

О РОЛИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ИНТЕРФЕРОН-ИНДУЦИРОВАННОГО ИЗМЕНЕНИЯ АНТИГЕННОГО ПРОФИЛЯ МЕМБРАН Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов, И. А. Колтаков, Е. В. Домнина

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 10.09.2014 г.

Аннотация. Методами регистрации люминолзависимой хемилюминесценции и спектрофотометрии изучены процессы накопления и утилизации активных форм кислорода Т-лимфоцитами крови человека в условиях воздействия препарата человеческого лейкоцитарного интерферона.

Ключевые слова: Интерферон, АФК, ПОЛ, каталаза, супероксиддисмутаза, антигенный профиль

Abstract. It was studied by Methods of registration of luminol-dependent chemiluminescence and spectrophotometry the processes of accumulation and disposal of reactive oxygen species by T lymphocytes in human blood under the influence of the preparation of human leukocyte interferon.

Keywords: interferon, ROS, Lipid peroxidation, catalase, superoxide dismutase

В настоящее время интерфероны широко применяются не только для лечения вирусных заболеваний, но и в качестве иммуномодуляторов широкого спектра действия [1], что способствует их активному использованию в клинической практике. Однако при введении в организм больших концентраций этого цитокина (100 – 500 МЕ/мл) или при длительном лечении происходит развитие ряда серьезных побочных эффектов, которые имеют дозозависимый характер. Так, гриппоподобный синдром, вызываемый интерфероном, может отрицательно влиять на сердечно-сосудистую систему, почки и ЦНС. Антипролиферативный эффект цитокина затрагивает систему кроветворения, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и внутренних органов, а взаимодействие с опиятными рецепторами может привести к нейротоксичности и дисфункции ЦНС [2].

Однако, в последнее время стали появляться работы, посвященные исследованию влияния различных иммуномодуляторов на активность ферментов антиоксидантной защиты и интенсивность протекания ПОЛ в иммунокомпетентных клетках [3, 4]. Это связано с тем, что в процессе обмена веществ в иммунocyтах непрерывно протекают реакции, направленные на синтез простагландинов, тромбоксанов, липоксанов, лейкотриенов и сопряженные со спонтанной генерацией активных форм кислорода (АФК). Согласно данным ряда авторов, высвобождение небольших концентраций АФК может происходить и при активации TCR на поверхности мембран Т-лимфоцитов [5], принимающих участие в передаче внутриклеточных сигналов [6, 7] и в регуляции ответа клеток на воздействие цитокинов [8].

Пероксидное окисление липидов (ПОЛ) представляет собой один из универсальных процессов повреждения мембранных систем, изменяющих их химический состав, физические параметры,

ультраструктурную организацию и функциональные характеристики. ПОЛ способствует обновлению липидного состава мембран вследствие удаления легко окисляющихся липидов. Это вызывает повышение проницаемости клеточных мембран для различных ионов и макромолекул и изменение функциональной активности большинства мембранных белков [9, 10].

Окислительные процессы с участием АФК являются неотъемлемым звеном существования высших форм живых организмов. Однако, с другой стороны, высокая реакционная способность делает их особо токсичными на всех уровнях биологических систем. Однако, в физиологических условиях образование АФК в клетке сдерживается на низком уровне системой антиоксидантов [11].

В связи с этим весьма актуальным является проведение исследований, посвященных оценке интенсивности протекания свободно-радикальных процессов в мембранах в Т-лимфоцитах крови человека в условиях воздействия препарата человеческого лейкоцитарного α -интерферона.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили Т-лимфоциты периферической крови здоровых добровольцев. Выделение иммунокомпетентных клеток с помощью метода седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$) по методу А. Воум [12] на центрифуге типа Ерpendorf 5702 с бакет-ротором в течение 15 мин при 400 g.

Слой лимфоцитов, образующийся на поверхности градиента, собирали по всей площади сечения пробирки, переносили в чистую, сухую центрифужную пробирку и разбавляли раствором Хенкса в соотношении 1:10 и трехкратно отмывали. Контроль чистоты суспензии клеток осуществляли спектрофотометрически и с помощью окрашивания мазков клеток суспензий по Романовскому [13] с последующим микроскопированием. Жизнеспособность лимфоцитов определяли в тесте с трипановым синим [14]. В работе использовались образцы клеток с жизнеспособностью не менее 95%. Разделение суспензии лимфоцитов на фракции Т- и В-клеток проводили по методу Р. Terasaki [15].

Модификацию Т-лимфоцитов растворами человеческого лейкоцитарного α -интерферона («Иммунопрепарат», Уфа) осуществляли в течение 24 часов при температуре 37 °С в диапазоне

концентраций 0.01; 0.1; 1; 10 и 100 МЕ/мл.

Спонтанное образование АФК Т-лимфоцитами определяли с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции, активность цитозольной каталазы определяли по методу М. А. Королюка и соавт. [16], а цинк-медь зависимой супероксиддисмутазы – по методу В. Н. Чумакова и соавт. [17].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами проводилась оценка влияния препарата человеческого лейкоцитарного интерферона на экспрессию основных компонентов Т-клеточного рецептора лимфоцитами крови человека [18, 19, 20, 21]. Было показано, что в зависимости от исходного состояния иммунокомпетентных клеток и концентрации исследуемого цитокина характер ответной реакции сильно варьировал.

Для выяснения влияния активных форм кислорода и интенсивности протекания ПОЛ на изменение антигенного профиля биомембран иммунокомпетентных клеток нами был осуществлен анализ свободнорадикальных процессов в мембранах Т-лимфоцитов, инкубированных с препаратом α -интерферона в диапазоне концентраций 0,01 – 100 МЕ/мл в течение 1 и 24 часов.

Максимальная интенсивность ЛЗХЛ контрольных образцов Т-лимфоцитов составила в среднем 0.034 ± 0.006 мВ, а светосумма – 11.9 ± 2.1 мВ·с (табл. 1).

Таблица 4
Динамика изменения параметров ЛЗХЛ Т-лимфоцитов в контроле и после их инкубации с различными концентрациями α -интерферона

время инкубации, ч	концентрация интерферона, МЕ/мл	I_{\max} , мВ	S, мВс
1	контроль	$0,034 \pm 0,006$	$11,9 \pm 2,1$
	0,01	$0,057 \pm 0,006^*$	$20,4 \pm 2,0^*$
	0,1	$0,064 \pm 0,007^*$	$22,4 \pm 2,5^*$
	1	$0,038 \pm 0,007$	$13,3 \pm 2,6$
	10	$0,031 \pm 0,005$	$10,9 \pm 1,8$
	100	$0,019 \pm 0,008^*$	$7,0 \pm 0,8^*$
24	контроль	$0,083 \pm 0,008$	$15,0 \pm 3,6$
	0,01	$0,248 \pm 0,012^*$	$68,0 \pm 3,3^*$
	0,1	$0,324 \pm 0,017^*$	$121,0 \pm 6,4^*$
	1	$0,399 \pm 0,018^*$	$156,0 \pm 6,7^*$
	10	$0,543 \pm 0,038^*$	$236,0 \pm 16,5^*$
	100	$0,701 \pm 0,042^*$	$249,0 \pm 14,9^*$

* - отличия от контроля статистически достоверны при $P < 0.05$

Термостатирование клеток с α -интерфероном в концентрациях 0.01 и 0.1 МЕ/мл в течение 1 ч

приводило к усилению I_{max} на 67 % и 88 %, а S - на 71 % и 88 % соответственно. При увеличении содержания цитокина в инкубационной среде до 1 и 10 МЕ/мл не было выявлено статистически достоверных отличий основных параметров хемиллюминесценции от контроля. Модификация клеток максимальной из используемых нами концентраций цитокина – 100 МЕ/мл, инициировала снижение регистрируемых показателей на 44 % и 41 %.

При увеличении времени термостатирования Т-лимфоцитов до 24 часов, нами было установлено повышение максимальной интенсивности I_{max} более чем в 2 раза до 0.083 ± 0.008 мВ и незначительное возрастание светосуммы S до 15 ± 3.6 мВ·с, однако, ее величина статистически достоверно не отличалась от таковой для часовой экспозиции. Инкубация клеток с интерфероном в концентрации 0.01 МЕ/мл приводила к повышению исследуемой величины на 226% (0.248 ± 0.012 мВ). Внесение в культуральную среду интерферона в дозе 0,1 МЕ/мл повышало уровень регистрируемого показателя на 326 % (0.324 ± 0.017 мВ). Модификация Т-лимфоцитов цитокином в концентрации 1 МЕ/мл способствовала росту интенсивности ЛЗХЛ на 425 % (0.399 ± 0.018 мВ). При термостатировании клеток с α -интерфероном в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл наблюдалось увеличение регистрируемого показателя на 614 и 822 % (0.543 ± 0.038 и 0.701 ± 0.042 мВ соответственно).

Установлено, что светосумма ЛХЗЛ образцов Т-лимфоцитов после их модификации α -интерфероном (0,01 – 100 МЕ/мл) увеличивалась пропорционально концентрации цитокина от 68.0 ± 3.3 до 249.0 ± 14.9 мВ·с.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно констатировать, что под действием α -интерферона происходит интенсификация продукции АФК в Т-лимфоцитах, и, как следствие, усиление интенсивности протекания процессов ПОЛ в клеточных мембранах, о чем свидетельствует зарегистрированное нами повышение основных параметров ЛЗХЛ.

Поскольку образование АФК в живых организмах находится в постоянном равновесии с их дезактивацией антиоксидантной системой защиты, нами была проведена серия экспериментов по изучению каталитической активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в лизатах нативных и инкубированных с препаратом α -интерферона в течение 1 и 24 ч Т-лимфоцитов.

Величина каталазной активности лизатов суспензий нативных Т-клеток, термостатирован-

ных при 37 °С в течение 1 ч, составила 23.4 ± 0.6 мкмоль/л·мин (рис. 1).

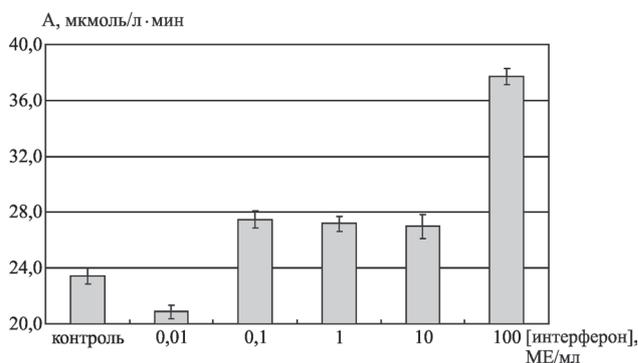


Рис. 1. Активность каталазы в лизатах нативных и инкубированных с α -интерфероном в течение 1 ч Т-лимфоцитов.

Инкубация Т-лимфоцитов с α -интерфероном в концентрации 0.01 МЕ/мл в течение 1 ч вызывала снижение активности исследуемого фермента до 20.9 ± 0.5 мкмоль/л·мин (на 10,9 % относительно контроля). Добавление в суспензии нативных Т-клеток препарата α -интерферона в концентрациях 0,1; 1; 10 и 100 МЕ/мл и последующая их инкубация при 37 °С способствовала статистически достоверному повышению каталазной активности лизатов до величин 27.5 ± 0.6 ; 27.2 ± 0.5 ; 27.0 ± 0.8 и 37.7 ± 0.6 мкмоль/л·мин соответственно.

При увеличении времени инкубации Т-лимфоцитов с исследуемым цитокином до 24 ч ферментативная активность цитозольной каталазы снижалась до величины 12.0 ± 0.6 мкмоль/л·мин.

Нами было обнаружено, что α -интерферон во всем используемом диапазоне концентраций вызывает значительное снижение активности каталазы в лимфоцитарных лизатах на 73 – 81% относительно интактных образцов (рис. 2).

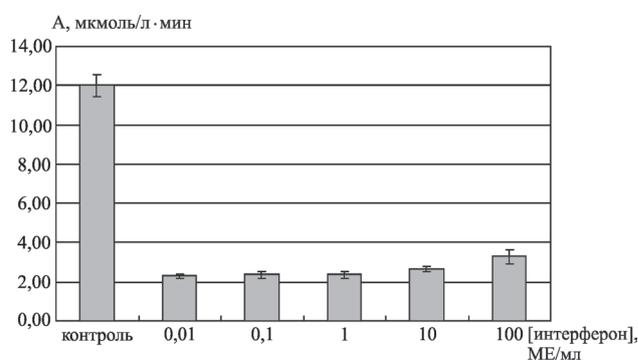


Рис. 2. Активность каталазы в лизатах нативных и инкубированных с α -интерфероном в течение 24 ч Т-лимфоцитов

Следующим этапом нашей работы стала оценка влияния 1 и 24 ч инкубации Т-лимфоцитов крови человека с препаратом α -интерферона (0.01 – 100 МЕ/мл) на активность супероксиддисмутазы в их лизатах.

В нативном состоянии СОД-активность лимфоцитарных клеток составила 0.55 ± 0.05 отн. ед (рис. 3).

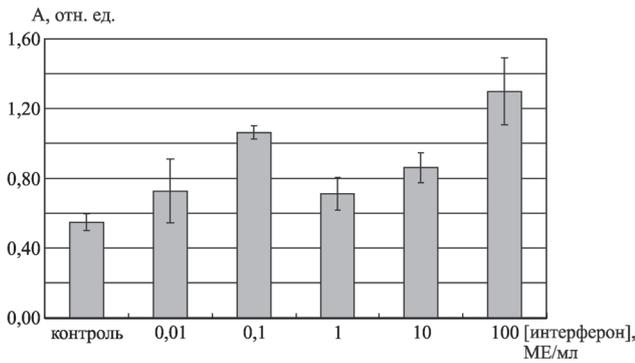


Рис. 3. СОД-активность лизатов нативных и инкубированных в течение 1 ч с α -интерфероном Т-лимфоцитов

Модификация клеток малой концентрацией цитокина (0.01 МЕ/мл) не приводила к статистически достоверному изменению активности исследуемого фермента. После часовой инкубации Т-лимфоцитов с исследуемым иммуномодулятором в концентрациях 0.1 – 100 МЕ/мл, нами было зарегистрировано повышение активности супероксиддисмутазы на 94 – 137 % относительно контроля (1.06 ± 0.04 ; 0.71 ± 0.09 ; 0.86 ± 0.09 и 1.30 ± 0.19 отн. ед. соответственно).

При увеличении времени термостатирования образцов до 24 ч активность исследуемого фермента снижалась до 0.39 ± 0.18 отн. ед., однако, ее отличие от таковой для клеток, проинкубированных при 37 °С в течение 1 часа, было статистически не достоверно (рис 4).

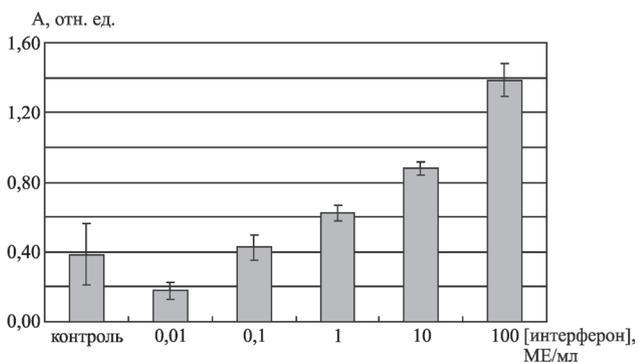


Рис. 4. СОД-активность лизатов нативных и инкубированных в течение 24 ч с α -интерфероном Т-лимфоцитов

Нами было установлено, что малые концентрации модификатора (0.01 ± 1 МЕ/мл) не вызывают статистически достоверных изменений каталитической активности СОД Т-лимфоцитов. Инкубирование клеток с большими концентрациями цитокина (10 и 100 МЕ/мл) приводило к увеличению регистрируемого показателя до величин 0.88 ± 0.04 и $1.38 \pm 0,09$ отн. ед. соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что продолжительное воздействие α -интерферона на Т-лимфоциты (24 ч термостатирование) способствует снижению активности каталазы, сопровождающемуся повышением активности СОД.

Одновременно с этим, при инкубировании Т-лимфоцитов с препаратом человеческого лейкоцитарного α -интерферона (0.1 – 100 МЕ/мл) в течение 1 ч активность каталазы повышается пропорционально концентрации исследуемого иммуномодулятора. Это будет способствовать повышению скорости утилизации АФК в лимфоцитарной клетке. Увеличение времени термостатирования образцов Т-клеток до 24 ч снижает активность фермента в 1.95 раза. Внесение в реакционную смесь цитокина способствует еще большему падению регистрируемого показателя. В результате в клетках будет накапливаться стабильная и токсичная форма АФК – пероксид водорода, являющийся субстратом для каталазы. В свою очередь, это будет способствовать интенсификации процессов ПОЛ в мембранах Т-лимфоцитов, что мы и наблюдали при регистрации ЛЗХЛ Т-лимфоцитов после воздействия на них α -интерферона. В связи с этим, можно предположить, что изменение антигенного профиля мембран иммуноцитов находится в тесной связи с процессом образования и утилизации в них АФК, а снижение количества тестируемых методом иммуноферментного анализа антигенных детерминант может происходить как в результате токсической инактивации продуктами ПОЛ, накапливающимися непосредственно в их локальном микроокружении, так и, по всей видимости, в результате окислительной модификации непосредственно самих мембранных маркеров.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», (кратко - ФЦП ИР14-20) соглашение № 14.593.21.0001, SPIN 9030-6599, с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ершов Ф. И. Интерфероны / Ф. И. Ершов // *Вопр. вирусологии*. — 1998. — №6. — С. 247-252.
2. Ершов Ф. И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф. И. Ершов, О. И. Киселев — М.: Гэотар-Медиа, 2005. — 368 с.
3. Михилева Е. А. Модуляция физико-химическими агентами структурно-функционального состояния нейтрофилов крови человека : дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / Е.А. Михилева. — Воронеж, 2005. — 205 с
4. Савостина И. Е. Исследование влияния УФ-света и иммуномодуляторов на антиоксидантный статус и состояние мембран лейкоцитов: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / И. Е. Савостина. — Воронеж, 2005. — 202 с.
5. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T-cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression / S. Devadas [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 195. — P. 59-70.
6. Finkel T. Oxygen radicals and signaling / T. Finkel // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1998. — № 10. — P. 248-253.
7. Gamaley I.A. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular function / I.A. Gamaley, I.V. Klyubin // *Int. Review. Cytol.* — 1999. — № 188. — P. 203-255.
8. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes / G. Pani [et al.] // *Biochem. J.* — 2000. — V. 347. — P. 173-181.
9. Артюхов В. Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина. — Воронеж, Изд-во ВГУ, 2000. — 296 с.
10. Наквасина М.А. УФ-индуцированные структурно-функциональные модификации компонентов эритроцитарных и лимфоцитарных клеток человека в присутствии биогенных аминов и активных форм кислорода: дисс. ... д-ра биологических наук : 03.00.02 / М.А. Наквасина. — Воронеж, 2006. — 400 с.
11. Зенков Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова // *Успехи соврем. биологии*. — 1993. — №3. — С. 286-296.
12. Boym A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes / A. Boym // *Tissue antigens*. — 1974. — № 4. — P. 269-274.
13. Земсков А.М. Иммунологический статус, критерии его оценки, принципы назначения иммунокорректирующих препаратов: Методические указания / А.М. Земсков, Е.Б. Войтекунас, А.В. Никитин. — Воронеж, 1988. — С. 11-26.
14. Новиков Д.К. Оценка иммунного статуса / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. — Витебск, М.: Медицина, 1996. — 282 с.
15. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика / Ю.М. Зарецкая — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
16. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк А.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лаб. Дело*. — 1988. — № 1. — С. 16-19.
17. Чумаков В.Н. Количественный метод определения активности цинк-медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале / В.Н. Чумаков, Л.Ф. Осинская // *Вопр. мед. химии*. — 1977. — Т. 27, №5 — С. 712-715.
18. Колтаков И.А. Исследование структурно-функционального состояния Т-лимфоцитов крови человека при модификации альфа-интерфероном и в условиях УФ-облучения : дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / И.А. Колтаков — Воронеж, 2007 — 130 с.
19. Анализ влияния человеческого лейкоцитарного интерферона на экспрессию некоторых CD-молекул Т-лимфоцитами / В.Г. Артюхов и др. // *Гематология и трансфузиология*. — 2006. — Т. 51. № 3. — С. 24-27.
20. Влияние различных доз человеческого лейкоцитарного интерферона на конъюгатсвязывающую способность Т-лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов и др. // *Гематология и трансфузиология*. — 2003. — Т. 48. № 6. — С. 33-36.
21. Экспрессия CD3-комплексов нативными УФ-облученными Т-лимфоцитами крови человека после их модификации препаратом лейкоцитарного α -интерферона / В.Г. Артюхов и др. // *Биофизика*. — 2009. — Т. 54. №2. — С. 252-255.

Путинцева Ольга Васильевна — Доктор биол. наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

Артюхов Валерий Григорьевич — Доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

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

Домнина Екатерина Викторовна — студентка 5 курса кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

Putintseva Olga V. — PhD (Biology), Full professor, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University

Artyukhov Valery G. — PhD (Biology), Full professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University

Koltakov Igor A. — PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University; e-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Domnina Ekaterina V. — 5th year student of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University