

ОПРЕДЕЛЕНИЕ IL-1 β , ВЫРАБАТЫВАЕМОГО КЛЕТКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКОВ γ -ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ И ИХ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ

Чекнев С.Б., Ефремова И.Е., Писковская Л.С.,
Юшковец Е.Н., Бабаянц А.А.

Лаборатория межклеточных взаимодействий НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Минздравсоцразвития России

Резюме. В работе показано, что в общем пуле цитокинов, вырабатываемых клетками крови человека в присутствии белков γ -глобулиновой фракции, их металлокомплексов с медью и цинком, а также катионов меди и цинка, примененных изолированно, содержится до $148,0 \pm 14,9$ пг/мл интерлейкина-1 β (IL-1 β). Трансформированные связыванием катионов цинка и меди γ -глобулины индуцируют в 2,0 раза ($p = 0,1$) и в 1,4 раза соответственно меньше IL-1, чем контрольные белки. При этом металлокомплекс γ -глобулина с медью оказывается в 2,7 раза ($p < 0,01$) более активным индуктором IL-1 β , чем белок, связавший катионы цинка. В контрольных на связанный металл дозах катионы цинка, примененные изолированно, практически не индуцируют выработку IL-1 β , катионы меди в 1,6 раза ($p < 0,05$) более активны, чем связавший их γ -глобулин, и в 1,45 раза ($p < 0,1$) эффективнее ФГА. Обсуждается участие катионов меди и цинка, хелатируемых из микроокружения антителами и трансформирующих Fc регионы молекул антител, в регуляции выработки IL-1 β клетками крови человека, индуцированными посредством активации их Fc рецепторов.

Ключевые слова: γ -глобулин, металлокомплексы, IL-1 β , индукция, выработка.

Cheknev S.B., Efremova I.E., Piskovskaya L.S., Yushkovets E.N., Babajanz A.A.

DETECTION OF IL-1 β PRODUCED BY HUMAN BLOOD CELLS IN PRESENCE OF PROTEINS FROM THE γ -GLOBULIN FRACTION AND THEIR COMPLEXES WITH METALS

Abstract. Present study has shown that a total cytokine pool produced by human blood cells in presence of proteins from the γ -globulin fraction, or their complexes with copper and zinc, as well as with pure copper and zinc cations, contains up to 148.0 ± 14.9 pg interleukin-1 β (IL-1 β) per mL. The γ -globulins modified by copper or zinc binding induce, resp., 2.0 and 1.4-fold less IL-1 β than intact proteins (significant by $p = 0.1$). Meanwhile, the copper- γ -globulin proved to be 2.7-fold more active ($p < 0.01$) IL-1 β inducer, as a zinc-protein complex. Pure zinc ions did not induce IL-1 β production, whereas induction rates with pure copper ions are 1.6-fold higher ($p < 0.05$) than with γ -globulin, and 1.45-fold more efficient than PHA stimulation ($p < 0.1$).

Адрес для переписки:

Чекнев Сергей Борисович,
НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития
России

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

Тел.: (499) 190-43-88.

Факс (499) 193-61-83.

E-mail: cheknev@gamaleya.org

A potential participation of copper and zinc cations bound to antibodies from the microenvironment and, thus, transforming Fc regions of antibody molecules, is discussed with regard of regulation of IL-1 β production by human blood cells induced by activation of their Fc receptors. (*Med. Immunol.*, Vol. 12, N 6, pp 497-502)

Keywords: γ -globulin, metal complexes, IL-1 β , induction, production.

Введение

Множественность биологических функций интерлейкина-1 (IL-1), как правило, реализующихся в процессах иммуногенеза с превалярованием провоспалительной и пирогенной составляющих, определяет существование высокоэффективной системы регуляции выработки этого цитокина, которая должна ограничивать развитие патологических проявлений, одновременно обеспечивая достаточный уровень активности моноцитарно-макрофагального звена иммунитета [1, 2, 3].

К числу факторов и механизмов тонкой настройки иммунной системы на индукцию IL-1 относят сигнальные пути, активирующие транскрипцию гена и процессинг цитокина [3], конкуренцию «сигнальных» и «несигнальных» рецепторов IL-1 за связывание лиганда [1], регуляцию активности IL-1 на уровне связывания с рецептором и инициации трансдукции сигнала в клетку [1]. В условиях иммунорегуляторного баланса амплификация IL-1 защитных реакций организма не выходит из-под контроля механизмов их рационального ограничения [1, 2].

Естественными регуляторами связанных с IL-1 реакций выступают катионы металлов, действующие на уровне индукции синтетических процессов, а также в ходе взаимодействия IL-1 с его рецептором и развития последующего ответа клетки [20, 21, 24]. При этом катионы меди и цинка могут служить индукторами экспрессии гена IL-1 и выработки этого цитокина [15, 20, 24], могут и ограничивать выработку IL-1 в активированных клетках [10, 12, 18], в определенных условиях конкурируя друг с другом [19].

Как установлено нашими предшествующими исследованиями, связываясь в режимах, приближенных к физиологическим, белками γ -глобулиновой фракции плазмы крови, образуя белковые металлокомплексы и первично трансформируя при этом Fc регионы молекул антител, катионы меди и цинка меняют взаимодействие таких антител с Fc рецепторами (FcR) клеток, что ведет к усилению (медь) или ослаблению (цинк) индукции внутриклеточных сигнальных путей, замкнутых на активацию FcR и обеспечивающих выработку интерферона- α (IFN α) и IFN γ [4, 5, 6, 8]. Одновременно, в присутствии металлокомплексов γ -глобулина в мононуклеарных клетках (МНК) периферической крови человека повышается содержание мРНК IL-1 β [7].

Целью работы явилась оценка выработки IL-1 β клетками крови человека в присутствии металлокомплексов человеческого сывороточно-го γ -глобулина с катионами меди и цинка.

Материалы и методы

Индукцию IL-1 β в суспензиях клеток, полученных разведением проб цельной периферической венозной крови человека (10^6 клеток в 1 мл), проводили в полной питательной среде, приготовленной на основе среды двойной Игла (ФГУП Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН), дополненной 2% плазмы донорской крови, L-глутамином (из комплекта к флакону среды), гентамицином (20 ЕД/мл) и гепарином (до 5,0 ЕД/мл), в течение 72 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Использовали пластиковые плоскородные 24-луночные планшеты (Costar).

Образцы модифицированного катионами меди или цинка человеческого сывороточного γ -глобулина (исходный препарат – ICN) применяли в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Параллельно оценивали действие контрольных препаратов γ -глобулина и солевых растворов меди (водный сульфат, Merck) и цинка (хлорид), содержание катионов в которых соответствовало количеству металла, связавшегося с белком на стадии получения экспериментальных образцов.

В качестве контрольных по меди и цинку использовали γ -глобулины, приготовленные из той же порции белка, что и соответствующие опытные (модифицированные), и прошедшие все те же стадии обработки, но не содержащие в растворе солей меди или цинка. Растворы контрольных белков дополняли по объему необходимым количеством 0,15 М NaCl.

Контрольным индуктором выработки IL-1 β служил фитогемагглютинин Р (ФГА, Difco, 1,0 мкг/мл).

Содержание IL-1 β в супернатантах индуцированных клеток крови определяли методом ИФА с использованием ELISA Processor II (Behring). Наборы для ИФА (ЗАО «Вектор-Бест») применяли согласно инструкции фирмы-производителя с дополнительными технологическими контролями.

При математической обработке результатов достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

В тексте и на рисунках концентрации IL-1 β приведены за вычетом показателей спонтанной продукции цитокина клетками периферической крови.

Результаты

Полученные данные обнаруживают, что в общем пуле цитокинов, вырабатываемых клетками периферической крови человека в присутствии образцов контрольного и модифицированного катионами металлов γ -глобулина, а также катионов

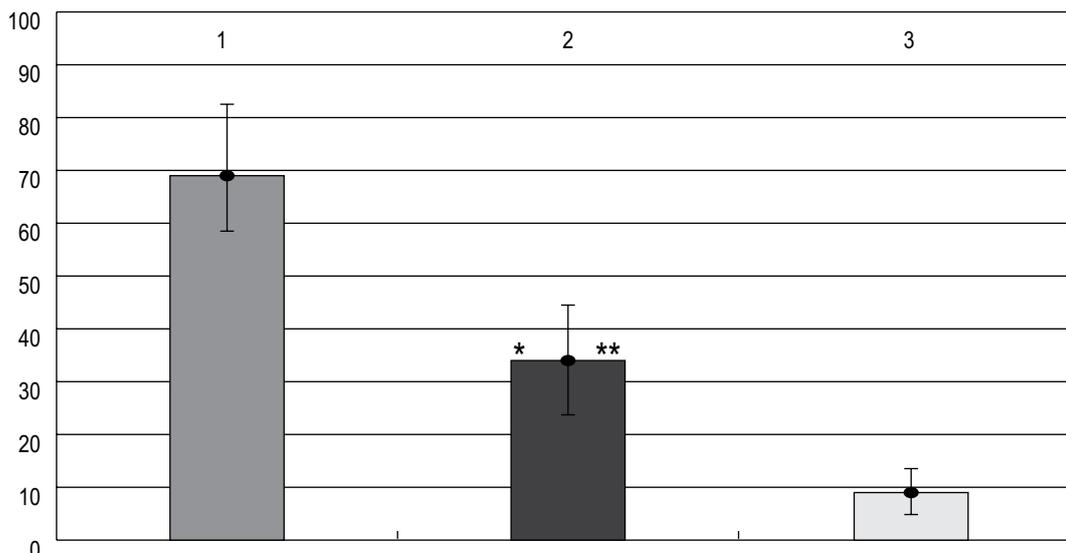


Рисунок 1. Выработка IL-1β клетками периферической крови человека в условиях индукции белками γ-глобулиновой фракции и их металлокомплексами с цинком ($M \pm m$, $n = 8$)

Примечание. По оси ординат: концентрация IL-1β, пг/мл. 1 – контрольный по цинку γ-глобулин, 2 – модифицированный цинком γ-глобулин, 3 – цинк.

Концентрации: 1 и 2 – 0,5 мкг/мл; 3 – 2,5 нг/мл. * – $p = 0,1$ по сравнению с показателями контрольного γ-глобулина (1), ** – $p < 0,05$ по сравнению с показателями цинка (3).

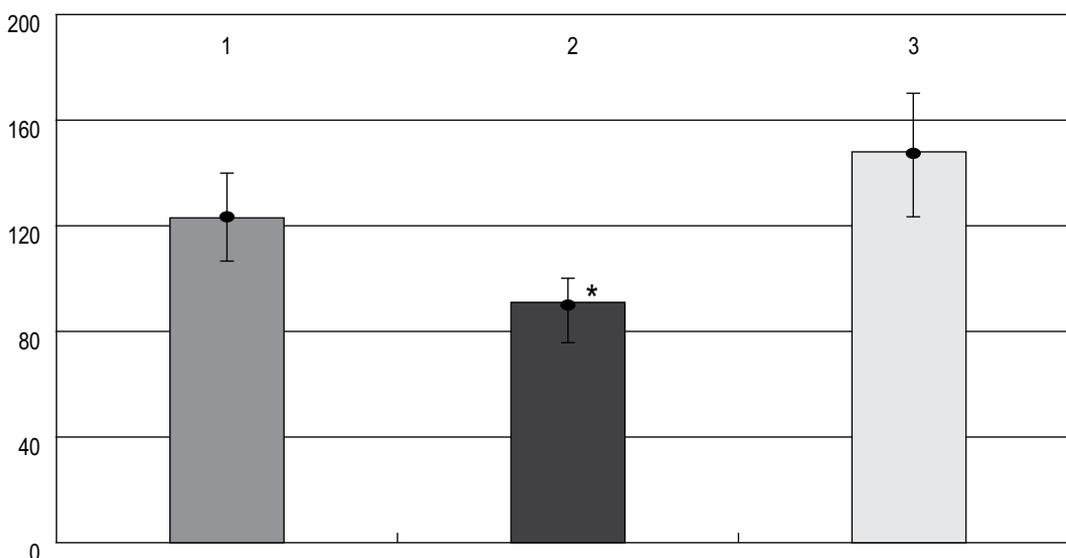


Рисунок 2. Выработка IL-1β клетками периферической крови человека в условиях индукции белками γ-глобулиновой фракции и их металлокомплексами с медью ($M \pm m$, $n = 8$)

Примечание. По оси ординат: концентрация IL-1β, пг/мл. 1 – контрольный по меди γ-глобулин, 2 – модифицированный медью γ-глобулин, 3 – медь. Концентрации: 1 и 2 – 0,5 мкг/мл; 3 – 1,0 нг/мл. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями меди (3).

меди и цинка, примененных изолированно, содержится от $9,0 \pm 3,4$ до $148,0 \pm 14,9$ пг/мл IL-1β. ФГА индуцировал выработку $102,0 \pm 9,6$ пг/мл IL-1β.

Белок, трансформированный связыванием цинка, индуцирует в 2,0 раза ($p = 0,1$) меньше IL-1β, чем контрольный γ-глобулин, но в 3,8 раза ($p < 0,05$) больше цитокина, чем катионы цинка, примененные изолированно (рис. 1). В использованной дозе 2,5 нг/мл, приготовленной на осно-

вании расчета количества катионов, связавшихся с белком на препаративном этапе исследования, металл оказывается в 7,7 раза ($p < 0,002$) менее активным в индукции IL-1β в сравнении с контрольным белком (рис. 1). В присутствии катионов цинка выработка IL-1β клетками крови не отличается от спонтанной ($p > 0,1$).

Белок, модифицированный связыванием меди, в индукции IL-1β оказывается в 1,4 раза

слабее контрольного γ -глобулина и в 1,6 раза ($p < 0,05$) менее активным, чем катионы меди, примененные изолированно (рис. 2). Одновременно, металлокомплекс γ -глобулина с медью индуцирует в 2,7 раза ($p < 0,01$) больше IL-1 β , чем белок, связавший катионы цинка (рис. 1 и 2). Соответствующие расчеты, учитывающие различия в активности контрольных по меди и цинку белков, показывают, что хелатировавший медь γ -глобулин индуцирует на 30 пг/мл (или в 1,5 раза) больше цитокина в сравнении с белком, модифицированным цинком.

Катионы меди, примененные изолированно в контрольной дозе 1,0 нг/мл, индуцируют выработку в 1,45 раза ($p < 0,1$) больших количеств IL-1 β , чем ФГА, и в 16,4 раза ($p < 0,001$) больших количеств цитокина, чем цинк (рис. 1 и 2). Прямое сравнение правомерно, поскольку в качестве контрольных по меди и цинку использовали одни и те же суспензии клеток.

Обсуждение

Функциональные взаимосвязи иммуоактивных цитокинов многочисленны и разнообразны. В физиологических условиях они формируют и поддерживают первичный регуляторный баланс, обеспечивающий необходимый уровень напряженности иммунитета для реализации иммунных функций в режиме форсированной нагрузки, исключая при этом возможность срыва толерантности и индукции аутореактивности. В самом деле, для любого ключевого иммуоактивного цитокина в каскаде индуцируемых им биологически активных соединений определяются один или несколько медиаторов, влияние которых на индукцию ключевого цитокина будет тормозящим. Такие связи очевидно обнаруживаются в развитии морфофункциональной дихотомии, лежащей в основе Th1/Th2 поляризации иммуногенеза.

Известно, например, о выработке моноцитами и макрофагами IL-1 в ответ на действие IFN γ [17]. IL-1, в свою очередь, реализует биологическую активность посредством внутриклеточных сигнальных путей, усиливающих транскрипцию генов IFN α/β [3]. Одновременно, IFN γ индуцирует экспрессию моноцитами/макрофагами генов высокоаффинных Fc γ RI [11], увеличивает число таких FcR на поверхности клеток [13, 22, 23] и усиливает трансдукцию Fc γ RI сигналов, переводя экспрессирующие FcR клетки в состояние активации [23]. IL-1 β ослабляет экспрессию моноцитами и макрофагами FcR (в том числе Fc γ RIII), индуцированную IFN γ [9, 16].

Катионы меди выступают индукторами выработки IL-1 β , IL-2, IL-6, фактора некроза опухоли α (TNF α), простагландина-E2, IFN α и IFN γ

[6, 8, 14, 15]. Катионы цинка тоже индуцируют клетки к продукции IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , IFN α и IFN γ [6, 8, 10, 12, 20, 21]. При этом в определенных условиях цинк может ограничивать продукцию IL-1 β , IL-6, TNF α и IL-8, поддерживая физиологический регуляторный баланс, ослабляя провоспалительную компоненту реагирования и предотвращая избыточную активацию цитокиновой сети [10, 12].

Связывание катионов меди и цинка белками γ -глобулиновой фракции плазмы крови и сопутствующие конформационные преобразования Fc регионов молекул антител приводят к изменению эффекторных функций хелатировавших металл белков в отношении клеток, экспрессирующих FcR [4, 5]. Медь усиливает, а цинк ослабляет индукцию γ -глобулином выработки ранних IFN α и IFN γ [6, 8]. Эффект регистрируется уже спустя 24 ч инкубации клеток [6, 8], пролонгируется до 48 ч с нарастанием различий между металлокомплексами цинка и меди [8] и сопровождается синтезом мРНК IL-1 β [7].

По-видимому, в течение указанного времени в использованной экспериментальной системе реализуется способность IFN γ индуцировать экспрессию на моноцитах и макрофагах высокоаффинных Fc γ RI [11, 13, 22, 23]. Методика исследования допускает присутствие в реакционной смеси металлокомплексов γ -глобулина в продолжение всего срока наблюдения (72 ч), и этого срока оказывается достаточно для активации клеток моноцитарно-макрофагального ряда и синтеза IL-1 β до уровня, сопоставимого с ФГА (см. выше).

Полученные данные обнаруживают высокую активность примененных изолированно катионов меди, которые индуцируют выработку клетками крови больших количеств IL-1 β , чем ФГА (рис. 2). Выработка цитокина в присутствии катионов цинка при этом не отличается от спонтанной (рис. 1). Ранее установлено существенное снижение активности моноцитов при высоком (до 100 мкМ) содержании цинка в плазме [12]. Использованная нами контрольная концентрация катионов составляла 37,5 нМ. По-видимому, для индукции выработки IL-1 β требуются меньшие дозы цинка, что соответствует физиологическим условиям: содержание свободного (биологически активного) цинка в плазме поддерживается на уровне 0,2-1,0 нМ, создавая возможность перманентной индукции провоспалительного компонента иммунного реагирования [20, 21].

Столь же естественной, как перманентная базальная индукция, с позиций общей теории воспаления видится способность катионов меди и цинка в результате их хелатирования белками

плазмы снижать активность γ -глобулинов в индукции выработки IL-1 β (рис. 1 и 2). Известно, что любое тканевое повреждение или воспаление вызывает дегрануляцию тромбоцитов, приводящую к значительному повышению локальных концентраций катионов цинка. При этом вполне вероятным событием может являться повышение доступности для метаболических процессов катионов меди, во многих реакциях выступающих функциональными антагонистами цинка. Но медь (как показано нами) – индуктор выработки IL-1 β (рис. 2). В иммунной системе, следовательно, в условиях воспаления перманентная индукция IL-1 β цинком могла бы переходить в форсированную, превышающую эффекты ФГА и неконтролируемую индукцию цитокина медью.

Этого, однако, не происходит, поскольку, как свидетельствуют результаты проведенного исследования, и цинк, и (что важно) медь, связываясь циркулирующими антителами, снижают активность трансформируемых ими антител в индукции выработки IL-1 β (рис. 1 и 2). Оба металла, таким образом, в связанном белками γ -глобулиновой фракции состоянии проявляют противовоспалительные свойства и выступают агонистами рационального ограничения воспаления (рис. 1 и 2).

Если же допустить, что часть металла оказывается не связанной белками γ -глобулиновой фракции и более доступной, чем в хелатированном ими состоянии, для включения в метаболические процессы и индукции выработки провоспалительных цитокинов напрямую, такая индукция тоже будет носить ограниченный характер. IL-1 и IL-6, активность которых повышается при воспалении, а также IFN γ индуцируют продукцию клетками печени металлотионеинов (MT), способных связывать катионы меди и цинка [18, 19, 21]. MT предпочтительнее связывают цинк, нежели медь [21]; металлы конкурируют между собой за белковые сайты связывания [19]; благодаря активации специфических мембранных транспортеров и синтезу MT, клетками печени при воспалении могут депонироваться значительные количества цинка [18]; уровень содержания металла в его биологически доступном пуле снижается [18].

И хотя, вследствие сказанного, в организме может возникать дефицит доступного (лабильного) цинка, ослабляющий иммуногенез в направлении Th1 и, в свою очередь, требующий компенсации, индукция воспаления как такового может ослабляться, активность клеток – возвращаться к базальному уровню, поступление меди в метаболические пути – реализоваться в режимах, близких к физиологическим.

Результаты проведенного исследования позволяют, таким образом, полагать, что, наряду с описанными ранее механизмами ограничения избыточной продукции IL-1 и ослабления аутореактивной компоненты индуцированного иммуногенеза [1, 2, 3], обменные процессы, связанные с транспортом в микроокружении клетки катионов металлов, могут формировать важную составляющую физиологической иммунорегуляции, способную обеспечивать индукцию и одновременно – торможение выработки IL-1, адекватные состоянию иммунной системы.

Список литературы

1. Рыбакина Е.Г., Корнева Е.А. Трансдукция сигнала интерлейкина-1 в процессах взаимодействия нервной и иммунной систем организма // Вестник РАМН. – 2005. – №7. – С. 3-8.
2. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета // Иммунология. – 2005. – Т. 26, № 6. – С. 368-377.
3. Хайтов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете // Там же. – 2009. – Т. 30, № 1. – С. 66-76.
4. Чекнев С.Б., Ефремова И.Е., Денисова Е.А., Юшковец Е.Н. Иммуноферментный анализ модифицированного катионами металлов γ -глобулина на низких концентрациях образцов // Росс. иммунол. журнал. – 2008. – Т. 2 (11), № 1. – С. 55-62.
5. Чекнев С.Б., Бабаянц А.А., Денисова Е.А. Индукция выработки интерферона конформационно измененными белками γ -глобулиновой фракции плазмы крови // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 2008. – Т. 146, № 11. – С. 526-530.
6. Чекнев С.Б., Бабаянц А.А., Ефремова И.Е., Юшковец Е.Н. Обнаружение ИФН- α , вырабатываемого в присутствии белков γ -глобулиновой фракции плазмы крови // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 2009. – Т. 147, № 5. – С. 544-548.
7. Чекнев С.Б., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Наровлянский А.Н. Экспрессия генов цитокинов в условиях индукции человеческим сывороточным γ -глобулином и его металлокомплексами с цинком // Мед. иммунология. – 2010. – Т. 12, № 3. – С.171-176.
8. Юшковец Е.Н., Ефремова И.Е., Бабаянц А.А., Чекнев С.Б. Динамика выработки интерферона- γ в условиях индукции белками γ -глобулиновой фракции плазмы крови, трансформированными катионами металлов // Росс. иммунол. журнал. – 2010. – Т.4 (13), № 1. – С. 41-47.
9. Arend W.P., Ammons J.T., Kotzin B.L. Lipopolysaccharide and interleukin 1 inhibit

- interferon- γ -induced Fc receptor expression on human monocytes // *J. Immunol.* – 1987. – Vol. 139, N 6. – P. 1873-1879.
10. Bao B., Prasad A.S., Beck F.W.J., Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines // *Amer. J. Physiol. – Endocrinol. Metabolism.* – 2003. – Vol. 285, N 5. – P. 1095-1102.
11. Bovolenta C., Gasperini S., McDonald P.P., Cassatella M.A. High affinity receptor for IgG (Fc γ RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN γ response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10 // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 911-919.
12. Driessen C., Hirv K., Kirchner H., Rink L. Zinc regulates cytokine induction by superantigens and lipopolysaccharide // *Immunology.* – 1995. – Vol. 84, N 2. – P. 272-277.
13. Guyre P.M., Morganelli P.M., Miller R. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes // *J. Clin. Invest.* – 1983. – Vol. 72, N 1. – P. 393-397.
14. Hopkins R.G., Failla M.L. Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression is impaired by copper deficiency in Jurkat human T lymphocytes // *J. Nutrition.* – 1999. – Vol. 129. – P. 596-601.
15. Huang Z.L., Failla M.L. Copper deficiency suppresses effector activities of differentiated U937 cells // *Ibid.* – 2000. – Vol. 130. – P. 1536-1542.
16. Liao G., Simon S.R. Temporal down-regulation of Fc γ RIII expression and Fc γ receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages induced by TNF- α and IL-1 β // *J. Leukocyte Biol.* – 1994. – Vol. 55. – P. 702-710.
17. Lucey D.R., Clerici M., Shearer G.M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases // *Clin. Microbiol. Reviews.* – 1996. – Vol. 9, N 4. – P. 532-562.
18. Maes M., Mihaylova I., De Ruyter M. Lower serum zinc in Chronic Fatigue Syndrome (CFS): Relationships to immune dysfunctions and relevance for the oxidative stress status in CFS // *J. Affective Disorders.* – 2006. – Vol. 90. – P. 141-147.
19. Mocchegiani E., Muzzioli M., Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools // *TiPS.* – 2000. – Vol. 21. – P. 205-208.
20. Rink L., Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production // *J. Nutrition.* – 2000. – Vol. 130, suppl.5S. – P. 1407-1411.
21. Vasto S., Mocchegiani E., Candore G., Listi F., Colonna-Romano G., Lio D., Malavolta M., Giacconi R., Cipriano C., Caruso C. Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related diseases // *Biogerontology.* – 2006. – Vol. 7. – P. 315-327.
22. Wallace P.K., Howell A.L., Fanger M.W. Role of Fc γ receptors in cancer and infectious disease // *J. Leukocyte Biol.* – 1994. – Vol. 55. – P. 816-826.
23. Wilson K.C., Finbloom D.S. Interferon rapidly induces in human monocytes a DNA-binding factor that recognizes the response region within the promoter of the gene for the high-affinity Fc γ receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 11964-11968.
24. Winchurch R.A. Activation of thymocyte responses to interleukin-1 by zinc // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1988. – Vol. 47. – P. 174-180.

поступила в редакцию 20.07.2010
принята к печати 17.09.2010