

О.В. Земченкова¹, И. Е. Савостина¹, О.В. Башарина²
**ВЛИЯНИЕ УФ-СВЕТА И ДЕКСАМЕТАЗОНА
НА ПРОДУКЦИЮ ИЛ-2 И ЕГО РЕЦЕПТОРА ЛИМФОЦИТАМИ
КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

¹ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н. Н. Бурденко Минздрава России,
каф. биохимии, каф. естественно-научных и математических дисциплин;

²ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет,
каф. биофизики и биотехнологии

Резюме. Исследованы способность лимфоцитов продуцировать ИЛ-2 и экспрессировать CD25 маркеры на лимфоцитарных мембранах в условиях воздействия на суспензию клеток крови доноров и больных бронхиальной астмой УФ-света (240–390 нм) в дозе 151 Дж/м² и дексаметазона. Показано, что синтез интерлейкина Т-клетками значительно возрастает после их фотомодификации, при добавлении дексаметазона к фотомодифицированным лимфоцитам концентрация цитокина снижается до уровня интактных клеток. УФ-свет приводит к повышению как количества CD25⁺-клеток, так и уровня экспрессии CD25-рецептора.

Концентрация ИЛ-2 у больных астмой несколько ниже нормальных показателей, в результате курса фототерапии у больных изначально пониженный уровень ИЛ-2 достигает уровня, сопоставимого с зарегистрированным у здоровых доноров.

Ключевые слова: лимфоциты, CD25, ИЛ-2, УФ-облучение, дексаметазон, бронхиальная астма.

Актуальность. Важной проблемой медицины в настоящее время является изучение механизмов реализации эффектов физических и химических факторов на клеточном уровне с целью регуляции действия этих факторов и их применения в терапевтических целях. При лечении воспалительных патологий для подавления иммунного ответа широко применяются глюкокортикостероиды (ГКС). Одним из современных высокоактивных лекарственных препаратов глюкокортикоидной природы является дексаметазон (Дм). Однако длительное применение ГКС чревато появлением серьезных побочных эффектов [1], в связи с этим актуальна проблема снижения дозы вводимого гормонального препарата. Описан положительный опыт применения метода экстракорпоральной иммунофармакотерапии (ЭИФТ) с преднизолоном и цианкобаламином в терапии больных бронхиальной астмой; в результате использования ЭИФТ впоследствии стала возможна отмена ГКС системного действия [2]. При лечении воспалительных заболеваний в ряде случаев к выраженному терапевтическому эффекту приводит метод аутотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК); его применение приводит к нормализации гемостатических, реологических свойств и кислородной емкости крови, а также метаболических нарушений, наблюдается коррекция функций иммунной системы [3]. Есть примеры совместного применения АУФОК и ЭИФТ [4].

Использование ГКС в сочетании с УФ-облучением как цельной крови, так и ее отдельных компонентов может позволить снизить дозы используемых лекарственных препаратов и, таким образом, минимизировать побочные эффекты гормонального препарата.

Интерлейкин 2 (ИЛ-2) является основным цитокином, регулирующим процессы пролиферации, активации и дифференцировки лимфоцитов. Этот интерлейкин

индуцирует рост и созревание В-лимфоцитов, цитотоксическую активность натуральных киллерных клеток, активирует вторичный синтез других провоспалительных цитокинов, ИФН γ , лимфотоксина [5].

ИЛ-2 синтезируют в основном субпопуляция Тх1 (Т-хелперы 1), но его продуцентами могут быть также Т-супрессоры и большие гранулярные лимфоциты. Мишенями регуляторного действия ИЛ-2 являются различные субпопуляции Т-клеток, В-лимфоциты, натуральные киллеры, макрофаги. Присутствие среди лимфоцитов клеток, несущих маркер CD25 (клетки CD25+), указывает на то, что в плазмалемме лимфоцитов экспонирована α -субъединица рецептора ИЛ-2 [6].

С целью изучения механизмов действия иммуномодуляторов на некоторые функции фотомодифицированных лейкоцитов мы исследовали влияние УФ-света и дексаметазона на продукцию лимфоцитами крови доноров и больных бронхиальной астмой интерлейкина-2 и его рецептора. Проведенные нами эксперименты представляются необходимыми для определения возможности снижения дозы ГКС больным в ходе проведения различных вариантов фототерапии (ЭИФТ и АУФОК).

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили лимфоциты здоровых доноров (мужчины в возрасте от 30 до 55 лет) и больных бронхиальной астмой.

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови (50 ЕД/мл) центрифугированием (1500 об/мин, 15 мин, 20 °С) на градиенте плотности фиколлюрографина ($\rho=1,077$ г/см³).

УФ-облучение суспензии лимфоцитов крови доноров проводили в термостатируемой кювете (20 °С) светом ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 (250-390 нм), использовали дозу 151 Дж/м², что соответствует 1 мин облучения и относится к терапевтическому диапазону доз.

Экстракорпоральную УФ- и фармакомодификацию лимфоцитов (УФМЛ) больных бронхиальной астмой проводили на базе БУЗ ВО ВГКБСМП № 1. В комплекс базисной терапии был включен курс лечебного дискретного плазмоцитафереза из 3-4 сеансов, проводимых через день. В основе этого метода лечения лежит УФ-облучение лимфоцитов аутокрови, а затем – их инкубация с дексаметазоном. Взвесь лейкоцитов (120±5 мл), обогащенную лимфоцитами до концентрации (4-8)±10⁹ клеток/л, облучали УФ-светом в аппарате «Надежда» в течение 15-20 мин в кювете с барбитацией для перемешивания стерильным потоком кислорода. В облученную взвесь клеток добавляли полусуточную дозу Дм пациента на данном этапе лечения. После инкубации в термостате при 37 °С в течение 60 мин лейкоцетальную взвесь реинфузировали больному.

Для изучения содержания интерлейкина-2 лимфоциты в концентрации (2-4)·10⁸ клеток/л инкубировали в течение 24 ч в среде RPMI-1640 с гентамицином (40 г/л) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. После окончания культивирования лимфоциты разрушали путем двукратного «замораживания-оттаивания». Определение концентрации исследуемых цитокинов проводили методом твердофазного

иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем «ProCon» (Санкт-Петербург) в диапазоне детектируемых концентраций от 20-50 до 1000 пг/мл.

Для определения уровня экспрессии CD25 маркеров на наружной мембране нативных и УФ-облученных клеток использовали цитофлуориметр «CyFlow space» (Partec, Германия). Двойное окрашивание клеток проводили с использованием моноклональных антител: CD3-FITC – CD25-PE и соответствующего изотипического контроля (все Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 104 клеток.

Результаты исследований обрабатывали с помощью пакета прикладных статистических программ “Microsoft Excel”. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали методом попарных сравнений, используя t-критерий Стьюдента при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Содержание ИЛ-2 в лимфоцитах доноров составляло $230,8 \pm 23,5$ пг/мл, доля CD25⁺-клеток – $3,0 \pm 1,2\%$. Выявлено, что в ходе суточной инкубации фотомодифицированных лимфоцитов здоровых доноров количество CD25⁺-клеток повышается в 6 раз. При этом уровень экспрессии CD25 рецепторов возрастает на 52 % по отношению к контролю. Данные изменения связаны не только с экспонированием рецепторов на поверхность плазматической мембраны вследствие ее фотомодификации, но и с синтезом данного рецептора de novo [7]. Анализ концентрации ИЛ-2 показал, что продукция данного цитокина лимфоцитами доноров после УФ-облучения возрастает в 2,8 раза.

Ранее нами отмечалось [8], что воздействие УФ-света приводит к дозозависимому повышению уровня пероксидного фотоокисления липидов (ПФОЛ); следствием ПФОЛ является снижение активности Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран лимфоцитов через 4 часа после воздействия УФ-света, а это, в свою очередь, приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Этот ион являясь вторичным мессенджером, играет важнейшую роль в активации транскрипционного фактора NFAT (ядерный фактор активированных клеток), а также в экспрессии как ИЛ-2, так и его рецептора. Таким образом, УФ-свет активирует экспрессию CD25-рецептора и, соответственно, приводит к увеличению количества CD25⁺-клеток. Это является необходимым условием активации лимфоцитов.

При изучении динамики содержания ИЛ-2 в лимфоцитах больных бронхиальной астмой в течение одного сеанса и в ходе всего курса УФМЛ-терапии с Дм установлено, что концентрация ИЛ-2 в лимфоцитарных клетках больных до лечения была ниже нормы на 24 % и составляла $186,1 \pm 41,8$ пг/мл. В ходе лечения выявлено повышение продукции ИЛ-2 на 48 %. После окончания курса УФМЛ-терапии с Дм содержание ИЛ-2 находилось в пределах значений, регистрируемых у доноров.

Определение концентрации ИЛ-2 в лимфоцитах больных бронхиальной астмой в ходе проведения сеанса УФМЛ с Дм осуществлялось после 24 ч инкубации лимфоцитов, исследуемый параметр регистрировали до и после воздействия УФ-света на суспензию лейкоцитов, а также после инкубации фотомодифицированных

лейкоцитов с Дм. В ходе проведенного исследования было показано, что фотомодификация клеток приводит к повышению концентрации ИЛ-2 на 83 %. При этом последующая инкубация лимфоцитов с Дм приводит к уменьшению продукции цитокина на 45 % по сравнению с фотомодифицированными клетками. Определяемые показатели являются суммой интра- и экстраклеточных составляющих.

На основании сопоставления полученных результатов исследований с показателями, характерными для лимфоцитов доноров [9], установлено, что изменение концентрации ИЛ-2 в лимфоцитах здоровых доноров и больных бронхиальной астмой имеет однонаправленный характер.

В ходе наших экспериментов показано, что происходит уменьшение содержания ИЛ-2 и его рецептора после инкубации лимфоцитов с дексаметазоном. Известно, что подавление иммунного ответа глюкокортикоидами основано на том, что они ингибируют экспрессию генов провоспалительных цитокинов. Наиболее важным полученным нами результатом является тот факт, что фотомодифицированные клетки доноров оказываются более чувствительными к воздействию гормонального препарата.

Сочетанное применение УФ-облучения и дексаметазона на лимфоциты оказывает более выраженное влияние на клетки по сравнению с раздельным действием этих факторов. Вероятно, одной из причин наблюдаемого эффекта может быть улучшение связывания Дм с мембранами УФ-облученных клеток.

Выводы. Полученные результаты можно использовать для объяснения одного из механизмов выраженного снижения воспалительного процесса у больных бронхиальной астмой в результате проведения им курса УФ- и фармакомодификации лимфоцитов с дексаметазоном. В результате проведения такого курса лечения происходит сдвиг цитокинового профиля в сторону Тх1-типа иммунного ответа. Таким образом, выявленное в нашей работе увеличение содержания ИЛ-2 и его рецептора в лимфоцитах является одной из составляющих положительного клинического эффекта УФМЛ-терапии с гормональным препаратом. Экстракорпоральное УФ-облучение иммуноцитов существенно оптимизирует гормонотерапию.

Литература.

1. Геномные и негеномные эффекты глюкокортикоидов / Н.М. Тодосенко [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, №1. – С. 27-33.
2. Халикова А.А. Ингаляционные глюкокортикоиды в терапии бронхиальной астмы / Халикова А.А., Пулатова Д.Б. // В книге: Новая наука: гипотезы, взгляды и факты Сборник научных трудов. Под общей редакцией С.В. Кузьмина. Казань, 2017. С. 327-330.
3. Карандашов В.И. Ультрафиолетовое облучение крови / В.И. Карандашов, Е.Б. Петухов. – М.: Медицина, 1997. – 224 с.
4. Емельянов А.В. Мометазона фуруат (асманекс твистхейлер) - новый ингаляционный глюкокортикоид для лечения бронхиальной астмы / Емельянов А.В., Горячкина Л.А. // Российский аллергологический журнал. 2012. № 4. С. 79-87.
5. Василенко А.М. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета / А.М. Василенко, Л.А. Захарова // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 120, № 2. – С. 174-189.
6. Хайтов Р. М. Иммунология / Р. М. Хайтов. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 496 с.

7. Влияние УФ-света на субпопуляционный состав и экспрессию мембранных маркеров лимфоцитов крови человека/ В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – Т. 56, № 1. – С. 73-79.

8. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 2. – С. 252-257.

9. Влияние ультрафиолетового света и дексаметазона на функциональные свойства лимфоцитов и нейтрофилов / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. Т. 45, № 2. – С. 196-200.

Abstract.

O.V. Zemchenkova¹, I.E. Savostina¹, O.V. Basharina²

EFFECT OF UV LIGHT AND DEXAMETHASON

ON THE PRODUCTION OF IL-2 AND ITS RECEPTOR BY BLOOD LYMPHOCYTES OF DONOR AND PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

¹Voronezh State Medical University, ²Voronezh State University

The ability of lymphocytes to produce IL-2 and express CD25 markers on lymphocyte membranes under conditions of exposure to a suspension of blood cells of donors and patients with bronchial asthma of UV light (240-390 nm) at a dose of 151 J/m² and dexamethasone was studied. It had been shown that the synthesis of interleukin by T-cells increases significantly after their photomodification; when dexamethasone is added to photomodified lymphocytes, the cytokine concentration decreases to the level of intact cells. UV- light leads to an increase in both the number of CD25+ -cells and the level of expression of the CD25 receptor.

The concentration of IL-2 in patients with asthma is slightly lower than normal, and as a result of a course of phototherapy in patients, the initially reduced level of IL-2 reaches a level comparable to that observed in healthy donors.

Keywords: lymphocytes, UV light, IL-2, CD25, dexamethasone, bronchial asthma.

References.

1. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids / N.M. Todosenko [et al.] // Genes and cells. – 2017. – Vol. 12, № 1. – P. 27-33.

2. Khalikova A. A. Inhaled glucocorticoids in the treatment of bronchial asthma / Khalikova A. A., Pulatova D. B. // in the book: New science: hypotheses, views and facts Collection of scientific papers. Under the General editorship of S. V. Kuzmin. Kazan, 2017. Pp. 327-330.

3. Karandashov V. I. Ultraviolet irradiation of blood / V. I. Karandashov, E. B. Petukhov. - M.: Medicine, 1997. - 224 p.

4. Emelyanov A.V. Mometasone furoate (asmanex twistheiler) - a new inhaled glucocorticoid for the treatment of bronchial asthma / Emelyanov A.V., goryachkina L. A. // Russian allergological journal. 2012. No. 4. Pp. 79-87.

5. Vasilenko A.M. Cytokines in the combined regulation of pain and immunity. Vasilenko, L.A. Zakharova // Successes of modern biology. –2000. – Vol. 120, № 2. – P. 174-189.

6. Khaitov R. M. Immunology / R. M. Khaitov. - 3rd ed., Pererab. and add. - M.: GEOTAR-Media, 2016. - 496 p.

7. Effect of UV light on the subpopulation composition and expression of membrane markers of human blood lymphocytes / V.G. Artyukhov [et al.] // Radiation biology. Radioecology. – 2016. – V. 56, № 1. – P. 73-79.

8. Features of the metabolism of UV-irradiated lymphocytes / V.G. Artyukhov [et al.] // Radiation biology. Radioecology. – 2011. – Vol. 51, № 2. – P. 252-257.

9. The effect of ultraviolet light and dexamethasone on the functional properties of lymphocytes and neutrophils / V.G. Artyukhov [et al.] // Radiation biology. Radioecology. – 2005. – Vol. 45, № 2. – P. 196-200.

Сведения об авторах: Земченкова Ольга Владимировна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, zov-bio@mail.ru; Савостина Ирина Евгеньевна – кандидат биологических наук, зав. кафедрой естественно-научных и математических дисциплин, Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, i_savostina@mail.ru; Башарина Ольга Владимировна – кандидат

биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, bov-bio@yandex.ru.

Цитировать:

Земченкова, О. В. Влияние УФ-света и дексаметазона на продукцию ИЛ-2 и его рецептора лимфоцитами крови доноров и больных бронхиальной астмой / О. В. Земченкова, И. Е. Савостина, О. В. Башарина // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2019. – Т. 22, № 3. – С. 73–78.