

## Образование активных форм кислорода и агрегация нейтрофилов крови человека при действии рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$

Г. Н. Семенкова, Е. И. Коваленко, П. П. Мурзенко<sup>1</sup>, С. Н. Черенкевич

Белорусский Государственный Университет  
Просп. Ф. Скорины, 4, Минск, 200050, Беларусь

<sup>1</sup> НИИ физиологии АН Беларуси  
Минск, Беларусь

*Изучено влияние рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  (рИЛ-1 $\beta$ ) на агрегацию нейтрофилов периферической крови человека. Показано, что рИЛ-1 $\beta$  значительно увеличивает скорость спонтанной агрегации нейтрофилов. Наблюдаемый эффект зависит от концентрации рИЛ-1 $\beta$ . Установлено, что рИЛ-1 $\beta$ -индуцированная агрегация нейтрофилов сопряжена с процессом генерации супероксидных анион-радикалов системами, локализованными на поверхности плазматических мембран.*

**Введение.** Интерлейкин-1 (ИЛ-1) является одним из гуморальных факторов, способных оказывать влияние на ход воспалительного процесса [1—3]. ИЛ-1 взаимодействует с рецепторами плазматических мембран нейтрофилов и вызывает в них ряд структурно-функциональных изменений, таких как повышение адгезивности к клеткам эндотелия [2, 4, 5], образование супероксидных анион-радикалов [6—8], стимуляция выхода лизосомных ферментов [9]. Поскольку результатом этих изменений является усиление фагоцитарной активности клеток, представлялось целесообразным исследовать молекулярно-мембранные механизмы ранних событий, имеющие место при действии ИЛ-1 на нейтрофилы и играющие ключевую роль в трансдукции сигнала через мембрану внутрь клетки.

В настоящей работе изучены агрегация нейтрофилов крови человека при действии рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  (рИЛ-1 $\beta$ ) и участие в этом процессе активных форм кислорода (АФК).

**Материалы и методы.** Нейтрофилы выделяли из обогащенной лейкоцитами плазмы крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина [10]. Чистота популяции составляла 96 %. Агрегацию нейтрофилов

исследовали методом светопропускания на малоугловом нефелометре. В качестве источника света применяли гелий-неоновый лазер ( $\lambda = 632,8$  нм) [11]. Измерения осуществляли при комнатной температуре в среде Эрла при pH 7,4. Агрегационный ответ нейтрофилов определяли из уравнения  $[(T - T_0) \cdot 100 \% ] / T_0$ , где  $T_0$  и  $T$  — суммарное светопропускание нейтрофилов в отсутствие и в присутствии рИЛ-1 $\beta$  соответственно. Для идентификации АФК использовали специфические перехватчики: супероксиддисмугтазу (СОД) — ингибитор супероксидных анион-радикалов; 1,4-диаза-2,2,2-бициклооктан (ДАБЦО) — дезактиватор синглетного кислорода; маннит — ловушку для гидроксильных радикалов и каталазу — для разложения перекиси водорода.

В работе использовали рИЛ-1 $\beta$  фирмы «Dai-riprop» (Япония), СОД, маннит, каталазу — «Sigma» (США), ДАБЦО — «Serva» (ФРГ), фиколл — «Pharmacia» (Швеция), остальные реактивы отечественного производства. Концентрация клеток составляла  $5 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup>, рИЛ-1 $\beta$  — 20 ед. акт. в 1 мл, СОД — 25 мкг/мл, ДАБЦО —  $1,0 \cdot 10^{-4}$  моль/л, маннита —  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л, каталазы — 25 мкг/мл.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1, а, представлены зависимости светопропускания суспензии нейтрофилов в отсутствие (кривая 1) и при добавлении (кривая 2) рИЛ-1 $\beta$ .

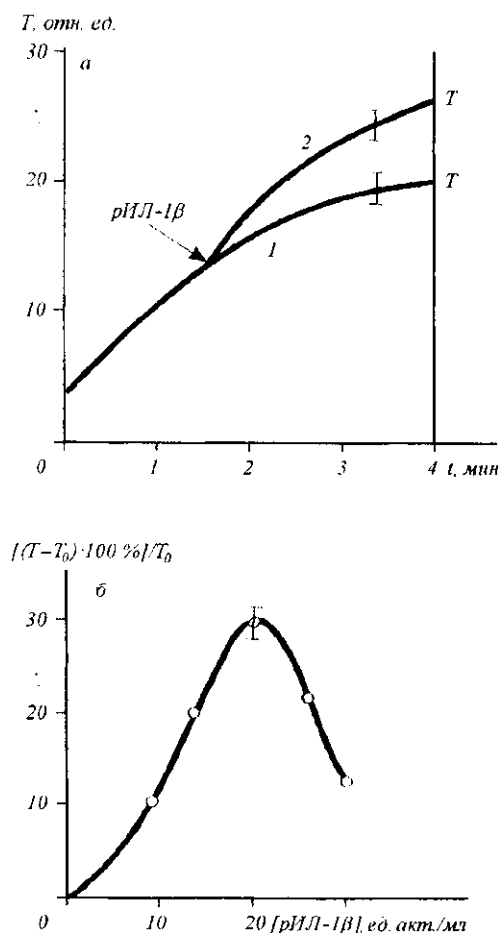


Рис. 1. Влияние рИЛ-1β на светопропускание нейтрофилов: а — кинетические зависимости интенсивности светопропускания нейтрофилов в отсутствие (1) и в присутствии (2) рИЛ-1β (концентрация рИЛ-1β 20 ед. акт./мл; стрелкой указан момент добавления рИЛ-1β); б — зависимость  $[(T - T_0) \cdot 100 \text{ \%}] / T_0$  от концентрации рИЛ-1β, где  $T_0$  — интенсивность светопропускания нейтрофилов в отсутствие рИЛ-1β;  $T$  — то же в присутствии рИЛ-1β

Видно, что в первом варианте имеет место увеличение светопропускания нейтрофилов. Анализ состояния клеток в суспензии с использованием микроскопа «Биолам-П-1» показал, что в данном случае происходит образование агрегатов, состоящих из двух—трех клеток. Следовательно, увеличение светопропускания суспензии нейтрофилов обусловлено спонтанной агрегацией клеток. Добавление рИЛ-1β к суспензии нейтрофилов приводило к резкому повышению светопропускания. Одновременно с помощью микроскопа было зарегистрировано увеличение числа агрегатов в суспензии

и количества клеток (до трех—пяти) в одном агрегате. Поскольку увеличение светопропускания клеточной суспензии и, как следствие, скорости агрегации нейтрофилов начинается сразу после добавления рИЛ-1β, можно предположить, что наблюдаемый эффект является результатом модифицирования поверхности клетки, вызванного рецепцией рИЛ-1β плазматической мембраной, и не связан с последствиями проникновения цитокина внутрь клетки (по данным работ [4, 12] время прохождения ИЛ-1 через мембрану ряда иммунокомпетентных клеток составляет 20 мин).

Обусловленное действием рИЛ-1β увеличение скорости агрегации нейтрофилов является дозозависимым и наиболее выражено для концентрации рИЛ-1β, соответствующей 20 ед. акт./мл (рис. 1, б). При этой концентрации рИЛ-1β наблюдается возрастание интенсивности относительно исходного уровня светопропускания нейтрофилов на 25 %. Ранее нами было показано, что рИЛ-1β в таких же концентрациях способен антивировать в нейтрофилах продукцию АФК [6]. Это позволяет сделать предположение о существовании взаимосвязи индуцированных рИЛ-1β процессов агрегации и активирования кислорода в нейтрофилах. Для проверки этого предположения было изучено влияние высокоспецифических перехватчиков АФК на индуцированную рИЛ-1β агрегацию нейтрофилов. На рис. 2 представлены данные агрегационного ответа нейтрофилов, индуцированного рИЛ-1β, в отсутствие и в присутствии перехватчиков АФК. Из данных этого рисунка видно, что используемые перехватчики АФК уменьшают агрегационный ответ нейтрофилов, вызываемый действием рИЛ-1β. Причем наиболее выраженным ингибирующим действием обладают СОД и каталаза, тогда как маннит и ДАБЦО подавляют агрегационный ответ в меньшей степени. Полученные результаты подтверждают предположение об участии кислородаактивирующих систем нейтрофилов в осуществлении межклеточных контактов. Поскольку СОД, утилизирующая супероксидные анион-радикалы, не проникает через клеточную мембрану, можно заключить, что в процесс агрегации нейтрофилов вовлечены супероксид-генерирующие структуры, локализованные на поверхности плазматических мембран. Значительный вклад супероксидгенерирующих систем в процесс индуцированной рИЛ-1β агрегации нейтрофилов косвенно подтверждается также ингибирующим эффектом каталазы, поскольку одним из основных источников перекиси водорода в клеточной суспензии является реакция ферментативной и неферментативной дисмутации супероксидных анион-радикалов на втором этапе

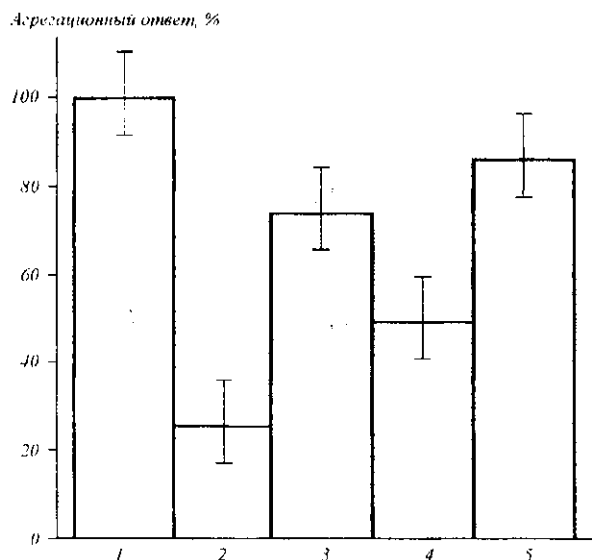


Рис. 2. Агрегационный ответ нейтрофилов, индуцированный рИЛ-1 $\beta$ , в отсутствие (1) и в присутствии перехватчиков АФК: 2 — СОД; 3 — ДАЦО; 4 — каталазы; 5 — магния

одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода [13].

Таким образом, наши исследования показали, что рекомбинантный интерлейкин-1 $\beta$  увеличивает скорость агрегации нейтрофилов крови человека. Наблюдаемый эффект является дозозависимым и, вероятно, связан со структурной модификацией компонентов плазматической мембраны на начальной стадии рецепции рИЛ-1 $\beta$ . Процесс рИЛ-1 $\beta$ -индуцированной агрегации нейтрофилов сопряжен с процессом генерации супероксидных анион-радикалов системами, локализованными на поверхности плазматических мембран.

Г. М. Семенкова, О. І. Коваленко, П. П. Мурзенко,  
С. М. Черенкевич

Утворення активних форм кисню та агрегація нейтрофілів крові людини при дії рекомбінантного інтерлейкіну 1 $\beta$

#### Резюме

Вивчено вплив рекомбінантного інтерлейкіну 1 $\beta$  (рИЛ-1 $\beta$ ) на агрегацію нейтрофілів периферичної крові людини. рИЛ-1 $\beta$  значно пришвидшує спонтанну агрегацію нейтрофілів. Спостережений ефект залежить від концентрації рИЛ-1 $\beta$ . Виявлено, що рИЛ-1 $\beta$ -індукована агрегація нейтрофілів сполучена з процесом генерації супероксидних аніон-радикалів системами, локалізованими на поверхні плазматичних мембран.

G. N. Semenkova, E. I. Kovalenko, P. P. Murzenok,  
S. N. Cherenkevich

The active oxygen forms production and aggregation of human blood neutrophils under the action of recombinant interleukin-1 $\beta$

#### Summary

The influence of recombinant interleukin-1 $\beta$  (rIL-1 $\beta$ ) on human blood neutrophils aggregation has been studied. The sharp increase of the rate of spontaneous cell's aggregation under the rIL-1 $\beta$  influence has been established. The observed effect depends on rIL-1 $\beta$  concentration. It has been found that the process of rIL-1 $\beta$  induced aggregation of neutrophils is coupled with the process of active oxygen forms generation by the enzyme systems localised on the plasma membrane surface.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов В. А., Громыкина Н. Д. Интерлейкин-1: роль в иммунитете // Иммунология.—1987.—№ 4.—С. 24—30.
2. Dinarello C. A. The biological properties of interleukin-1 // Eur. Cytokine Netw.—1994.—5, N 6.—P. 517—531.
3. Espat N. J., Rogy M. A., Copeland E. M., Moldawer L. L. Interleukin-1, interleukin-1 receptor, and interleukin-1 receptor antagonist // Proc. Nutr. Soc.—1994.—53, N 2.—P. 393—400.
4. Brooks J. W., Mizel S. B. Interleukin-1 signal transduction // Eur. Cytokine Netw.—1994.—5, N 6.—P. 547—561.
5. Cortran R. S. New roles for the endothelium on inflammation and immunity // Amer. J. Pathol.—1987.—129, N 3.—С. 407—413.
6. Семенкова Г. Н., Закревская Ю. В., Черенкевич С. Н., Мурзенко П. П., Гурич В. Н. Влияние рекомбинантного интерлейкина-1 на генерацию АФК нейтрофилами крови человека // Докл. АН Беларуси.—1993.—№ 6.—С. 22—26.
7. Figari I. S., Mori N. A., Pallandino M. A. Regulation of neutrophils migration and superoxide production by recombinant tumor necrosis factors- $\alpha$  and  $\beta$ : Comparison to recombinant interferon- $\gamma$  and interleukin-1 $\alpha$  // Blood.—1987.—70, N 4.—P. 979—984.
8. Shieh J. H., Gordon M. S., Peterson R. H., Jakubowski A. A., Gabrilove J. V., Moore M. A. S. Modulation of cytokine receptors and superoxide production in neutrophils treated with IL-1 *in vitro* and *in vivo* // Blood.—1990.—76(suppl.)—P. 165.
9. Smith R. J., Bowman B. J. IL-1 stimulates granule exocytosis from human neutrophils // The Physiologic, Metabolic and Immunologic Actions of Interleukin-1.—1985.—4.—P. 31—43.
10. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов // Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика.—М.: Медицина, 1980.—С. 9—36.
11. Татаринцев Б. А., Цвирко В. А., Черенкевич С. Н., Коляк А. И. Применение метода малоуглового светорассеяния для изучения клеток в процессе их структурных перестроек // Вестн. БГУ им. В. И. Ленина, Сер. 1.—1980.—№ 1.—С. 30—33.
12. Solari R., Smithers N., Kennard N. et al. Receptor mediated endocytosis and intracellular fate of IL-1 // Biochem. Pharmacol.—1994.—47, N 1.—P. 93—101.
13. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами.—М.: Наука, 1982.—144 с.

УДК 577.2:612.071.1

Поступила в редакцию 23.06.98