 10). Интересно, что молекулярные массы отдельных стимулирующих фракций были при этом во много раз ниже молекулярных весов ингибирующих (~10 кД и ~80 кД соответственно) (табл. 1). В дальнейших исследованиях мы использовали только объединенные фракции со стимулирующим эффектом.

Действие стимулирующих фракций нейтрофилокинов на лизосомы макрофагов

Исследование влияния ФНфК на лизосомный аппарат Мф свидетельствует о том, что ФНфК, выделенные из нейтрофилокинов, синтезированных Нф интактных мышей, оказывают слабое влияния на лизосомы Мф интактных животных. В то же время ФНфК, полученные от иммунных мышей, при добавлении к Мф иммунных животных обуславливают более выраженное снижение числа лизосомных гранул в одной клетке,

не влияя на процент клеток, содержащих лизосомы (табл. 2).

Влияние стимулирующих фракций нейтрофилокинов на дифференцировку моноцитов в макрофаги

Оценка действия стимулирующих ФНфК, выделенных из СН нейтрофилов интактных животных, на трансформацию моноцитов в Мф показала, что ФНфК не влияют на ПМТМ в опытах как *in vivo*, так и *in vitro*. При добавлении их к периферической крови интактных и иммунных мышей *in vitro* или при внутривенном введении интактным и иммунным экспериментальным животным *in vivo*, ПМТМ оставался на уровне контроля (табл. 3). Вместе с тем, ФНфК, полученные из СН нейтрофилов иммунных животных, *in vivo* способствуют повышению ПМТМ в отношении моноцитов интактных мышей в 3 раза. Добавление этих же препаратов к периферической крови интактных животных *in vitro* не сопровождалось изменением ПМТМ.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ СТИМУЛИРУЮЩИХ ФРАКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОКИНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ НЕЙТРОФИЛАМИ ИНТАКТНЫХ И ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ, НА ПМТМ ИНТАКТНЫХ И ИММУННЫХ МЫШЕЙ

ФНфК, полученные от животных	Моноциты периферической крови мышей	Индукторы нейтрофилокинов	ПМТМ	
			<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
интактных	интактных	<i>Y. pestis</i> EV	18±2,2	22±1,8
		0,15 М раствор хлорида натрия (контроль)	17±2,6	18±2,4
интактных	иммунных	<i>Y. pestis</i> EV	78±3,2	79±3,6
		0,15 М раствор хлорида натрия (контроль)	72±4,5	72±4,5
иммунных	интактных	<i>Y. pestis</i> EV	12±1,7	38±3,2
		0,15 М раствор хлорида натрия (контроль)	16±2,9	16±2,9
иммунных	иммунных	<i>Y. pestis</i> EV	60±2,4	82±2,8
		0,15 М раствор хлорида натрия (контроль)	62±4,5	72±4,5

Обсуждение

Ранее нами [2] установлено, что Нф экспериментальных животных под действием вакцинного штамма чумного микроба синтезируют пул нейтрофилокинов (НфК), обладающих регуляторной активностью в отношении иммунокомпетентных клеток. В рамках данной работы мы выделили с помощью гель-хроматографического разделения их суммарного пула на оборудовании фирмы LKB (Швеция) отдельные фракции нейтрофилокинов (ФНфК). Изучение влияния этих фракций на киллерную активность макрофагов (Мф) позволило выявить фракции, обладающие стимулирующим и ингибирующим эффектом. В дальнейших исследованиях мы изучали только стимулирующие фракции НфК.

Результаты наших исследований показали, что изученные нами ФНфК, не оказывая влияния на поглотительную способность Мф, усиливают киллинг возбудителя чумы макрофагами, полученными как от интактных, так и от иммунных мышей.

Для более полной характеристики ФНфК, обладающих стимулирующей активностью, мы изучили их влияние на другие функции Мф.

Результаты изучения их действия на лизосомы Мф, показали, что ФНфК, полученные из СН нейтрофилов иммунных животных, вызывают выраженное снижение лизосомных гранул в одной клетке, не влияя на процент клеток, содержащих лизосомы, что можно объяснить лабильзацией лизосомных мембран, которая имеет положительное значение. Такие изменения мембран являются показателем активации обменных процессов в клетке и защитных механизмов, обеспечивающих захват и уничтожение чужеродных агентов с помощью кислых гидролаз и катионных белков лизосом, для чего необходим выход этих биологически активных компонентов из лизосом. Вероятно, для лабильзирующего воздействия нейтрофилокинов на лизосомную мембрану Мф необходима «подготовленность» последних, которая развивается в результате иммунизации животных вакцинным штаммом чумного микроба.

Проведенные исследования влияния стимулирующих ФНфК на трансформацию моноцитов (Мн) в Мф, свидетельствуют что ФНфК, выделенные из СН нейтрофилов иммунных мышей, оказывают позитивное влияние на дифференцировку Мн в Мф, эффект которого проявляется только в опытах *in vivo* при использовании

интактных животных, что объясняется высокими значениями этого показателя у иммунных мышей.

Таким образом, полученные нами стимулирующие фракции нейтрофилокинов содержат биологически активные низкомолекулярные пептиды, усиливающие киллинг Мф, активирующие слияние лизосом с фагосомами в этих клетках и способствующие трансформации моноцитов периферической крови в Мф.

Список литературы

1. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Киселева А.К. Сравнительная характеристика завершенности фагоцитоза вирулентного и вакцинного штаммов чумного микроба в культуре перитонеальных макрофагов // Диагност. и профилактич. особо опасн. инф. — Саратов, 1983. — С. 54-58.
2. Васильева Г.И., Иванова И.А., Киселева А.К., Дорошенко Е.П., Беспалова И.А. Влияние нейтрофилокинов на функциональную активность макрофагов в процессе формирования противочумного иммунитета // Биотехнология. — 2004. — № 2. — С. 47-54.
3. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Чукичев А.В. Регуляторные пептиды // Иммунология. — 1990. — №3. — С. 35-37.
4. Демченко Т.А., Джагинян А.И., Ситина Н.Н. Микрометод определения показателя макрофагальной трансформации мононуклеаров // Лаб. дело. — 1982. — № 10. — С. 41-43.
5. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. — Казань, 1993. — 132 с.
6. Маянский А.Н. Проблемы хронического воспаления в современной патофизиологии // Пат. физиол. — 1994. — № 2. — С. 51-55.
7. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — Т. 23, № 5. — С. 656-661.
8. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала. — Обинск, 1980. — 15 с.
9. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. — М.: Медицина, 1978. — 200 с.
10. Dubois M., Gilles K., Hamilton J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. — 1956. — Vol. 28, N 3. — P. 350-356.
11. Khavkin T.N., Freidlin I.S., Saccharova I. Vital fluorescence microscopy of lysosomes in cultured mouse peritoneal macrophages during

their interaction with microorganisms and active substances // Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. — 1977. — Vol. 24., N 1. — P. 284-291.

12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227, N 3. — P. 680-685.

13. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — № 1. — P. 265-275.

поступила 15.02.2010

отправлена на доработку 20.02.2010

принята к печати 05.03.2010