

О РЕГУЛЯЦИИ ИНТЕРФЕРОНАМИ КЛЮЧЕВЫХ ФУНКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

И. А. Колтаков, Е. В. Шилова, К. Ю. Синюкова, А. Я. Гокбаева,
В. А. Рябова, С.О. Янкова, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 15.12.2020 г.

Аннотация. Исследование молекулярно-клеточных механизмов функционирования иммунной системы в последние десятилетия особо сильно притягивает внимание исследователей. Это связано с тем, что факторы иммунитета являются основными элементами поддержания гомеостаза организма человека. Выяснение детальных механизмов саморегуляции работы иммунной системы цитокинами, гормонами, и другими неспецифическими регуляторами и разнонаправленный эффект их действия открывают широкие перспективы для иммунокорректирующей терапии.

Некоторые цитокины и, в частности, интерфероны стали использоваться в качестве высокоэффективных естественных лекарственных препаратов. Тем не менее, несмотря на большие перспективы использования α -интерферона в клинической практике, необходимо решить проблемы, связанные с трудностью подбора максимально эффективных для каждого пациента концентраций, контроля реакции организма на введение цитокина и прогнозирования результатов лечения на ранних этапах [4, 5, 6, 13].

Главным сдерживающим фактором широкого распространения интерферонотерапии при лечении различных патологий являются побочные эффекты, развивающиеся при использовании высоких концентраций цитокина: гриппоподобный синдром, артралгии, миалгии, лейко- и тромбоцитопении, галлюцинации, расстройства периферической нервной системы.

Изученный в настоящей работе характер изменения уровня экспрессии основных маркеров и образования внеклеточных сетей нейтрофилами крови человека в условиях воздействия α -интерферона позволил выявить ключевые пути регуляции основных функций этой группы иммунокомпетентных клеток, важных для понимания молекулярных аспектов иммуномодулирующего действия данного цитокина.

Исследование влияния препарата человеческого лейкоцитарного α -интерферона на иммунокомпетентные клетки позволит разработать новые подходы к иммунокоррекции различных патологических состояний при проведении фармакотерапии заболеваний.

Ключевые слова: нейтрофилы, внеклеточные сети, апоптоз, интерферон, миграция нейтрофилов

Нейтрофильные гранулоциты являются наиболее распространенными группами лейкоцитов в периферической крови. С момента открытия процесса фагоцитоза И. И. Мечниковым их основной функцией считалось поглощение и элиминация из организма различных чужеродных агентов и патогенных микроорганизмов с помощью большого количества ферментных систем секреторных гранул и активных кислородных метаболитов, генерируемых в процессе респираторного взрыва [1-8].

Однако на протяжении последних десятилетий оказалось, что нейтрофилы имеют до-

полнительный способ убивать микроорганизмы после активации: они способны выпускать содержимое ядра – хроматин, специфические секреторные гранулы, которые вместе образуют внеклеточные волокнистые структуры, неспецифически связывающие различные патогены [9-18].

Эти новые структуры впервые были описаны в работах сотрудников Института инфекционной биологии Макса Планка Артуро Жилински и Волькера Бринкмана в 2004 году, которые и подарили исследователям новое направление для изучения биологии неспецифической защиты иммунной системы.

Детальные исследования привели к неоднозначному пониманию совокупностей процессов,

© Колтаков И. А., Шилова Е. В., Синюкова К. Ю., Гокбаева А. Я., Рябова В. А., Янкова С. О., Артюхов В. Г., 2021

лежащих в основе работы внеклеточных сетей, поскольку снижение факторов вирулентности и уничтожение бактерий, грибов и паразитов, сочетается в них с активным стимулированием развития свободно циркулирующих опухолевых клеток.

В связи с этим, необходимо провести детальное изучение механизмов регуляции образования обозначенных нами структур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили изолированные нейтрофилы периферической крови здоровых добровольцев. Выделение целевых клеток осуществляли по методу Вбуит [19] седиментацией на двойном градиенте плотности перколла ($\rho_1 = 1.077 \text{ г/см}^3$, $\rho_2 = 1.119 \text{ г/см}^3$). Нейтрофилы модифицировали препаратом α_{2b} -интерферона (альфарон, НПП «Фармаклон», Москва) в концентрациях 1, 10 и 100 МЕ/мл в течение 1 часа при $t = 37^\circ\text{C}$ в термостате ТС-80М. Анализ процесса образования внеклеточных сетей проводили методом флуоресцентной микроскопии. Все манипуляции с клетками, направленные на изучение уровня экспрессии поверхностных антигенов нейтрофилов осуществлялись на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8 HT (Merk-Millipore Group, USA) по стандартным методикам и протоколам, рекомендованным производителями наборов реагентов. Определение жизнеспособности полученной клеточной фракции осуществляли согласно протоколу коммерческого набора GUAVA VIA COUNT. В работе использовали образцы клеток с жизнеспособностью не менее 98%. Уровень экспрессии поверхностных дифференцировочных антигенов TLR4, CD95, CD 14, CD11b определяли с использованием моноклональных антител LT14 и LT11b (Сорбент, Москва) и моноклональных антител

против TLR4, CD95 человека. Обработку и анализ данных, полученных методом проточной цитофлуориметрии, проводили в модуле inCyte управляющего пакета программ GuavaSoft 3.3. Анализ микроскопических изображений проводили в управляющем программном пакете NIS Elements BR.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования нами была проведена оценка способности спонтанного образования сетей нейтрофилами крови человека в нативном

состоянии и в условиях воздействия IFN α -2b (рис. 1). Было установлено, что модификация исследуемых клеток цитокином во всем используемом диапазоне концентраций, оказывает стимулирующее действие на спонтанное образование ловушек нейтрофилами крови человека, увеличивая величину регистрируемого показателя на 12-69%.

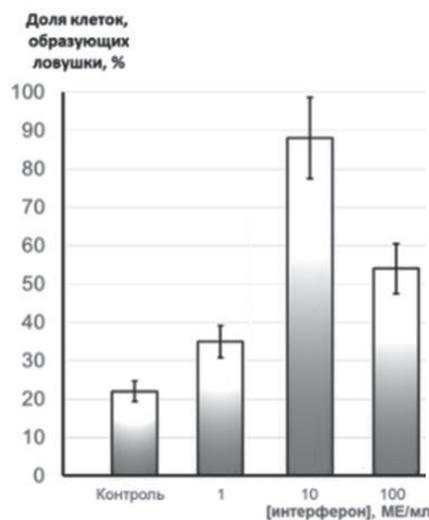


Рис. 1. Динамика образования внеклеточных сетей нейтрофилами крови человека в нативном состоянии и в условиях воздействия IFN α -2b в концентрациях 1, 10 и 100 МЕ/мл

Одновременно с анализом образования внеклеточных сетей нами была исследована динамика изменения уровня экспрессии TLR4 (рис. 2), CD14 (рис. 3) и CD95 (рис. 4) маркеров на поверхности мембран нейтрофилов человека в нативном состоянии и в условиях воздействия α -2b интерферона.

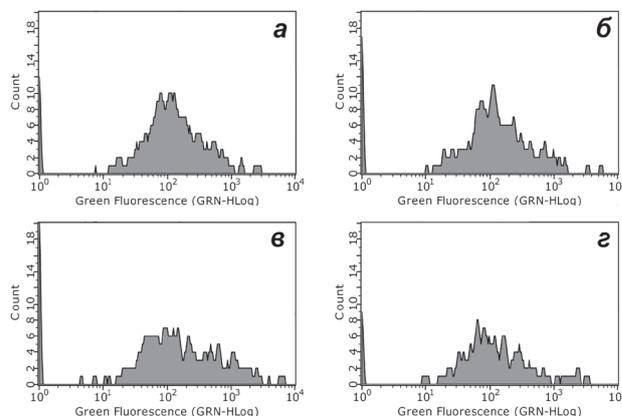


Рис. 2. Динамика изменения уровня экспрессии TLR4 маркера на поверхности мембран нейтрофилов человека в нативном состоянии (а) и в условиях воздействия альфа2b-интерферона в концентрациях 1 (б), 10 (в) и 100 (г) МЕ/мл

Было установлено, что в концентрации 10 МЕ/мл изучаемый цитокин повышал экспрессию *tlr4* на 19% и CD14 на 7,5%. Увеличение его дозы в 10 раз способствовало увеличению регистрируемого показателя в случае *tlr4* на 3,8%, а в случае CD14 снижению на 4% относительно нативных мембран. Не было выявлено статистически достоверных отличий от контроля при модификации клеток цитокином в концентрации 1 МЕ/мл.

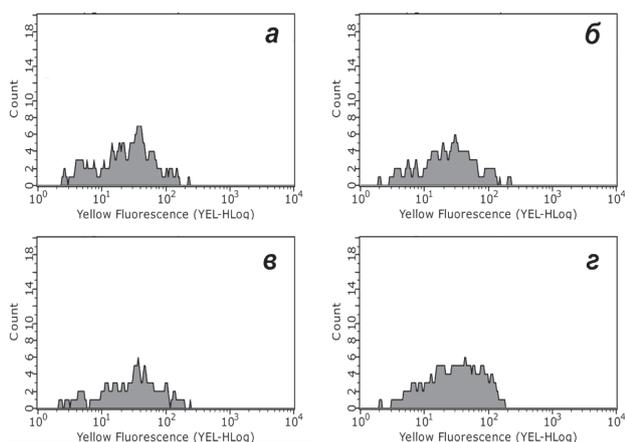


Рис. 3. Динамика изменения уровня экспрессии CD14 на поверхности мембран нейтрофилов человека в нативном состоянии (а) и в условиях воздействия альфа2b-интерферона в концентрациях 1 (б), 10 (в) и 100 (г) МЕ/мл

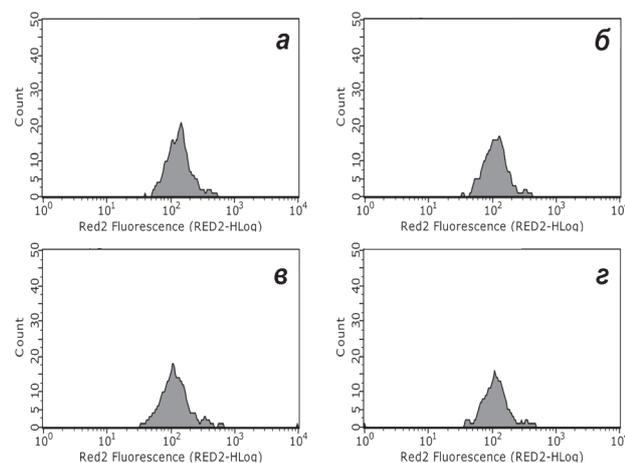


Рис. 4. Динамика изменения уровня экспрессии CD95 на поверхности мембран нейтрофилов человека в нативном состоянии (а) и в условиях воздействия альфа2b-интерферона в концентрациях 1 (б), 10 (в) и 100 (г) МЕ/мл

Далее нами была исследована динамика изменения уровня экспрессии CD95 на поверхности мембран нейтрофилов человека в нативном состоянии и в условиях воздействия альфа2b интерферона. Исследование показало, что IFN α -2b в концен-

трациях 1 и 10 МЕ/мл вызывало понижение уровня экспрессии исследуемого маркера на 13% и 14,5% соответственно. Максимальная из используемых нами концентраций цитокина 100 МЕ/мл вызывала снижение регистрируемого показателя только на 5,6% относительно контрольного образца.

Для рассмотрения адгезионной способности нейтрофилов в условиях эксперимента нами была проведена оценка уровня экспрессии маркеров CD11b на поверхности мембран этих клеток. Было установлено, что после добавления IFN α -2b выявляется тенденция к увеличению исследуемого показателя во всем используемом нами диапазоне доз исследуемого цитокина от 4,2 до 17% относительно контроля.

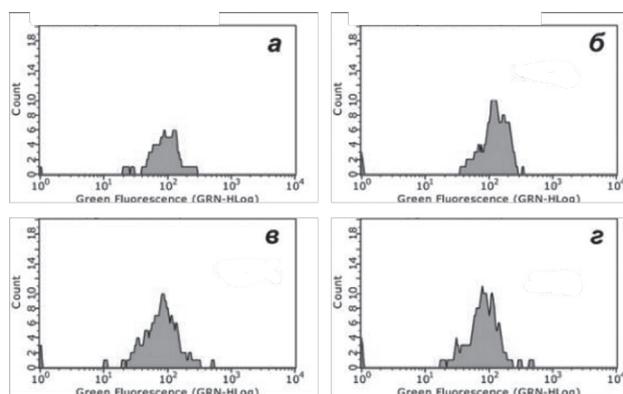


Рис. 5. Динамика изменения уровня экспрессии CD11b на поверхности мембран нейтрофилов человека в нативном состоянии (а) и в условиях воздействия альфа2b-интерферона в концентрациях 1 (б), 10 (в) и 100 (г) МЕ/мл

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведения исследования, мы показали, что модификация иммунных клеток крови человека цитокинами может выступать в качестве триггера, переключающего направления реализации иммунных процессов. Анализ данных позволяет предположить, что формирование контура неспецифической иммунной защиты, опосредованного образованием внеклеточных сетей не является ключевым для реализации функциональной активности иммунных клеток и не может быть принесен в жертву для активации более агрессивных путей поддержания гомеостаза в организме, отдавая приоритет реализации механизмов специфического целенаправленного воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева Ж.И., Мазина Н.М., Лукашева Т.В. // Вестник дерматологии и венерологии. 1990. №7. С. 7-12.

2. Албертс Б. Молекулярная биология клетки: в 3-х т. М.: Мир, 1994, Т.1, 517 с.
3. Алмазов В.А. Физиология лейкоцитов человека. Л.: Наука, 1979, 230 с.
4. Бахов Н. И., Майчук Ю. Ф., Корнев А. В. // Успехи современной биологии. 2000. Т. 120. С. 23-25.
5. Бахов Н. И. [и др.] // Успехи современной биологии. 1987. Т. 104. С. 281-296.
6. Бережная Н. М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев: Наук, думка, 1988, 192 с.
7. Колтаков И. А., Шилов С. В., Леликова Е. Н., Артюхов В. Г. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013. № 2. С. 105-109.
8. Колтаков И.А., Артюхов В.Г., Шилов С.В., Дельцова О.А., Нгихангва С.М.Л. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. № 3. С. 59-63.
9. Варгин В. В., Семенов Б. Ф. Иммунология инфекционного процесса. М., 1994, С. 178-192.
10. Ковальчук Л. В., М. В. Хорева М. В., Варивода А. С. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. № 4. С. 96-104.
11. Колтаков И.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 4. С. 73-81.
12. Шилов С. В., Колтаков И. А., Леликова Е. Н., Артюхов В. Г. Вестник // Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. №1. С. 97-101.
13. Шилов С.В., Артюхов В. Г., Колтаков И. А., Шилова Е. В. Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием. 2017. С. 2220-2222.
14. Алферов В.П., Ариненко Р.Ю., Аникин В.Б. // Рос. Сем. Врач. 1998. №1. С. 35-41.
15. Андрюков Б. Г., Сомова Л. М., Тимченко Н. Ф. // Инфекция и иммунитет. 2015. №1. С. 15-26.
16. Бажан С. И., Белова О. Е. // Вестник РАМН. 1998. №3. С. 18-24.
17. Винокуров М. Г. // Иммунология. 2001. № 2. С. 25-27.
18. Колтаков И. А. Исследование структурно-функционального состояния Т-лимфоцитов крови человека при модификации α -интерфероном и в условиях УФ-облучения: дис. ... Канд. Биол. Наук, Воронежский государственный университет, Воронеж, 2007.
19. Vöyum A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest Suppl. 1968. vol. 97 P. 77-89.

*Воронежский государственный университет
Колтаков И. А., к.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

Шилова Е. В., ассистент кафедры биофизики и биотехнологии

Синюкова К. Ю., магистрант кафедры биофизики и биотехнологии

Гокбаева А. Я., магистрант кафедры биофизики и биотехнологии

Рябова В.А. студент кафедры биофизики и биотехнологии

Янкова С.О. студент кафедры биофизики и биотехнологии

*Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artuykhov@bio.vsu.ru*

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

Shilova E.V., Assistant Professor of the Department of Biophysics and Biotechnology

Sinyukova K. Yu., Master's student, Department of Biophysics and Biotechnology

Gokbaeva A. Ya., Master's student, Department of Biophysics and Biotechnology

Ryabova V.A., student, Department of Biophysics and Biotechnology

Yankova S.O., student, Department of Biophysics and Biotechnology

*Artyukhov V.G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: artuykhov@bio.vsu.ru*

ON THE REGULATION OF THE KEY FUNCTIONS OF HUMAN BLOOD NEUTROPHILS BY INTERFERONS

I. A. Koltakov, E. V. Shilova, K. Yu. Sinyukova, A. Ya. Gokbayeva,
V.A. Ryabova, S.O. Yankova, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. The study of the molecular and cellular mechanisms of the immune system functioning in recent decades has particularly attracted the attention of researchers. This is due to the fact that immunity factors are the main elements of maintaining the homeostasis of the human body. The elucidation of the detailed mechanisms of self-regulation of the immune system by cytokines, hormones, and other non-specific regulators and the multidirectional effect of their action open up broad prospects for immunocorrective therapy.

Some cytokines and, in particular, interferons have been used as highly effective natural medicines. Nevertheless, despite the great prospects for the use of α -interferon in clinical practice, it is necessary to solve the problems associated with the difficulty of selecting the most effective concentrations for each patient, monitoring the body's reaction to the introduction of cytokine and predicting treatment results at early stages [4, 5, 6, 13].

The main limiting factor of the widespread use of interferon therapy in the treatment of various pathologies are the side effects that develop when using high concentrations of cytokine: flu-like syndrome, arthralgia, myalgia, leuko- and thrombocytopenia, hallucinations, disorders of the peripheral nervous system.

The nature of changes in the level of expression of the main markers and the formation of extracellular networks by human blood neutrophils under the influence of α -interferon, studied in this work, allowed us to identify key ways of regulating the main functions of this group of immunocompetent cells, which are important for understanding the molecular aspects of the immunomodulating action of this cytokine.

The study of the effect of the human leukocyte α -interferon drug on immunocompetent cells will allow developing new approaches to immunocorrection of various pathological conditions during pharmacotherapy of diseases.

Keywords: neutrophils, extracellular networks, apoptosis, interferon, neutrophil migration

REFERENCES

1. Avdeyeva ZH.I., Mazina N.M., Lukasheva T.V., Vestnik dermatol. i venerologii, 1990, №7, S. 7-12.
2. Alberts B. Molekulyarnaya biologiya kletki: v 3-kh t. M.: Mir, 1994, T.1, 517 s.
3. Almazov V.A. Fiziologiya leykotsitov cheloveka. L.: Nauka, 1979, 230 s.
4. Bakhov N. I., Maychuk YU. F., Kornev A. V., Uspekhi sovremennoy biologii, 2000, T. 120, S. 23-25.
5. Bakhov N. I. [i dr.] Uspekhi sovremennoy biologii, 1987, T. 104, S. 281-296.
6. Berezhnaya N. M. Neytrofil'y i immunologicheskiy gomeostaz. Kiyev: Nauk, dumka, 1988, 192 s.
7. Koltakov I. A., Shilov S. V., Lelikova Ye. N., Artyukhov V. G. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2013, № 2, S. 105-109.
8. Koltakov I.A., Artyukhov V.G., Shilov S.V., Del'tsova O.A., Ngikhangva S.M.L. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2015, № 3, S. 59-63.
9. Vargin V. V., Semenov B. F. Immunologiya infektsionnogo protsessa. M., 1994, S. 178-192.
10. Koval'chuk L. V., M. V. Khoreva M. V., Varivoda A. S. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii, 2005, № 4, S. 96-104.
11. Koltakov I.A., Artyukhov V.G., Putintseva O.V. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2018, № 4, S. 73-81.
12. Shilov S. V., Koltakov I. A., Lelikova Ye. N., Artyukhov V. G. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2014, №1, S. 97-101.
13. Shilov S.V., Artyukhov V. G., Koltakov I. A., Shilova Ye. V. Materialy XXIII s"yezda Fiziologicheskogo obshchestva im. I. P. Pavlova s mezhdunarodnym uchastiyem. 2017. S. 2220-2222.
14. Alferov V.P., Arinenko R.YU., Anikin V.B. Ros. Sem. Vrach, 1998, №1, S. 35-41.

15. Andryukov B. G., Somova L. M., N. F. Timchenko. *Infektsiya i immunitet*, 2015, №1, S. 15-26.

16. Bazhan S. I., Belova O. Ye., *Vestnik RAMN*, 1998, №3, S 18-24.

17. Vinokurov M. G. *Immunologiya*, 2001, № 2. S. 25-27.

18. Koltakov I. A. *Issledovaniye strukturno-funktsional'nogo sostoyaniya T-limfotsitov krovi cheloveka pri modifikatsii a-interferonom i v usloviyakh UF-oblucheniya: dis. ... Kand. Biol. Nauk, Voronezhskiy gosudarstvennyy universitet, Voronezh, 2007.*

19. Böyum A. *Scand. J. Clin. Lab. Invest Suppl.* 1968, vol. 97 P. 77-89.