

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ДЕФЕНЗИНОВ *IN VITRO*

Чальй Ю.В., Котлинский К.В., Шолух А.М., Войтенко Н.Н.*

РНПЦ гематологии и трансфузиологии МЗ РБ, Минск, Беларусь;

* Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, Москва, Россия

Резюме. Изучены закономерности индукции синтеза интерлейкина-8 (IL-8) под действием α -дефензинов в культуре различных клеток человека: линии бронхоэпителиальной карциномы A-549, моноцитов и макрофагов, дифференцированных из моноцитов в присутствии M-CSF, эндотелиальных клеток пупочного канатика (HUVEC), эмбриональных клеток почки человека линии HEK293, миеломоноцитарной линии THP-1. Дефензины в концентрации 10^{-5} - 10^{-4} М оказывали цитотоксическое действие на клетки линии A-549 в бессывороточной культуре и индуцировали синтез IL-8. Добавление сыворотки полностью подавляло цитотоксический эффект и индукцию синтеза IL-8. Сходные данные получены для клеток линии HEK293 и эндотелиальных клеток.

В отличие от клеток A-549, HEK293 и эндотелия, добавление сыворотки в культуры моноцитов и макрофагов не подавляло синтеза IL-8 под действием дефензинов в концентрации 10^{-5} - 10^{-4} М, несмотря на полное подавление цитотоксичности. Данные указывают на то, что индукция синтеза IL-8 в культуре моноцитов и макрофагов под действием дефензинов может быть обусловлена существованием специфических клеточных рецепторов для дефензинов и, возможно, может наблюдаться и *in vivo*.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, IL-8, человеческие α -дефензины.

Chaly Y.V., Kotlinsky K.V., Sholukh A.M., Voitenok N.N.

THE STUDY OF REGULARITIES OF INDUCTION OF IL-8 SYNTHESIS BY NEUTROPHIL DEFENSINS *IN VITRO*

Abstract. We explored the effects of defensins on IL-8 synthesis in various human cells, including bronchoepithelial cell line A-549, monocytes, monocyte-derived macrophages differentiated in the presence of M-CSF, HUVEC cells, HEK293 and THP-1 cell lines. HNP at 10^{-5} - 10^{-4} М induced IL-8 production and cytotoxicity in serumless A-549 culture. The addition of serum abrogated the cytotoxicity along with the induction of IL-8 synthesis. Similar effects were observed in HEK293 cell line and HUVEC.

The induction of cytotoxicity along with IL-8 production by HNP at 10^{-5} - 10^{-4} М was also observed in the serum-less cultures of human monocytes and macrophages. However, monocytes and macrophages retained HNP-induced production of IL-8 after the addition of serum, while cytotoxic effect of HNP was completely inhibited. The data imply a specific interaction of alpha-defensins with some membrane receptors of monocytes and macrophages that leads to the induction of IL-8 and might also occur *in vivo*. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 579-582)

Дефензины играют центральную роль в антибактериальной защите многоклеточных и имеют схожую структуру у насекомых, растений и различных классов позвоночных [1-3]. Около 5% общего белка

нейтрофильных лейкоцитов человека составляют α -дефензины (human neutrophil peptides, HNP) - катионные тридисульфидные пептиды с молекулярной массой 3 - 4 кДа [1-3]. Они микробицидны для различных бактерий, грибов и оболочечных вирусов. Дефензины HNP 1-3 выделяются путем дегрануляции нейтрофилов в процессе их локальной и системной активации и в высокой концентрации обнаруживаются в плазме крови при сепсисе и септическом шоке [4].

Адрес для переписки:

Котлинский Константин Вячеславович,
Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Шугаева, д. 19/2, кв.14.
Тел.: (017) 289-86-19.
E-mail: kostia_kotlinski@yahoo.com

Отправным моментом наших исследований было предположение о том, что дефензины могут принимать участие в регуляции воспаления и влиять на течение болезней [5]. Нами было показано, что нейтрофильные α -дефензины способны стимулировать экспрессию фактора некроза опухолей (TNF) и интерлейкина-1 β (IL-1 β) в моноцитах человека, но подавлять экспрессию IL-10 [6].

В работах лаборатории J. Oppenheim было показано, что дефензины могут вызывать хемотаксис Т-клеток и дендритных клеток через рецептор CCR6 [7] и стимулировать синтез мРНК RANTES, MIP α , MIP1 β и некоторых других хемокинов и их рецепторов, взаимодействуя с TLR4 [8]. Большое внимание привлекли данные Van Wetering с коллегами [9] о том, что HNP стимулируют синтез интерлейкина-8 (IL-8) в клетках линии A-549 из бронхоальвеолярного эпителия человека. Было высказано предположение, что индукция синтеза IL-8 в клетках бронхоальвеолярного эпителия под действием нейтрофильных дефензинов может быть важным физиологическим механизмом антибактериальной защиты и регуляции воспаления в бронхах и легких [10].

В настоящей работе изучены закономерности индукции синтеза IL-8 под действием нейтрофильных α -дефензинов HNP *in vitro* в культурах моноцитов, макрофагов, клеток линии A-549 из бронхоальвеолярного эпителия человека, клеток линии HEK (human embryonic kidney cells), эндотелиоцитов и клеток миеломоноцитарной линии THP-1.

Материалы и методы

Альфа-дефензины HNP выделяли из нейтрофилов крови человека кислотной экстракцией катионных пептидов из гранул с последующей хроматографической очисткой [11]. Содержание эндотоксина в препарате HNP было менее 0,3 нг/мг.

Моноциты получали путем адгезии на пластике из фракции мононуклеарных лейкоцитов донорской крови, выделенных на фиколл/верографине, и культивировали в платах 20 часов в среде RPMI-1640 с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) или без сыворотки. Макрофаги получали путем культивирования моноцитов с рекомбинантным M-CSF в течение 7 дней. Клетки линии A-549 из бронхоальвеолярного эпителия человека и клетки HEK культивировали в среде DMEM/10% ЭТС, эндотелиальные клетки HUVEC (Clonetics) культивировали в среде EBM (Clonetics). Клетки HEK, трансфицированные кДНК TLR4 были предоставлены Н. Heine, Borstel, Германия. Оценка жизнеспособности клеток проводилась с использованием трипанового синего или Alamar Blue.

Уровень продукции IL-8 в культурах определяли с помощью иммуоферментного анализа (ИФА) как описано ранее [12, 13].

Результаты и обсуждение

Изучение закономерностей индукции синтеза IL-8 под действием нейтрофильных дефензинов в культурах различных клеток мы начали с воспроизведения данных Van Wetering и соавторов [9, 10], ко-

Табл. ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ДЕФЕНЗИНОВ HNP НА СИНТЕЗ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ МОНОЦИТОВ КРОВИ И В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЛИНИИ A-549 ИЗ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Индукторы	A-549				Моноциты			
	RPMI 1640 без ЭТС		RPMI 1640 + 5% ЭТС		RPMI 1640 без ЭТС		RPMI 1640 + 5% ЭТС	
	IL-8, нг/мл	Жизнеспособность, %	IL-8, нг/мл	Жизнеспособность, %	IL-8, нг/мл	Жизнеспособность, %	IL-8, нг/мл	Жизнеспособность, %
Среда	0,47±0,17	100	2,03±0,09	100	0,2±0,07	100	1,71±0,26	100
HNP 10 ⁻⁷ M	0,51±0,12	95±1,6	1,97±0,13	108±5,4	0,11±0,04	100±3,5	1,02±0,15	103±3,8
HNP 10 ⁻⁶ M	0,37±0,05	93±2,9	2,06±0,11	92±2,5	0,04±0,01	98±6,5	1,01±0,08	104±2,6
HNP 10 ⁻⁵ M	1,69±0,23	84±2	2,12±0,06	83±3,5	11,18±0,38	93±4,7	1,75±0,06	106±2,9
HNP 3x10 ⁻⁵ M	7,47±1,11	39±3,4	2,77±0,14	101±5,6	4,4±0,29	60±11,7	3,59±0,21	103±3,6
HNP 10 ⁻⁴ M	10,13±0,41	24±3,1	2,65±0,14	90±1	1,18±0,15	4±5,6	7,36±0,31	97±3,6
TNF α 5нг/мл	5,06±0,29	94±1,7	14,97±0,01	89±2,2	0,49±0,05	93±1,2	4,83±0,14	100±1,7
IL-1 β 5нг/мл	12,14±0,23	97±1,4	15,28±0,3	102±2,2	1,83±0,39	100±3,7	10,42±1,74	106±2,9
ЛПС 10нг/мл	0,24±0,07	98±2,4	2,6±0,13	107±2,8	2,64±0,42	102±2,3	16,58±0,22	104±2,6

торые показали, что HNP стимулируют синтез IL-8 в клетках линии A-549 из бронхоальвеолярного эпителия. Van Wetering и соавторы описали индукцию синтеза IL-8 в бессывороточной культуре клеток A-549. В наших опытах HNP в концентрации 10^{-5} – 10^{-4} М также индуцировал высокий уровень синтеза IL-8 в бессывороточной культуре клеток A-549 (таблица), количественно сопоставимый с действием IL-1 и TNF.

Далее нами было установлено, что, как и в случае клеток A-549, в бессывороточных культурах клеточных линий НЕК, ТНР-1 и эндотелия, а также моноцитов и макрофагов дефензины в концентрации 10^{-5} – 3×10^{-5} М индуцировали высокий уровень синтеза IL-8. Как видно в таблице, стимуляция синтеза IL-8 в бессывороточной культуре A-549 и моноцитов сопровождалась полной (10^{-4} М) или частичной (10^{-5} – 3×10^{-5} М) цитотоксичностью HNP. Наибольший синтез IL-8 наблюдался при частичной цитотоксичности HNP (табл.), но снижался при высокой цитотоксичности HNP и не наблюдался при ее отсутствии. Аналогичная закономерность отчетливо проявлялась и в бессывороточных культурах всех исследованных клеток. Мы полагаем, что это явление связано с известным феноменом стимуляции синтеза IL-8 в культуре «прикрепляющихся» клеток под действием различных факторов, вызывающих отслаивание клеток и субтоксический эффект [14].

При изучении индукции синтеза IL-8 под действием HNP в культурах, содержащих сыворотку, были выявлены резкие различия между разными клетками. Таблица показывает, что в присутствии сыворотки полностью отменялась цитотоксичность HNP. При этом клетки A-549 не реагировали на HNP в присутствии сыворотки, тогда как моноциты отвечали на HNP достаточно высоким синтезом IL-8.

Нами показано, что присутствие 10% сыворотки в культуре полностью отменяло цитотоксичность и индукцию синтеза IL-8 в культуре НЕК, в том числе трансфицированных TLR4. В культурах моноцитов (табл.), макрофагов и ТНР-1, содержащих сыворотку, цитотоксичность HNP полностью отменялась, но индукция синтеза IL-8 сохранялась. Индукция синтеза IL-8 в этих клетках не была связана с загрязнением препаратов HNP эндотоксином, так как не отменялась в присутствии полимиксина В и не наблюдалась в клетках НЕК-TLR4, хорошо реагирующих на ЛПС.

Результаты работы позволяют заключить, что индукция синтеза IL-8 в культурах клеток A-549 и НЕК была связана с цитотоксичностью HNP в бессывороточной среде и отменялась в присутствии сыворотки, т.е., по-видимому, является чисто «культуральным» феноменом и не имеет отношения к физиологическим событиям *in vivo*. Напротив, моноциты и макрофаги реагируют на HNP индукцией синтеза IL-8 и в присутствии сыворотки, что может

иметь важное физиологическое значение в регуляции воспаления и предполагает наличие специфических рецепторов для HNP. Результаты работы также доказывают, что индукция синтеза IL-8 под действием HNP в моноцитах и макрофагах не опосредована через рецепторы TLR4.

Список литературы

1. Lehrer I.R., Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence // Curr. Opin. Immunol. - 1999. - v.11. - p.23-27.
2. Lehrer R.I., Ganz T. Antimicrobial peptides of vertebrates // Cur. Opin. Immunol. - 1998. - V. 10. - P. 41-44.
3. Lehrer R.I., Lichtenstein A.K., Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // Annu. Rev. Immunol. - 1993. - V. 11. - P. 105-128.
4. Lehrer R.I., Ganz T. Defensins of vertebrate animals // Curr. Opin. Immunol. - 2002. - V.14. - P.96-102.
5. Мисуно Н.И., Колесникова Т.С., Лереп Р., Ганц Т., Войтенко Н.Н.. Влияние дефензина HNP-1 на продукцию фактора некроза опухолей альфа моноцитами крови человека *in vitro* // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. - 1992 - Т. 113(5). - С. 524-527.
6. Chaly Y.V., Paleolog E.M., Kolesnikova T.S. Human neutrophil α -defensin modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells // Eur. Cytokine Netw. - 2000. - V. 11. - P. 257-266
7. Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 // Science. - 1999. - V. 286. - P. 525-528.
8. Biragyn A., Ruffini P. A., Leifer C. A., Klyushnikova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A. K., Farber J. M., Segal D. M., Oppenheim J. J., Kwak, L. W. Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by β -Defensin 2 // Science. - 2002. - V. 298. - P. 1025–1029.
9. Van Wetering S., Mannesse-Lazeroms S. P. G., Van Sterkenburg M. A. J. A. Effect of defensins on IL-8 synthesis in airway epithelial cells // Am. J. Physiol. - 1997. - V. 272. - P. L888-L896.
10. Aarbiou, J., Ertmann M., van Wetering S., Van Noort P., Rook D., Rabe K. F., Litvinov S. V., Van Krieken J. H., de Boer W. I., Hiemstra P. S. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation *in vitro* // J. Leukoc. Biol. 2002. - V. 72. - P. 167-174.
11. Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils // J. Clin. Invest. - 1985. - V. 76. - P. 1427-1435.
12. Ko Y., Mukaida N., Panyutich A., Voitenok N. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human interleukin-8 // J. Immunol. Meth. - 1992. - V. 149. - P. 227-235.

13. Nashkevich N.N., Akalovich S., Louneva N., Heavner G.A., Voitenok N.N. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) // J. Immunol. Meth. - 2002. - V. 270(1). - P. 37-51.

14. Shibata Y., Nakamura H., Kato S., Tomoike H. Cellular detachment and deformation induce IL-8 gene expression in human epithelial cells // J. Immunol. - 1996. - V. 156. - P. 772-777.

поступила в редакцию 25.02.2005

принята к печати 17.04.2005