

Влияние гранулоцит-колониестимулирующего фактора «Granocyte» на генерацию активных форм кислорода нейтрофилами *in vitro*

Е. И. Коваленко, Г. Н. Семенкова, Е. Н. Смирнова¹,
С. Н. Черенкевич, Ю. А. Разумович, В. Герайн²

Кафедра биофизики Белгосуниверситета
220050, Минск, просп. Фр. Скорины, 4

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии
223052, Минский р-н, пос. Лесной, Беларусь

² Детская онкогематологическая клиника, п/я 100564
51605, Гуммерсбах, Германия

*Гранулоцит-колониестимулирующие факторы являются стимуляторами лейкопоэза, в связи с чем их используют при различных патологиях для вывода организма из состояния миелосупрессии. Методом хемилюминесценции с использованием люминола изучено действие гранулоцит-колониестимулирующего фактора «Granocyte» на индуцированную адгезией клеток к поверхности стекла, частицами латекса, фитогемагглютинином и арахидоновой кислотой генерацию активных форм кислорода и миелопероксидазную активность нейтрофилов здоровых доноров *in vitro*. Установлено, что при действии «Granocyte» на нейтрофилы здоровых доноров *in vitro* увеличивается выход активных форм кислорода, генерация которых индуцирована адгезией клеток на стекло, и происходят разнонаправленные изменения в генерации активных форм кислорода нейтрофилами в присутствии стимуляторов клеточного метаболизма. Эффект фактора «Granocyte» на исследуемые клетки *in vitro* не вызывает изменения миелопероксидазной активности нейтрофилов, что свидетельствует о модифицирующем влиянии гранулоцит-колониестимулирующего фактора на кислородоактивирующие системы плазматических мембран, но не внутриклеточных структур.*

Введение. В последние годы при терапии онкологических заболеваний широко используют гемопоэтические факторы роста и дифференцировки, среди которых важное место занимают гранулоцит-колониестимулирующие факторы (G-CSFs). Показано, что G-CSFs способствуют восстановлению миелопоэза после трансплантации костного мозга и позволяют интенсифицировать режимы химиотерапии за счет снижения глубины и длительности состояния нейтропении [1]. Сопоставление *in vitro* биологических возможностей различных коммерческих рекомбинантных форм G-CSFs позволило заключить, что наибольшей эффективностью обладает гликозилированный препарат G-CSF леногра-

стим «Granocyte» по сравнению с негликозилированной формой [2]. Ранее нами было установлено, что использование G-CSF «Granocyte» для вывода организма из состояния нейтропении при лечении неходжкинских лимфом, нейробластом, острого лимфобластного лейкоза (первичного и рецидивного) у детей может приводить не только к активации лейкопоэза, но и к улучшению кислородоактивирующей способности нейтрофилов [3–5]. Это свидетельствует о восстановлении функциональной активности этих клеток.

В настоящей работе для выявления молекулярно-клеточных механизмов влияния G-CSF «Granocyte» на способность нейтрофилов к фагоцитозу изучено его действие на индуцированную стимуляторами клеточного метаболизма генерацию активных форм кислорода (АФК) и миелопероксидазную

(МП) активность нейтрофилов здоровых доноров *in vitro*.

Материалы и методы. Нейтрофилы выделяли из плазмы периферической крови здоровых доноров по стандартной методике [6]. Генерацию АФК изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) на биохемилюминиметре БХЛ-1 (Республика Беларусь) [7, 8]. Для стимуляции метаболизма нейтрофилов осуществляли адгезию клеток на стекло, добавляли 15 мкл/мл стандартного раствора латекса (завод биопрепаратов, Каунас, Литва), 50 мкг/мл фитогемагглютинина (РНА) («Sigma», США) и 25 мкг/мл арахидоновой кислоты (АК) («Sigma»). Концентрация люминола $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Концентрация клеток $1,6 \cdot 10^6$ клеток/мл. В работе использовали G-CSF «Granocyte» («Rhone-Poulenc Rorerr», Франция, Германия) в концентрации 50 мкг/мл.

МП активность нейтрофилов определяли методом хемилюминесценции в среде Эрла (рН 7,4, 20 °С). Перед измерением ферментативной активности клетки разрушали трехкратным замораживанием—размораживанием. Исходная концентрация нейтрофилов составляла $1,6 \cdot 10^6$ клеток/мл. Проба для определения МП активности содержала 2 мл разбавленного в 1000 раз клеточного супернатанта, $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола и $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л H_2O_2 .

Обследованы 22 здоровых донора. Статистическую обработку результатов проводили с использованием коэффициентов Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Нейтрофилы периферической крови человека при адгезии на стекло и действии ряда стимуляторов метаболизма генерируют активные формы кислорода, такие как супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, гидроксильный радикал и перекись водорода [7—9]. Выход АФК в процессе адгезии зависит от времени взаимодействия клеток с поверхностью стекла и положительно коррелирует с функциональной активностью нейтрофилов. На рис. 1 изображены кинетические зависимости интенсивности ЛЗХЛ нейтрофилов здорового донора при адгезии на стекло и добавлении G-CSF. Видно, что внесение G-CSF в кювету одновременно с клетками не приводит к изменению кинетики образования АФК нейтрофилами при адгезии на дно стеклянной кюветы (кривые 1 и 2). При добавлении G-CSF к суспензии нейтрофилов спустя 3—15 мин после начала адгезии наблюдается увеличение скорости образования активных форм кислорода (кривые 3, 4). Выход АФК тем выше, чем позже добавлен фактор. В условиях, препятствующих адгезии клеток к стеклу, внесение G-CSF в кювету не вызывает изменений в кинетике ЛЗХЛ (кривые 5, 6). Из

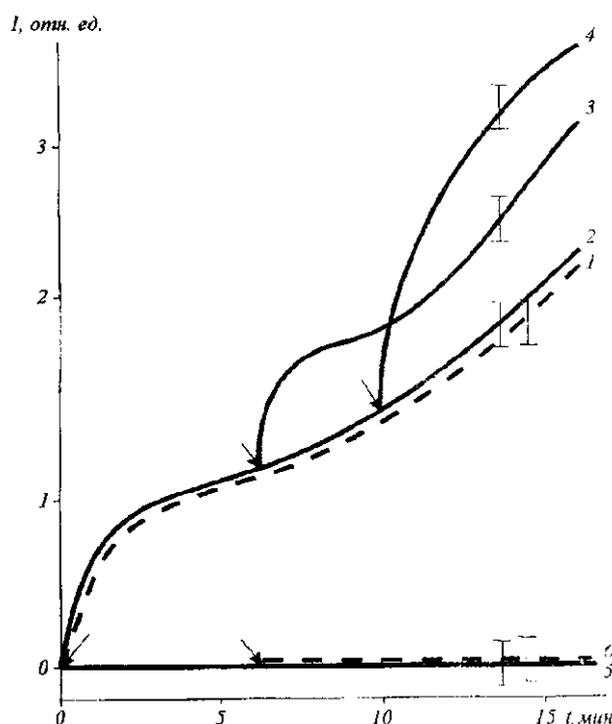


Рис. 1. Кинетические зависимости интенсивности ЛЗХЛ нейтрофилов здорового донора при адгезии на стекло: в отсутствие G-CSF (1), при добавлении G-CSF в различные моменты времени (2—4); в условиях, препятствующих адгезии клеток: в отсутствие G-CSF (5), при добавлении G-CSF (6). Стрелкой указан момент добавления G-CSF

этих данных следует, что адгезия клеток является необходимым условием генерации АФК в нейтрофилах под действием G-CSF «Granocyte», а индуцируемое G-CSF образование АФК зависит либо от числа адгезированных клеток, либо от степени их прикрепления к подложке.

На рис. 2 представлены данные по влиянию G-CSF на ЛЗХЛ нейтрофилов здоровых доноров при действии латекса, РНА и АК. Среди обследованных нами здоровых доноров следует отметить три основные группы. У ряда доноров фактор G-CSF не вызывал существенных изменений ЛЗХЛ нейтрофилов при действии изучаемых стимуляторов функциональной активности. Во второй группе

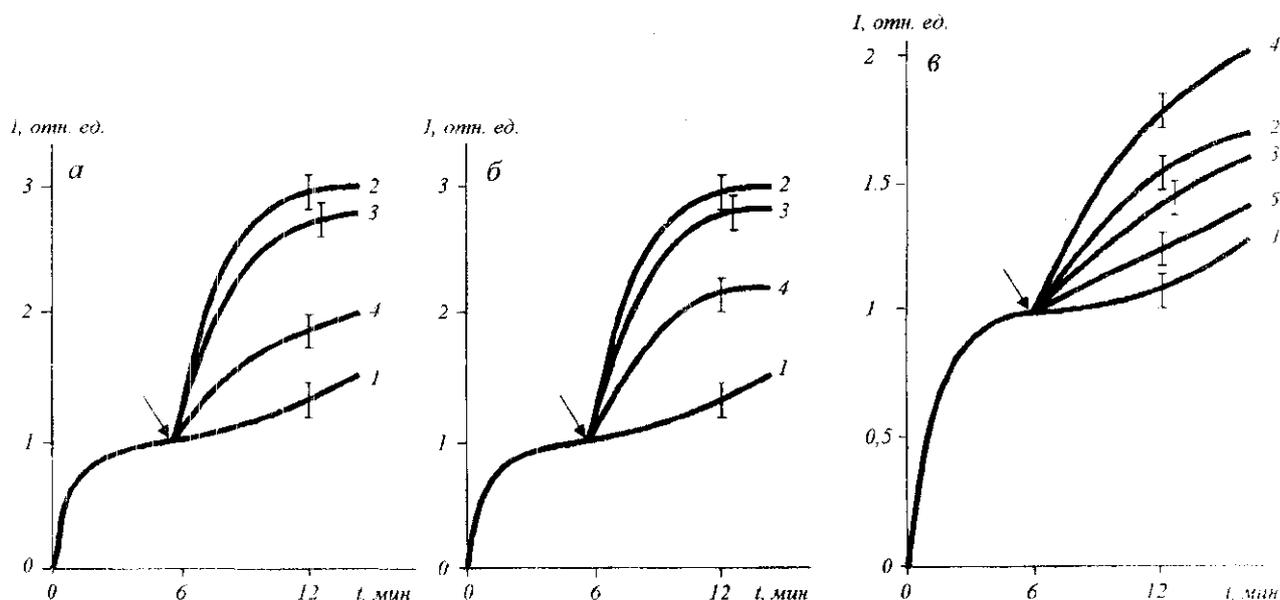


Рис. 2. Влияние G-CSF на ЛЗХЛ нейтрофилов здоровых доноров при действии латекса (а), арахидоновой кислоты (б) и фитогеммагглютинаина (в). Стрелкой указан момент добавления стимуляторов: 1 — при адгезии на стекло; при действии стимуляторов метаболизма: 2 — в отсутствие G-CSF, 3—5 — в присутствии G-CSF для различных групп доноров

доноров инкубирование нейтрофилов с G-CSF приводило к ингибированию кислородактивирующей способности клеток. В третьей группе G-CSF повышал интенсивность ЛЗХЛ при стимулирующих воздействиях. На рис. 2, а, показано влияние G-CSF на ЛЗХЛ нейтрофилов при действии латекса. Наблюдались два возможных варианта ответа нейтрофилов различных доноров на стимуляцию латексом: добавление частиц латекса либо не влияло на кислородактивирующие системы, либо приводило к незначительному снижению выхода АФК. Можно предположить, что под действием G-CSF *in vitro* ингибируется кислородактивирующая способность нейтрофилов для некоторых доноров. Такое же влияние оказывает G-CSF «Granocyte» на ЛЗХЛ нейтрофилов при действии АК. Для большинства доноров действие G-CSF *in vitro* уменьшает выход АФК при стимуляции нейтрофилов АК, однако в ряде случаев ($\approx 20\%$) добавление «Granocyte» не приводит к изменению кинетики ЛЗХЛ (рис. 2, б). Изучение влияния G-CSF на ЛЗХЛ нейтрофилов при действии РНА позволило выделить три типа воздействия фактора на кинетику генерации АФК для различных доноров: увеличение, уменьшение

либо отсутствие изменений в продукции активных кислородных интермедиатов (рис. 2, в).

Известно, что на поверхности нейтрофилов имеются рецепторы к G-CSF [10]. Неодинаковое влияние G-CSF на генерацию АФК при стимуляции функциональной активности клеток для различных доноров, вероятно, может быть обусловлено различным уровнем экспрессии рецепторов к G-CSF. При взаимодействии клеток с различными подложками происходит фиксирование ряда рецепторов, что влечет за собой структурные перестройки плазматических мембран и приводит к изменению активности редокс-систем клеток [11]. Кроме того, взаимодействие нейтрофилов с поверхностью стекла может приводить как к изменению числа рецепторов, так и влиять на структурное состояние рецепторов к G-CSF на поверхности нейтрофилов. Данные обстоятельства и могут быть причинами, обуславливающими различия в генерации АФК при добавлении «Granocyte» на разных стадиях клеточной адгезии. Представленные на рис. 1 и 2, а также полученные нами ранее данные [3—5] свидетельствуют о том, что восстановление функциональной активности нейтрофилов у детей с

онкогематологическими заболеваниями в процессе терапии с использованием G-CSF происходит не в результате прямого воздействия на нейтрофилы, а на уровне вмешательства «Granocyte» в процессы кроветворения в костном мозге.

В экспериментах *in vivo* нами было установлено, что при терапии с G-CSF «Granocyte» при выходе из состояния нейтропении детей с неходжкинскими лимфомами, нейробластомами и острым лимфобластным лейкозом восстанавливается активность редокс-систем, локализованных в плазматической мембране. При этом активность внутриклеточной мислопероксидазной системы, основным компонентом которой является фермент мислопероксидаза, не изменяется [12]. Изучение влияния G-CSF на МП активность нейтрофилов *in vitro* показало, что инкубирование «Granocyte» с суспензией нейтрофилов в течение 1 ч не приводит к изменению активности изучаемого фермента (данные не представлены). Из этого следует, что изменение кислородактивирующей способности клеток здоровых доноров при воздействии G-CSF *in vitro*, вероятно, также связано с модифицирующим действием фактора в отношении мембранных редокс-систем, но не внутриклеточных оксидаз. Следует отметить, что многие антибиотики и цитостатики, применяемые при терапии онкогематологических заболеваний, обладают способностью подавлять мислопероксидазную активность клеток иммунной системы и тем самым снижать их функциональную способность [13]. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии подобного побочного действия у G-CSF «Granocyte».

Таким образом, полученные нами результаты позволяют сделать следующие выводы:

— G-CSF «Granocyte» при действии *in vitro* на нейтрофилы здоровых доноров приводит к увеличению выхода АФК, генерация которых индуцирована адгезией клеток на стекло;

— использование G-CSF «Granocyte» *in vitro* для различных доноров вызывает разнонаправленные изменения в генерации АФК нейтрофилами при действии латекса, АК и РНА;

— действие G-CSF «Granocyte» на нейтрофилы *in vitro* не приводит к изменению мислопероксидазной активности клеток, что позволяет сделать заключение о модифицирующем влиянии гранулоцит-колониестимулирующего фактора на кислородактивирующие системы плазматических мембран, а не внутриклеточных структур.

Авторы выражают глубокую признательность Белорусскому Фонду Сороса (Грант № В 95-9-1100-к-1), Министерству образования и науки Республики Беларусь — за частичную финансовую

поддержку работы и благотворительному обществу «Помощь детям Чернобыля» (Германия) — за безвозмездно предоставленные фармакологические препараты.

О. Й. Коваленко, Г. М. Семенкова, О. М. Смирнова,
С. М. Черенкевич, Ю. О. Разумович, В. Герейн

Вплив гранулоцит-колониестимулюючого фактора «Granocyte» на генерацію активних форм кисню нейтрофілами *in vitro*

Резюме

Гранулоцит-колониестимулюючі фактори є стимуляторами лейкопоезу, у зв'язку з чим їх використовують при різних патологіях для виведення організму із стану мієлоіпресії. Методом хемілюмінесценції з застосуванням люмінола вивчено дію гранулоцит-колониестимулюючого фактора «Granocyte» на індуковану адгезією клітин до поверхні скла, частками латексу, фітогеммаглютиніном та арахідоновою кислотою генерацію активних форм кисню і мислопероксидазну активність нейтрофілів здорових донорів *in vitro*. Встановлено, що «Granocyte», діючи на нейтрофіли здорових донорів *in vitro*, призводить до зростання виходу активних форм кисню, генерація яких індукована адгезією клітин на скло, та до різнонаправлених змін у генерації активних форм кисню нейтрофілами при дії стимуляторів клітинного метаболізму. Ефект фактора «Granocyte» на досліджувані клітини *in vitro* не викликає змін мислопероксидазної активності нейтрофілів, що свідчить про модифікуючий вплив гранулоцит-колониестимулюючого фактора на кисеньактивируючі системи плазматичних мембран, але не внутрішньоклітинних структур.

E. I. Kovalenko, G. N. Semenкова, E. N. Smirnova,
S. N. Cherenkevich, Y. A. Razumovich, V. Gerein

The influence of granulocyte colony-stimulating factor «Granocyte» on active oxygen forms generation by neutrophils *in vitro*

Summary

Granulocyte colony-stimulating factors are used at the therapy of myelosuppressive conditions. The influence of granulocyte colony-stimulating factor «Granocyte» *in vitro* on active oxygen forms generation by neutrophils of healthy donors and myeloperoxidase activity of these cells was investigated at the adhesion of cells on the glass surface and the action of latex, phytohemagglutinin and arachidonic acid. Researches were carried out by chemiluminescent method with use of luminol. It was shown, that «Granocyte» increases the yield of active oxygen forms in neutrophils of healthy donors *in vitro* at the adhesion of cells on the glass. «Granocyte» induces the changes of the kinetics of active forms generation at actions of cell metabolism stimulators for different healthy donors. Myeloperoxidase activity of neutrophils is not changed under the influence of granulocyte colony-stimulating factor «Granocyte» *in vitro*. It was supposed, that granulocyte colony-stimulating factor «Granocyte» modifies activity of the plasma membranes redox-systems, but does not influence on intracellular oxidases.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taylor K. M., Jagannath S., Spitzer G. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor hastens granulocyte recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation // J. Clin. Oncol.—1989.—1, N 12.—P. 1791—1799.
2. Nissen C., Carbonare V. D., Moser Y. *In vitro* comparison of

- the biological potency of glycosylated versus nonglycosylated rG-CSF // *Drug. Invest.*—1994.—7, N 6.—P. 346—352.
3. *Semenkova G. N., Smirnova E. N., Kovalenko E. I. et al.* Chemiluminescent monitoring of neutrophils functional activity in oncohematological patients at the exit from neutropenia state: Abstracts of 2nd ICCS (April 27-30).—Berlin, 1996.—A12.
 4. *Smirnova E. N., Semenkova G. N., Kovalenko E. I. et al.* The generation of active oxygen forms and granulocytopenia in patients with acute lymphoblastic leukemia at therapy with use granulocyte colony-stimulating factor // *Ann. Hematol.*—1997.—74 (Suppl. 1).—A30.
 5. *Semenkova G. N., Smirnova E. N., Kovalenko E. I. et al.* Oxygen activating ability of neutrophils of children with non-Hodgkin's lymphomas at therapy with G-CSF // *Exp. Oncol.*—1997.—19, N 2.—P. 153—156.
 6. *Böyum A.* Isolation lymphocytes, granulocytes and macrophages. Lymphocytes: isolation, fractionation and characterisation // *Univ. Scan. J. Immunol.*—1976.—5.—P. 9—18.
 7. *Ветохин С. С., Семенкова Г. И., Черенкевич С. Н.* Хемилюминесцентные методы анализа активации клеток. Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях.—Рига, 1987.—С. 81—85.
 8. *Семенкова Г. И., Черенкевич С. Н., Левин В. И., Смирновский А. И.* Генерация активных форм кислорода нейтрофилами и лимфоцитами периферической крови человека при адгезии на стекло // *Биофизика.*—1985.—30, № 5.—С. 864—867.
 9. *Allen R. C., Stjernholm R., Steele R.* Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity // *Biophys. and Biochem. Res. Commun.*—1972.—47.—P. 679—684.
 10. *Ohsaka A., Saionji K., Sato N. et al.* Granulocyte colony-stimulating factor down regulates the surface expression of the human leukocytes adhesion molecule-1 on human neutrophils *in vitro* and *in vivo* // *Brit. J. Haematol.*—1993.—84, N 4.—P. 574—580.
 11. *Барсуков А. А., Филатов А. В., Васин Ю. А. и др.* Выделение активных форм кислорода при адгезии макрофагов // *Иммунология.*—1983.—1.—С. 69—73
 12. *Семенкова Г. И., Коваленко Е. И., Смирнова Е. Н. и др.* Влияние гранулоцит-колониестимулирующего фактора G-CSF на процесс восстановления гранулоцитопоэза и функциональную активность нейтрофилов при онкогематологических заболеваниях // Тез. докл. 2-го съезда Белорусского общества фотобиологов и биофизиков «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем».—Минск, 1996.—С. 176.
 13. *Nauseef W. M.* Myeloperoxidase deficiency // *Haematol. Pathol.*—1990.—4.—P. 165—178.

Поступила в редакцию 20.10.97