

нового лиганда для CXCR2, коррелировал с неблагоприятным прогнозом и летальностью в группе критически больных пациентов с системным воспалительным ответом. Наличие тесной положительной корреляции между pCXCR2 и HNP, являющихся маркером активации нейтрофилов, свидетельствует о лейкоцитарном происхождении pCXCR2 в локальном участке воспаления, поскольку именно на ПМН экспрессируется наибольшее количество рецепторов CXCR2, которые при активации нейтрофилов ФНО, липополисахаридом или фагоцитарными стимулами протеолитически отщепляются с поверхности клеток и переходят в растворимую форму. Мы предполагаем, что в сайте воспаления могли бы формироваться комплексы анионного pCXCR2 с катионными HNP, модулируя эффекты друг друга.

Заключение

Таким образом, pCXCR2, образующийся в месте воспаления может участвовать в защит-

ных иммунных реакциях *in vivo*. В нашем исследовании у двух умерших пациентов, повторно оперированных из-за развившихся хирургических осложнений и исключенных из исследования, высокое содержание HNP в перитонеальной жидкости (95,01 и 34,06 мкг/мл) сопровождалось низкой концентрацией pCXCR2 (0,29 и 0,12 нг/мл), соответственно. Это может свидетельствовать о большом количестве функционально неактивных нейтрофилов, обусловленном массовой гибелью клеток под действием бактериальных продуктов и медиаторов воспаления, которая сопровождалась нарушением отщепления CXCR2 с поверхности ПМН.

Мы предполагаем, что определение pCXCR2 в перитонеальной жидкости наряду с ИЛ-6 и HNP, может служить дополнительным диагностическим инструментом раннего распознавания интраабдоминальных осложнений перитонита.

УДК 612.112.95

СТИМУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В КУЛЬТУРЕ МОНОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 CXCR2

К. В. Котлинский¹, Ю. В. Котлинская¹, Н. Н. Войтенко²

¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск
²Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, г. Москва

Интерлейкин-8 (ИЛ-8) является основным хемотактическим фактором для полиморфноядерных нейтрофилов (ПМН) при воспалении. Ранее нами было показано, что стимуляция ПМН *in vitro* вызывает резкое снижение экспрессии рецептора ИЛ-8 второго типа CXCR2 на мембране ПМН и появление растворимого гликопептида CXCR2 (pCXCR2) в супернатанте. В данной работе мы изучили влияние pCXCR2 на синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека А549. Было показано, что pCXCR2 достоверно стимулировал синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов с выраженным дозозависимым эффектом. В культуре бронхоэпителиальных клеток человека А549 pCXCR2 не вызывал синтеза ИЛ-8. Действие pCXCR2 на моноциты не было связано с загрязнением препарата липополисахаридом и было обусловлено наличием как белковой, так и углеводными частями в составе молекулы pCXCR2.

Ключевые слова: растворимый рецептор интерлейкина-8 CXCR2, моноциты крови человека, бронхоэпителиальные клетки человека А549, интерлейкин-8

STIMULATION OF INTERLEUKIN-8 SYNTHESIS IN MONOCYTE CULTURE UNDER SOLUBLE INTERLEUKIN-8 CXCR2 RECEPTOR

K. V. Kotlinskiy¹, Yu. V. Kotlinskaya¹, N. N. Voitenok²

¹Republican Research Centre for Hematology and Transfusiology, Minsk
²Fund for Molecular Hematology and Immunology, Moscow

Interleukin-8 (IL-8) is the main chemotactical factor for polymorphonuclear neutrophils (PMN) in inflammation. We have already shown that PMN stimulation *in vitro* causes a sharp decrease of IL-8 receptor expression of second type CXCR2 on the PMN membrane and an emergence of soluble glycopeptid CXCR2 (pCXCR2) in the supernatant. In this work we have studied the effect of pCXCR2 on IL-8 synthesis in the monocyte culture of the blood and bronchoepithelial human cells A549. It was shown that pCXCR2 reliably stimulated IL-8 synthesis in the monocyte culture with the evident dose-dependent effect. pCXCR2 did not cause IL-8 synthesis in the culture of the bronchoepithelial human cells A549. The influence of pCXCR2 on the monocytes was not related to the lipopolysaccharide contamination of the preparation and was caused by the protein and carbohydrate parts, included in pCXCR2 molecule.

Key words: soluble receptor of interleukin-8 CXCR2, human blood monocytes, bronchoepithelial human cells A549, interleukin-8.

Введение

Интерлейкин-8 (ИЛ-8/CXCL8), белок с молекулярной массой 8,3 кДа, является основным хемотактическим фактором, вызывающим миграцию ПМН крови в ткани при воспалении [7]. Нейтрализация ИЛ-8 антителами *in vivo* приводит к подавлению миграции ПМН в очаг воспаления [9]. Свое действие ИЛ-8 оказывает через два мембранных рецептора, CXCR1 и CXCR2, которые активируют каскад внутриклеточных реакций, приводящих к хемотаксису и активации ПМН [7].

В наших предыдущих исследованиях было впервые показано, что снижение уровня экспрессии CXCR2 на поверхности нейтрофилов *in vitro* при фагоцитозе микроорганизмов, под действием фактора некроза опухолей α (ФНО) или липополисахарида (ЛПС) происходит путем протеолитического отщепления N-концевого внеклеточного фрагмента CXCR2 и сопровождается появлением растворимого CXCR2 (pCXCR2) [1, 3, 4]. По данным гель-проникающей хроматографии pCXCR2 имеет молекулярную массу 35–40 кДа [4]. Анализ растворимого рецептора с помощью электрофореза в денатурирующих условиях показал, что молекулярная масса растворимого рецептора составляет 14–17 кДа [4]. Показано, что pCXCR2 N-гликозилирован, имеет самую низкую изоэлектрическую точку среди всех известных цитокинов и растворимых цитокиновых рецепторов (pI 3,2), может накапливаться в местах воспаления *in vivo* и всегда выявляется в моче здоровых лиц и больных с различной патологией [4, 1]. Физико-химические свойства растворимого CXCR2, экскретируемого с мочой, идентичны свойствам pCXCR2 из супернатанта активированных нейтрофилов [1].

Известно, что биологически активные молекулы, обладающие сходными с pCXCR2 физико-химическими свойствами — низким значением изоэлектрической точки, а также имеющие в своем составе углеводные остатки (полирибонуклеиновые кислоты, ЛПС клеточной стенки грам-отрицательных бактерий и др.), способны стимулировать моноциты крови человека [6, 10]. При воспалительных процессах моноциты крови и тканевые макрофаги играют центральную роль в развитии защитной воспалительной реакции, продуцируя различные цитокины, в т. ч. ИЛ-8, ФНО, ИЛ-1 и др. [12]. Взаимодействие между макрофагами и гранулоцитами является важнейшим компонентом воспалительного ответа [5, 2]. Ряд цитокинов, синтезируемых моноцитами и макрофагами, такие как ИЛ-8, ИЛ-1, ФНО и другие могут активировать гранулоциты, однако практически ничего не известно о гранулоцитарных факторах, модулирующих активность моноцитов/макрофагов человека. Ранее нами было показано, что небольшие ка-

тионные белки α -дефензины способны запускать синтез ИЛ-8 в моноцитах человека [8]. В данной работе мы изучили влияние pCXCR2 на синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека A549.

Материалы и методы исследования

Кровь здоровых доноров стабилизировали гепарином и наслаивали на одноступенчатый градиент Histopaque («Sigma»). После центрифугирования при 400 g в течение 30 мин слой клеток, находящийся в интерфазе отбирали и дважды отмывали средой RPMI-1640, содержащей 1 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Фракция моноцитов была получена путем адгезии суспензии клеток на пластике в течение 1 часа при 37 °C.

Адгезивные моноциты и клетки линии A549 культивировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640, содержащей 5 % ЭТС в атмосфере 5 %-ного CO₂ при температуре 37 °C в присутствии факторов в течение 20 ч. Жизнеспособность клеток на всех этапах эксперимента составляла более 95 % по отношению к соответствующим контрольным образцам (по данным колориметрического теста с использованием витального красителя AlamarBlue). ИЛ-1 β (ООО «Цитокин») в концентрации 5 нг/мл использовали в качестве положительного контроля. ЛПС *Escherichia coli* («Sigma») добавляли в концентрации 200 пг/мл. Полимиксин Б («Sigma») использовали в концентрации 50 Ед/мл. pCXCR2 и N-гликозидазу F («NEB») смешивали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) из расчета 10 Ед фермента на 1 мкг pCXCR2 и преинкубировали в течение 2-х ч. при 37 °C перед добавлением к моноцитам, или преинкубировали по отдельности в ФСБ и смешивали в момент добавления к моноцитам. pCXCR2 и протеиназу К («Merk») смешивали в ФСБ из расчета 0,5 мкг фермента на 1 мкг pCXCR2 и преинкубировали в течение 2 часов при 37 °C перед добавлением к моноцитам, или преинкубировали по отдельности в ФСБ и смешивали в момент добавления к моноцитам. Содержание ИЛ-8 в культуральных супернатантах определяли ранее разработанным в нашей лаборатории твердофазным иммуноферментным методом [11].

Выделение pCXCR2 из мочи здоровых доноров (м-pCXCR2) проводили методом иммуноаффинной сорбции с последующей очисткой методом гель-проникающей хроматографии на колонке Zorbax GF-250 хроматографа высокого давления («Agilent») [1, 3, 4]. Чистота препарата pCXCR2 после иммуносорбции с последующей очисткой по показаниям оптической плотности составляла более 96 %. Содержание эндотоксина в очищенном препарате pCXCR2, определенное с помощью хромогенной тест-системы «Hycult Biotech», не превышало 5 пг на 1 мкг pCXCR2.

Результаты исследования и их обсуждение

Чтобы определить, стимулирует ли рСХСR2 синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека А549, мы инкубировали клетки в присутствии рСХСR2. Анализ культуральных супернатантов показал, что рСХСR2 в концентрации 0,2 мкг/мл и 1 мкг/мл повышал продукцию ИЛ-8 в 2,1 и 6 раз, соот-

ветственно, в культуре моноцитов (рисунок 1А). В культуре бронхоэпителиальных клеток человека А549 рСХСR2 не вызывал синтез ИЛ-8 (рисунок 1Б), что может свидетельствовать о специфическом действии рСХСR2 на моноциты и обеспечиваться специфическими рецепторами на клетках, связывание которых ведут к активации синтеза ИЛ-8 в моноцитах.

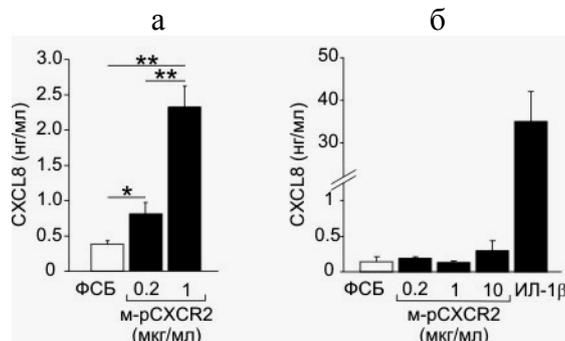


Рисунок 1 — Стимуляция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови (а) и клеток линии А549 (б) под действием рСХСR2:

а — результаты пяти независимых экспериментов с моноцитами 5 различных доноров (среднее ± SEM); * $P > 0,05$, ** — $P > 0,01$, достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием критерия t-Стьюдента.
б — результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение ± SD)

При очистке белков из биологических жидкостей человека необходимо контролировать их загрязнение ЛПС грамм-отрицательных бактерий, который способен стимулировать лейкоциты крови. Для того, чтобы проверить, могут ли следовые количества ЛПС вызывать сходную индукцию ИЛ-8 в моноцитах, мы инкубировали моноциты с рСХСR2 (1 мкг/мл) в присутствии антибиотика полимиксина Б, который нейтрализует действие ЛПС. Из рисунка 2 видно, что активность рСХСR2 наблюдается и в присутствии полимиксина Б, который в том же эксперименте нейтрализовал ЛПС в концентрации, 20-кратной по отношению к его примеси в использованном препарате рСХСR2.

рСХСR2 представляет собой кислый гликопротеин, причем углеводная часть составляет более 2/3 молекулярной массы молекулы [4]. Чтобы установить какой компонент молекулы

рСХСR2 обеспечивает активность рСХСR2 в культуре моноцитов, мы использовали протеолитический фермент протеиназу К и дегликозилирующий фермент N-гликозидазу F.

При обработке препарата рСХСR2 протеиназой К и последующей нейтрализации фермента добавлением сыворотки индукция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов полностью подавлялась. При контрольном добавлении сыворотки до инкубации препарата рСХСR2 с протеиназой К активность рСХСR2 (1 мкг/мл) не подавлялась (рисунок 3а). При исследовании действия N-гликозидазы F на активность рСХСR2 (рисунок 3б) было показано снижение активности рСХСR2, что свидетельствует о важности как белкового, так и углеводного компонента для проявления биологической активности рСХСR2 в культуре моноцитов крови человека.

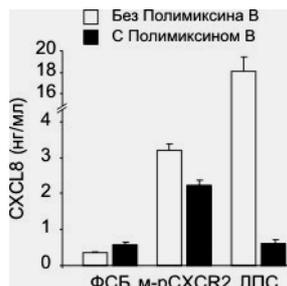


Рисунок 2 — Влияние липополисахарида на стимуляцию синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека. Представлены результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение ± SD)

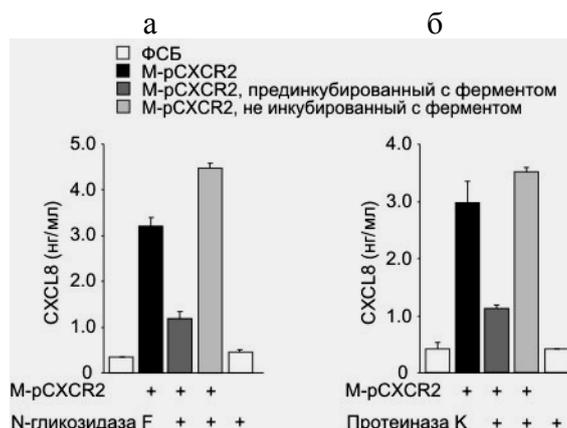


Рисунок 3 — Стимуляция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека под действием рCXCR2 в присутствии либо отсутствии протеиназы К (а) и гликозидазы F (б). Представлены результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение ± SD)

Таким образом, нами впервые показана способность рCXCR2 стимулировать синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и установлено, что как белковая, так и углеводная части рCXCR2 необходимы для проявления этой активности. Это может указывать на наличие биологической активности у рCXCR2 *in vivo* в очаге воспаления и на его роль в реакциях естественного иммунитета, направленную на привлечение нейтрофилов в очаг инфекции и поддержания их активированного состояния.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Выявление и иммунохимическая характеристика растворимой формы рецептора CXCR2 интерлейкина-8 человека / С. Т. Акалович [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2008. — № 6. — С. 87–92.
2. Васильева, Г. И. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами доноров / Г. И. Васильева, И. А. Иванова, С. Ю. Тюкавкина // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 11–17.
3. Роль металлопротеиназ в регуляции экспрессии рецептора интерлейкина-8 CXCR2 на нейтрофилах человека / Ю. В. Котлинская [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2011. — № 3. — С. 83–87.
4. Биохимическая характеристика растворимой формы рецептора CXCR2 интерлейкина-8 человека / К. В. Котлинский [и др.] // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. — 2009. — № 2. — С. 85–89.
5. Потаннев, М. П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении / М. П. Потаннев // Иммунология. — 1995. — № 4. — С. 34–40.
6. Akira, S. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR / S. Akira, H. Hemmi // Immunol.Lett. — 2003. — Vol. 85. — P. 85–95.
7. Baggolini, M. Chemokines in pathology and medicine / M. Baggolini // J. Intern. Med. — 2001. — Vol. 250. — P. 91–104.
8. Human neutrophil α -defensin modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells / Y. V. Chaly [et al.] // Eur. Cytokine Netw. — 2000. — Vol. 11. — P. 257–266.
9. Systemic neutralization of interleukin-8 markedly reduces neutrophilic pleocytosis during experimental lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits / R. A. Dumont [et al.] // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68. — P. 5756–5763.
10. Characterization of conserved viral leader RNA sequences that stimulate innate immunity through TLRs / A. Forsbach [et al.] // Oligonucleotides. — 2007. — Vol. 17. — P. 405–417.
11. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) / N. N. Nashkevich [et al.] // J. Immunol. Methods. — 2002. — Vol. 270. — P. 37–51.
12. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1) / T. Yoshimura [et al.] // J. Immunol. — 1987. — Vol. 139. — P. 788–793.

УДК 611.013.395+615.324

ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля

9-я городская клиническая больница, г. Минск

Перспективным и уже применяемым в клинической практике в Республике Беларусь направлением клеточной терапии является тандемная трансплантация гемопоэтических и мезенхиальных стволовых клеток (ГСК и МСК) при онкогематологических заболеваниях и рассеянном склерозе. МСК также эффективно используются в качестве сопутствующей иммуносупрессивной терапии при возникновении острой и хронической РТПХ. Протоколы применения МСК для терапии онкогематологических больных и больных рассеянным склерозом утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Эффективность клеточной терапии с использованием МСК изучается в клинических исследованиях при лечении различных заболеваний: генетически обусловленных дегенеративных заболеваний скелета, ишемической болезни, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера). Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда и заместительной терапии при печеночной недостаточности.

Ключевые слова: стволовые клетки, трансплантация мезенхиальных стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», рассеянный склероз, кардиомиопластика, заболевания печени.