

## УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ HLA-DR АНТИГЕНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И $\alpha_{2b}$ -ИНТЕРФЕРОНА

С. В. Шилов, И. А. Колтаков, Е. Н. Леликова, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 15.10.2012 г.

**Аннотация.** Методом непрямого иммуноферментного анализа проведено комплексное исследование изменения уровня экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) в условиях комбинированного воздействия УФ-излучения и  $\alpha_{2b}$ -интерферона. Установлено, что в случае совместного воздействия  $\alpha_{2b}$ -интерферона и УФ-излучения характер ответной реакции иммуноцитов находится в сложной зависимости от доз модифицирующих агентов и исходного уровня экспрессии изучаемых антигенных детерминант.

**Ключевые слова:** HLA-DR, УФ-излучение, нейтрофилы, фотомодификация, комбинированное действие.

**Abstract.** Indirect ELISA method carried out a comprehensive study changes in the level of antigen expression of major histocompatibility complex class II (HLA-DR) under the combined effects of UV radiation and  $\alpha_{2b}$ -interferon. It was established that in the case of joint action of interferon  $\alpha_{2b}$ -and UV-radiation response immunocyte is a complex dependence on the dose-modifying agents and initial expression level of investigated antigens.

**Keywords:** HLA-DR, UV radiation, neutrophils, Photomodification synergistic.

Среди всех известных на сегодняшний день рецепторов TLR особый интерес исследователей вызывает маркер TLR4, экспрессирующийся на поверхности всех нейтрофильных гранулоцитов, основной функцией которого является распознавание липополисахаридов Грамм-отрицательных бактерий. Распознавание им компонентов бактериальной клеточной стенки возможно только при условии экспрессии на поверхности мембраны клетки вспомогательной корцепторной молекулы CD 14. Однако запуск каскада процессов активации нейтрофилов после взаимодействия комплекса TLR4 – CD14 с лигандом регулируется со стороны иммунной системы большим количеством цитокинов и других малых регуляторных молекул, которые могут определенным образом корректировать поведение клетки на полученный сигнал и, в частности, могут приводить к активации неспецифического, опсонин-независимого фагоцитоза одиночных бактерий, которые, в дальнейшем, выступают в качестве источника маркерных антигенов, позволяющих другим иммуно-

компетентным клеткам распознать эти чужеродные для организма объекты.

Поскольку Т-лимфоциты лишены способности непосредственно распознавать чужеродные антигены, то они находятся в зависимости от антиген-презентирующих клеток, в качестве которых согласно данным ряда авторов могут выступать изучаемые нами полиморфно-ядерные лейкоциты [1, 2].

Таким образом, на первое место вместе с комплексами TLR4-CD14 в реализации антиген-презентирующей функции нейтрофилов выходят антигены главного комплекса гистосовместимости I и II класса, которые играют важную роль в процессе активации иммунного ответа по клеточному (активация CD8<sup>+</sup> лимфоцитов – Т-супрессоры, цитотоксические Т-лимфоциты – антигенами, встроенными в молекулы ГКГС I класса) или гуморальному (активация CD4<sup>+</sup> лимфоцитов – Т-хелперы – антигенами встроенными в молекулы ГКГС II класса) пути [3].

В связи с этим, определенный практический интерес представляет изучение уровня экспрессии вышеперечисленных антигенных детерминант

под воздействием различных физико-химических агентов, так как они в полной мере отражающих способность изучаемых клеток принимать участие в одном из важнейших этапов реализации иммунного ответа – презентации чужеродного антигена.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на изолированных полиморфноядерных лейкоцитах, выделенных методом седиментации на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho_1 = 1.119 \text{ г/см}^3$ ,  $\rho_2 = 1.076 \text{ г/см}^3$ ) из периферической крови доноров. Модификацию суспензий клеток препаратом  $\alpha_{2b}$ -интерферона в концентрациях 1, 10 и 100 МЕ/мл проводили в течение 1 часа в термостате при 37 °С. Облучение УФ-светом в дозах от 151 до 1359 Дж/м<sup>2</sup> осуществляли светом Ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 с использованием светофильтра УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм. Уровень экспрессии определяли с помощью метода непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител мыши против HLA-DR маркеров человека («Сорбент», Москва) по стандартной методике. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом нашего исследования явилось изучение уровня экспрессии молекул антигенов локуса HLA-DR на поверхности мембран нейтрофилов крови человека в условиях воздействия препарата  $\alpha_{2b}$ -интерферона. Количество маркеров на поверхности нативных клеток составило  $0.482 \pm 0.020$  ед. опт. плотн. HLA-DR антигены проявили высокую степень резистентности к действию модификатора: статистически достоверное повышение величины изучаемого показателя на 17.5% было зарегистрировано нами при модификации образцов клеток интерфероном в концентрации 100 МЕ/мл наблюдалось (Рис. 1а).

Таким образом, повышение уровня экспрессии HLA-DR маркеров свидетельствует об увеличении эффективности презентации чужеродных антигенов CD 4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам.

Для выяснения механизмов изменения количества изучаемого нами антигенных детерминант была проведена серия опытов с использованием транскрипционного (актиномицин D) и трансля-

ционного (циклогексимид) блокаторов белкового синтеза. При добавлении в инкубационную среду совместно с интерфероном в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл как актиномицина D (рис. 1б), так и циклогексимида (рис. 1в), нами было выявлено снижение уровня экспрессии HLA-DR на поверхности мембран нейтрофилов крови человека от 8.8% до 14.7%.

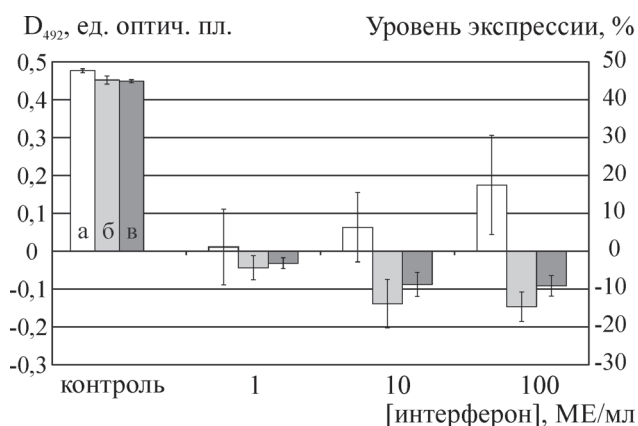


Рис. 1. Динамика уровня экспрессии антигенов локуса HLA-DR на поверхности мембран нейтрофилов крови человека в условиях воздействия  $\alpha_{2b}$ -интерферона. Обозначения: а – в отсутствие блокаторов белкового синтеза, б – при добавлении в инкубационную среду актиномицина D, в – при добавлении в инкубационную среду циклогексимида.

Таким образом, на основании данных об интерферон-индуцированном снижении регистрируемого показателя на фоне действия блокаторов синтеза белка можно констатировать, что зарегистрированный нами ранее эффект увеличения количества HLA-DR маркеров на поверхности мембран клеток после внесения в инкубационную среду  $\alpha_{2b}$ -интерферона в концентрации 100 МЕ/мл связано с синтезом этих антигенных детерминант de novo.

Следующим этапом нашей работы явилось изучение изменения уровня экспрессии антигенов локуса HLA-DR нейтрофилами крови человека в условиях воздействия УФ-света (240-390 нм) в дозах 151 – 1359 Дж/м<sup>2</sup>.

Все исследованные нами образцы клеток проявили высокую лабильность к действию УФ-света. Было установлено, что характер ответной реакции клеток на облучение зависел от исходного уровня экспрессии изучаемых антигенов, в связи с чем все обследованные нами доноры были разделены на 2 группы.

Уровень экспрессии изучаемых маркеров на поверхности мембран образцов клеток, отнесенных к первой группе, составил  $0,552 \pm 0,028$  ед. опт. плотн (Рис. 2а.).



Рис. 2. Динамика уровня экспрессии HLA-DR антигенов на поверхности мембран нативных и модифицированных УФ-облучением нейтрофилов крови доноров, отнесенных к I (а) и II (б) группам

Облучение клеток УФ-светом в дозах 151 и 453 Дж/м² вызывало увеличение количества изучаемых нами антигенных детерминант на поверхности их мембран на 5,5 и 6 % соответственно. Увеличение дозы облучения до 906 и 1359 Дж/м² не вызывало статистически достоверных отличий регистрируемого показателя от контрольных значений.

Во вторую группу (Рис. 2б) вошли доноры, для которых был характерен низкий исходный уровень экспрессии изучаемых антигенов ( $0,421 \pm 0,018$  ед. опт. пл.).

Фотомодификация образцов клеток во всем используемом нами диапазоне доз (151 – 1359 Дж/м²) приводила к снижению уровня ИФА сигнала на 10 – 14 % относительно контроля.

Для выяснения механизмов изменения уровня HLA-DR антигенов на поверхности мембран фотомодифицированных клеток нами был проведен блок исследований с использованием блокаторов белкового синтеза: актиномицина D и циклогексимида. При этом было установлено, что внесение как транскрипционных, так и трансляционных блокаторов синтеза белка нивелирует различия в характере ответной реакции образцов клеток обеих групп доноров на воздействие УФ-света во всем используемом нами диапазоне доз (рис. 3).

Так, облучение суспензии исследуемых клеток УФ-светом в диапазоне доз от 151 до 1359 Дж/м²

на фоне воздействия актиномицина снижало количество тестируемых антигенных детерминант на поверхности нейтрофилов на 9.8 – 20.5 % относительно контроля.



Рис. 3. Динамика уровня экспрессии HLA-DR маркеров на поверхности мембран нативных и модифицированных УФ-облучением нейтрофилов крови человека. Обозначения: а – в отсутствие блокаторов белкового синтеза, б – при добавлении в инкубационную среду актиномицина D, в – при добавлении в инкубационную среду циклогексимида

Подобная ответная реакция нейтрофилов на облучение УФ-светом была выявлена нами при использовании в качестве блокатора синтеза белка – циклогексимида. Фотомодификация суспензий клеток доноров обеих групп в дозах 906 и 1359 Дж/м² приводила к снижению уровня экспрессии HLA-DR маркеров на 6 – 15 % соответственно.

Таким образом, одной из причин повышения уровня экспрессии изучаемых антигенов на поверхности мембран нейтрофилов крови доноров, отнесенных ранее к первой группе, может служить их синтез de novo.

Для расширения представлений о совместном влиянии УФ-излучения и  $\alpha_{2b}$ -интерферона на механизмы регуляции иммунных реакций, связанных с изучаемыми антигенными детерминантами, мы провели оценку количества HLA-DR антигенов, экспрессированных на поверхности мембран нейтрофилов крови человека.

Уровень экспрессии исследуемых маркеров на поверхности мембран нативных клеток доноров первой группы составил  $0,552 \pm 0,028$  ед. опт. плотн. Инкубация нейтрофилов  $\alpha_{2b}$ -интерфероном в концентрации 100 МЕ/мл вызывала повышение оптической плотности исследуемых образцов на 17.5% относительно контроля. (Рис. 4).

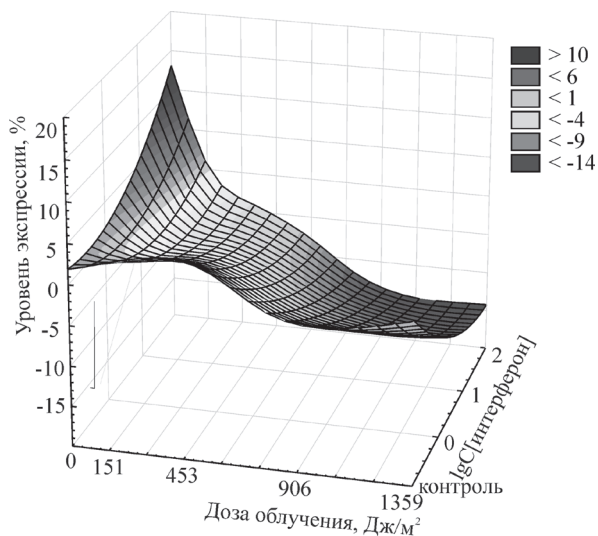


Рис. 4. Динамика уровня экспрессии HLA-DR антигенов нейтрофилами крови доноров 1 группы в условиях комбинированного воздействия  $\alpha_{2b}$ -интерферона и УФ-облучения.

Облучение клеток УФ-светом в дозах 151 и 453 Дж/м<sup>2</sup> способствовало статистически достоверному повышению уровня ИФА – сигнала на 5,5 и 6 % относительно контроля. Нами было установлено, что инкубация суспензий фотомодифицированных в дозах 906 и 1359 Дж/м<sup>2</sup> нейтрофилов с препаратом  $\alpha_{2b}$ -интерферона в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл приводит к уменьшению уровня экспрессии изучаемых антигенных детерминант на 12 – 27% по сравнению с клетками, не подвергавшимся предварительному УФ- облучению. В остальных случаях статистически достоверных отличий сравниваемых показателей нами выявлено не было.

У второй группы доноров с исходно низким уровнем экспрессии антигенов локуса HLA-DR так же наблюдалось повышение их количества инкубации клеток с интерфероном в концентрациях 100 МЕ/мл на 17.5 % соответственно (рис. 5).

Облучение нейтрофилов доноров этой группы УФ-светом в дозах 151 – 906 Дж/м<sup>2</sup> снижало количество изучаемых антигенов на поверхности их мембран на 10 – 14 % относительно контроля. Последующая инкубация фотомодифицированных клеток с  $\alpha_{2b}$ -интерфероном в концентрациях 1, 10 и 100 МЕ/мл вызывала статистически достоверное восстановление до контрольных значений уровня экспрессии HLA-DR антигенов, сниженного воздействием УФ-света.

После воздействия на тестируемые нами полиморфно-ядерные лейкоциты УФ-излучения в

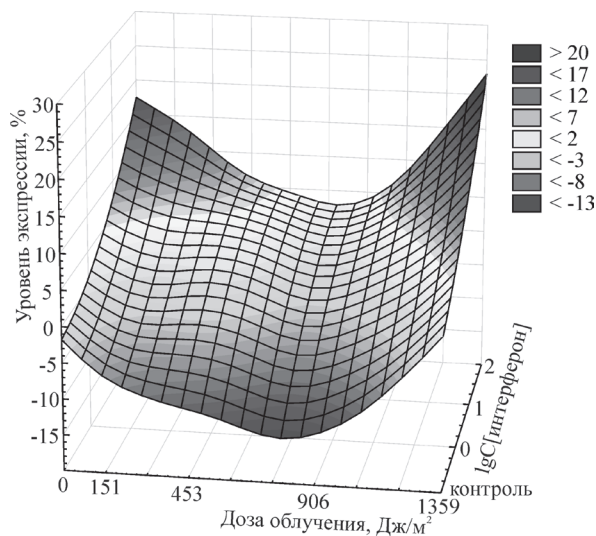


Рис. 5. Динамика уровня экспрессии HLA-DR антигенов нейтрофилами крови доноров 2 группы в условиях комбинированного воздействия  $\alpha_{2b}$ -интерферона и УФ-облучения.

дозе 1359 Дж/м<sup>2</sup> не было зарегистрировано статистически достоверных изменений уровня ИФА-сигнала. Последующее добавление интерферона к фотомодифицированным клеткам способствовало повышению регистрируемого показателя на 6 – 24 % в диапазоне концентраций 10 – 100 МЕ/мл.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью методов непрямого твердофазного иммуоферментного анализа было исследовано влияние препарата  $\alpha_{2b}$ -интерферона (1 – 100 МЕ/мл) и УФ- излучения (240 - 390 нм) на экспрессию антигенов локуса HLA-DR нейтрофилами крови человека.

Было установлено, что исследуемые маркеры проявили высокую степень резистентности к действию малых концентраций интерферона. Наиболее эффективными оказались концентрации 10 – 100 МЕ/мл. На основании этого можно предположить, что на ранних этапах иммунного ответа нет ярко выраженной потребности в интенсификации процессов презентации чужеродных антигенов иммунокомпетентным клеткам. В том случае, если количество патогенов в организме увеличивается, то происходит повышение концентрации интерферонов (как естественных, так и вносимых извне в виде лекарственных препаратов) и активация звена антигенпрезентирующих клеток, что приводит к повышению эффективности представления и распознавания чужеродных антигенов.

Анализ данных по изучению влияния УФ света на антигенпрезентирующие клетки показал, что под действием малых доз УФ-излучения может происходить как увеличение, так и снижение (для клеток с исходно низким уровнем экспрессии) уровня экспрессии исследуемых антигенов.

Было показано, что для образцов нейтрофилов с исходно высоким уровнем экспрессии наблюдается яркое стимулирующее действие интерферона и УФ-света. В том случае, если исходный уровень экспрессии исследуемых поверхностных дифференцировочных антигенов был ниже среднего уровня, то величина регистрируемого показателя существенно снижалась под действием УФ-света. Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с тем, что у лиц с исходно заниженным уровнем исследуемых антигенов

могут иметь место существенные функциональные нарушения, которые, вероятно, могут проявляться в блокировании процессов синтеза мембранных маркеров или же их токсической инактивации вследствие накопления токсических продуктов ПФОЛ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hallman M. Toll-like receptors as sensors of pathogens / M. Hallman, M. Ramet, R.A. Ezekowitz // *Pediatr. Res.* – 2001. – Vol. 92, № 3. – P. 315–321.
2. O'Neill L. A. Toll-like receptors signal transduction and tailoring of innate immunity: a role for Mal / L. A. O'Neill // *Trends Immunol.* – 2002. – Vol. 23, № 6. – P. 296–300.
3. Галактионов В. Г. Иммунология / В. Г. Галактионов. – М. : Изд-во МГУ, 2004. – 528 с.

---

*Шилов Сергей Владимирович* — аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

*Колтаков Игорь Александрович* — кандидат биологических наук, ассистент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: koltakov@bio.vsu.ru

*Леликова Елена Николаевна* — студент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

*Артюхов Валерий Григорьевич* — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: avg@main.vsu.ru

*Shilov Sergey V.* — postgraduate student, Department of Biophysics and Biotechnology of the Voronezh State University

*Koltakov Igor A.* — Assistant Professor, Ph.D., Candidate of Biological Sciences, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University; e-mail: koltakov@bio.vsu.ru

*Lelikova Elena N.* — student, Department of Biophysics and Biotechnology of the Voronezh State University

*Artyukhov Valery G.* — Full Professor, Ph.D., Dsci., Head of the Department of Biophysics and Biotechnology of the Voronezh State University; e-mail: avg@main.vsu.ru