

ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНТЕРФЕРОНА УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ (240 – 390 НМ) В ДОЗАХ 151 - 1359 ДЖ/М² ОКАЗЫВАЕТ РЕГУЛЯТОРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ Т-ХЕЛПЕРОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

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

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 11.09.2018 г.

Аннотация. В последнее время внимание исследователей направлено на изучение молекулярно-клеточных механизмов функционирования иммунной системы. Это связано с тем, что факторы иммунитета являются основными элементами поддержания гомеостаза организма человека.

Высокая чувствительность иммунокомпетентных клеток к действию разнообразных химических агентов обеспечивает тонкую регуляцию иммунной системы *in vivo*, а также возможность разработки новых способов лечения патологических состояний. Однако наибольший интерес представляет выяснение механизмов саморегуляции, поскольку большое разнообразие естественных иммуномодуляторов (цитокины, гормоны, неспецифические регуляторы) и разнонаправленный эффект их влияния открывают широкие перспективы для иммунокорректирующей терапии.

Известно, что индивидуальное использование для модификации иммунокомпетентных клеток УФ-света или лекарственного препарата (человеческий лейкоцитарный α -интерферон) оказывает иммуностимулирующее влияние на экспрессию CD3 комплексов Т-лимфоцитами. Проведенное нами исследование показало, что сочетанное воздействие этих иммунорегуляторов может нивелировать действие друг друга.

Изучение индуцированных α -интерфероном изменений уровня экспрессии CD 3 комплексов и CD 4 маркеров, за счет которых реализуется способность Т-лимфоцитов распознавать чужеродные антигены, важно при рассмотрении вопросов, связанных с вкладом отдельных субпопуляций клеток в реализацию иммунного ответа на чужеродное воздействие.

Полученные нами данные о влиянии УФ-света и α -интерферона на уровень экспрессии CD3 комплексов и CD4 антигенов, отражающих антигенраспознающую способность Т-лимфоцитов крови человека, имеют важное значение в клинической практике для прогноза ожидаемых эффектов при совместном проведении АУФОК- и цитокинотерапии у больных с различной патологией.

Ключевые слова: Интерферон, лимфоциты, иммуноферментный анализ, проточная цитфлуориметрия

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 [2]. 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 [3]. Так, гриппоподоб-

ный синдром, вызываемый интерфероном, может отрицательно влиять на сердечно-сосудистую систему, почки и ЦНС [4-7]. Антипролиферативный эффект цитокина затрагивает систему кроветворения [8], слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [9] и внутренних органов [10], а во взаимодействии с опитными рецепторами может привести к нейротоксичности и дисфункции ЦНС [11-13].

При лечении ряда патологий, сопровождающихся значительной интоксикацией организма и иммунодефицитными состояниями, активно используется сочетанное воздействие УФ-облучения

и фармакологических препаратов на иммунокомпетентные клетки [14-17], это позволяет использовать с лечебной целью активированные вне организма аутогенные клетки-регуляторы иммунной системы [18], а также снизить дозы используемых лекарств.

В связи с этим определенным практический интерес представляет подбор условий интерферонотерапии, при которых уменьшение используемой концентрации цитокина позволило бы сохранить его максимальный положительный биологический эффект.

Для решения поставленной задачи нами были проведены модельные эксперименты по изучению влияния нативного и УФ-облученного интерферона на экспрессию CD 3 комплексов и CD 4 маркеров нативными и фотомодифицированными лимфоцитами крови человека

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на изолированных лимфоцитах крови человека. Изучаемые клетки выделяли на градиенте плотности фиколл-урографина по методу Boum et al. [19], а разделение Т-клеток на субпопуляции осуществляли на колонках с нейлоновой ватой по методу Terasaki [20].

Жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии в тесте с набором Guava ViaCount (Millipore), а чистоту клеточной взвеси в тесте с набором Guava T-cells kit (Millipore). В работе использовались образцы клеток с чистотой не менее 89% и жизнеспособностью более 97%.

Т-лимфоциты модифицировали растворами человеческого лейкоцитарного α -интерферона («Иммунопрепарат», Уфа) по следующей схеме. К 0.2 мл суспензии Т-клеток ($1 \cdot 10^5$ клеток/мл) добавляли 0.2 мл цитокина в концентрациях 0.1; 1; 10; 100 или 1000 МЕ/мл, доводили объем образца до 2 мл и инкубировали при 37 °С в термостате ТС-80М в течение 24 часов. Конечная концентрация модификатора в инкубационной среде составляла 0.01; 0.1; 1; 10 и 100 МЕ/мл.

Полученные суспензии Т-лимфоцитов в объеме 3 мл облучали с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в термостатированной кювете (37 °С) при постоянном перемешивании магнитной мешалкой типа ММ6. Интенсивность облучения составляла $151 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$ на расстоянии 0.23 м до объекта. Образцы суспензий клеток облучали в течение 1, 3, 6 и 9 мин, что соответствовало дозам 151; 453; 906 и $1359 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$.

Для изучения совместного действия УФ-излучения и α -интерферона на лимфоциты, модификацию клеток проводили по следующей схеме:

1) лимфоциты, облученные УФ-светом в дозах $151 \div 1359 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$, инкубировали в течение 24 ч с препаратом α -интерферона в концентрациях 0,01 \div 100 МЕ/мл;

2) лимфоциты инкубировали в течение 24 ч с препаратом α -интерферона, облученным УФ-светом в дозах $151 \div 1359 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$;

3) фотомодифицированные в дозах $151 \div 1359 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$ лимфоциты инкубировали в течение 24 ч с α -интерфероном, облученным УФ-светом в тех же дозах.

Для определения уровня экспрессии CD 3 и CD 4 маркеров использовали моноклональные антитела LT3 и LT4 и конъюгат к ним - козьи антитела против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена («Сорбент», Москва). Результаты экспериментов выражали в единицах оптической плотности.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием модуля статистического анализа Microsoft office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии CD3 комплексов на поверхности мембран нативных Т-клеток составил $0.203 \div 0.003$ ед. опт. пл.

Термостатирование клеток с α -интерфероном в диапазоне концентраций 0.01–100 МЕ/мл увеличивало уровень ИФА-сигнала на 16 - 76 % относительно контроля во всем диапазоне используемых концентраций цитокина (рис. 1а).

Облучение Т-лимфоцитов УФ-светом в минимальной дозе ($151 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$) повышало количество изучаемых антигенов на мембранах Т-клеток до величины $0.235 \div 0.005$ ед. опт. пл. (на 16 % относительно контроля). Последующая инкубация фотомодифицированных лимфоцитов с α -интерфероном в концентрациях 1 и 10 МЕ/мл способствовала снижению уровня экспрессии CD3 комплексов на 15 и 20 % , а в концентрации 100 МЕ/мл – увеличению количества данного антигена на 26 % по сравнению с облученными Т-лимфоцитами. Модификация УФ-облученных клеток цитокином в концентрациях 0.01 и 0.1 МЕ/мл не приводила к статистически достоверным отличиям по сравнению с облученными образцами.

После воздействия на Т-клетки УФ-излучения в дозе $453 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$ наблюдалось повышение уровня экспрессии CD3 комплексов на 14% до 0.232 ± 0.008 ед. опт. пл. Последующее добавление интерферона

к фотомодифицированным Т-клеткам в концентрациях 0.01–10 МЕ/мл вызывало уменьшение уровня CD3 комплексов на 9–20 % по сравнению с облученными лимфоцитами, а в концентрации 100 МЕ/мл не оказывало статистически достоверного влияния на исследуемый показатель.

Облучение Т-клеток УФ-светом в дозе 906 Дж/м² увеличивало уровень экспрессии изучаемого антигена на поверхности их мембран до 0.240 ± 0.009 ед. опт. пл. (на 18 %). Следующая за фотомодификацией лимфоцитов инкубация с α -интерфероном приводила к дальнейшему усилению ИФА-сигнала на 15 - 56 % при всех используемых концентрациях цитокина.

Воздействие максимальной из используемых нами доз облучения (1359 Дж/м²) на Т-клетки доноров резко снижало количество изучаемых антигенов на их мембране до величины 0.175 ± 0.006 ед. опт. пл. Инкубация этих образцов со всеми концентрациями цитокина вызывала значительный рост уровня ИФА-сигнала от 66 до 121 % по сравнению с облученными Т-клетками, что свидетельствует о стимулирующем влиянии α -ИФН на экспрессию CD3 молекул фотомодифицированными лимфоцитами.

Таким образом, нами было установлено, что изучаемый цитокин в концентрациях 0.01 ± 100 МЕ/мл нивелирует иммунодепрессивное действие максимальной дозы УФ-излучения (1359 Дж/м²), способствуя восстановлению и многократному возрастанию уровня экспрессии CD3 комплексов на поверхности мембран Т-лимфоцитов.

Для расширения представлений о совместном влиянии УФ-излучения и α -интерферона на механизмы регуляции протекания иммунных реакций нами была проведена оценка количественного содержания молекул CD 4 антигенов, экспрессиро-

ванных на поверхности мембран субпопуляции Т-хелперов и выполняющих функцию корцептора Т-клеточного рецептора для антигена.

Уровень экспрессии CD 4 маркеров на поверхности мембран нативных Т-клеток составил 0.203 ± 0.008 ед. опт. пл. (рис. 1б). Инкубация Т-клеток с α -интерфероном в диапазоне концентраций 0.01 – 1 МЕ/мл вызывала повышение оптической плотности исследуемых образцов на 17 – 22 % относительно контроля. Максимальная из используемых нами концентраций интерферона – 100 МЕ/мл, снижала уровень экспрессии CD4 антигенов на 23 %. При модификации клеток цитокином в концентрации 10 МЕ/мл не было выявлено статистически достоверных отличий тестируемого показателя.

При облучении Т-лимфоцитов УФ-светом в дозе 151 Дж/м² количество изучаемых антигенов на мембранах Т-клеток повышалось на 22 % и составило 0.247 ± 0.012 ед. опт. пл. Последующая инкубация фотомодифицированных Т-лимфоцитов с интерфероном в концентрациях 0.1 и 1 МЕ/мл приводила к повышению уровня экспрессии CD4 антигенов на 21 и 12 % соответственно. Модификация УФ-облученных клеток цитокином в концентрациях 0.01; 10 и 100 МЕ/мл не вызывала статистически достоверных отличий исследуемого показателя от такового у облученных Т-клеток.

Доза УФ-облучения 453 Дж/м² приводила к увеличению уровня экспрессии CD 4 маркеров на 32 %. Последующее добавление интерферона в концентрациях 0.01 ÷ 1 МЕ/мл уменьшало исследуемый параметр на 22 – 36 %, а в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл - не приводило к его статистически достоверным изменениям.

Облучение Т-клеток УФ-светом в дозе 906 Дж/м² увеличивало уровень ИФА-сигнала исследуемых образцов до 0.242 ± 0.014 ед. опт. пл. (на 19 %). Последующее добавление интерферона в концентрации

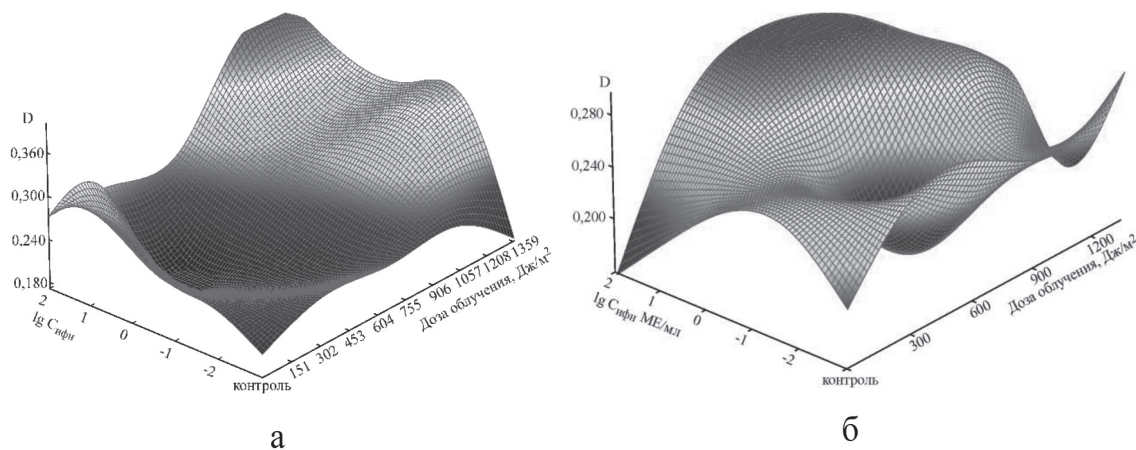


Рис. 1. Динамика изменения уровня экспрессии CD 3 (а) и CD 4 (б) маркеров нативными и фотомодифицированными Т-лимфоцитами крови человека, инкубированными с α -интерфероном

0.01 МЕ/мл вызывало уменьшение исследуемой величины на 12 %, а в дозе 10 МЕ/мл – наоборот, повышение уровня экспрессии CD4 антигенов на 23 %.

Максимальная из используемых доз облучения 1359 Дж/м² увеличивала уровень экспрессии изучаемых антигенов на 35 %. Последующая инкубация облученных образцов с цитокином в концентрациях 0.01; 1; 10 и 100 МЕ/мл снижала уровень ИФА-сигнала на 37, 20, 27 и 19 % соответственно по отношению к облученным Т-клеткам.

Поскольку в молекулах всех 14 подтипов α-интерферона на долю ароматических и серосодержащих аминокислотных остатков, которые могут выступать в качестве потенциальных акцепторов УФ-излучения, приходится от 11 до 14 %, то в процессе проведения АУФОК-терапии эти белки претерпевают цепь сложных фотохимических превращений, затрагивающих все уровни пространственной организации белковой глобулы и изменяющих их конформацию и способность взаимодействовать с мембранными структурами иммунокомпетентных клеток (Таблица 1). Поэтому нами было исследовано влияние УФ-облученного в дозах 151 ÷ 1359 Дж/м² α-интерферона на уровень экспрессии CD 3 комплексов Т-лимфоцитами крови. Количество исследуемых антигенных детерминант на поверхности мембран нативных Т-клеток равнялось 0.203 ± 0.003 ед. опт. пл..

Инкубация Т-клеток с нативным интерфероном во всем диапазоне концентраций приводила к увеличению уровня экспрессии CD3 комплексов на поверхности мембран от 0.236 ± 0.002 ед. опт.

пл. до 0.358 ± 0.009 ед. опт. пл.

Было установлено, что внесение в суспензию лимфоцитов облученного УФ-светом в дозе 151 Дж/м² α-интерферона в концентрациях 0.01 – 10 МЕ/мл вызывало повышение экспрессии CD3 комплексов от 10 до 25 % по сравнению с лимфоцитами, модифицированными нативным α-интерфероном в тех же концентрациях (рис. 2а).

Термостатирование образцов Т-клеток с фотомодифицированным в дозе 453 Дж/м² интерфероном в концентрации 0.01 МЕ/мл увеличивало уровень ИФА-сигнала на 9 %, а в концентрациях 1 и 10 МЕ/мл – снижало на 18 и 23 %. При использовании УФ-облученного интерферона в концентрациях 0.1 и 100 МЕ/мл не было выявлено статистически достоверных отличий от контроля.

Инкубация лимфоцитов с интерфероном, облученным УФ-светом в дозе 906 Дж/м² в концентрациях 1 – 10 МЕ/мл, способствовала уменьшению оптической плотности тестируемых образцов на 22 и 37 %, а в концентрации 100 МЕ/мл – ее повышению на 25 %.

α-интерферон (0.01 – 100 МЕ/мл), модифицированный максимальной, из используемых нами, дозой облучения (1359 Дж/м²), оказывал негативное воздействие на изменение уровня экспрессии лимфоцитами изучаемых нами маркеров, уменьшая оптическую плотность тестируемых образцов на 5 – 34 %.

Таким образом, молекулы интерферона, облученные малой дозой УФ-света (151 Дж/м²),

Таблица 1.

Количественное содержание аминокислот в полипептидных цепях α-интерферонов

Аминокислоты	Тип интерферона													
	a1a	a1b	a2a	a2b	a2c	a4	a5	a6	a7	a8	a14	a16	a17	a21
Ala	10	9	8	8	8	9	8	8	9	9	9	12	9	9
Arg	12	12	9	10	11	11	11	15	12	10	11	10	10	10
Asn	6	6	4	4	4	5	6	5	5	4	9	6	7	6
Asp	11	11	8	8	8	8	10	9	7	11	7	10	7	7
Cys	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Gln	10	10	12	12	12	13	13	12	12	13	13	13	14	14
Glu	15	15	14	14	14	15	13	14	17	15	15	11	15	15
Gly	3	3	5	5	5	5	4	4	4	2	2	7	5	5
His	3	3	3	3	2	5	3	4	4	3	3	3	3	3
Ile	7	7	8	8	8	8	7	6	8	10	7	9	9	9
Leu	22	22	21	21	21	20	18	20	19	21	18	18	21	19
Lys	8	8	11	10	10	8	8	8	9	10	10	9	8	10
Met	6	6	5	5	5	4	8	6	5	5	9	5	5	4
Phe	8	8	10	10	10	10	10	9	12	10	11	13	9	11
Pro	6	6	5	5	5	4	5	4	5	4	4	3	5	5
Ser	13	13	14	14	14	14	13	13	13	16	13	12	14	14
Thr	9	9	10	10	10	9	11	8	8	6	8	7	9	8
Trp	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2
Tyr	4	4	5	5	5	4	5	5	4	4	4	5	4	3
Val	6	7	7	7	7	8	7	9	7	7	7	7	6	8

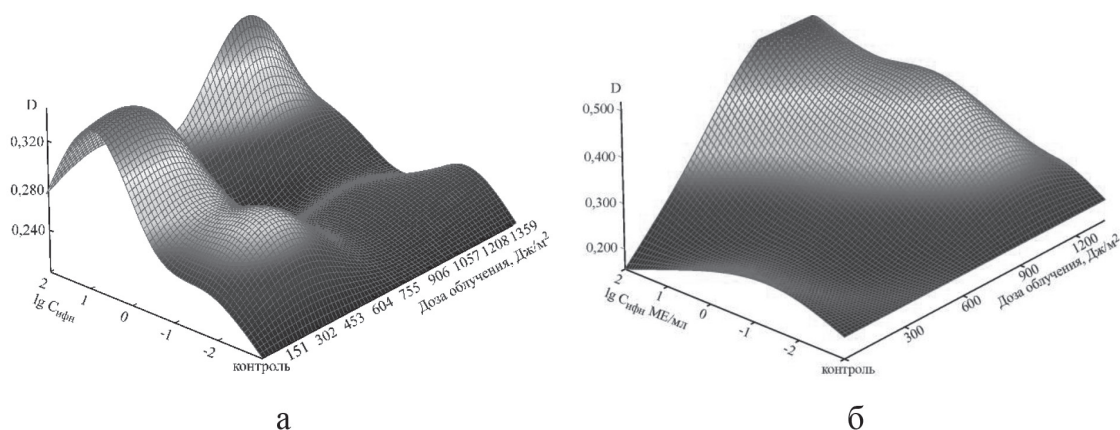


Рис. 2. Динамика изменения уровня экспрессии CD 3 (а) и CD 4 (б) маркеров Т-лимфоцитами крови человека, инкубированными с УФ-облученным α -интерфероном

оказывали стимулирующее действие на экспрессию CD3 комплексов на поверхности лимфоцитарных мембран, тем самым способствуя усилению эффективности распознавания чужеродных антигенов Т-лимфоцитами крови человека при их взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками. После модификации интерферона большими дозами УФ-излучения (453 и 906 Дж/м²) происходит ослабление иммуностимулирующего действия препарата интерферона.

Аналогично исследованиям с CD3 комплексами, нами была проведена серия экспериментов по изучению влияния препарата человеческого лейкоцитарного интерферона, облученного УФ-светом (240–390 нм) в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м², на уровень экспрессии CD4 антигенов на поверхности нативных Т-лимфоцитов крови человека.

Было установлено, что облученный малой дозой УФ-света (151 Дж/м²) интерферон в концентрациях 0,01 – 10 МЕ/мл снижает на 18–19 %, а в концентрации 100 МЕ/мл – наоборот, повышает экспрессию CD4 антигенов по сравнению с лимфоцитами, модифицированными нативным α -интерфероном, на 24 % (рис. 2б).

Использование α -интерферона, облученного УФ-светом в дозе 453 Дж/м², в концентрации 0,01 МЕ/мл вызывало снижение на 22 %, а в концентрациях 1 – 100 МЕ/мл – увеличение уровня экспрессии данного антигена на 11 – 180 % соответственно по сравнению с лимфоцитами, модифицированными необлученным α -интерфероном в тех же концентрациях.

Инкубирование Т-лимфоцитов с фотомодифицированным в дозе 906 Дж/м² цитокином в концентрациях (0,01 – 100 МЕ/мл) увеличивало уровень исследуемого показателя от 26 до 224 % относительно образцов, термостатированных с

нативным α -интерфероном.

Модификация лимфоцитов облученным максимальной дозой УФ-света (1359 Дж/м²) интерфероном в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл приводила к увеличению уровня регистрируемого показателя на 26 и 28 %, а в концентрации 1 МЕ/мл – к его снижению на 11 %.

Таким образом, молекулы интерферона (0,01–10 МЕ/мл), облученные малой дозой УФ-света (151 Дж/м²), оказывают угнетающее действие на Т-лимфоциты, понижая их антигенраспознающую способность. После фотомодификации интерферона большими дозами УФ-излучения (453–1359 Дж/м²) его иммуномодулирующее действие на Т-лимфоциты резко возрастает, особенно при дозе 906 Дж/м², что приведет к усилению участия Т-хелперов в регуляции и реализации иммунного ответа организма.

Следующим этапом работы явилось исследование влияния фотомодифицированного α -интерферона на экспрессию CD 3 комплексов УФ-облученными Т-лимфоцитами крови человека. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 3 (а).

Уровень экспрессии CD3 комплексов на поверхности мембран нативных Т-клеток составил 0.203 ± 0.003 ед. опт. пл.

Было установлено, что термостатирование лимфоцитов, модифицированных малой дозой УФ-света (151 Дж/м²) с интерфероном (0,01; 10 и 100 МЕ/мл), облученным той же дозой, снижало уровень экспрессии CD3 комплексов на 13, 22 и 7 % соответственно по сравнению с облученными клетками.

Инкубация лимфоцитов, модифицированных УФ-светом в дозе 453 Дж/м², с облученным интерфероном в концентрациях 0,01 и 1 МЕ/мл способствовала снижению уровня регистрируемого по-

казателя на 9 и 19 %, а в концентрации 100 МЕ/мл – повышению на 25 %. Таким образом, после инкубации интерферона (0.01 МЕ/мл), облученного УФ-светом в дозах 151 и 453 Дж/м², с фотомодифицированными теми же дозами Т-лимфоцитами уровень экспрессии CD3 комплексов на поверхности иммунокомпетентных клеток снижался до контрольных показателей, т.е. воздействие вышеуказанной концентрации цитокина полностью нивелировало иммуностимулирующий эффект УФ-излучения.

Добавление в суспензию облученных большими дозами УФ-света (906 и 1359 Дж/м²) лимфоцитов α -интерферона, облученного теми же дозами ультрафиолета во всем используемом диапазоне концентраций (0.01–100 МЕ/мл), приводило к увеличению уровня экспрессии CD3 комплексов от 18 до 118 % по сравнению с облученными клетками.

Последним этапом нашего исследования было изучение уровня экспрессии CD 4 комплексов на поверхности мембран фотомодифицированных Т-лимфоцитов крови человека, инкубированных с УФ-облученным в тех же дозах α -интерфероном.

Было установлено, что взаимодействие лимфоцитов, модифицированных УФ-светом в дозах 151 и 906 Дж/м², с интерфероном (0.01, 1, 10 и 100 МЕ/мл), облученным теми же дозами, сопровождалось снижением уровня экспрессии CD4 антигенов на поверхности Т-клеток от 12 до 41 % (рис. 3б).

Термостатирование лимфоцитов, модифицированных УФ-светом в дозе 453 Дж/м², с облученным интерфероном в концентрациях 0,1 и 100 МЕ/мл способствовало снижению уровня экспрессии исследуемого показателя на 15 и 16 % соответственно.

Инкубация лимфоцитов, модифицированных большой дозой УФ-света (1359 Дж/м²) с интерфе-

роном, облученным той же дозой ультрафиолета в концентрациях 0.01; 0.1; 1 и 100 МЕ/мл, приводила к снижению на 18 – 49 %, а в концентрации 10 МЕ/мл – к увеличению уровня экспрессии исследуемых антигенных детерминант на 85 % по сравнению с облученными клетками.

Для сопоставления характера изменения уровня экспрессии CD 3 и CD 4 маркеров на поверхности мембран УФ- и цитокинмодифицированных лимфоцитов нами были рассчитаны коэффициенты корреляции. Положительные значения коэффициента корреляции при взаимодействии УФ-облученных в дозах 453 и 906 Дж/м² клеток с цитокином (0.889 и 0.480 соответственно) указывают на высокую и среднюю степень прямой зависимости между исследуемыми параметрами. Подобную картину мы наблюдаем и при действии подвергнутого УФ-облучению в дозах 453 и 906 Дж/м² препарата α -интерферона на нативные лимфоциты (0.536 и 0.642).

В случае инкубации лимфоцитов с α -интерфероном после их фотомодификации одинаковыми дозами УФ-света положительная корреляция изменения уровня экспрессии исследуемых маркеров, равная 0.605, была выявлена при использовании дозы УФ-света, равной 151 Дж/м². В остальных случаях имеет место отрицательная обратная зависимость между числом CD 3 и CD 4 молекул на поверхности мембран Т-лимфоцитов, свидетельствующая о частичной компенсации повышения или снижения активности TCR за счет вспомогательной корцепторной молекулы CD 4, которая регулирует пороговое значение количества антигена, необходимого для успешной активации Т-клеток и запуска иммунных процессов, направленных на его элиминацию из организма.

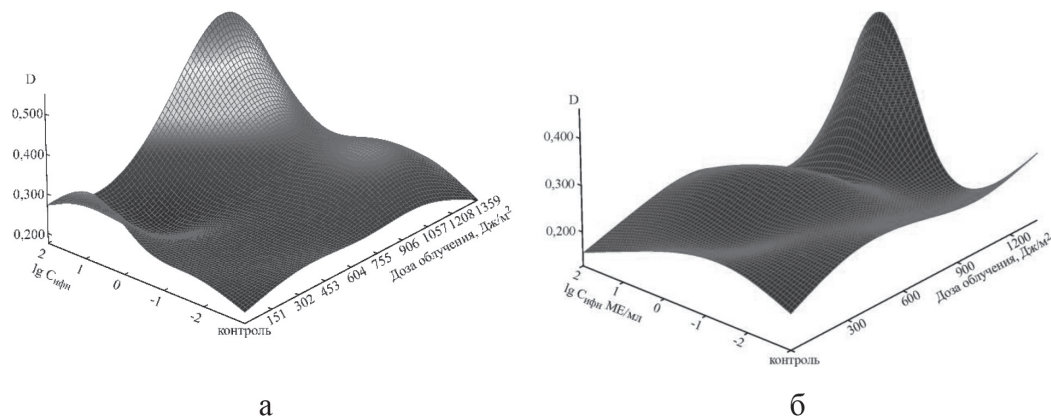


Рис. 3. Динамика изменения уровня экспрессии CD 3 (а) и CD 4 (б) маркеров нативными и фотомодифицированными Т-лимфоцитами крови человека, инкубированными с УФ-облученным α -интерфероном

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование комбинированного воздействия препарата человеческого лейкоцитарного α -интерферона (0.01 – 100 МЕ/мл) и УФ-излучения (240 – 390 нм) в дозах 151 – 1359 Дж/м² на экспрессию CD 3 и CD 4 маркеров Т-лимфоцитами крови человека позволило установить следующее.

Облучение Т-клеток УФ-светом в малых и средних дозах (151 - 906 Дж/м²) индуцирует возрастание, а в большой дозе 1359 Дж/м² – снижение количества CD3 комплексов на их поверхности. Введение исследуемого цитокина (0.01–100 МЕ/мл) в суспензии фотомодифицированных в дозе 1359 Дж/м² лимфоцитов нивелирует иммунодепрессивное действие этой дозы УФ-излучения и вызывает увеличение уровня экспрессии CD3 комплексов на поверхности мембран облученных Т-лимфоцитов, тем самым способствуя восстановлению и многократному повышению их функциональной активности.

Несмотря на то, что индивидуальное использование для модификации иммунокомпетентных клеток УФ-света или лекарственного препарата (человеческий лейкоцитарный α -интерферон) оказывает иммуностимулирующее влияние на экспрессию CD3 комплексов Т-лимфоцитами, их сочетанное воздействие может нивелировать действие друг друга. Это необходимо учитывать в клинической практике при назначении больным цитокинов группы интерферонов после проведения сеансов АУФОК-терапии.

Изучение влияния фотомодифицированного интерферона на антигенраспознающую функцию нативных и фотомодифицированных в тех же дозах Т-лимфоцитов выявило, что ответная реакция CD 3 комплексов и CD 4 корецептора на воздействие фотомодифицированного интерферона (0.01 – 10 МЕ/мл) противоположна. Так, облученные малой дозой УФ-света (151 Дж/м²) молекулы интерферона оказывают разнонаправленное действие на мембраны Т-лимфоцитов: происходит увеличение уровня экспрессии CD3 комплексов и снижение экспрессии CD4 антигенов. Инкубация лимфоцитов с цитокином в концентрациях 1 и 10 МЕ/мл, модифицированным УФ-светом в дозах 453 и 906 Дж/м², приводит к снижению экспрессии CD3 комплексов и увеличению экспрессии CD 4 антигенов. Таким образом, УФ-облученный α -интерферон в концентрациях 1 и 10 МЕ/мл оказывает иммуномодулирующее действие на уровень экспрессии изучаемых антигенов.

После инкубации интерферона (0.01 МЕ/мл), облученного УФ-светом в дозах 151 и 453 Дж/м², с фотомодифицированными теми же дозами Т-лимфоцитами, количество CD 3 комплексов на

поверхности иммунокомпетентных клеток снижалось до контрольных показателей, т.е. в отсутствие вышеуказанной концентрации цитокина полностью нивелировало иммуностимулирующий эффект УФ-излучения.

Инкубация лимфоцитов, модифицированных большими дозами УФ-света (906 и 1359 Дж/м²), с интерфероном, облученным теми же дозами ультрафиолета во всем используемом диапазоне концентраций (0.01–100 МЕ/мл) приводила к увеличению уровня экспрессии CD3 комплексов по сравнению с таковыми для облученных без цитокина Т-клетками.

Наблюдаемый эффект определяется концентрацией фотомодифицированного α -интерферона, поэтому при проведении АУФОК-терапии необходимо учитывать уровень цитокинов, находящихся в сыворотке крови больных, т.к. от их концентрации зависит конечный результат воздействия квантов УФ-света на состояние мембран иммунокомпетентных клеток, а, следовательно, и их способность выполнять свои иммунологические функции.

Основным механизмом, приводящим к фотоиндуцируемым перестройкам рецепторного материала, являются процессы ПОЛ и ПФОЛ, накопление АФК и токсичных продуктов, что способствует частичной деструкции биомембраны и фотоальтерации гликокаликса, то есть десорбции антигенных детерминант с клеточной поверхности и демаскировки предрасположенных в толще мембраны антигенных структур, ранее не доступных для определения [21].

Таким образом, уровень экспрессии изучаемых рецепторов на мембранах Т-лимфоцитов в условиях проведенных экспериментов находится в сложной зависимости от применяемых модификаторов. Он определяется как дозой УФ-света, так и концентрацией α -интерферона.

Изменение состояния компонентов иммунной системы, вследствие УФ-модификации, неизбежно будет отражаться на их функциональной активности (степень ответа на чужеродный антиген, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов, кооперативные взаимодействия иммунокомпетентных клеток, процессы антителозависимой клеточной цитотоксичности и др.).

В связи с этим открываются широкие перспективы для регуляции активности Т-клеточного звена иммунитета комбинированным действием УФ-излучения и естественных модуляторов (α -интерферон), так как использование фотомодификации крови может способствовать повышению эффективности цитокинотерапии при лечении патологий различной степени

тяжести и снижению вероятности развития отрицательных побочных эффектов.

Полученные нами данные о влиянии УФ-света и α -интерферона на уровень экспрессии CD3 комплексов и CD4 антигенов, отражающих антигенраспознающую способность Т-лимфоцитов крови человека, имеют важное значение в клинической практике для прогноза ожидаемых эффектов при совместном проведении АУФОК- и цитокинотерапии у больных с различной патологией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева Ж.И. // Вестник дерматол. и венерологии. 1990. №7, С. 7-12.
2. Алферов В.П., Ариненко Р. Ю., Аникин В. Б. // Рос. сем. врач. 1998. №1, С. 35-41.
3. Прозоровский Н.С. // Иммунология. 1992. № 2, С. 19-21.
4. Волкова М.А. // Гематология и трансфузиология. 1999. №4, С. 32-36.
5. Смородинцев А.А. Л.: Наука. 1985., 23 с.
6. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. М.: Медицина. 1981, 400 с.
7. Ершов Ф.И. // Вопр. вирусологии. 1998. №6., С. 247-252.
8. Наровлянский А.Н. // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1989. № 5, С. 38-41.
9. Ершов Ф.И., Киселев О.И. М.: Гэотар-Медиа. 2005, 368 с.
10. Малашенкова И.К. // Терапевт. архив. 1998. №11, С. 35-39.
11. Лосева Е. В. // Журнал высшей нервной деятельности. 2009. том 59. No 4, С. 461–472
12. Лосева Е. В., Логинова Н. А., Акмаев И. Г. // Успехи физиологических наук. 2008. Том 39. N 2, С. 32-46.
13. Кузнецов В.П. // Иммунология. 1987. №4, С. 30-34.
14. Олейникова Е. А. // Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. Л. 1986, С. 103-109
15. Михилева Е. А. Модуляция физико-химическими агентами структурно-функционального состояния нейтрофилов крови человека: диссертация . канд. биол. наук : 03.00.02 / Е.А. Михилева Воронеж. 2006, 201 с.
16. Савостина И.Е. Исследование влияния УФ-света и иммуномодуляторов на антиоксидантный статус и состояние мембран лейкоцитов: диссертация канд. биол. наук : 03.00.02 / И.Е. Савостина. Воронеж. 2005, 202 с.
17. Крыленков В.А. // ДАН СССР. 1983. №5, С. 242-246.
18. Frick G. Munchen: Hans Muller Verlag. 1993., S. 89.
19. Voym A. // Tissue antigens. 1974. № 4. P. 269-274.
20. Земсков А.М., Войтекунас Е.Б., Никитин А.В. Воронеж. 1988, С. 11-26.
21. Fridman W. // FASEB J. 1991. Vol. 5, P. 2684-2689.

Воронежский Государственный Университет
*Колтаков И.А., канд. биол. наук., доцент кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии
Тел.: +7 (473) 220-89-81
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Путинцева О. В., доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии

Voronezh State University
*Koltakov I. A., PhD., Associate Professor, Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., PhD, DSci., Full Professor, Head of the Biophysics and Biotechnology department
Ph.: +7 (473) 220-89-81
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Putintseva O. V., PhD., DSci., Full Professor, Department of Biophysics and Biotechnology

THE PHOTOMODIFICATION OF HUMAN LEUKOCYTE INTERFERON BY UV RADIATION (240–390 NM) AT DOSES OF 151–1359 J/M² HAS A REGULATORY EFFECT ON THE ANTIGEN RECOGNITION ABILITY OF HUMAN T-HELPERS

I. A. Koltakov, V. G. Artyukhov, O. V. Putintseva

Voronezh State University

Abstract. Recently, the attention of researchers focused on the study of molecular-cellular mechanisms of the immune system. This is due to the fact that immunity factors are the main elements of maintaining

homeostasis of the human body. The high sensitivity of immunocompetent cells to the action of various chemical agents provides for fine regulation of the immune system *in vivo*, as well as the possibility of developing new methods for treating pathological conditions. However, the most interesting is the elucidation of the mechanisms of self-regulation, since a large variety of natural immunomodulators (cytokines, hormones, nonspecific regulators) and the multidirectional effect of their influence open up broad prospects for immunocorrective therapy.

It is known that individual use of UV light or a drug (human leukocyte α -interferon) to modify immunocompetent cells has an immunostimulating effect on the expression of CD3 complexes by T-lymphocytes. Our study showed that the combined effects of these immunoregulators can level the effects of each other.

The study of α -interferon-induced changes in the expression level of CD 3 complexes and CD 4 markers, which realize the ability of T-lymphocytes to recognize foreign antigens, is important when considering issues related to the contribution of individual subpopulations of cells to the implementation of the immune response to foreign effects.

Our findings on the effect of UV light and α -interferon on the expression level of CD3 complexes and CD4 antigens, reflecting the antigen recognition ability of human T-lymphocytes, are important in clinical practice for predicting the expected effects of autotransfusion of UV irradiated blood and cytokine therapy in patients with various pathologies.

Keywords: interferon, lymphocytes, enzyme-linked immunosorbent assay, flow cytometry

REFERENCES

1. Avdeyeva Zh.I. Vestnik dermatol. i venerologii. 1990. №7, S. 7-12.
2. Alferov V.P., Arinenko R. Yu., Anikin V. B. Ros. sem. vrach. 1998. №1, S. 35-41.
3. Prozorovskiy N.S. Immunologiya. 1992. № 2, S. 19-21.
4. Volkova M.A. Gematologiya i transfuziologiya. 1999. №4, S. 32-36.
5. Smorodintsev A.A. L.: Nauka. 1985., 23 s.
6. Solov'yev V.D., Bektemirov T.A. M.: Meditsina. 1981., 400 s.
7. Yershov F.I. Vopr. virusologii. 1998., №6., S. 247-252.
8. Narovlyanskiy A.N. Mol. genetika. mikrobiologiya i virusologiya. 1989. № 5, S. 38-41.
9. Yershov F.I., Kiselev O.I. M.: Geotar-Media, 2005., 368 s.
10. Malashenkova I.K. Terapevt. arkhiv. 1998. №11, S. 35-39.
11. Loseva Ye. V. Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti. 2009. tom 59. No 4, s. 461-472
12. Loseva Ye. V., Loginova N. A., Akmayev I. G. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2008. Tom 39, N 2. S. 32-46.
13. Kuznetsov V.P. Immunologiya. 1987. №4. S. 30-34.
14. Oleynikova Ye. A. Mekhanizmy vliyaniya obluchennoy ul'trafiolotovymi luchami krovi na organizm cheloveka i zhivotnykh. L. 1986, S. 103-109.
15. Mikhileva Ye. A. Modulyatsiya fiziko-khimi-cheskimi agentami strukturno-funktsional'nogo sostoyaniya neytrofilov krovi cheloveka: dissertatsiya. kand. biol. nauk : 03.00.02. Ye.A. Mikhileva Voronezh. 2006, 201 s.
16. Savostina I.Ye. Issledovaniye vliyaniya UF-sveta i immunomodulyatorov na antioksidantnyy status i sostoyaniye membran leykotsitov: dissertatsiya kand. biol. nauk : 03.00.02. I.Ye. Savostina. Voronezh. 2005, 202 s.
17. Krylenkov V.A. DAN SSSR. 1983. №5, S. 242-246.
18. Frick G. Munchen: Hans Muller Verlag. 1993., S. 89.
19. Boym A. Tissue antigens. 1974. № 4., P. 269-274.
20. Zemskov A.M., Voytekunas Ye.B., Nikitin A.V. Voronezh. 1988., S. 11-26.
21. Fridman W. FASEB J. 1991. Vol. 5, P. 2684-2689.