

РОЛЬ ЛЕКТИН-СУБСТРАТНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ В ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И IgG

• ” • ” • ”
• •

Отдел иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Резюме. По снижению ответа КонА-бластов на IL-2 установлено, что белок А стафилококка извлекает из среды культивирования IL-2, проинкубированный с IgG, и не связывается с чистым IL-2. Нормальный иммуноглобулин человека тормозит также реакцию на листериозный антиген эфektorов ГЗТ, активность которых зависит от IL-2. Иммуномодулятор «Фоспренил» (полипренилфосфат натрия) отменяет ингибирующее действие иммуноглобулина. Поскольку фоспренил, как было показано ранее, взаимодействует с α -цепью rIL-2 (CD25) и блокирует активность IL-2, два препарата выступают как конкуренты. Последнее объясняется идентичностью простетических (углеводных) частей обоих гликопротеинов (CD25 и гаммаглобулина), по отношению к которым «Фоспренил» и IL-2 ведут себя подобно лектинам. Эти результаты характеризуют локально действующие условия и механизмы регуляции клеточного иммунитета притканевом доминировании гаммаглобулина или антител данного изотипа. При этом IgG связывается с IL-2, реагируя не с активным центром, а с эффекторной частью молекулы иммуноглобулина и блокирует активность IL-2. Так как аналогичный эффект наблюдается и в условиях *in vivo* на модели ГЗТ, выявленный феномен может объяснять подавление иммунного ответа после пассивного введения антител, а также наличие обратной взаимосвязи между гуморальным и клеточным иммунитетом. Торможение биологической активности IL-2 после его взаимодействия с IgG и иммунными комплексами можно рассматривать как проявление универсального механизма иммунорегуляции, осуществляемой по принципу обратной связи, влиять на который можно с помощью иммуномодуляторов, аналогичных «Фоспренилу». При некоторых инфекциях, малигнизации и т.п. этот механизм может приобретать ведущее патогенетическое значение. Вместе с тем нельзя исключить его участие в физиологически обусловленных иммуногенетических коллизиях в системе мать — плод, где с его помощью может происходить положительная селекция особей с более широким репертуаром МНС, необходимым для формирования индивидуальной и популяционной устойчивости к инфекциям.

Ключевые слова: IL-2, IgG, полипренолы, иммунорегуляция

Sobolev S.M., Nikolaeva T.N., Grigorjeva E.A., Pronin A.V.

ROLE OF LECTIN-SUBSTRATE RECOGNITION IN IMMUNOREGULATORY INTERACTION BETWEEN INTERLEUKIN-2 AND IgG

Abstract. As assessed by decreased response of ConA-induced blasts to IL-2, a staphylococcal protein A was shown to extract IL-2 from cultural medium after its preincubation with IgG, but it did not bind pure IL-2.

Адрес для переписки:

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

Тел./факс: (499) 190-58-51.

E-mail: proninalexander@yandex.ru

Normal human immunoglobulin inhibits reaction of DTH effectors to Listeria antigen, which is also IL-2-dependent. An immunomodulating drug Phosphrenyl (sodium polyphenylphosphate) abolishes the inhibitory effect of immunoglobulin. Since Phosphrenyl (as shown earlier) interacts with alpha-chain of rIL-2 and

blocks IL-2 activity, the two drugs are in competitive relations. The latter may be explained by identities in prosthetic carbohydrate groups of the both glycoproteins (CD25 and immunoglobulin), whereas Phosprenyl and IL-2 would behave like as lectins. These results characterize local conditions and mechanisms of immune regulation under tissue domination of gamma-globulin or antibodies of a given isotype. IgG binds with IL-2, reacting not with an active center but with effector region of IgG molecule, thus blocking IL-2 activity. Since a similar effect is observed under in vivo conditions (in a DTH model), the phenomenon revealed may explain inhibition of immune response after passive injection of antibodies, as well as a feed-back relationship between humoral and cellular immunity. Inhibition of IL-2 biological activity after its interaction with IgG and immune complexes may be considered as a universal mechanism of immune regulation performed by a feedback regulation, which may be influenced by means of Phosprenyl-like immunomodulators. In some infections, malignant growth etc., such mechanism may be of utmost pathogenetic significance. Moreover, such a mechanism cannot be also excluded in some physiological immunogenetic interactions, e.g., in feto-maternal system, where it could promote a positive selection for individuals with broader MHC repertoire, which would be necessary for development of individual and population-based resistance to infections. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N1-2, pp 13-20)

Keywords: IL-2, IgG, polyphenols, immunoregulation.

Введение

Нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения (ГГч) долгое время использовался для лечения иммунодефицитных состояний, а в настоящее время все чаще применяется как иммуномодулирующее средство при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях [11, 14]. Механизм действия ГГч окончательно не установлен. Вероятно, этот механизм комплексный и связан со способностью ГГч взаимодействовать с самыми разными компонентами иммунной системы: Fc-рецепторами, компонентом, цитокинами, Т- и В-лимфоцитами, дендритными клетками, естественными киллерами и др. [4]. Основным активным компонентом ГГч является IgG. Терапевтический эффект IgG зависит от Fc и/или F(ab')₂ фрагментов [4] и обусловлен блокадой Fc-рецепторов, нейтрализацией аутоантител за счет антиидиотипических антител, влиянием на процесс Fas-зависимого апоптоза и влиянием на секрецию ряда цитокинов, в частности IL-2 [15]. В последнем случае эффект часто связывают с наличием антител к цитокинам [5]. Однако имеются данные о том, что подавление с помощью ГГч продукции IL-2 происходит на посттранскрипционной стадии и может указывать на существование особого механизма регуляции продукции IL-2 и в целом иммунного ответа [8]. Цель настоящей работы состояла в исследовании этого возможного механизма.

Материалы и методы

Материалы

На различных этапах работы были использованы следующие коммерческие препараты: рекомбинантный IL-2 человека (Институт органического синтеза АН Латвии, МНТК «Биоген»), очищенный IL-2 крысы (Sigma, США), кроличья поликлональная антисыворотка против IL-2 человека (Amersham, Великобритания), нор-

мальный иммуноглобулин человека («ИмБио», РФ), бараньи моносpezifические сыворотки против IgG (H+L), IgM (H), IgA (H) (АО «Биомед» им. И.И. Мечникова, РФ), баранья моносpezifическая сыворотка против IgG кролика (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, РФ), кроличья гемолитическая сухая сыворотка («Антиген», РФ), стафилококковый реагент, содержащий белок А (НИИЭМ им. Л. Пастера, РФ), эритроциты барана в консерванте «Глюгидир» (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, РФ), полипренилфосфат натрия («Фоспренил», ЗАО «Микро-плюс», Россия).

Для получения лизата эритроцитов барана (ЛЭБ) их отмывали от консерванта в физиологическом растворе, а плотный осадок (1 мл) подвергали пятикратному замораживанию при -20 °С и оттаиванию при 37 °С. После осаждения центрифугированием (3000 об/мин, 30 мин) стромы разрушенных эритроцитов, супернатант собирали и хранили в замороженном состоянии до его использования в качестве растворимого антигена.

10%-ю взвесь золотистого стафилококка штамма А-676 Cowan 1 (СС-1) получали регидратацией реагента в 2 мл дистиллированной воды и после отмывания от наполнителей использовали для сорбции IgG и связанного с ним IL-2 [6], в процессе которой СС-1 сенсибилизировался к агглютинирующему действию антисыворотки.

Культура Кона-бластов спленоцитов мыши

Лимфоциты беспородных мышей (питомник лабораторных животных РАМН «Столбовая») стимулировали в течение 3 суток конканавалином А (2 мкг/мл, Sigma, США). Культивирование осуществляли в пластиковых флаконах объемом 50 мл (Nunc, Дания), в которые вносили 15 миллионов клеток в 5 мл. После отмывания от митогена клетки в количестве 40 тысяч/0,2 мл вносили в лунки 96-луночных планшетов (Limbro, США) вместе с α-метилманнопиранозидом (конечная концентрация 0,1 М) для блокирования остаточной активности Кона. Культивирование

осуществляли в среде RPMI 1640 с 5-10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ буферного раствора HEPES, 2 мМ L-глутамина, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола и 50 мкг/мл гентамицина. В среду добавляли в различных концентрациях тестируемые ингредиенты (IL-2, IgG, кроличью гемолитическую сыворотку и др.). Планшеты с Кона-блантами инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 20 часов. За 4 часа до окончания культивирования в каждую лунку вносили 1 мкКи ³H-тимидина в объеме 5 мкл. Клетки переносили на стекловолкнистые фильтры харвестером фирмы Flow (Великобритания) и просчитывали радиоактивность проб на жидкостном β-спектрометре Intertechnique SL30 (Франция).

Реакция ГЗТ

Постановку реакции на мышах Центрального питомника лабораторных животных РАМН проводили по стандартной схеме: примиряющая доза антигена (инактивированная парами хлороформа агаровая культура *Listeria monocytogenes*) — 5×10^5 КОЕ/ 0,2 мл физиологического раствора; подкожно, разрешающая доза — 5×10^7 КОЕ/0,02 мл, в стопу задней лапы. Интервал между первым и вторым введениями антигена — 6 суток. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 часа после введения разреша-

ющей дозы антигена. По разнице в массе опытной и контрольной стоп сдвиг индекса реакции между опытными и контрольными (несенсибилизированными) группами животных оценивали как положительный при разнице в показателях > 5%.

Статистика

Полученные результаты подвергали статистической обработке с нахождением средних геометрических значений показателей в группах и их стандартных ошибок. Доверительные интервалы и достоверность различий между группами определяли при выбранном уровне вероятности, равном 0,05.

Результаты

Ранее [12] нами было показано, что нормальный IgG человека дозозависимо (от 2,5 до 10 мг/мл) угнетает пролиферацию Кона-бластов под действием рекомбинантного IL-2. Белок A *S. aureus* Cowan I, связывающий IgG, практически не влияет на пролиферативную активность (рис. 1) бластных клеток. Инкубация IgG с белком А в течение 1 часа с последующим удалением образовавшегося комплекса центрифугированием одновременно удаляет из супернатанта и компонент, способный ингибировать IL-2-зависимую пролиферацию, т.е. IgG. Если же 1-часовую инкубацию белка А и IgG

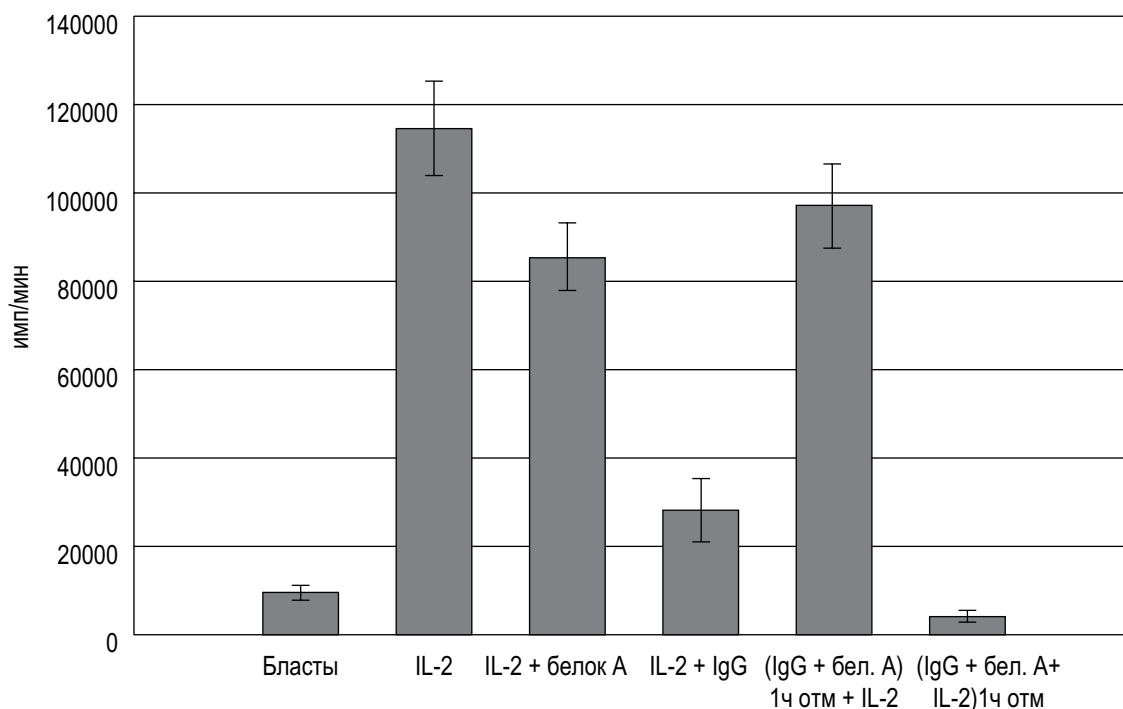


Рисунок 1. Белок А стафилококка удаляет IL-2 вместе с IgG

Примечание. По оси ординат – включение ³H-тимидина (импульсы/мин), по оси абсцисс – реагенты, добавленные в культуру Кона-бластов. «(IgG + бел. А) 1ч отм + IL-2» – IgG проинкубирован с белком А 1 час, затем осадок удален центрифугированием, к супернатанту добавлен IL-2 и полученная смесь добавлена к бластным клеткам. «(IgG + бел. А + IL-2) 1ч отм» – IgG проинкубирован с белком А и IL-2 в течение 1 часа, затем осадок удален центрифугированием и полученная смесь добавлена к бластным клеткам.

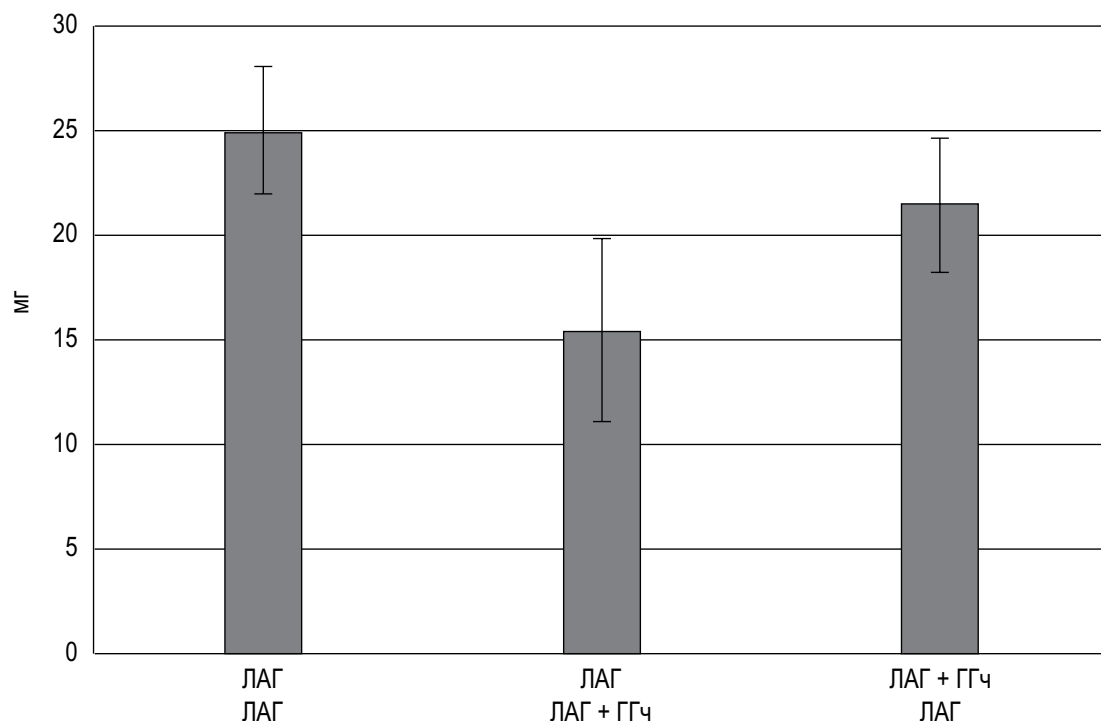


Рисунок 2. Гамма-глобулин человека ингибирует индуктивную фазу ГЗТ

Примечание. По оси ординат – разница в массе опытной и контрольной стоп (мг). Подписи по оси абсцисс: верхняя строка – реагенты, использованные для разрешения реакции, нижняя строка – реагенты, использованные при сенсibilизации. ЛАГ – листериозный антиген, ГГч – нормальный гамма-глобулин человека.

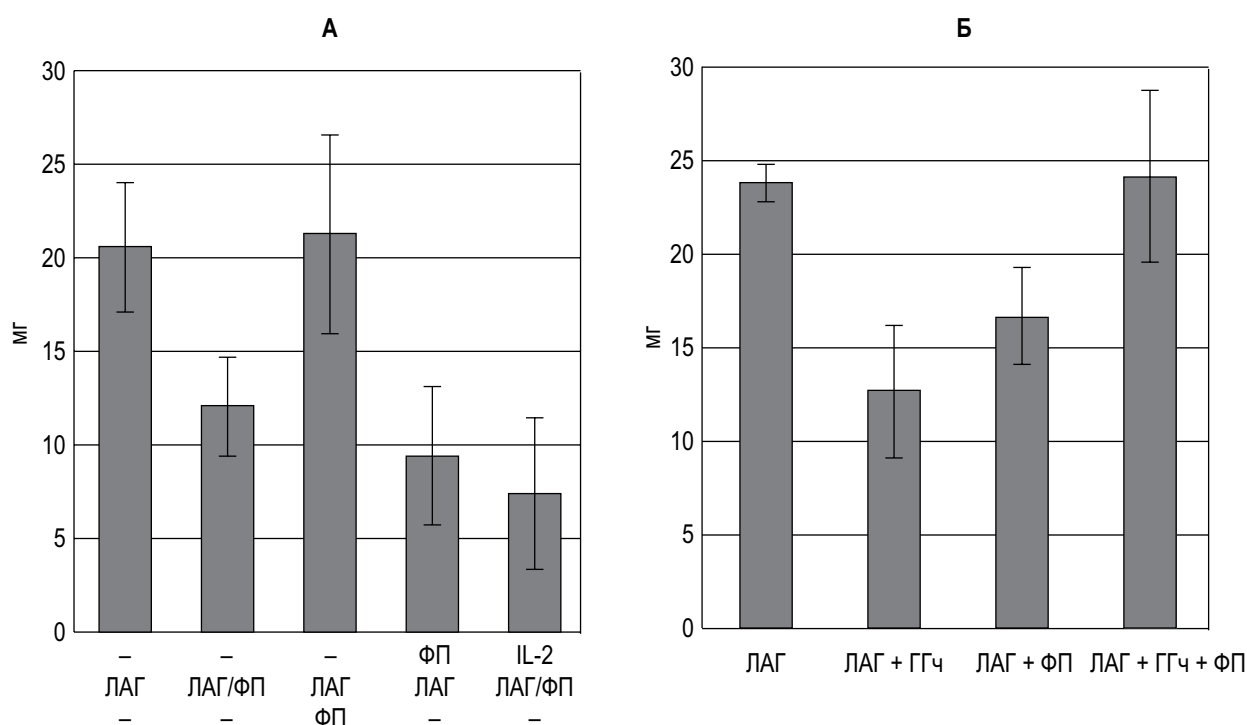


Рисунок 3. «Фоспренил» ингибирует ГЗТ, блокируя IL-2r, и отменяет ингибирующее действие гамма-глобулина

Примечание. По оси ординат – разница в массе опытной и контрольной стоп (мг). Подписи по оси абсцисс: А – верхняя строка – реагенты, введенные через 1 сутки после сенсibilизации, средняя строка – реагенты, введенные в момент сенсibilизации, нижняя строка – реагенты, введенные за 1 сутки до сенсibilизации. Б – реагенты, введенные в момент сенсibilизации. Разрешение – во всех случаях листериозным антигеном (ЛАГ), ГГч – нормальный гамма-глобулин человека, ФП – «Фоспренил».

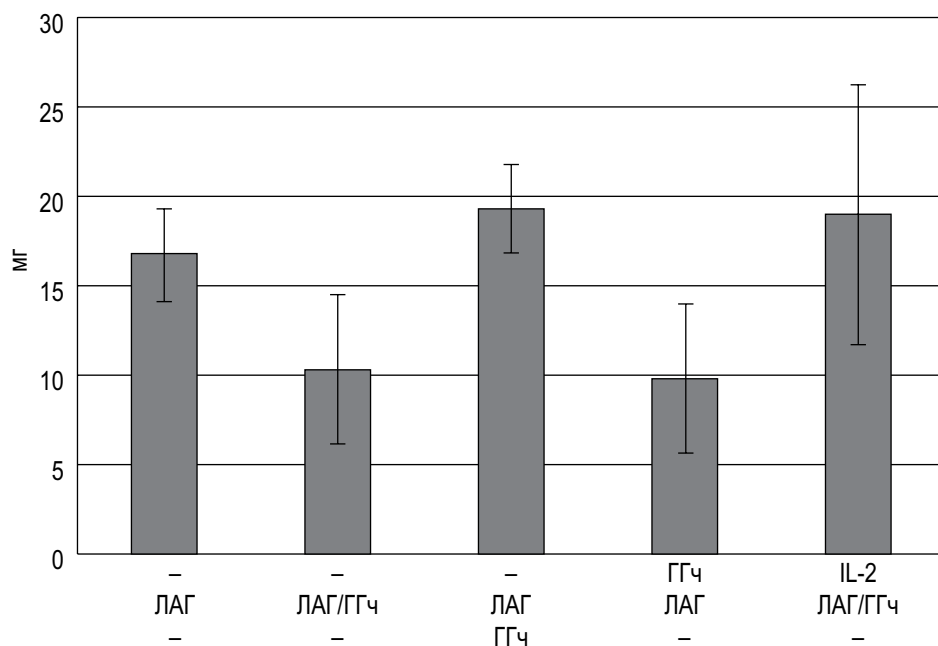


Рисунок 4. Гамма-глобулин ингибирует ГЗТ, блокируя IL-2

Примечание. По оси ординат – разница в массе опытной и контрольной стоп (мг). Подписи по оси абсцисс: верхняя строка – реагенты, введенные через 1 сутки после сенсibilизации, средняя строка – реагенты, введенные в момент сенсibilизации, нижняя строка – реагенты, введенные за 1 сутки до сенсibilизации. Разрешение – во всех случаях листериозным антигеном (ЛАГ), ГГч – нормальный гамма-глобулин человека.

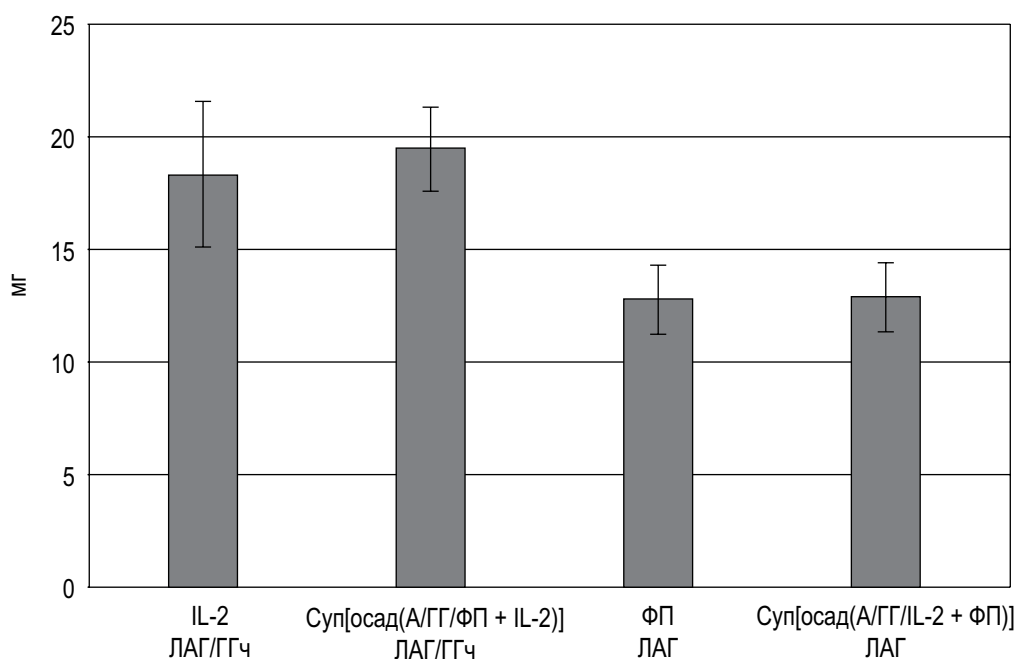


Рисунок 5. IL-2 и «Фоспренил» конкурируют за связь с гамма-глобулином

Примечание. По оси ординат – разница в массе опытной и контрольной стоп (мг). Подписи по оси абсцисс: верхняя строка – реагенты, введенные через 1 сутки после сенсibilизации, нижняя строка – реагенты, введенные в момент сенсibilизации. Разрешение – во всех случаях листериозным антигеном (ЛАГ), ГГч – нормальный гамма-глобулин человека, ФП – «Фоспренил». «Суп[осад(А/ГГч/ФП + IL-2)]» – белок А проинкубирован в течение 1 часа с ГГч и ФП, затем к смеси добавлен IL-2 и после новой 1-часовой инкубации образовавшийся осадок удален центрифугированием, а супернатант введен животным. Суп[осад(А/ГГч/IL-2 + ФП)] – белок А проинкубирован в течение 1 часа с ГГч и IL-2, затем к смеси добавлен ФП и после новой 1-часовой инкубации образовавшийся осадок удален центрифугированием, а супернатант введен животным.

молекул, влияя на их функции. Представленные в настоящей работе данные показывают, что иммуномодулирующий препарат «Фоспренил», действующим компонентом которого является полипренилфосфат, взаимодействует как с рецептором IL-2 [10], так и с ГГч. Последний, в свою очередь, способен реагировать с IL-2. Анализ всех указанных взаимодействий показывает, что они могут быть связаны с N-гликанами, содержащими двухантенные негалактозированные терминалы с 5 или 6 остатками маннозы, которые присутствуют в молекулах IgG, CD25 и яичном альбумине, но отсутствуют в человеческом и бычьем сывороточных альбуминах [7]. Подтверждением этому предположению служат предварительные данные о том, что яичный альбумин, в отличие от бычьего и человеческого сывороточных альбуминов, оказывает на развитие реакции ГЗТ такое же действие, как и ГГч. Таким образом, IL-2, взаимодействуя с рецепторным комплексом IL-2, усиливает ГЗТ, но при повышенном содержании в сыворотке IgG часть IL-2 будет связываться с IgG, что приведет к снижению ГЗТ и воспалительных процессов. Совершенно противоположный эффект будет вызывать иммуномодулятор ФП: блокируя CD25, он будет препятствовать индукции ГЗТ и, возможно, регуляторных Т-клеток, но при повышенном содержании IgG его эффект сменится на противоположный. Это лишний раз подчеркивает необходимость более осторожно-го использования иммуномодулирующих препаратов, действие которых может быть прямо противоположным в зависимости от конкретной фазы развития иммунного ответа и состояния иммунной системы в целом.

Выводы

1. IgG неиммунно взаимодействует с антирецепторным сайтом IL-2 и ингибирует биологическую активность последнего.
 2. Обнаружена способность к образованию биологически инертных комплексов: у IgG с «Фоспренилом» и IL-2, а у «Фоспренила» — с гамма-глобулином и CD25.
 3. Комплексообразование осуществляется, по-видимому, за счет олигоманнозид N-гликанов в простетической части гликопротеинов CD25 и IgG, по отношению к которым IL-2 и «Фоспренил» ведут себя подобно лектинам.
- Неиммунное взаимодействие IgG и IL-2 может быть частью физиологического иммунорегуляторного механизма, проявлением которого служат известные данные об обратной зависимости антителообразования и Т-клеточных реакций, данные о клеточно-опосредованных им-

мунодефицитах при маннозидозах, кандидозах, а также при гипергамма-глобулинемиях (СПИД) и новообразованиях.

4. «Фоспренил», вводясь в регуляторную цепь IgG — IL-2, вызывает иммуномодулирующий эффект.

Список литературы

1. Наровлянский А.Н., Васильев А.Н., Савойская С.Л., Иванова А.М., Измestьева А.В., Данилов Л.Л., Веселовский В.В., Ожерелков С.В., Зубашев И.К., Пронин А.В., Санин А.В., Ершов Ф.И. Система изопреноидов: роль в противовирусном иммунитете // Вестник НЦ экспертизы средств медицинского применения. — 2007. — № 3. — С. 66-75.
2. Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Caboneil C., Misra N., Donkova V., Pashov A., Chevailler A., Mouthon L., Weill B., Bruneval P., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin // Blood. — 2003. — Vol. 101, N 2. — P. 758-765.
3. Doebeis C., Siegmund K., Loddenkemper C., Lowe J.B., Issekutz A.C., Hamann A., Huehn J., Syrbe U. Cellular Players and Role of Selectin Ligands in Leukocyte Recruitment in a T Cell-Initiated Delayed- Type Hypersensitivity Reaction // Amer. J. Pathol. — 2008. — Vol. 173, N 4. — P. 1067-1076.
4. Galeotti C., Maddur M.S., Kazatchkine M.D., Mouthon L., Kaveri S.V. Mechanisms of action of IVIG in autoimmune and inflammatory disorders: recent developments // Transfus. Clin. Biol. — 2009. — Vol. 16, N 2. — P. 75-79.
5. Gupta M., Noel G.J., Schaefer M., Friedman D., Bussel J., Johann-Liang R. Cytokine modulation with immune gamma-globulin in peripheral blood of normal children and its implications in Kawasaki disease treatment // J. Clin. Immunol. — 2001. — Vol. 21, N 3. — P. 193-199.
6. Kessler S.W. Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcus protein A — antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A // J. Immunol. — 1975. — Vol. 115, N 6. — P. 1617-1624.
7. Marth J.D., Grewal P.K. Mammalian glycosylation in immunity // Nature Reviews Immunology. — 2008. — Vol. 8, N 11. — P. 884-887.
8. Modiano J.F., Amran D., Lack G., Bradley K., Ball C., Domenico J., Gelfand E.W. Posttranscriptional regulation of T cell IL-2 production by human pooled immunoglobulin // Clin. Immunol. Immunopathol. — 1997. — Vol. 83, N 1. — P. 77-85.
9. Nachbaur D., Herold M., Eibl B., Glassl H., Schwaighofer H., Huber C.,

Gachter A. A comparative study of the *in vitro* immunomodulatory activity of human intact immunoglobulin (7S IVIG), F(ab')₂ fragments (5S IVIG) and Fc fragments. Evidence for post-transcriptional IL-2 modulation // Immunology. — 1997. — Vol. 90. — P. 212-218.

10. Pronin A.V., Ozherelkov S.V., Narovlyansky A.N., Danilov L.L., Maltsev S.D., Deyeva A.V., Grigorieva E.A., Sanin A.V. Role of cytokines in immunomodulatory effects of polyphenyl phosphate: new generation of antiviral drugs // Russian J. Immunol. — 2000. — Vol. 5, N 2. — P. 156-164.

11. Siberil S., Elluru S., Graff-Dubois S., Negi V.S., Delignat S., Mouthon L., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D., Bayary J., Kaveri S.V. Intravenous immunoglobulins in autoimmune and inflammatory diseases: a mechanistic perspective // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2007. — Vol. 1110. — P. 497-506.

12. Sobolev S.M., Pronin A.V. Functional and serological evidences of the non-immune interaction

of interleukin-2 and immunoglobulin G // Russian J. Immunol. — 2000. — Vol. 5, N 2. — P. 203-208.

13. Szereday L., Spath P., Szekeres-Bartho J. Natural killer activity and cytokine production after *in vitro* immunoglobulin treatment of lymphocytes derived from pregnant women with or without risk for spontaneous abortion // Am. J. Reprod. Immunol. — 1999 — Vol. 42, N 5. — P. 282-287.

14. Vani J., Elluru S., Negi V.S., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D., Bayary J., Kaveri S.V. Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective // Autoimmun. Rev. — 2008. — Vol. 7, N 6. — P. 440-444.

15. Wu K.H., Wu W.M., Lu M.Y., Chiang B.L. Inhibitory effect of pooled human immunoglobulin on cytokine production in peripheral blood mononuclear cells // Pediatr. Allergy Immunol. — 2006. — Vol. 17, N 1. — P. 60-68.

поступила в редакцию 16.06.2009

принята к печати 21.06.2009