

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ A<sub>2B</sub> ИНТЕРФЕРОНА

И. А. Колтаков, В. Г. Артюхов, С. В. Шилов, О. А. Дельцова, С. М. Л. Нгихангва

*Воронежский государственный университет*

Поступила в редакцию 20.11.2014 г.

**Аннотация.** Методом проточной цитофлюориметрии было изучено влияние  $\alpha 2b$ -интерферона в концентрациях 1; 10 и 100 МЕ/мл на метаболическую активность нейтрофилов крови человека и экспрессию CD11b маркеров на поверхности их мембран. Установлено иммуномодулирующее действие некоторых доз агента на экспрессию CD-11b рецепторов на мембранах полиморфно-ядерных лейкоцитов крови человека.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, интерферон, экспрессия, рецепторы

**Abstract.** By flow cytometry we studied the effect  $\alpha 2b$ -interferon concentrations of 1; 10 and 100 IU/ml on the metabolic activity of human blood neutrophils and expression of CD11b markers on the surface of their membranes. Was established immunomodulatory effects on certain doses of agent CD11b expression of receptors on the membranes of polymorphonuclear leukocytes in human blood.

**Keywords:** neutrophils, interferon, expression, receptors.

С момента открытия процесса фагоцитоза И. И. Мечниковым основной функцией нейтрофильных гранулоцитов считалось поглощение и элиминация из организма различных чужеродных агентов и патогенных микроорганизмов с помощью большого количества активных кислородных метаболитов, генерируемых в процессе респираторного взрыва. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов находится в непосредственной зависимости от количества и плотности распределения на поверхности клеточной мембраны таких рецепторов, как CD11b/CD18, CD16, CD32, CD95.

В последние годы стало известно, что фагоцитарные реакции нейтрофилов являются частью стратегии, направленной на поддержание постоянства внутренней среды организма. Нейтрофилы

реализует свой эффекторный потенциал не только посредством фагоцитоза, но и секрецией растворимых регуляторных продуктов, таких как лейкотриены, простагландины, интерфероны, интерлейкины, активные формы кислорода и др.

Нейтрофилы тесно взаимодействуют практически со всеми гуморальными и клеточными системами крови и соединительной ткани, участвующими в сохранении гомеостаза, однако, в последнее десятилетие, ученые были вынуждены пересмотреть свои взгляды и более пристально начать изучать данную группу иммунокомпетентных клеток вследствие открытия нескольких новых функций, присущих им.

Основу для понимания механизмов реализации данного процесса заложили Brinkmann, O'Neill, и Hallman, которые показали, что нейтрофилы могут образовывать внеклеточные сетеподобные структуры (NET) [1], а так же принимать участие в презентации чужеродных антигенов

© Колтаков И. А., Артюхов В. Г., Шилов С. В., Дельцова О. А., Нгихангва С. М. Л., 2015

T-лимфоцитам крови человека [2, 3].

Ранее, нами было показано, что в условиях воздействия препарата  $\alpha_{2b}$ -интерферона происходит усиление уровня экспрессии CD14 маркеров нейтрофилами крови человека [4] пропорционально концентрации модификатора. В то же время, исследуемый цитокин оказывал иммуномодулирующее действие на изменение количества молекул системы МНС (HLA-DR) на поверхности мембран нейтрофилов крови человека [5]. Таким образом, можно предположить, что  $\alpha_{2b}$ -интерферон в диапазоне концентраций 10 - 100 МЕ/мл может оказывать регулирующее воздействие на способность нейтрофилов презентовать антигены другим иммунокомпетентным клеткам. Однако для понимания полной картины совокупности процессов, происходящих в ходе реализации данных процессов необходимо провести оценку способности нейтрофильных лейкоцитов принимать участие в межклеточных взаимодействиях, в качестве показателя которой нами было выбрано изменение уровня экспрессии CD11b маркеров на поверхности их мембран.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили изолированные нейтрофилы периферической крови здоровых добровольцев.

Выделение целевой популяции клеток осуществляли методом седиментации на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho_1 = 1.077 \text{ г/см}^3$ ,  $\rho_2 = 1.119 \text{ г/см}^3$ ) по методу Boum.

Нейтрофилы модифицировали препаратом  $\alpha_{2b}$ -интерферона (альфарон, НПП «Фармаклон», Москва) в концентрациях 1, 10 и 100 МЕ/мл. После чего образцы инкубировали при  $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  в термостате ТС-80М в течение 1 часа.

Определение жизнеспособности полученной клеточной фракции осуществляли на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8 HT (Merk-Millipore Group, USA) согласно протоколу коммерческого набора GUAVA VIA COUNT. В работе использовали образцы клеток с жизнеспособностью не менее 98%.

Уровень экспрессии поверхностных дифференцировочных антигенов CD11b определяли методом проточной цитофлуориметрии на цитометре Guava easyCyte 8 HT (Merk-Millipore Group, USA) с использованием моноклональных антител LT11b против маркеров CD11b человека (Сорбент, Москва).

Статистическую обработку результатов про-

водили с помощью пакета прикладных программ с использованием t - критерия Стьюдента.

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нашего исследования для исключения погрешности изменения количества живых клеток в исследуемых образцах, нами был проведен анализ жизнеспособности нейтрофилов в условиях воздействия препарата  $\alpha_{2b}$ -интерферона методом проточной цитофлуориметрии с использованием пары высокочувствительных красителей 7-AAD и PI, входящих в состав коммерческой тест-системы ViaCount (Millipore, USA) с использованием проточного цитофлуориметра Guava easyCyte 8HT.

Окраску клеток проводили по методике, предложенной производителем используемой тест-системы. Для получения статистически достоверных данных, нами осуществлялся подсчет не менее 10000 клеток, удовлетворяющих условию: 7AAD<sup>+</sup> PI<sup>-</sup> и 7AAD<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>, после чего подсчитывали жизнеспособность по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{Количество живых клеток}}{\text{Общее количество подсчитанных клеток}}$$

Поскольку в работе были использованы суспензии клеток с начальным содержанием живых клеток не менее 98%, то процент жизнеспособности контрольных образцов был принят нами за 100%.

Инкубация нейтрофилов препаратом  $\alpha_{2b}$ -интерферона в концентрации 1 МЕ/мл не приводило к статистически достоверному изменению количества живых клеток в суспензии. Увеличение дозы используемого лекарственного препарата от 10 до 100 МЕ/мл способствовало пропорциональному снижению исследуемого показателя до величины  $99.17 \pm 0.20$  и  $97.20 \pm 0.12$  % соответственно.

Таким образом, нами было установлено, что модификация нейтрофильных гранулоцитов с препаратом  $\alpha_{2b}$ -интерферона в течение 1 часа не приводит к существенной гибели иммуноцитов, а выявленное нами снижение исследуемой величины до 2.8% не будет оказывать существенного влияния на дальнейшее проведение исследований.

Следующим этапом нашей работы являлось изучение экспрессии CD11b маркеров нейтрофилов периферической крови доноров. Экспонируясь на поверхности моноцитов, гранулоцитов и макрофагов, данный маркер принимает активное

участие в реализации межклеточных взаимодействий, в том числе и при презентации антигенов лимфоцитам данными субпопуляциями клеток.

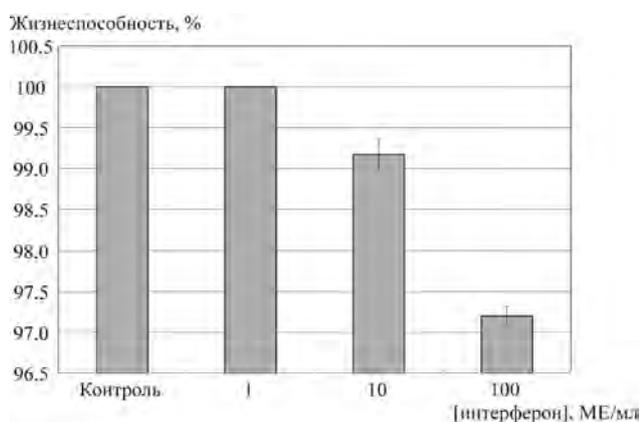


Рис. 1 Влияние  $\alpha_{2b}$ -интерферона на жизнеспособность нейтрофилов периферической крови доноров.

Анализ полученных данных показал, что распределение клеток по уровню экспрессии CD11b является неоднородным мультимодальным, все зарегистрированные нами события были разделены на 3 группы с исходно низким, средним и высоким содержанием изучаемого антигенного маркера в составе нейтрофильных мембран. Выделение целевой популяции клеток осуществлялось по соотношению параметров прямого и бокового светорассеяния, а из полученного гейта были отсечены участки по оси абсцисс со значениями интенсивности флуоресценции менее 10 отн.ед. (фоновая флуоресценция) и область более 5000 отн.ед., не содержащие клеток. (Рис. 2)

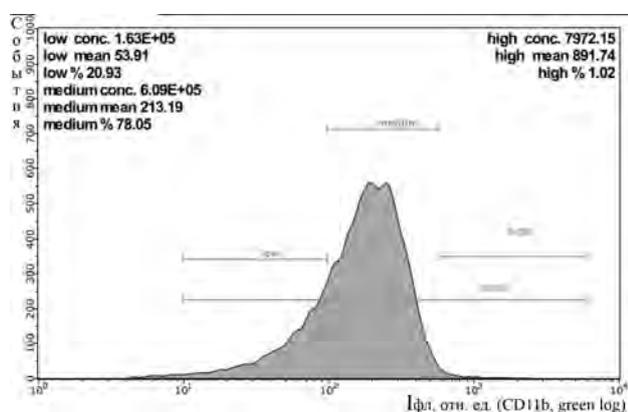


Рис. 2 Распределение количества клеток по уровню экспрессии CD11b рецепторов на поверхности их мембран.

Анализ полученных данных показал, что распределение клеток по представленным трем группам было неоднородно. Таким образом, дальнейший уровень экспрессии CD11b антигенов на поверхности мембран нейтрофилов мы проводили отдельно в каждом из 3-х выделенных пулов клеток.

В первый пул нами были отнесены клетки с исходно низким уровнем экспрессии CD11b, который составил для контрольных образцов  $53.82 \pm 0.18$  отн. ед. (Рис. 3). Модификация образцов нейтрофилов  $\alpha_{2b}$ -интерфероном в концентрации 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл способствовала как снижению уровня экспрессии изучаемого нами мембранного рецептора на 0.74% и 0.78% соответственно, так и количества клеток с интенсивностью флуоресценции данного диапазона на 6.8 % и 13.6% соответственно.

При инкубировании нейтрофилов с интерфероном в концентрации 1МЕ/мл не было выявлено статистически достоверных отличий обоих параметров от контроля.

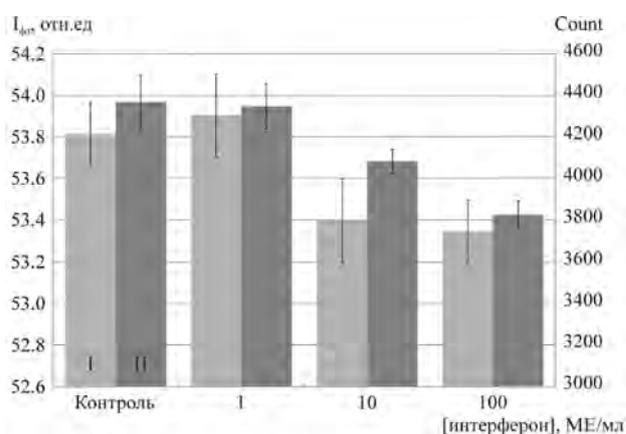


Рис. 3 Динамика интерферон-индуцированного изменения уровня экспрессии CD11b маркеров (I) нейтрофилами крови человека и количества клеток (II) отнесенных к первому пулу.

Во второй пул нами были отнесены клетки со средним уровнем интенсивности регистрируемого параметра (Рис. 4).

При добавлении  $\alpha_{2b}$ -интерферона в концентрации 10МЕ/мл и 100МЕ/мл к образцам данной группы клеток было зарегистрировано повышение интенсивности уровня экспрессии изучаемого антигена на 3.8 % и 6.6 % соответственно. Не было выявлено статистически достоверных отличий изменения количества клеток данного пула от контроля.

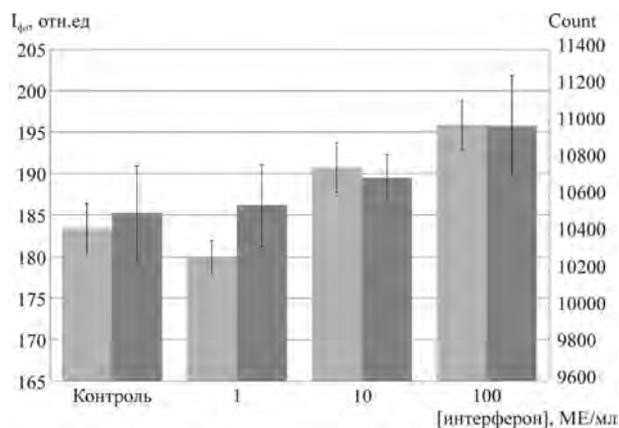


Рис. 4 Динамика интерферон-индуцированного изменения уровня экспрессии CD11b маркеров (I) нейтрофилами крови человека и количества клеток (II) отнесенных ко второму пулу.

К третьему пулу нами были отнесены клетки, несущие на поверхности своих мембран наибольшее количество CD11b маркеров (Рис. 5).

При инкубации иммуноцитов с интерфероном в минимальной используемой концентрации, было обнаружено статистически достоверное отличие снижение как уровня экспрессии исследуемых антигенных детерминант, так и количества клеток данного пула на 7.1 % и 29.1% соответственно. Причиной изменения данных параметров после модификации клеток используемым цитокином, вероятно, связано с совокупностью процессов в клеточных мембранах, приводящих к изменению локального микроокружения исследуемых антигенов и шеддингу их с поверхности мембран.

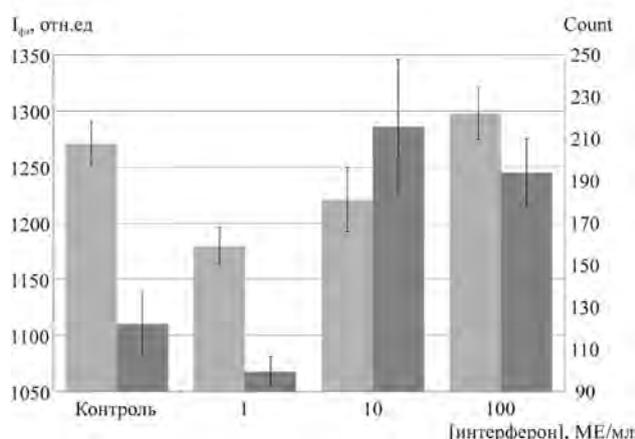


Рис. 5 Динамика интерферон-индуцированного изменения уровня экспрессии CD11b маркеров (I) нейтрофилами крови человека и количества клеток (II) отнесенных к третьему пулу.

При модификации клеток  $\alpha_{2b}$ -интерфероном в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл наблюдали повышение уровня экспрессии CD 11b маркеров до контрольных значений, сопровождающееся значительным (на 86% и 66% соответственно) увеличением числа клеток с данным количеством исследуемых антигенных детерминант на поверхности их мембран.

Таким образом, на основании проведенного нами исследования можно констатировать, что  $\alpha_{2b}$ -интерферон в дозах 10 и 100 МЕ/мл оказывает иммуностимулирующее действие на способность нейтрофилов крови человека реализовывать образование межклеточных контактов. Нами было установлено, что под действием модификатора происходит постепенное увеличение количества экспонированных на поверхности мембран маркеров. Возможными причинами этого могут быть синтез рецепторов *de novo* и разэкранировка предсуществующих на поверхности мембраны молекул, недоступных ранее для используемых антител.

Следовательно, накопление в суспензии клеток с исходно высоким уровнем CD11b, отнесенных нами к третьему пулу, по видимому, будет способствовать увеличению количества клеток, которые потенциально способны презентовать чужеродные антигены Т-лимфоцитам, которые так же оказываются подверженными воздействию изучаемого модификатора [6, 7].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann // *Science*. — Vol. 303. — № 5663. — P. 1532-1535.
2. 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.
3. 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, No 6. — P. 296–300.
4. Колтаков И. А. Уровень экспрессии CD14 антигенов нейтрофилами крови человека в условиях комбинированного воздействия УФ-излучения и  $\alpha_{2b}$ -интерферона / И. А. Колтаков, С. В. Шилов, Е. Н. Леликова, В. Г. Артюхов // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. — 2013. — № 2. — С. 105-109.
5. Шилов С.В. Уровень экспрессии HLA-DR антигенов нейтрофилами крови человека в услови-

ях комбинированного воздействия УФ-излучения и  $\alpha_2\beta$ -интерферона / С. В. Шилов, И. А. Колтаков, Е. Н. Леликова, В. Г. Артюхов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2014. — № 1. — С. 97-101.

6. Колтаков И. А. Исследование структурно-функционального состояния Т-лимфоцитов крови человека при модификации  $\alpha$ -интерфероном и в условиях УФ-облучения: дис. ... канд. биол. наук

*Воронежский государственный университет  
Колтаков И. А., кандидат биологических наук,  
доцент кафедры биофизики и биотехнологии  
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

*Артюхов В. Г., доктор биологических наук,  
профессор, заведующий кафедрой биофизики и  
биотехнологии  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Шилов С. В., аспирант кафедры биофизики и  
биотехнологии*

*Дельцова О. А., студентка 4 курса кафедры  
биофизики и биотехнологии*

*Нгихангва С. М. Л., студентка 4 курса кафе-  
дры биофизики и биотехнологии*

— Воронежский государственный университет.  
— Воронеж, 2007.

7. Артюхов В. Г. Экспрессия CD3-комплексов нативными УФ-облученными Т-лимфоцитами крови человека после их модификации препаратом лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона / В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева, И. А. Колтаков, В. А. Вдовина // Биофизика. — 2009. — Т. 54. — № 2. — С. 252-255

*Voronezh State University  
Koltakov I. A., Ph.D., Associate Professor of  
biophysics and biotechnology  
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

*Artyukhov V. G., Ph.D., Full Professor, Head of  
the Department of Biophysics and Biotechnology  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Shilov S. V., post-graduate student of the  
Department of Biophysics and Biotechnology*

*Deltsova O. A. — 4th year student of the  
Department of Biophysics and Biotechnology*

*Nghihangva S. M. L., 4th year student of the  
Department of Biophysics and Biotechnology*