

# КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ConA-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Коненков В.И., Авдошина В.В., Ракова И.Г.,  
Смольникова М.В. \*\*, Гельфгат Е.Л.\*

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, Россия;

\*ГУ НИИ клинической иммунологии, Новосибирск, Россия;

\*\* Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

**Резюме.** Целью данной работы явилась комплексная одномоментная оценка уровня стимулированной продукции цитокинов в супернатантах культивируемых моноклеарных клеток здоровых лиц европеоидного происхождения. Проведено сравнение уровня цитокинов по различным группам. Продукция IFN- $\gamma$  Th1 клетками преобладает над продукцией IL-2 этими же клетками. Анализ цитокинов Th2 группы обнаружил преобладание IL-10 над уровнем продукции других цитокинов. Также у здоровых людей выявлено преобладание интенсивности продукции IL-13 над IL-4 цитокинов, являющихся ко-стимуляторами пролиферации преактивированных В-клеток.

Сопоставление концентраций ростовых факторов показало, что интенсивность продукции G-CSF значительно выше, чем продукция GM-CSF, что отражает преобладание дифференцировочных сигналов гранулоцитопоэза над моноцитопоэзом в костном мозге здорового человека.

Среди провоспалительных цитокинов значительно преобладает продукция TNF- $\alpha$ . Низкий уровень ConA стимулированной продукции IL-7, синтезируемого стромальными элементами костного мозга и активирующего додифференцировку предшественников Т- и В-лимфоцитов, может быть связан с низкой активностью митогена для нелимфоидных клеток.

*Ключевые слова:* цитокины, продукция, конканавалин А, доноры.

*Konenkov V.I., Avdoshina V.V., Rakova I.G., Smolnikova M.V., Gelfgat E.L.*

## MULTIPLEX EVALUATION OF ConA-INDUCED PRODUCTION OF TWELVE CYTOKINES IN THE CULTURES OF MONONUCLEAR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY SUBJECTS

**Abstract.** The goal of this work was a multiplex single-step evaluation of the levels of stimulated cytokine production in the supernates of cultivated mononuclear cells from healthy Caucasian individuals. We compared the levels of cytokines for various groups. In Th1 cells, the production of INF- $\gamma$  is typically greater than production of IL-2. Analysis of Th2-derived cytokines demonstrated predominance of IL-10 production over other cytokines. Furthermore, we observed in healthy donors a significantly stronger production of IL-13 as compared to IL-4. These cytokines function as co-stimulators of proliferation for pre-activated B-cells.

When performing pairwise comparisons of the growth factor concentrations, we have shown higher levels of G-CSF production than that of GM-CSF, thus reflecting predominance of differentiation stimuli for granulocytopoiesis over monocytopoiesis in bone marrow of healthy humans.

Among pro-inflammatory cytokines tested, the significantly higher TNF- $\alpha$  production is prevalent. Low

### Адрес для переписки:

Авдошина Валерия Владимировна,  
Ядринцевская, 14, Новосибирск, 630099  
Тел.: 8 (3832) 28-50-84, факс 8 (3832) 30-21-63.  
E-mail: valeriya\_avdoshina@ngs.ru

levels of ConA stimulated IL-7 production from the bone marrow stromal cells, which activates complete differentiation of T- and B-lymphocyte progenitors, might be due to low mitogen activity for the non-lymphoid cells. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 517-522)

## Введение

Цитокины играют важную роль в регуляции иммунных, воспалительных реакций, процессов дифференцировки и пролиферации различных типов клеток. По своей биологической принадлежности они являются группой полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. К цитокинам относятся интерфероны, колониестимулирующие факторы, интерлейкины, хемокины, трансформирующие ростовые факторы, группа фактора некроза опухолей и некоторые другие. К общим функциональным свойствам цитокинов, объединяющим их в самостоятельную систему регуляции, относятся: плейотропизм и взаимозаменяемость биологического действия, преимущественно индуцибельный характер синтеза, отсутствие антигенной специфичности действия, саморегуляция продукции и способность к формированию цитокиновой сети.

На настоящий момент известно более 100 индивидуальных веществ, относящихся к семейству цитокинов [2]. Это представляет значительные трудности в комплексной интерпретации их биологических функций как единого целого и, вероятно, потребует в перспективе использование математических методов системного анализа.

Действие цитокинов, как участников сложной сети, регулирующих многие функции организма, усложняет анализ отдельно взятых цитокинов [5, 6, 10]. Существуют значительные индивидуальные различия в продукции цитокинов [3, 4]. Различия между максимальным и минимальным уровнями многих цитокинов часто достигают десятикратных и больше величин, и эти различия не постоянны в разные промежутки времени [9].

Кроме того, значительный размах доверительных интервалов нормативных значений в группах здоровых лиц, затрудняет выработку диагностических критериев иммунопатологических состояний. Использование моноспецифических тест-систем позволяет проводить в данном образце и в данный момент времени определение только одного цитокина с использованием своей калибровочной кривой. Появление новой проточной технологии на основе твердофазного анализа связывания цитокинов с флуоресцирующими антителами на поверхности меченных цветом микросфер, разработанной на базе двухлазерной платформы Luminex позволяет с меньшими затратами обнаруживать и производить количественную оценку в режиме реального времени в 50 мкл образца до 100 цитокинов. К настояще-

му времени разработаны и нашли применение наборы для определения 17 цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ . Одним из существенных преимуществ данной технологии является комплексное определение унифицированных калибровочных стандартов для каждого цитокина в отдельности, что позволяет достоверно оценивать уровень продукции большого числа цитокинов в одном образце одновременно.

Учитывая технологические предпосылки, в цели настоящего исследования входило определение концентрации цитокинов в супернатантах культуры клеток, при использовании митогена конканавалина А, стимуляция которым позволяет создать условную модель реакции клетки на антигенное воздействие.

## Материалы и методы

В исследование были включены здоровые (по клиническим и параклиническим данным) индивидуумы европеоидного происхождения, длительно проживающие в Новосибирской области. Возраст колебался от 18 до 58 лет, из них 22 женщины и 26 мужчин. Для исследования использовалась цельная кровь. Периферическую кровь забирали в пробирки, содержавшие 25 ЕД гепарина на 1 мл крови, из локтевой вены в условиях асептического бокса.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли на градиенте урографина – фиккола ( $\rho=1,077$ ). Полученную клеточную взвесь трижды отмывали средой RPMI-1640 (Sigma, США). Выделенные и отмытые клетки культивировали 48 часов с митогеном ConA (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл. В качестве питательной среды для МНК использовали RPMI-1640 с добавлением инактивированной 5% эмбриональной сыворотки (Sigma, США). Собирали супернатанты после 48-часовой инкубации. Их центрифугировали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Перед исследованием супернатанты размораживали и фильтровали через одноразовые нитроцеллюлозные фильтры с порами 0,4 мкм в диаметре.

Концентрацию цитокинов в супернатантах клеточных культур оценивали методом проточной иммунофлюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США). Для исследования концентрации цитокинов в 50 мкл образца использовали коммерческую тест-систему 17-plex фирмы Bio-Rad (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12,

IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) в соответствии с инструкцией фирмы производителя. Диапазон валидных декларируемых фирмой измерений находился в пределах от 2 до 32000 пкг/мл.

Для характеристики продукции цитокинов использовались методы описательной и структурной статистики. Для оценки типа распределения использовались показатели эксцесса, асимметрии и критерий  $\chi^2$  [1]. Для выделения различных диапазонов варьирования продукции цитокинов, связанных с оптимальной продукцией и ее повышением и снижением использовали методы квантильного анализа по Мостеллеру и Тьюки. Диапазон оптимума ограничивался значениями квантилей р25 и р75. В качестве параметров сниженной и повышенной продукции цитокинов принимались перцентильные диапазоны выше р80 и р95, а сниженной – р20 и р5. Расчет показателей осуществлялся с использованием пакета статистических программ SPSS 12.0.

## Результаты

Детальный анализ калибровочных кривых тест системы 17-plex показал, что валидируемые значения концентрации цитокинов находятся в пределах 1 пкг/мл – 4000 пкг/мл. В ряде случаев уровень цитокинов в супернатантах оказывался выше верхней допустимой границы. На основании этого эти цитокины (IL-6, IL-8, IL-17, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) из дальнейшего рассмотрения исключены, так как не могут характеризовать достоверные диапазоны колебаний исследуемых цитокинов. Однако для характеристики уровня продукции цитокинов методом квантильного анализа им была условно присвоена концентрация >4000 пкг/мл.

Результаты распределения показателей стимулированной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных клеток представлены в таблице 1.

Определение нормативных показателей часто определяется общепринятыми статистическими методами обработки данных, что не всегда правомерно, поскольку они ориентированы на нормальный характер распределения признаков в выборке. Учитывая это, на первом этапе анализа было проведено исследование типа распределения полученных данных.

Как видно из таблицы 1, индивидуальные значения показателей концентрации цитокинов зачастую варьируют в очень широком диапазоне. Коэффициент вариации многих цитокинов превышает 100%. В ряде случаев у таких цитокинов минимальные и максимальные значения различаются в десятки и сотни раз. Существование такой широкой вариабельности величин продукции значительно затрудняет расчет нормативных значений этих показателей. Более того, при анализе типа распределения ряда цитокинов было обнаружено, что оно характеризуется критическими значениями асимметрии и эксцесса что свидетельствует о скошенности и об островершинном типе распределения признаков. Это подтверждается и значениями критерия  $\chi^2$ , указывающими на наличие достоверного отклонения от нормального характера распределения. Для того чтобы определить тип продукции, необходимо выделить соответствующих диапазонов и разделить генеральной выборки на группы с низкой, умеренно низкой, оптимальной, умеренно высокой и высокой продукцией.

В качестве альтернативного метода оценки среднего уровня продукции и выделения оптимальных значений, а также диапазонов высокой и низкой

Табл. 1. ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ (пкг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ СТИМУЛИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

№ п.п	Цитокин	минимум	максимум	Средняя величина $\pm$ ошибка средней
1	IL-1 $\beta$	0,3	734,0	427 $\pm$ 35
2	IL-2	1,2	222,7	19 $\pm$ 6
3	IL-4	1,2	148,0	23 $\pm$ 3
4	IL-5	0,02	759,6	99 $\pm$ 26
5	IL-7	0,01	2,4	0,27 $\pm$ 0,06
6	IL-10	0,3	1096,7	514 $\pm$ 57
7	IL-12	0,5	2691,7	155 $\pm$ 73
8	IL-13	0,0	2297,9	463 $\pm$ 85
9	G-CSF	13,4	16939,3	4283 $\pm$ 579
10	GM-CSF	19,2	1231,3	240 $\pm$ 33
11	IFN $\gamma$	2,1	5203,0	1862 $\pm$ 254
12	TNF $\alpha$	8,1	3709,3	983 $\pm$ 134

продукции, нами были применены рекомендуемые методы квантильного анализа, основанного на расчете центелей по Мостеллеру и Тьюки. Мы применили квантильный способ анализа вариационного ряда как более устойчивый к наличию экстремально повышенных и пониженных значений признака. В нашем исследовании при нахождении диапазонов нормальных и других (повышенных и пониженных) значений применялись подходы, принятые в медико-биологических исследованиях. За диапазон оптимума нормативных значений принимался диапазон, который находится в пределах от 25 до 75 квантили, т.е. в этот диапазон включалось 50% значений измерения показателя у здоровых лиц, распределенных по 25% слева и справа от средней величины продукции. Значения показателей в интервале от p10 до p25 и от p75 до p90 относились к умеренно сниженным и умеренно повышенным величинам показателям, а от p1 до p5 к низким и от p95 до p99 к высоким.

Таким образом, были выделены подгруппы с низким и умеренно низким уровнем продукции каждого цитокина, а также подгруппы с умеренно высоким и высоким уровнем продукции.

Для сравнительной характеристики уровня продукции цитокинов нами был проведен анализ в диапазоне оптимума. Результаты квантильно-ранговой классификации представлены в таблице 2. Как видно из данных проведенного анализа для каждого из цитокинов нами выделен так называемый ди-

апазон оптимума, который характерен для большей части обследуемых индивидов. В этот диапазон попадает от 50 до 58% всех проанализированных нами случаев. Соответственно, выделяются диапазоны, маркирующие понижение или повышение уровня продукции того или иного цитокина. В каждый из них попадает около 25% от всех исследованных случаев.

Так, при сопоставлении уровня продукции цитокинов продуцирующимися Th1 (IL-2 и IFN-γ) клетками установлено достоверное (p<0,01) превышение концентрации интерферона-γ над содержанием интерлейкина-2 в стимулированных супернатантах культивируемых мононуклеаров здоровых лиц. Вероятно, это можно объяснить более широкими потребностями в гамма-интерфероне, который имеет противовирусную и иммуномодулирующую активность и обеспечивает регуляцию клеточной пролиферации.

При анализе группы Th2 цитокинов обращает на себя внимание значительное преобладание продукции интерлейкина-10 над уровнем продукции других цитокинов, продуцирующихся этими клетками. Возможно, это связано с тем, что он является ингибитором пролиферации Т-лимфоцитов, вызываемой аллергеном или митогеном в культуре мононуклеарных клеток, ингибирует синтез цитокинов моноцитами, вызывает дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, подавляет синтез воспалительных цитокинов [7]. В этой группе цитокинов

Табл.2. КВАНТИЛЬНЫЕ ДИАПАЗОНЫ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ (пкг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ЧАСТОТА ИХ ВСТРЕЧАЕМОСТИ В %.

Цитокин	Уровни снижения		Диапазон оптимума	Уровни повышения	
	Низкий	Умеренно низкий сниженный		Умеренно высокий	Высокий
IFN-γ	< 23 8,3%	23,1-180,9 16,7%	181-3531 50%	3531,03-4930,2 20,8%	>4930,3 4,2%
IL-2	< 2,9 8,3%	3-5,2 14,6%	5,3-12,3 58,3%	12,4-139,5 14,6%	> 140 4,2%
IL-5	< 0,03 4,2%	0,04-1,8 16,7%	1,9-94,5 54,1%	95-610,4 20,8%	> 610,5 4,2%
IL-13	< 0,1 4,2%	0,11-30,2 14,6%	30,3-618 56,3%	619-1903 20,8%	> 1904 4,1%
IL-1β	< 12 4,2%	13-130 14,6%	131-639 56,3%	640-720 20,8%	> 721 4,1%
TNF-α	< 20 4,2%	20,1-158 12,5%	159-1579 58,3%	1580-3661 18,8%	3662 6,2%
IL-12	< 0,5 16,7%	0,6-7 12,5%	8-41 50%	42-1303 16,7%	> 1304 4,1%
IL-4	< 3 4,2%	4-8,2 14,6%	8,3-30,2 56,3%	30,3-46 20,8%	> 47 4,1%
IL-7	< 0,01 4,2%	0,02-0,04 16,7%	0,05-0,23 54,2%	0,24-1,35 20,8%	> 1,36 4,1%
IL-10	< 12 4,2%	13-53 14,6%	54-926 56,3%	927-1081 21,9%	> 1082 2%
G-CSF	< 161 4,2%	162-747 14,6%	748-6278 58,3%	6279-13052 18,7%	> 13053 4,2%
GM-CSF	< 26 4,2%	27-73 14,6%	74-322 56,3%	323-777 20,8%	> 778 4,1%

заметно преобладание уровня стимулированной продукции IL-13 над уровнем продукции IL-4, что может быть связано как с их однонаправленными эффектами в стимуляции гуморального иммунитета, так и с различиями в интенсивности подавления активности провоспалительных цитокинов макрофагами в поддержании нормального баланса регуляции воспалительных процессов у здорового человека.

Сопоставляя концентрации, продуцируемых клетками периферической крови ростовых факторов заметно, что интенсивность продукции гранулоцит-колониестимулирующего фактора значительно выше, чем продукция гранулоцит-моноцит-колониестимулирующего фактора, что, вероятно, отражает преобладание дифференцировочных сигналов гранулоцитопоэза над моноцитопоэзом в костном мозге здорового человека.

Среди провоспалительных цитокинов значительно преобладает продукция TNF- $\alpha$ . Вероятнее всего, это связано с тем, что IL-1 $\beta$  и IL-12 являются стимуляторами продукции TNF- $\alpha$  при клеточной активации. Другим вероятным объяснением выявленного феномена может явиться тесное соседство гена TNF- $\alpha$  с генами HLA комплекса на 6 хромосоме человека, совместная активация этих сцепленных генов сопровождается инициацию процессов распознавания и процессинга антигенного материала клетками иммунной системы при воспалении и формировании начальных этапов иммунного ответа.

Низкий уровень CopA стимулированной продукции IL-7, синтезируемого стромальными элементами костного мозга и активирующего додифференцировку предшественников Т- и В-лимфоцитов, может быть связан с низкой активностью митогена для нелимфоидных клеток.

## Обсуждение

Для всех 12 исследованных нами цитокинов характерен широкий разброс в уровне продукции факторов, и представляет несомненный интерес попытка разобраться в причинах этого явления, а также проследить судьбу здоровых лиц, попавших в группы с необычайно низким или высоким уровнем продукции различных интерлейкинов. Можно предположить, что именно они составят группы лиц с высоким уровнем предрасположенности к развитию тех или иных отклонений в функционировании иммунной системы, к преимущественному развитию иммунопатологических состояний различного генеза.

Высокая гетерогенность по уровню стимулированной продукции цитокинов группы здоровых лиц, относящихся к одной этнической группе европеоидов, вероятно, связана как с генетическими, так и с физиологическими факторами. Хотя в данном ис-

следовании не прослеживается взаимосвязи между уровнем продукции цитокинов и полом и возрастом, перспективным представляется фенотипирование генов иммунного ответа этих лиц, к которым можно отнести не только традиционно исследуемые гены HLA-комплекса, но и гены самих интерлейкинов, их рецепторов и антагонистов.

Можно заключить, что проведенный анализ выявил необходимость комплексного анализа баланса в уровнях продукции интерлейкинов, участвующих в формировании цитокиновой сети. Данные о высоком уровне гетерогенности в уровне спонтанной продукции цитокинов у здоровых лиц, должны быть учтены при разработке нормативных значений их исследования и в установлении диагностической и прогностической значимости изменения уровня концентраций цитокинов в клинической практике.

Использованная в настоящем исследовании модель стимуляции продукции цитокинов митогенами может считаться лишь относительно пригодной для оценки потенциала клеток наращивать продукцию цитокинов при развитии иммунного ответа. К ее достоинствам можно отнести сопоставление возможности клеток продуцировать различные цитокины при стандартном активирующем воздействии, а также возможность оценить величину индивидуального разброса в уровне ответа клеток на стандартное воздействие среди здоровых лиц. Кроме того, эта модель позволяет оценить сравнительную степень резерва продукции различных цитокинов без учета специфичности антигенного стимула в каждом конкретном случае. Для определения подобных резервных возможностей клеток при оценке развития иммунного ответа в ходе вакцинации или развития инфекционного процесса предпочтение, несомненно, должно быть отдано использованию специфичных для конкретного иммунного ответа антигенов.

## Список литературы

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М. Высшая школа. - 1973. - 343 с.
2. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. - 2002. - Т.1, №1. - С.9-16.
3. Хаитов Р.М., Чувиров Г.Н. Иммунопатологические аспекты ВИЧ-инфекции и СПИД // Иммунология. - 1994. - №5. - с. 6-12.
4. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. - 1997. - №5. - с. 7-14.
5. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lessonlie P., Nourhashemi F., Enault G., Abbal M., Constantin A., Laroche M., Mazieres B. IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-4, and IL-10 gene polymorphisms. // Arthri-

tis and Rheumatism. - 1999. - Vol.42, №6 . - P.1093-1100.

6. Cork M.J., Crane A.M., Duff G.W. Cytokine gene polymorphisms in Alopecia Areata. //Dermatologic clinics. - 1996. - Vol. 14, N4.

7. Crowe P.D., VanArsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. A lymphotoxin beta specific receptor // Science. - 1994. - Vol. 264, N5159. - P. 707-710.

8. Hutchinson I.V., Pravica V., Hajeer A., Sinnott P.J. Identification of high and low responders to allografts // Rev Immunogenetics. -1999. - Vol.1. - P.323-333.

9. Koss K., Satsangi J., Fanning G.C., Welsh K.I., Jewell D.P. Cytokine (TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$  and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies// Genes and immunity. - 2000. - Vol.1. - P.185-190.

*поступила в редакцию 16.02.2006*

*отправлена на доработку 21.03.2006*

*принята к печати 08.04.2006*