

О СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИНИМАТЬ УЧАСТИЕ В ПРОЦЕССАХ АНТИГЕННОЙ ПРЕЗЕНТАЦИИ В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ α_{2b} -ИНТЕРФЕРОНА И УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

У.В. Рожковская, Е.Н. Леликова, В.Г. Артюхов, И.А. Колтаков

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 05.09.2024 г.

Аннотация. Длительное время нейтрофилы рассматривались исследователями как простые короткоживущие фагоцитирующие клетки первичного звена иммунной защиты, способные поглощать и уничтожать чужеродные агенты и патогенные микроорганизмы. Однако после открытия рецепторов семейства TLR (Toll-Like Receptors), представление о их роли в реализации иммунного ответа было существенно пересмотрено. Особенно интересным для исследователей оказался рецептор TLR4, который в присутствии корецепторной молекулы CD14 распознает липополисахариды грамм-отрицательных бактерий.

При этом, активация клеток регулируется цитокинами и другими регуляторными молекулами, которые корректируют их поведение и активируют неспецифический фагоцитоз. Важную роль в этом процессе играют антигены главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I и II класса, которые активируют Т-лимфоциты по клеточному (CD8+) или гуморальному (CD4+) пути.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что изучаемые маркеры проявляют устойчивость к воздействию низких концентраций интерферона, а наиболее эффективными оказались его дозы порядка 10 – 100 МЕ/мл. Основной причиной этого эффекта, вероятно, является отсутствие необходимости вовлечения дополнительного пула антигенпрезентирующих клеток на ранних стадиях иммунного ответа. Однако, когда инфекция усиливается и концентрация интерферонов повышается, активируется резервный пул антигенпрезентирующих клеток, что приводит к более эффективному распознаванию и представлению антигенов. В то же время было установлено, что фотомодификация может как увеличивать, так и снижать уровень экспрессии антигенов, что свидетельствует о регуляторном воздействии УФ-света на эти процессы.

Таким образом, полученные нами данные следует учитывать при выборе стратегии цитокинотерапии пациентов на фоне естественной или терапевтической инсоляции УФ-излучением.

Ключевые слова: дифференцировочные антигены, твердофазный иммуноферментный анализ, нейтрофилы, интерферон, УФ-излучение

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.

Открытие в 1997 году группы рецепторов, получивших название Toll-Like Receptors – «Странные, заманчивые рецепторы», позволило взглянуть под другим углом на роль нейтрофильных

гранулоцитов в реализации врожденного иммунного ответа. После проведения детальных исследований оказалось, что эти мембранные маркеры возникли на заре эволюционного процесса и являются приобретением не только человека и всех позвоночных, но и многих других групп живых организмов, например, насекомых [1–4].

Среди всех известных на сегодняшний день рецепторов семейства TLR особый интерес исследователей вызывает маркер TLR4, экспрессирующийся на поверхности всех нейтрофильных гранулоцитов, основной функцией которого является распознавание липополисахаридов Грамм-отрицательных бактерий [5–8]. Однако, одним из функциональных ограничений данного маркера

является то, что распознавание им компонентов бактериальной клеточной стенки возможно только при условии экспрессии на поверхности мембраны клетки вспомогательной корецепторной молекулы CD 14. При этом 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, приводить к активации процесса опсонин-независимого неспецифического фагоцитоза одиночных бактерий.

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 полиморфно-ядерные лейкоциты [9; 10].

Таким образом, на первое место вместе с комплексами TLR4-CD14 выходят антигены главного комплекса гистосовместимости I и II класса, которые играют важную роль в процессе активации иммунного ответа по клеточному (активация CD8⁺ лимфоцитов – Т-супрессоры, цитотоксические Т-лимфоциты – антигенами, встроенными в молекулы ГКГС I класса) или гуморальному (активация CD4⁺ лимфоцитов – Т-хелперы – антигенами встроенными в молекулы ГКГС II класса) пути [11–17].

Одним из наиболее эффективных способов воздействия на клетки иммунной системы в случае возникновения патологий различной этиологии является цитокиноterapia. Рядом авторов было показано, что в некоторых условиях в клинической практике можно существенным образом повысить эффективность проводимого лечения, а также добиться ослабления или полного нивелирования побочных эффектов [18; 19], возникающих при действии синтетических аналогов цитокинов на иммунную систему и добиться дополнительной стимуляции иммунокомпетентных клеток организма человека за счет комбинирования цитокино- и фототерапии, и в частности УФ-излучения (АУФОК-терапия), действие которого на структуру и функциональные свойства этих клеток усиленно изучается в настоящее время.

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 отражают спо-

собность изучаемых клеток принимать участие в одном из важнейших этапов реализации иммунного ответа – презентации чужеродного антигена.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования служили нейтрофилы, выделенные из периферической крови здоровых добровольцев. Выделение нейтрофилов проводили с помощью метода седиментации на двойном градиенте плотности фиколл-градограф ($\rho_1=1,119\text{г/см}^3$, $\rho_2=1,077\text{г/см}^3$). Осаждение клеток осуществляли на центрифуге типа MPW-340 в течение 40 мин при 400 g. Слой нейтрофилов на границе раздела между растворами фиколл-градографа разной плотности собирали пастеровской пипеткой по всей площади сечения пробирки, переносили в чистую, сухую центрифужную пробирку и разбавляли раствором Хенкса в соотношении 1:6. Полученную суспензию отмывали от следов градиента и плазмы крови 3 раза. Подсчёт клеток осуществляли с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность полученных аликвот клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии в стандартном тесте GUAVA ViaCount, на анализаторе GUAVA EasyCyte 8 HT (Merck - Millipore, Франция). В дальнейшей работе использовали суспензии клеток с жизнеспособностью не менее 94% и концентрацией $2,5 \cdot 10^5$ клеток/мл.

УФ-облучение нейтрофилов проводили в термостатируемой (20 ± 1 °C) кювете полусферической формы с площадью облучаемой поверхности 10^{-3} м² при постоянном перемешивании магнитной мешалкой типа ММ-3М излучением ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания в области 240-390 нм в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м². Интенсивность излучения составляла 151 Дж/м² в минуту с учётом расстояния до облучаемого объекта 0,23 м.

Модификацию клеток раствором α_{2b} -интерферона (альфарона, НПП «Фармаклон», Москва) проводили по следующей схеме: в культуральную среду вносили препарат интерферона с конечной концентрацией 1, 10 и 100 МЕ/мл, после чего образцы инкубировали при $t = 37$ °C в термостате ТС-80М в течение 1 часа.

Определение уровня экспрессии CD14 и HLA-DR маркеров на поверхности нейтрофилов крови человека проводили с использованием метода непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа. Результаты исследования учитывали спектрофотометрически на вертикальном планшетном фотометре при длине волны $\lambda=450$ нм и выражали в единицах оптической плотности. Статистиче-

скую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA» с использованием t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе исследования, нами была проведена оценка уровня экспрессии CD14 и HLA-DR маркеров на поверхности мембран нейтрофилов крови человека. Уровень ИФА-сигнала для контрольных образцов составил $0,516 \pm 0,030$ и $0,418 \pm 0,042$ ед. опт. плотности соответственно.

При использовании α_{2b} -интерферона в концентрации 1 МЕ/мл наблюдалось снижение уровня экспрессии CD14 антигена на 7,1 % (рис. 1 а, б). Добавление модификатора в инкубационную среду в концентрации 10 МЕ/мл приводило к возрастанию регистрируемого показателя на 8,8 %. При внесении интерферона в концентрации 100 МЕ/мл наблюдалось возрастание регистрируемого показателя на 21,2 %.

При изучении исследуемого показателя при фотомодификации клеток было установлено наличие разнонаправленной ответной реакции на облучение, в связи с чем все доноры были разделены на 2 группы. В первой группе с исходно более высоким уровнем ИФА-сигнала наблюдалось увеличение экспрессии исследуемого маркера на 10, 8, 13 и 6% при дозах облучения 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² соответственно, что свидетельствует об улучшении возможности связывания липополисахаридов бактериальных мембран (рис. 1а).

Во второй группе с исходно заниженным уровнем экспрессии (0,486 опт.ед. плотности по сравнению с 0,560 в первой группе) наблюдалось уменьшение экспрессии CD14 на 12, 13, 22 и 10%

при дозах облучения 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² соответственно (рис. 1б).

При анализе комбинированного воздействия интерферона и УФ-излучения в качестве контроля нами были выбраны значения исследуемого параметра фотомодифицированных клеток без последующей модификации цитокином. У первой группы с исходно более высоким уровнем экспрессии CD14 рецепторов наблюдалось увеличение исследуемого показателя при инкубации с препаратом α_{2b} -интерферона в концентрации 100 МЕ/мл на 5,6; 11; 9,6 и 6,5 % для клеток, облученных в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² соответственно. При воздействии более низких концентраций интерферона не было выявлено достоверных отличий от контроля, в качестве которого выступали клетки, облученные соответствующими дозами УФ-света, но не подвергавшиеся действию интерферона.

У второй группы с исходно более низким уровнем экспрессии наблюдалось увеличение экспрессии CD14 маркера. Для клеток, облученных в дозе 151 Дж/м² увеличение составило 5,2; 15,5 и 25 % при воздействии интерферона в концентрации 1, 10 и 100 МЕ/мл соответственно.

У образцов, подвергавшихся воздействию УФ-света в дозе 453 Дж/м², увеличилось значение регистрируемого показателя на 16,9 и 10,8% при инкубации с модификатором в концентрации 1 и 100 МЕ/мл. Повышение составило 15,9 % у клеток, облученных УФ-светом в дозе 906 Дж/м², под воздействием концентрации интерферона 100 МЕ/мл; 26 и 8,9 % у клеток, облученных дозой 1359 Дж/м², при инкубации с цитокином в концентрации 10 и 100 МЕ/мл. Таким образом, из полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о

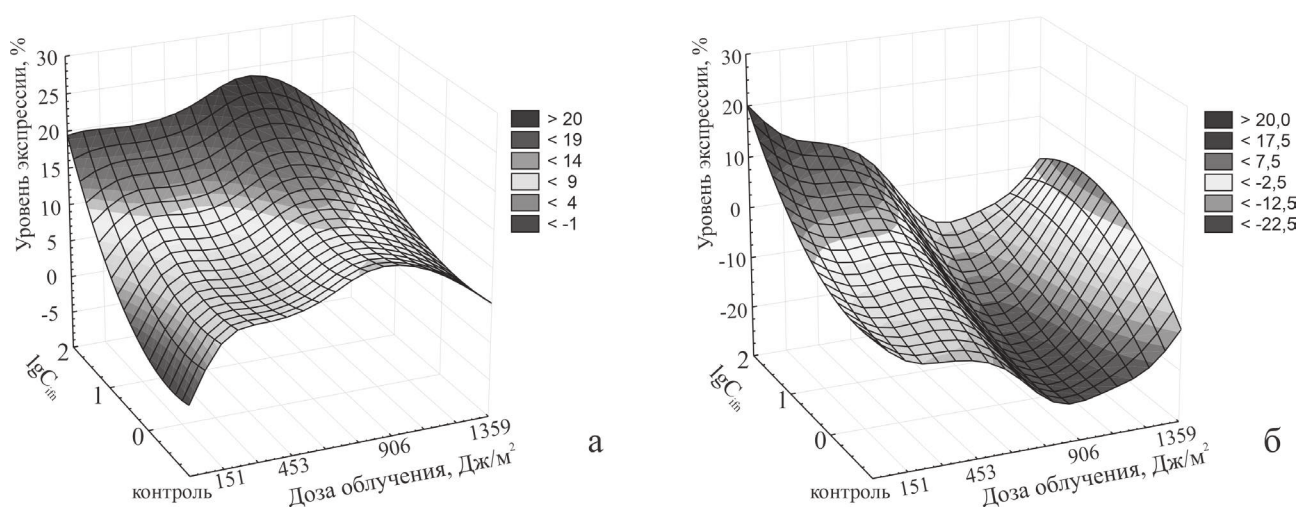


Рис. 1. Динамика уровня экспрессии CD14 маркера на поверхности мембран нейтрофилов крови человека в нативном состоянии и в условиях комбинированного действия α_{2b} -интерферона и УФ-излучения

том, что сочетание изучаемых физико-химических факторов приводит к изменению экспрессии CD14 маркеров. Характер изменений зависит как от концентрации интерферона, так и от дозы облучения.

При анализе уровня экспрессии HLA-DR антигенов на поверхности нейтрофильных мембран, характер ответной реакции клеток на фотомодификацию сохранился, в связи с чем разделение на 2 группы было нами сохранено.

Анализ комбинированного воздействия УФ-излучения и интерферона показал, что у первой группы с исходно более высоким уровнем экспрессии HLA наблюдалось снижение исследуемого показателя под влиянием интерферона, что частично нивелировало увеличение экспрессии рецепторов клеток, облученных УФ-светом, не подвергавшихся воздействию препарата интерферона.

У клеток, облученных в дозе 151 Дж/м² наблюдалось снижение уровня экспрессии HLA на 10,1 и 12,3 % при воздействии интерферона в концентрациях 10 и 100 МЕ/мл соответственно по сравнению с клетками, облученными в аналогичной дозе, но без инкубации с интерфероном (Рис 2а).

При фотомодификации в дозе 453 Дж/м² наблюдалось снижение регистрируемого показателя на 7,6 и 10,4 % при модификации препаратом интерферона в концентрации 10 и 100 МЕ/мл. Для образцов, облученных в дозах 906 Дж/м² и 1359 Дж/м² снижение уровня экспрессии изучаемых рецепторов составило от 9,6 до 16,2 % при воздействии интерферона во всех используемых концентрациях.

У второй группы доноров с исходно более низким уровнем экспрессии HLA-DR наблюдалось

повышение исследуемого показателя под воздействием интерферона по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию препарата (Рис 2б).

Так у клеток, облученных УФ-светом в дозе 151 Дж/м² увеличение экспрессии HLA-DR составило от 12 до 30 % пропорционально концентрации интерферона. Фотомодификация образцов УФ-светом в дозах 453 и 906 Дж/м², повышала уровень ИФА-сигнала менее интенсивно от 8,9 до 21 %. В то же время, фотомодификация в максимальной из используемых нами доз показала характер ответной реакции на уровне 151 Дж/м².

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что интерферон оказывает корректирующий эффект на уровень экспрессии HLA-DR клеток, модифицированных УФ-светом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведения исследования нами было показано, что изучаемые 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 усилении процесса презентации чужеродных антигенов за счет мобилизации пула нейтрофильных гранулоцитов.

Однако, если воздействие инфекции на организм усиливается и повышается концентрация интерферонов (как естественных, так и вносимых извне в виде лекарственных препаратов), происходит активация этого резервного пула антиген-презентирующих клеток, что, в свою очередь,

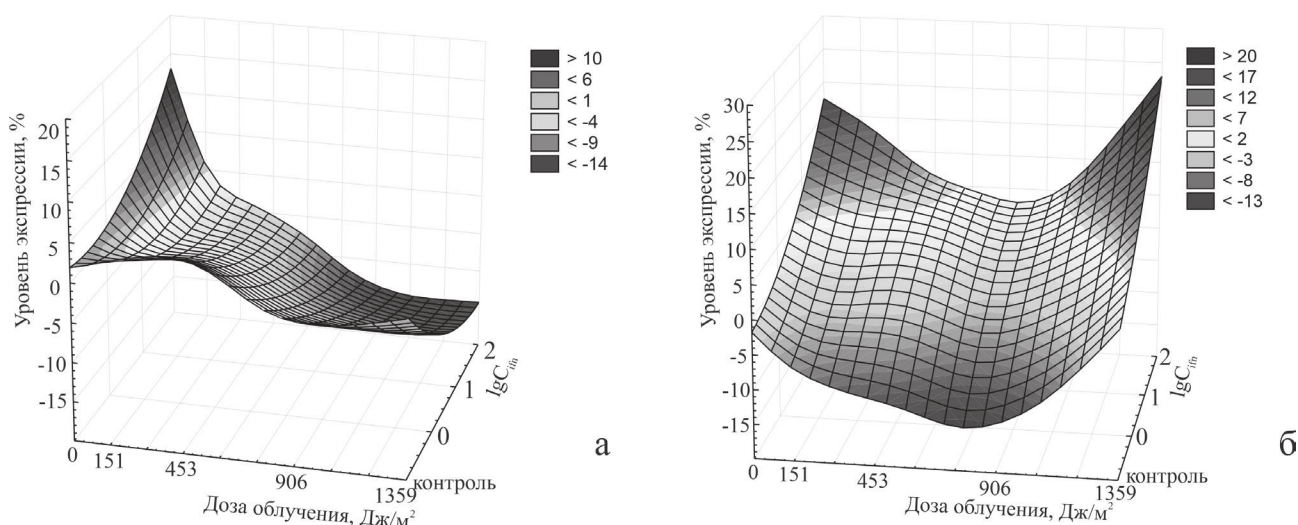


Рис. 2. Динамика уровня экспрессии HLA-DR маркера на поверхности мембран нейтрофилов крови человека в нативном состоянии и в условиях комбинированного действия α_{2b} -интерферона и УФ-излучения

приводит к повышению эффективности распознавания и представления чужеродных антигенов.

В то же время, анализ данных о влиянии УФ-излучения на этот процесс показал, что фотомодификация может инициировать как увеличение, так и снижение (для клеток с исходно низким уровнем экспрессии) уровня экспрессии исследуемых антигенов, в результате чего можно констатировать, что УФ свет оказывает влияние на регуляцию исследуемых процессов.

Было установлено, что для образцов нейтрофилов с исходно высоким количеством CD14 и HLA-DR маркеров на поверхности клеточных мембран наблюдается яркое стимулирующее действие при комбинированном применении 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 наблюдаться существенные функциональные нарушения, которые, вероятно, связаны с блокированием процессов синтеза этих мембранных маркеров *de novo* или же их токсической инактивацией вследствие накопления продуктов ПФОЛ.

Таким образом, полученные нами данные следует учитывать при выборе и реализации стратегии цитокинотерапии пациентов на фоне естественной или терапевтической инсоляции (при проведении АУФОК-терапии) УФ-излучением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Medzhitov R. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity / R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway // *Nature*. – 1997. – Vol. 388. – № 6640. – P. 394-397.
2. Medzhitov R. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition / R. Medzhitov, C. A. Janeway // *Cell*. – 1997. – Vol. 91. – Innate Immunity. – № 3. – P. 295-298.
3. The Dorsal-ventral Regulatory Gene Cassette *spätzle*/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults / B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut [et al.] // *Cell*. – 1996. – Vol. 86. – № 6. – P. 973-983.
4. Hashimoto C. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein / C. Hashimoto, K. L. Hudson, K. V. Anderson // *Cell*. – 1988. – Vol. 52. – № 2. – P. 269-279.
5. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 189. – № 11. – P. 1777-1782.
6. Endotoxin-tolerant Mice Have Mutations in Toll-like Receptor 4 (*Tlr4*) / S. T. Qureshi, L. Larivière, G. Leveque [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 189. – № 4. – P. 615-625.
7. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene / A. Poltorak, X. He, I. Smirnova [et al.] // *Science*. – 1998. – Vol. 282. – № 5396. – P. 2085-2088.
8. Gerard C. For whom the bell tolls / C. Gerard // *Nature*. – 1998. – Vol. 395. – № 6699. – P. 217-219.
9. O'Neill L. A. J. Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? / L. A. J. O'Neill // *Trends in Immunology*. – 2002. – Vol. 23. – № 6. – P. 296-300.
10. Hallman M. Toll-like Receptors as Sensors of Pathogens / M. Hallman, M. Rämert, R. A. Ezekowitz // *Pediatric Research*. – 2001. – T. 50. – № 3. – C. 315-321.
11. Kam M. Handbook of HLA typing techniques / M. Kam, J. L. Bidwell. – CRC Press, 2020. – 430 p.
12. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity / G. Bottazzo, T. Hanafusa, R. Pujol-Borrell, M. Feldmann // *The Lancet*. – 1983. – Vol. 322. – № 8359. – P. 1115-1119.
13. Chen X. Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells / X. Chen, J. J. Oppenheim // *International Immunopharmacology*. – 2011. – Vol. 11. – № 10. – P. 1489-1496.
14. Predicting HLA class II antigen presentation through integrated deep learning / B. Chen, M. S. Khodadoust, N. Olsson [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2019. – Vol. 37. – № 11. – P. 1332-1343.
15. Full-length next-generation sequencing of HLA class I and II genes in a cohort from Thailand / A. Geretz, P. K. Ehrenberg, A. Bouckennooghe [et al.] // *Human Immunology*. – 2018. – Vol. 79. – № 11. – P. 773-780.
16. Carey B. S. Factors affecting HLA expression: A review / B. S. Carey, K. V. Poulton, A. Poles // *International Journal of Immunogenetics*. – 2019. – Vol. 46. – Factors affecting HLA expression. – № 5. – P. 307-320.
17. Krensky A. M. The HLA system, antigen processing and presentation / A. M. Krensky // *Kidney International. Supplement*. – 1997. – Vol. 58. – P. S2-7.

18. Canna S. W. Making Sense of the Cytokine Storm: A Conceptual Framework for Understanding, Diagnosing, and Treating Hemophagocytic Syndromes / S. W. Canna, E. M. Behrens // Pediatric Clinics of North America. – 2012. – Vol. 59. – Making Sense of the Cytokine Storm. – № 2. – P. 329-344.

19. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome / D. W. Lee, R. Gardner, D. L. Porter [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 124. – № 2. – P. 188-195.

*Воронежский государственный университет
Рожковская Ульяна Васильевна, студентка 4
курса кафедры биофизики и биотехнологии*

*Voronezh State University
Rozhkovskaya Ulyana V., 4th year student,
Department of Biophysics and Biotechnology*

*Леликова Елена Николаевна студентка 6 курса
кафедры биофизики и биотехнологии*

*Lelikova Elena N. 6th year student, Department
of Biophysics and Biotechnology*

Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

*Artyukhov Valery G. , PhD., DSci., Full
Professor, Head of the Department of Biophysics and
Biotechnology*

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Колтаков Игорь Александрович кандидат биологических наук, Доцент, кафедра биофизики и биотехнологии

*Koltakov Igor A. PhD., Associate Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology*

E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

ON THE ABILITY OF HUMAN BLOOD NEUTROPHILS TO PARTICIPATE IN THE PROCESSES OF ANTIGENIC PRESENTATION UNDER CONDITIONS OF COMBINED EXPOSURE TO A_{2B} INTERFERON AND UV IRRADIATION

U.V. Rozhkovskaya, E.N. Lelikova, V.G. Artyukhov, I.A. Koltakov

Voronezh State University

Abstract. For a long time, researchers considered neutrophils to be simple short-lived phagocytic cells that form the primary line of immune defense and are capable of absorbing and eliminating foreign agents and pathogens. However, with the discovery of Toll-like receptors (TLRs), the role of these cells in immune response has been significantly revised. Of particular interest was the TLR-4 receptor, which detects lipopolysaccharides from gram-negative bacteria and activates the immune system through the CD14 co-receptor. In this case, activation of cells is regulated by cytokines and regulatory molecules, which correct their behavior and stimulate non-specific phagocytosis. Antigens from the major histocompatibility complex (MHC) play an important role in these processes, as do class I and class II cells, which activate T-lymphocytes through the cellular (CD8+) or humoral (CD4+) pathways.

During the study, we found that the markers we studied showed resistance to low concentrations of IFN, and doses of around 10-100 IU/ml were most effective. This is likely due to the lack of need for additional antigen-presenting cell pools in the early phases of the immune response. However, as the infection progresses and IFN levels increase, the antigen-presenting pool is activated, leading to more effective recognition and presentation. We also found that photomodification can increase or decrease antigen expression levels, indicating the regulatory effects of UV light. Therefore, our findings should be considered when selecting cytokine therapies for patients exposed to natural or therapeutic UVR.

Keywords: differentiation antigens, solid-phase enzyme immunoassay, neutrophils, interferon, UV irradiation