

На правах рукописи



Вдовина Вера Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА И
РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ α -ИНТЕРФЕРОНА НА СТРУКТУРНО-
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ Т- И В-
КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА**

03.01.02. – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2010

Работа выполнена в Воронежском государственном университете

Научный руководитель доктор биологических наук,
профессор Артюхов Валерий Григорьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Попова Татьяна Николаевна
кандидат биологических наук,
доцент Дмитриев Евгений Владиславович

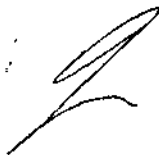
Ведущая организация: Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Защита состоится 31 января 2011 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006 Воронеж, Университетская пл., 1, биолого-почвенный факультет, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета.

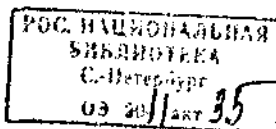
Автореферат разослан 19 декабря 2010 года

Ученый секретарь
диссертационного совета



Грабович М.Ю.

2011/4
866



Актуальность проблемы.

Иммунорегуляция является одной из наиболее актуальных проблем современной фундаментальной и прикладной иммунологии, молекулярной биофизики и биофизики клетки.

Функционирование иммунной системы контролируется за счет целого ряда эндогенных и экзогенных факторов. Ключевым этапом функционирования иммунной системы является экспрессия поверхностных рецепторов, которые обеспечивают восприятие клеткой внешних сигналов. На поверхности мембран лимфоцитов в большом количестве экспрессируются молекулы рецепторного комплекса, принимающие участие в антигенраспознающей функции Т- (CD3-TCR, корецепторы CD4 и CD8) и В-лимфоцитов (костимулирующие молекулы BCR – CD19, CD20 маркеры) (А.А. Ярилин, 1999; Р.М. Хантов, 2006). Для нормального протекания иммунного ответа в организме необходима сбалансированная активность взаимодействующих иммунорегуляторных клеток. При различных патологических состояниях (аутоиммунные и аллергические заболевания, иммунодефициты, гепатиты различного вида, злокачественные опухоли и др.) меняется поверхностный фенотип иммунокомпетентных клеток, количественный и качественный состав их субпопуляций, уровень продуцируемых цитокинов, в результате чего механизмы регуляции иммунного ответа будут нарушены (Г.Н. Дранник, 2003; Н.В. Романова и др., 2005; О.Е. Чечина и др., 2008; Y.B. Sullivan et al., 2001). Так, отсутствие или незначительный уровень экспрессии функционально значимых молекул на поверхности иммуноцитов при различных патологиях ведут к ослаблению процессов передачи сигнала внутрь клетки и к снижению интенсивности иммунного ответа на попадание чужеродного антигена (Г.Н. Дранник, 2003).

Одним из возможных регуляторов процессов взаимодействия между клеточными и гуморальными факторами иммунитета является УФ-свет, который в последнее время широко применяется в клинической практике. Для коррекции нарушений в работе иммунной системы больных используется метод АУФОК-терапии (аутотрансфузии УФ-облученной крови). При проведении этого метода были установлены такие лечебные эффекты как бактерицидный, противовоспалительный, иммунокорректирующий, комплексный иммуностимулирующий (увеличение количества и активности иммунокомпетентных клеток в циркулирующей крови, стимуляция выработки иммуноглобулинов, компонентов комплемента) и др. (Е.В. Волгарева и др., 1990; Ф.Х. Кутушев и др., 1990; К.А. Самойлова, 1991; В.И. Карандашов и др., 2001).

При ретрансфузии УФ-облученной крови происходят структурно-функциональные изменения поверхности иммунокомпетентных клеток и их активация (И.М. Гамова и др., 1991).

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, молекулярные механизмы регуляторного действия УФ-света на клеточные и гуморальные компоненты иммунной системы недостаточно хорошо изучены.

Основными модуляторами иммунной системы и факторами межклеточного взаимодействия являются цитокины, участвующие в формировании и ре-

гуляции всех звеньев иммунного ответа (неспецифическая резистентность, гуморальный и клеточный иммунитет), включая дифференцировку иммунокомпетентных клеток-предшественников, презентацию антигена, клеточную активацию и пролиферацию, экспрессию молекул адгезии (Г.И. Васильева и др., 2001; А.С. Симбирцев, 2002; В.А. Щербак и др., 2005; Е.И. Батенева и др., 2006).

В настоящее время в медицине для лечения больных с различной патологией эффективно применяется цитокинотерапия, в частности, терапия природными и генно-инженерными препаратами α -интерферона. (И.А. Васильева и др., 2003; Ф.И. Ершов, О.И. Киселев, 2005; В.А. Шмелев, 2008). Интерфероны играют важную роль в функционировании иммунной системы и являются иммуномодуляторами широкого спектра действия (В.П. Алферов и др., 1998; Ф.И. Ершов, О.И. Киселев, 2005; В.А. Шмелев, 2008). Несмотря на большие перспективы использования различных препаратов α -интерферона в клинической практике, необходимо решить ряд проблем, связанных с подбором терапевтических концентраций, трудностью прогнозирования и контроля реакций организма на цитокинотерапию на ранних этапах и при длительном лечении.

С лечебной целью нередко используется совместное проведение АУФОК- и цитокинотерапии. Тем не менее, конкретные механизмы их сочетанного действия на организм человека требуют дальнейшего исследования.

В связи с вышесказанным, представляется интересным изучение возможности регулирования иммунологических процессов как отдельным, так и комбинированным действием на компоненты иммунной системы естественных модуляторов физической и химической природы (УФ-света и α -интерферона), что позволит разработать методы направленной иммунокоррекции для комплексной терапии.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение структурно-функционального состояния компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека после воздействия УФ-излучения, различных препаратов α -интерферона и их сочетанного действия.

В связи с вышесказанным перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние УФ-света (240–390 нм) в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² на уровень экспрессии основных мембранных маркеров рецепторного комплекса Т- и В-лимфоцитов, образование «кэплинг»-эффекта молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса на поверхности Т-клеток, ИФН γ -продуцирующую способность Т-клеток и антителообразующую способность В-лимфоцитов.

2. Исследовать действие рекомбинантного $\alpha_2\beta$ -интерферона (0,01–100 МЕ/мл) на уровень экспрессии рецепторного аппарата Т- и В-лимфоцитов, ИФН γ -продуцирующую способность Т-клеток и антителообразующую способность В-лимфоцитов.

3. Изучить структурное состояние мембран лимфоцитов после воздействия УФ-света (151–1359 Дж/м²) и рекомбинантного $\alpha_2\beta$ -интерферона (0,01–100 МЕ/мл).

4. Оценить сочетанное влияние УФ-излучения (151–1359 Дж/м²) и чело-

веческого лейкоцитарного α -интерферона (0,01–100 МЕ/мл) на уровень экспрессии CD8 и CD95 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов крови человека.

Научная новизна. Работа является комплексным исследованием, посвященным изучению структурно-функционального состояния компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека после воздействия УФ-излучения, различных препаратов α -интерферона и их комбинированного действия.

Обнаружено, что УФ-свет в малых и средних дозах (151, 453 и 906 Дж/м²) оказывает однонаправленное (активирующее) действие на экспрессию молекул рецепторного комплекса Т- и В-лимфоцитов крови человека, а в большой дозе (1359 Дж/м²) может как повышать (CD4, CD8, CD95, CD19 и CD20 маркеры), так и снижать (CD3 комплексы) количество анализируемых молекул на поверхности их мембран.

Показано, что структурно-функциональные фотомодификации мембран Т-лимфоцитов обусловлены «кэппинг»-эффектом молекул рецепторного комплекса (CD3, CD4 и CD8 маркеров), участвующих в распознавании чужеродных антигенов.

Установлено, что изучаемые нами трансмембранные рецепторы обладают разной чувствительностью к действию рекомбинантного α_{2b} -интерферона.

Показаны изменения функциональной активности (цитокинпродуцирующей способности Т-лимфоцитов и антителообразующей способности В-лимфоцитов) иммунокомпетентных клеток крови человека после УФ-облучения и модификации рекомбинантным α_{2b} -интерфероном.

Впервые был изучен характер изменения уровня экспрессии CD8 и CD95 рецепторов на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека в условиях комбинированного действия УФ-света и человеческого лейкоцитарного α -интерферона.

Предложены схемы возможных механизмов действия УФ-света и рекомбинантного α_{2b} -интерферона на структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека.

Практическая значимость. Научные положения диссертационной работы расширяют и углубляют современные представления о механизмах действия физико-химических агентов (УФ-излучения и различных препаратов α -интерферона) на функционирование отдельных звеньев иммунной системы.

Данные, полученные при исследовании влияния УФ-света и α -интерферона на уровень экспрессии CD3, CD4, CD8 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов и CD19, CD20 рецепторов на поверхности В-клеток необходимо учитывать при изучении вклада отдельных популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток в процессы реализации иммунного ответа.

Результаты изучения индуцированных УФ-светом и различными препаратами α -интерферона изменений уровня экспрессии молекул рецепторного комплекса Т- и В-лимфоцитов, цитокинпродуцирующей и антителообразующей способности иммуноцитов важны для понимания тонких механизмов саморегуляции и функционирования компонентов иммунной системы в норме и при патологии.

Полученные экспериментальные данные могут способствовать разработке новых подходов к иммунокоррекции отдельных звеньев иммунного ответа

при различных патологических состояниях организма как при отдельном, так и при совместном проведении АУФОК- и цитокинотерапии.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на IV Международной конференции по иммунотерапии «Физиология и патология иммунной системы» (Москва, 2008); V Съезде Российского фотобиологического общества (Пушино, 2008); IV Международной научной конференции «Электромагнитные излучения в биологии. БИО-ЭМИ-2008» (Калуга, 2008); II Съезде физиологов СНГ (Кишинев, 2008); Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2009); Международной научной школе для молодежи «Инновационные технологии в здравоохранении: молекулярная медицина, клеточная терапия, трансплантология, нанотехнологии» (Екатеринбург, 2009); VI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. БФФХ – 2010» (Севастополь, 2010); Девятом съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2010); Международной научной конференции «Современные проблемы радиобиологии» (Гомель, 2010); XXI Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010).

Публикации. По теме диссертационной работы имеется 22 публикации: 14 статей и 8 тезисов, в том числе 2 статьи в журналах из «Перечня ВАК РФ».

На защиту выносятся следующие положения:

1. УФ-свет ($151-1359 \text{ Дж/м}^2$) и рекомбинантный α_2 -интерферон (0,01–100 МЕ/мл) изменяют структурное состояние лимфоцитарных мембран, уровень экспрессии молекул рецепторного комплекса Т-клеток (CD3, CD4, CD8, CD95) и В-лимфоцитов (CD19, CD20), их функциональную активность.

2. УФ-свет ($151-1359 \text{ Дж/м}^2$) вызывает перераспределение молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса (CD3, CD4 и CD8 маркеров) на поверхности Т-лимфоцитов в виде «кэппинг»-эффекта с образованием рецепторных кластеров различных типов («кэп $\frac{1}{2}$ », «кэп $\frac{1}{4}$ » и амебовидный кэп).

3. Ответная реакция CD8 и CD95 маркеров Т-лимфоцитов крови человека на комбинированное воздействие УФ-света и человеческого лейкоцитарного α -интерферона зависит как от используемой дозы УФ-облучения, так и от концентрации добавленного цитокина.

4. УФ-излучение ($151-1359 \text{ Дж/м}^2$) и препараты лейкоцитарного и рекомбинантного α -интерферона (0,01–100 МЕ/мл) могут выступать в роли факторов, определяющих направление иммунного ответа по клеточному или гуморальному пути и регулирующих уровень его интенсивности.

5. Схемы возможных процессов действия УФ-света и рекомбинантного α_2 -интерферона на структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа включает 154 страницы машинописного текста; состоит из «Введения», 5 глав, «Заключения», «Выводов» и «Приложения». Список литературы содержит 184 источника. Иллюстрационный материал включает 37 рисунков и 2 таблицы в основном тексте и 22 таблицы в «Приложении».

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе дана краткая характеристика Т- и В-лимфоцитов крови человека, рассмотрены структурно-функциональные свойства молекул рецепторного комплекса на их поверхности, охарактеризованы фотоиндуцированные изменения компонентов иммунной системы. Представлен анализ литературных данных о классификации, физико-химических и функциональных свойствах основных модуляторов иммунной системы – интерферонов.

Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились лимфоцитарные клетки, выделенные из гепаринизированной крови доноров с помощью седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (Д. Кэтти, 1991). Разделение лимфоцитов на Т- и В-популяции осуществляли используя колонки с синтетической ватой по методу Р. Terasaki (Ю.М. Зарецкая, 1983; J. Danilovs, 1980).

Жизнеспособность лимфоидных клеток определяли в тесте с трипановым синим (Д.К. Новиков, В.И. Новикова, 1996).

Облучение суспензий лимфоцитов УФ-светом проводили в термостатируемой (37 °С) стеклянной чашке сверху с использованием ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм. Интенсивность излучения составляла 151 Дж/м² в мин на расстоянии 0,23 м до объекта. Дозы облучения клеточных суспензий – 151, 453, 906 и 1359 Дж/м².

Для модификации суспензий Т- и В-лимфоцитов применяли препараты человеческого лейкоцитарного α-интерферона (Микроген, Москва), рекомбинантного α_{2b}-интерферона (НПП «Фармаклон») в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 10; 100 МЕ/мл и ингибитор синтеза белка – анизомияцин (10⁻⁶ моль/л; «Sigma», США).

Для определения уровня экспрессии CD3 комплексов, CD4, CD8, CD95, CD19 и CD20 маркеров на поверхности мембран нативных и модифицированных Т- и В-лимфоцитов применяли методы непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и проточной цитофлуориметрии.

При проведении ИФА использовали соответствующие моноклональные антитела LT3, LT4, LT8, LT95, LT19 и LT20 и конъюгат к ним – козы анти тела против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена («Сорбент», Москва).

При использовании метода проточной цитофлуориметрии применяли моноклональные антитела LT3, LT4, LT8, меченные ФИТЦ (ООО «Сорбент», Москва) и IgG-FITC в качестве изотипического контроля.

Распределение CD3 комплексов, CD4 и CD8 рецепторов на поверхности нативных и фотомодифицированных Т-клеток исследовали методом непрямого иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител LT3, LT4, LT8 к CD3, CD4, CD8 рецепторам соответственно и F(ab)₂-фрагментов овечьих антител к IgG мыши, меченных ФИТЦ («Сорбент», Москва).

Исследование структурного состояния лимфоцитарных мембран осуше-

ствляли при помощи флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната.

Концентрации γ -интерферона, IgM, IgG и IgA в супернатантах нативных и модифицированных лимфоцитов крови человека определяли с помощью коммерческих ИФА-тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест»).

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью прикладных программ «STATISTICA 6.0.» Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента при 5 % уровне значимости.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УФ-СВЕТА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ Т- И В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА

При исследовании структурного состояния цитоплазматических мембран после воздействия УФ-излучения ($151\text{--}1359 \text{ Дж/м}^2$) на суспензию лимфоцитов было обнаружено статистически достоверное понижение интенсивности флуоресценции зонда 1,8-АНС (рис. 1) и сдвиг максимума его спектра флуоресценции в более коротковолновую область, что свидетельствует об изменении микроокружения зонда с полярного на более гидрофобное.

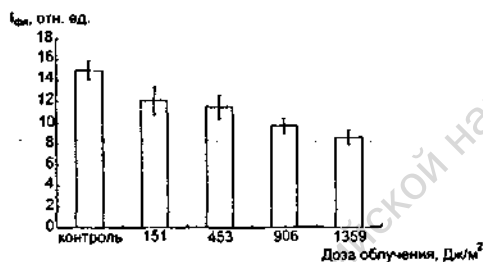


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции зонда 1,8-АНС в лимфоцитарных мембранах после УФ-облучения

Таким образом, модификация структурного состояния лимфоцитарных мембран после воздействия УФ-света может отразиться на уровне экспрессии поверхностных рецепторов, их локализации и переориентировке в мембране, что будет вносить вклад в модуляцию функциональной активности Т- и В-клеточного звена иммунитета.

При изучении влияния УФ-света ($151\text{--}1359 \text{ Дж/м}^2$) на Т-клеточное звено иммунитета человека были получены следующие данные. Показано, что УФ-свет в малых и средних дозах ($151, 453$ и 906 Дж/м^2) оказывает одностороннее (активирующее) действие на экспрессию молекул рецепторного комплекса Т-лимфоцитов крови человека, а в большой дозе (1359 Дж/м^2) может как повышать (CD4, CD8, CD95 маркеры), так и снижать (CD3 комплексы) количество анализируемых молекул на поверхности их мембран (рис. 2).

Использование ингибитора синтеза белка – аннизомицина, позволило нам установить, что увеличение уровня экспрессии тестируемых маркеров после облучения Т-лимфоцитов УФ-светом в дозах $151\text{--}906 \text{ Дж/м}^2$ (CD3, CD4) и $453\text{--}1359 \text{ Дж/м}^2$ (CD8, CD95) связано с синтезом данных рецепторов Т-лимфоцитами *de novo* (рис. 2).

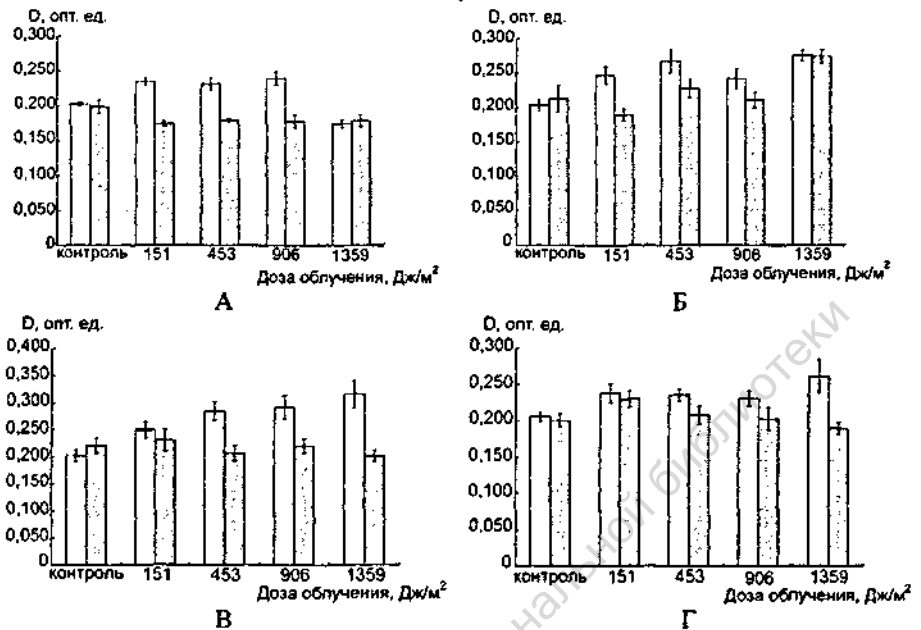


Рис. 2. Динамика уровня экспрессии CD3 комплексов (А), CD4 (Б), CD8 (В) и CD95 (Г) маркеров на поверхности УФ-облученных Т-лимфоцитов в присутствии анннзомицина: □ лимфоциты; ▨ лимфоциты + анннзомицин

Для подтверждения результатов, полученных с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа, при исследовании влияния УФ-света на уровень экспрессии CD3 комплексов, CD4, CD8 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека нами были проведены эксперименты по изучению уровня экспрессии изучаемых маркеров на поверхности нативных и фотомодифицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Было выявлено, что субпопуляционный состав нативных Т-лимфоцитов включал в себя 76 ± 4 % CD3⁺ клеток, 43 ± 2 % CD4⁺ лимфоцитов, 23 ± 4 % CD8⁺ клеток и не изменялся после воздействия на смесь иммунокомпетентных клеток УФ-света в дозах 151–1359 Дж/м². Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) CD3⁺ клеток после действия на смесь лимфоцитов УФ-света в дозах 151–906 Дж/м² повышалась, а в дозе 1359 Дж/м² – снижалась. УФ-свет во всех используемых дозах индуцировал увеличение СИФ CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD8⁺ клеток относительно немодифицированных образцов, причем наблюдался эффект увеличения численности клеток в субфракции с высоким уровнем экспрессии CD4 и во фракции со сниженным уровнем экспрессии CD8 под влиянием УФ-облучения (рис. 3).

Таким образом, результаты, полученные с помощью метода проточной цитометрии, позволили исключить возможность субпопуляционных сдвигов и показали более четкую динамику изменения уровня экспрессии CD3, CD4 и CD8 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов крови человека после воздействия УФ-излучения.

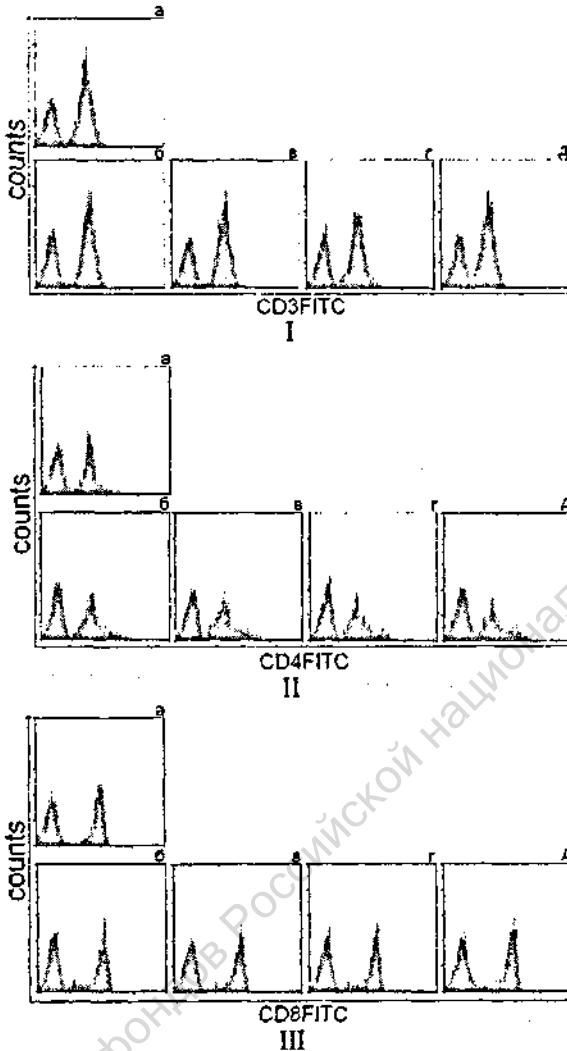


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии CD3 комплексов (I), CD4 (II) и CD8 (III) маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных УФ-светом (гистограммы, слева – изотип-контроль, справа – специфическая окраска): а – нативные клетки; б, в, г, д – УФ-облученные лимфоциты в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² соответственно

Для выяснения наличия «кэппинг»-эффекта молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса (CD3, CD4 и CD8 маркеров) на поверхности мембран Т-лимфоцитов после действия УФ-излучения (151–1359 Дж/м²) были проведены эксперименты с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Типы распределения флуоресцирующих комплексов (CD3, CD4 и CD8 маркеров с FITC-мечеными лигандами) на поверхности нативных и УФ-модифицированных Т-лимфоцитов представлены на рис. 4.

При изучении локализации CD3, CD4 и CD8 рецепторов на поверхности нативных Т-лимфоцитов крови человека было установлено, что 56 % CD3⁺, 55 % CD4⁺ и 49 % CD8⁺-лимфоцитов характеризовались равномерной (периферической) флуоресценцией, а 44 %, 45 % и 51 % клеток находились в состоянии кэппинга соответственно. УФ-свет в терапевтической дозе (151 Дж/м²) не вызывал

увеличения числа кэспирующих иммунцитов, зато приводил к появлению клеток с амёбовидным типом свечения ($CD3^+$, $CD8^+$) и флуоресцирующих по типу «кэп $\frac{1}{4}$ » ($CD4^+$). После действия УФ-света в дозах 453, 906 и 1359 Дж/м² доля кэспирующих $CD3^+$ - и $CD4^+$ -клеток достоверно повышалась, также появлялись клетки с амёбовидным типом свечения ($CD3^+$) и флуоресцирующие по типу «кэп $\frac{1}{4}$ » ($CD4^+$). Увеличение числа кэспирующих $CD8^+$ -клеток наблюдалось после облучения лимфоцитов УФ-светом в дозах 453 и 906 Дж/м².

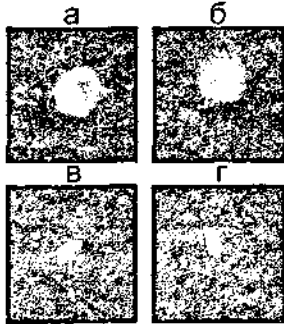


Рис. 4. Типы распределения флуоресцирующих комплексов ($CD3$, $CD4$ и $CD8$ маркеров с FITC-мечеными лигандами) на поверхности нативных и УФ-модифицированных Т-лимфоцитов: а) периферический; б) «кэп $\frac{1}{2}$ »; в) «кэп $\frac{1}{4}$ »; г) амёбовидный кэп

Таким образом, УФ-свет (151–1359 Дж/м²) вызывает перераспределение $CD3$, $CD4$ и $CD8$ рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов и индуцирует структурные фотомодификации их мембран, проявляющиеся в виде «кэспинг»-эффекта с образованием рецепторных кластеров различных типов («кэп $\frac{1}{2}$ », «кэп $\frac{1}{4}$ » и амёбовидный кэп), что свидетельствует о способности иммунокомпетентных клеток регулировать процесс функционирования антигенраспознающего рецепторного аппарата при экзогенных воздействиях.

При исследовании влияния УФ-излучения на цитокинпродуцирующую способность Т-лимфоцитов крови человека было установлено, что УФ-свет в дозах 151–1359 Дж/м² оказывает иммуносупрессивное воздействие на продукцию ими γ -интерферона, что, по-видимому, может быть связано с фотоинактивацией путей передачи транскрипционного сигнала в клетке (рис. 5).

При изучении влияния УФ-света на В-клеточное звено иммунитета человека было выявлено, что корцепторные молекулы $CD19$ и $CD20$ на поверхности В-лимфоцитов проявили фоторезистентность к действию УФ-света в дозах 151–906 Дж/м² и только максимальная доза УФ-света (1359 Дж/м²) индуцировала рост уровня их экспрессии (рис. 6).

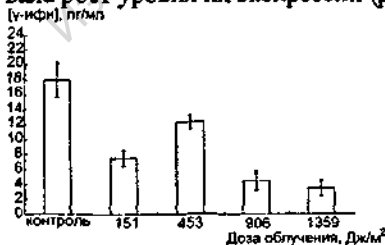


Рис. 5. Влияние УФ-излучения на синтез γ -интерферона Т-лимфоцитами крови человека

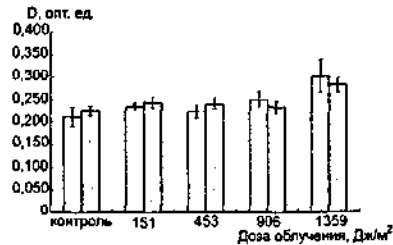


Рис. 6. Изменение уровня экспрессии $CD19$ и $CD20$ рецепторов на поверхности В-лимфоцитов, модифицированных УФ-светом (151–1359 Дж/м²): □ $CD19$; □ $CD20$

Установлено, что УФ-свет (151–1359 Дж/м²) разнонаправленно влияет на антителообразующую способность В-лимфоцитов крови человека: активизирует синтез IgA, IgG и снижает уровень продукции IgM (рис. 7).

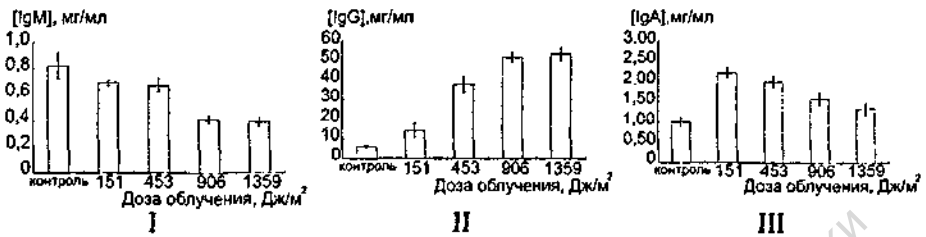


Рис. 7. Влияние УФ-излучения на синтез IgM (I), IgG (II) и IgA (III) В-лимфоцитами крови человека

Проведенные нами исследования показали, что УФ-свет (240–390 нм) в дозах 151–1359 Дж/м² значительным образом влияет на структурно-функциональные свойства лимфоцитарных клеток: индуцирует изменение поверхностного фенотипа Т- и В-лимфоцитов, вызывая перераспределение молекул антигенраспознающего рецепторного комплекса (CD3, CD4 и CD8 маркеров) на поверхности Т-лимфоцитов в виде «кэпвинг»-эффекта, снижает продукцию γ -интерферона Т-лимфоцитами и оказывает разнонаправленное действие на антителообразующую способность В-клеток, тем самым принимая участие в регуляции иммунных реакций Т- и В-клеточного звена иммунитета.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО α_{2b} -ИНТЕРФЕРОНА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ Т- И В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА

При исследовании структурного состояния мембран лимфоцитов после действия на них рекомбинантного α_{2b} -интерферона (0,01–100 МЕ/мл) было обнаружено снижение интенсивности флуоресценции зонда 1,8-АНС и сдвиг его максимума флуоресценции в более коротковолновую область, что указывает на изменение микроокружения АНС с полярного на более гидрофобное и повышение микровязкости липидного бислоя мембраны (рис. 8). Модификация липидного состава лимфоцитарных мембран после действия используемого циткина отразится на топографии поверхности их мембран.

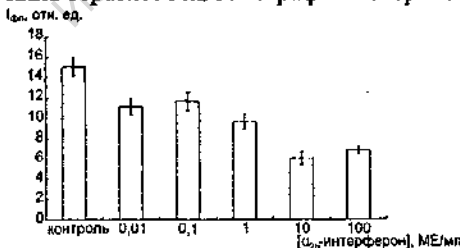


Рис. 8. Изменение интенсивности флуоресценции зонда 1,8-АНС в лимфоцитарных мембранах после действия рекомбинантного α_{2b} -интерферона

На рис. 9 представлены данные по влиянию рекомбинантного α_{2b} -интерферона на рецепторный аппарат мембран Т-лимфоцитов крови человека.

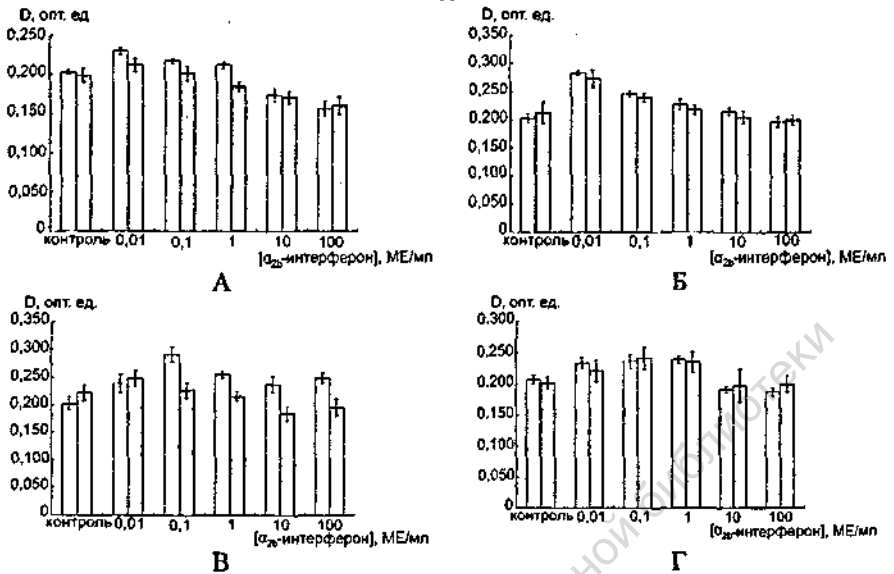


Рис. 9. Динамика уровня экспрессии CD3 комплексов (А), CD4 (Б), CD8 (В) и CD95 маркеров (Г) на поверхности Т-лимфоцитов, модифицированных рекомбинантным α_{2b} -интерфероном и анизомицином: □ лимфоциты; ▨ лимфоциты + анизомицин

Установлено, что цитокин в малых концентрациях (0,01–1 МЕ/мл) увеличивает уровень экспрессии CD3, CD4, CD8 и CD95 маркеров, а в больших концентрациях (10 и 100 МЕ/мл) – снижает уровень экспрессии CD3 и CD95 рецепторов и повышает количество CD8 антигенов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека. Эксперименты с использованием ингибитора синтеза белков – анизомицина, подтвердили, что увеличение уровня экспрессии CD3 комплексов после действия α_{2b} -интерферона в концентрациях 0,01–1 МЕ/мл и CD8 маркеров после действия цитокина в концентрациях 0,1–100 МЕ/мл обусловлено синтезом Т-лимфоцитами их новых молекул (рис. 9).

При изучении функциональных свойств Т-лимфоцитов крови человека, было выявлено, что α_{2b} -интерферон (0,01–100 МЕ/мл) увеличивает уровень спонтанной и ФГА-индуцированной продукции ими γ -интерферона (рис. 10).

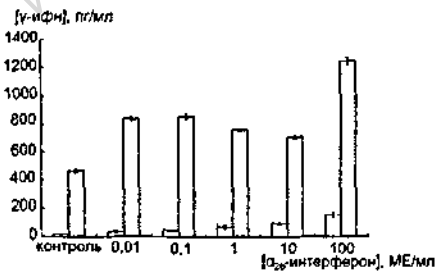


Рис. 10. Уровень продукции γ -интерферона Т-лимфоцитами крови человека, модифицированными рекомбинантным α_{2b} -интерфероном: □ уровень продукции γ -ифи; ▨ уровень ФГА-индуцированной продукции γ -интерферона

В отношении В-лимфоцитов было показано, что применение рекомбинантного α_{2b} -интерферона в малых концентрациях (0,01 и 0,1 МЕ/мл) индуцирует увеличение уровня экспрессии CD20 маркеров, а в диапазоне концентраций 0,01–100 МЕ/мл – рост уровня экспрессии CD19 маркеров на поверхности их мембран (рис. 11). Данный цитокин в малых концентрациях (0,01–1 МЕ/мл) индуцирует синтез IgA, в большой концентрации (100 МЕ/мл) – синтез IgG, но не оказывает влияния на синтез IgM В-лимфоцитами крови доноров (рис. 12).

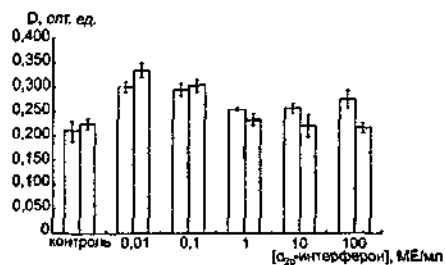


Рис. 11. Динамика уровня экспрессии CD19 и CD20 маркеров на поверхности В-лимфоцитов, модифицированных рекомбинантным α_{2b} -интерфероном: □ CD19; ■ CD20

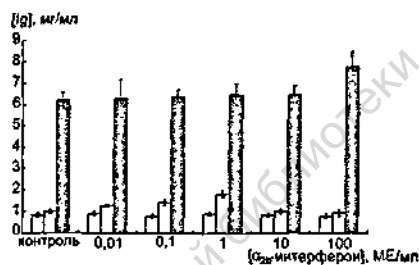


Рис. 12. Влияние рекомбинантного α_{2b} -интерферона на синтез IgM, IgG и IgA В-лимфоцитами крови человека: □ IgM; ■ IgA; ▨ IgG

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что рекомбинантный α_{2b} -интерферон индуцирует синтез γ -интерферона Т-лимфоцитами, антителообразующую способность В-лимфоцитов (IgG и IgA) и усиление экспрессии мембранных белков на поверхности иммунокомпетентных клеток, тем самым оказывая иммунорегуляторное действие на Т- и В-клеточное звено иммунитета.

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА И ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО α -ИНТЕРФЕРОНА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD8 И CD95 МАРКЕРОВ Т-ЛИМФОЦИТАМИ КРОВИ ДОНОРОВ

В настоящее время в клинической практике для коррекции иммунного статуса больных с различными типами патологий эффективно применяются как АУФОК, так и фармакоиммуноотерапия.

В связи с вышесказанным нами были проведены модельные эксперименты по изучению совместного действия человеческого лейкоцитарного α -интерферона и УФ-света на уровень экспрессии CD8 и CD95 маркеров на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека.

Установлено, что цитокин в диапазоне концентраций 0,01–1 МЕ/мл стимулирует экспрессию CD8 маркеров нативными Т-лимфоцитами. Ответная реакция CD8 антигенов фотомодифицированных Т-клеток на воздействие α -интерферона зависит как от используемой дозы УФ-облучения, так и от концентрации добавленного к ним цитокина (рис. 13).

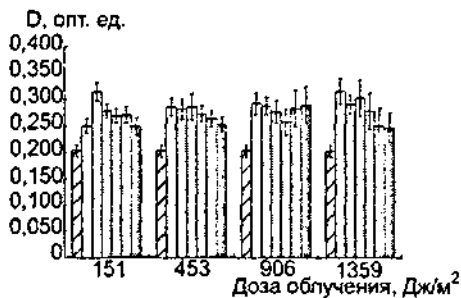


Рис. 13. Динамика уровня экспрессии CD8 маркеров на поверхности УФ-облученных Т-лимфоцитов, модифицированных человеческим лейкоцитарным α -интерфероном: интактные клетки \square ; УФ-облученные Т-лимфоциты \square ; УФ-облученные Т-лимфоциты, модифицированные α -интерфероном в концентрациях: 0,01 МЕ/мл \square ; 0,1 МЕ/мл \square ; 1 МЕ/мл \square ; 10 МЕ/мл \square ; 100 МЕ/мл \square

Выявлено, что применение цитокина в малых концентрациях (0,01 и 0,1 МЕ/мл) способствует усилению иммуностимулирующего действия УФ-света в терапевтической дозе (151 Дж/м²). Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозах 453 и 906 Дж/м², проявляют резистентность к действию α -интерферона (0,01–100 МЕ/мл). Данный цитокин ослабляет активирующий эффект большой дозы УФ-излучения (1359 Дж/м²).

В связи с тем, что при АУФОК-терапии прямому действию УФ-квантов подвергаются не только форменные элементы крови, но и цитокины, находящиеся в плазме, в том числе различные виды интерферонов, мы сочли целесообразным изучить воздействие УФ-облученного (151–1359 Дж/м²) α -интерферона на уровень экспрессии CD8 антигенов на поверхности мембран нативных и фотомодифицированных в тех же дозах Т-лимфоцитов. Установлено, что цитокин в концентрациях 0,01–100 МЕ/мл, модифицированный УФ-излучением в дозах 151–906 Дж/м² и с активностью 0,01–10 МЕ/мл, облученный УФ-светом в дозе 1359 Дж/м², вызывает рост уровня экспрессии CD8 антигенов на поверхности Т-лимфоцитов (рис. 14).

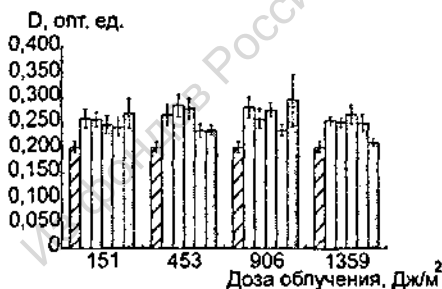
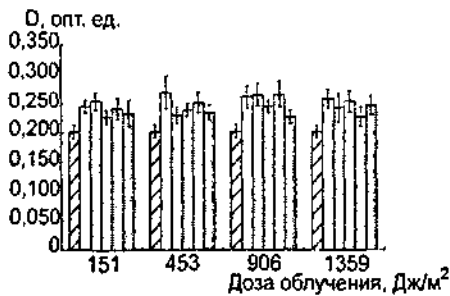


Рис. 14. Динамика уровня экспрессии CD8 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов, модифицированных УФ-облученным человеческим лейкоцитарным α -интерфероном: интактные клетки \square ; Т-лимфоциты, модифицированные УФ-облученным α -интерфероном в концентрациях: 0,01 МЕ/мл \square ; 0,1 МЕ/мл \square ; 1 МЕ/мл \square ; 10 МЕ/мл \square ; 100 МЕ/мл \square

Результаты экспериментов по исследованию уровня экспрессии CD8 маркеров на поверхности мембран фотомодифицированных Т-лимфоцитов крови доноров, инкубированных с УФ-облученным человеческим лейкоцитарным α -интерфероном, представлены на рис. 15. Показано, что воздействие УФ-облученного (1359 Дж/м²) цитокина в концентрациях 0,01–100 МЕ/мл нивелирует иммуностимулирующий эффект данной дозы УФ-излучения на экспрессию CD8 маркеров Т-лимфоцитами.



Выявлено, что человеческий лейкоцитарный α -интерферон в диапазоне концентраций 0,01–1 МЕ/мл увеличивает экспрессию CD95 маркеров нативными Т-лимфоцитами. Добавление большой концентрации α -интерферона (100 МЕ/мл) к фотомодифицированным Т-клеткам снижает уровень экспрессии изучаемых маркеров, тем самым нивелируя иммуностимулирующий эффект УФ-облучения (151–1359 Дж/м²) (рис. 16).

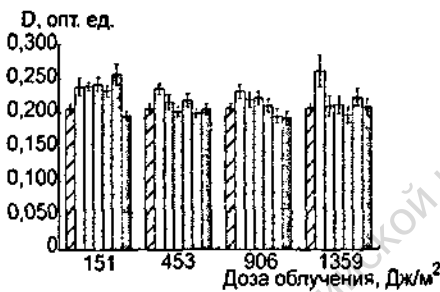


Рис. 16. Динамика уровня экспрессии CD95 маркеров на поверхности УФ-облученных Т-лимфоцитов, модифицированных человеческим лейкоцитарным α -интерфероном: интактные клетки \square ; УФ-облученные Т-лимфоциты \square ; УФ-облученные Т-лимфоциты, модифицированные α -интерфероном в концентрациях: 0,01 МЕ/мл \square ; 0,1 МЕ/мл \square ; 1 МЕ/мл \square ; 10 МЕ/мл \square ; 100 МЕ/мл \square

Полученные нами данные о сочетанном влиянии человеческого лейкоцитарного α -интерферона и УФ-света на уровень экспрессии CD8 и CD95 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека имеют важное значение и могут быть использованы для прогнозирования результатов лечения больных при совместном проведении АУФОК- и цитокинотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью методов лазерной проточной цитофлуориметрии, твердофазного иммуноферментного анализа, непрямого иммунофлуоресценции и флуоресцентных зондов исследовано структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека после воздействия УФ-излучения (240–390 нм) в дозах 151–1359 Дж/м² и различных препаратов α -интерферона (0,01–100 МЕ/мл).

Методом флуоресцентных зондов было выявлено, что УФ-свет и рекомбинантный α_{2b} -интерферон влияют на структурное состояние лимфоцитарных

мембран, изменяют гидрофобное окружение зонда и повышают микровязкость липидного бислоя мембраны, что, в свою очередь, может отразиться на уровне экспрессии поверхностных рецепторов, их локализации и переориентировке в мембране.

Данные проточной цитофлуориметрии и ИФА подтвердили изменение уровня экспрессии молекул рецепторного комплекса на поверхности Т- (TCR-CD3 и костимулирующих CD4 и CD8 молекул; CD95 маркеров, инициирующих апоптоз) и В-лимфоцитов (корцепторов BCR - CD19 и CD20 маркеров) крови человека после действия УФ-излучения (151–1359 Дж/м²).

Установлено, что УФ-свет в малых и средних дозах (151, 453 и 906 Дж/м²) индуцирует повышение уровня экспрессии CD3 комплексов, CD4, CD8 и CD95 маркеров, а в большей дозе (1359 Дж/м²) – снижение уровня экспрессии CD3 комплексов и увеличение количества CD4, CD8, CD95 антигенов на поверхности мембран Т-клеток.

С помощью иммуофлуоресцентного метода было показано, что УФ-свет (151–1359 Дж/м²) вызывает перегруппировку CD3, CD4 и CD8 рецепторов, участвующих в распознавании чужеродных антигенов, на поверхности Т-лимфоцитов в виде «кэппинг»-эффекта с образованием рецепторных кластеров различных типов («кэп ½», «кэп ¼» и амбовидный кэп).

Основными механизмами фотондуцированных изменений экспрессии изучаемых трансмембранных маркеров на поверхности иммуоцитов являются конформационные перестройки, вызывающие их переориентировку в мембране; синтез рецепторов de novo; открытие предсуществующих антигенных структур, локализованных в толще липидного бислоя, ранее не доступных для определения (экстернализация), и шеддинг антигенных детерминант с клеточной поверхности или их интернализация.

При изучении цитокинпродуцирующей способности Т-клеток нами было выявлено снижение синтеза γ -интерферона фотомодифицированными Т-лимфоцитами крови доноров.

При исследовании влияния УФ-излучения на компоненты гуморального звена иммунитета было обнаружено, что УФ-свет в максимальной дозе (1359 Дж/м²) увеличивает уровень экспрессии CD19 и CD20 маркеров на поверхности мембран В-лимфоцитов. Изучаемые корцепторы BCR оказались фоторезистентны к действию УФ-света в дозах 151–906 Дж/м². УФ-свет оказывает разнонаправленное влияние на функциональную активность (антителообразующую способность) В-лимфоцитов крови человека. Нами было показано стимулирующее действие УФ-света (151–1359 Дж/м²) на синтез IgG, IgA и супрессивное – на синтез IgM В-лимфоцитами.

Известно, что от соотношения Т-хелперов 1 и 2 типов, продуцирующих различный набор цитокинов (Th1 – γ -ИФН, IL-2, ФНО- α/β , IL-12 и др.; Th2 – IL-4, IL-6, IL-10 и др.), зависит структура иммунной защиты и направление развития иммунных процессов в сторону клеточного и гуморального ответа. Th1 определяют развитие иммунитета по клеточному типу, а Th2 – по гуморальному. Так, по-видимому, выявленное нами УФ-индуцированное снижение синтеза γ -интерферона (основного цитокина, усиливающего клеточный иммунный ответ) Th1-лимфоцитами компенсируется выработкой цитокинов Th2-клетками,

обеспечивающих развитие гуморальной формы иммунитета посредством усиленного синтеза иммуноглобулинов фотомодифицированными В-клетками.

Таким образом, УФ-свет принимает активное участие в регуляции соотношения клеточной и гуморальной составляющих иммунного ответа.

На основании литературных и собственных экспериментальных данных была предложена схема возможных механизмов действия УФ-света на структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека (рис. 17).

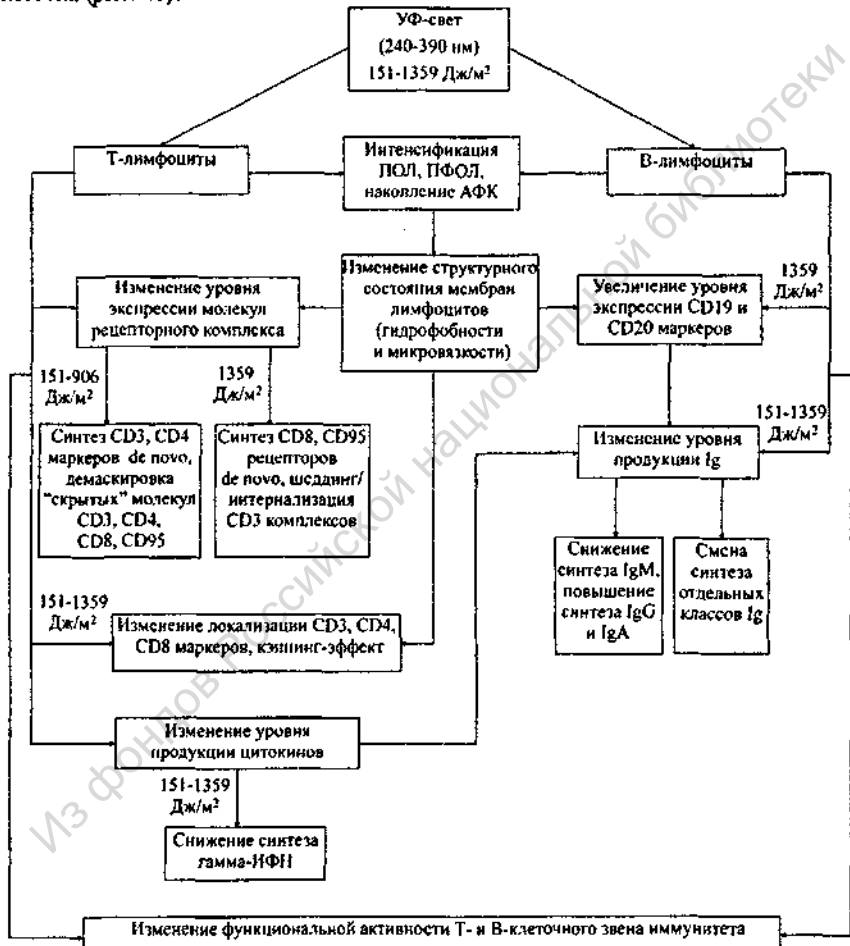


Рис. 17. Схема возможных механизмов действия УФ-света на структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека

Результаты исследования уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов крови человека, модифицированных рекомбинантным α_{2b} -интерфероном, свидетельствуют о том, что данный цитокин в малых концен-

трациях (0,01–1 МЕ/мл) оказывает иммуностимулирующее влияние на уровень экспрессии CD3 комплексов, CD4 и CD95 маркеров, а в больших концентрациях (10 и 100 МЕ/мл) – иммунодепрессивное действие на уровень экспрессии CD3 и CD95 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов крови человека. α_{25} -интерферон во всех используемых концентрациях (0,01–100 МЕ/мл) увеличивает количество CD8 антигенов на поверхности Т-клеток.

Увеличение уровня экспрессии изучаемых маркеров иммунокомпетентными клетками после действия используемого цитокина может быть обусловлено их синтезом de novo: α -интерферон стимулирует возникновение транскрипционного сигнала, включающего активацию цитоплазматических факторов STAT α/β и STAT2, тирозинкиназ Jak1 и Tyk2, образование транскрипционного фактора ISGF3 и синтез ряда белков в клетке. Кроме того, известно, что при действии α -интерферона происходит усиление процессов ПОЛ биомембран лимфоцитов и накопление в клетке АФК, что, с одной стороны, может привести к шеддингу рецепторов с клеточной поверхности или к их интернализации, а, с другой стороны, – к экспонированию «скрытых» молекул рецепторов на поверхность плазматической мембраны лимфоцитов.

При изучении функциональных свойств Т-лимфоцитов крови человека было установлено, что α_{25} -интерферон (0,01–100 МЕ/мл) увеличивает уровень спонтанной и ФГА-индуцированной продукции ими γ -интерферона, под действием которого происходит усиление экспрессии молекул MHC I и II классов на антигенпредставляющих клетках и активация синтеза цитокинов, необходимых для презентации антигена Т-лимфоцитами. В то же время он служит фактором, способствующим выработке IgG и IgA В-лимфоцитами (А.А. Ярилин, 1999).

В отношении В-лимфоцитов было установлено, что рекомбинантный α_{25} -интерферон в малых концентрациях (0,01 и 0,1 МЕ/мл) индуцирует увеличение уровня экспрессии CD20 маркеров, а в диапазоне концентраций 0,01–100 МЕ/мл – рост уровня экспрессии CD19 маркеров на поверхности их мембран. При исследовании антителообразующей способности В-лимфоцитов крови доноров после действия α_{25} -интерферона было обнаружено, что данный цитокин в малых концентрациях (0,01–1 МЕ/мл) индуцирует синтез IgA, в большой концентрации (100 МЕ/мл) – синтез IgG, но не оказывает влияния на синтез IgM.

Следовательно, рекомбинантный α_{25} -интерферон принимает участие в модуляции ряда иммунорегуляторных функций, которые способствуют взаимодействию между Т- и В-лимфоцитами.

На основании литературных и собственных экспериментальных данных была предложена схема возможных механизмов действия рекомбинантного α_{25} -интерферона на структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека (рис. 18).

Изучение уровня экспрессии CD8 и CD95 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов крови доноров при сочетанном применении УФ-света и природного лейкоцитарного α -интерферона позволило сделать заключение о том, что нативные и фотомодифицированные Т-лимфоциты по-разному отвечают на действие человеческого лейкоцитарного α -интерферона. Так, α -интерферон в диапазоне концентраций 0,01–1 МЕ/мл стимулирует экспрессию CD8 и CD95 маркеров интактными Т-лимфоцитами. Ответная реакция данных антигенов

фотомодифицированных Т-клеток на воздействие α -интерферона зависит от используемой дозы УФ-облучения и от концентрации добавленного к ним цитокина.

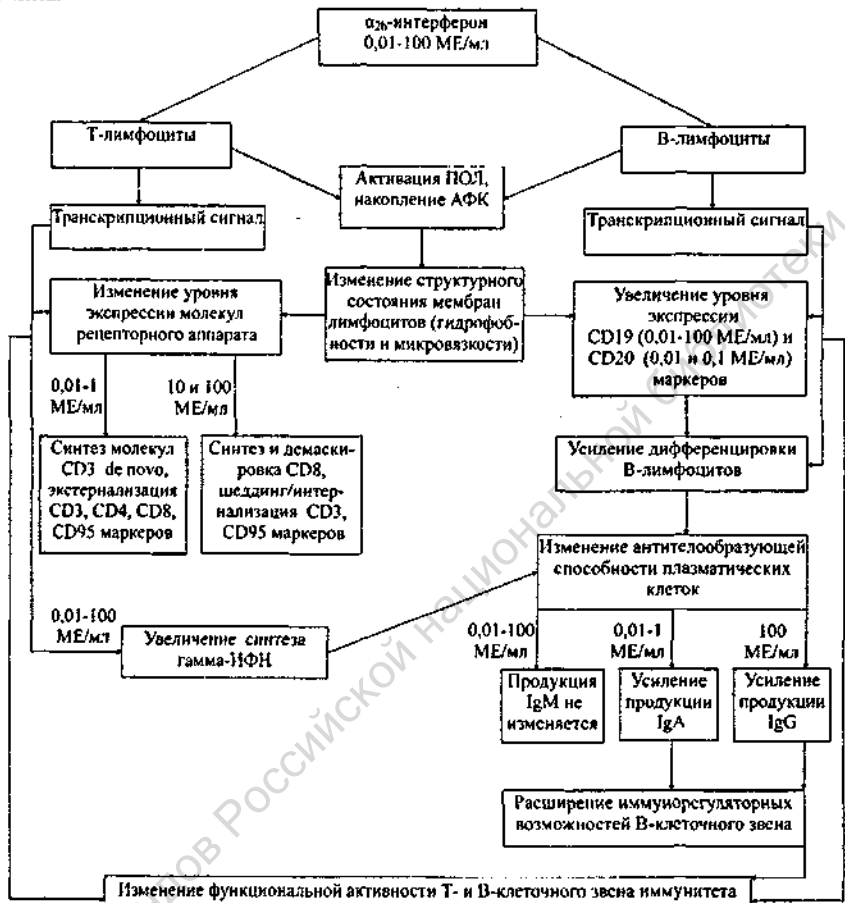


Рис. 18. Схема возможных механизмов действия рекомбинантного α_{2b} -интерферона на структурно-функциональное состояние компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета человека.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что УФ-излучение ($151-1359 \text{ Дж/м}^2$) и различные препараты лейкоцитарного и рекомбинантного α -интерферона ($0,01-100 \text{ МЕ/мл}$) оказывают значительное влияние на структурно-функциональное состояние иммунокомпетентных клеток и могут выступать в роли факторов, целенаправленно регулирующих уровень интенсивности иммунного ответа. В связи с этим открываются широкие перспективы для модуляции активности Т- и В-клеточного звена иммунитета как отдельным, так и комбинированным воздействием УФ-излучения и различных препаратов α -интерферона.

1. После воздействия на смесь иммунокомпетентных клеток УФ-света (240–390 нм) в дозах 151–1359 Дж/м² субпопуляционный состав нативных Т-лимфоцитов (76±4 % CD3⁺ клеток, 43±2 % CD4⁺ лимфоцитов, 23±4 % CD8⁺ клеток) не изменялся.
2. Снижение интенсивности флуоресценции зонда 1,8-АНС в суспензии лимфоцитов после действия УФ-света (151–1359 Дж/м²) свидетельствует об изменении структурного состояния их мембран, что, в свою очередь, отражается на уровне экспрессии поверхностных рецепторов, их локализации и переориентировке в мембране.
3. УФ-свет в малых и средних дозах (151, 453 и 906 Дж/м²) оказывает однопольное (активирующее) действие на экспрессию молекул рецепторного комплекса Т-лимфоцитов крови человека, а в большой дозе (1359 Дж/м²) может как повышать (CD4, CD8, CD95 маркеры), так и снижать (CD3 комплексы) количество анализируемых молекул на поверхности их мембран.
4. Установлено, что увеличение уровня экспрессии тестируемых маркеров после облучения Т-лимфоцитов УФ-светом в дозах 151–906 Дж/м² (CD3, CD4) и 453–1359 Дж/м² (CD8, CD95) связано с синтезом данных рецепторов *de novo*.
5. УФ-свет (151–1359 Дж/м²) вызывает перераспределение CD3 комплексов, CD4 и CD8 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов крови человека в виде «кэппинг»-эффекта с образованием рецепторных кластеров различных типов («кэп ½», «кэп ¼» и амбовидный кэп).
6. Корцепторные молекулы CD19 и CD20 на поверхности В-лимфоцитов крови человека проявляют фоторезистентность к действию УФ-света в дозах 151–906 Дж/м² и только максимальная доза УФ-света (1359 Дж/м²) оказывает иммуностимулирующее влияние на уровень их экспрессии.
7. Изменение структурного состояния мембран лимфоцитов, выявленное после воздействия рекомбинантного α_{2b}-интерферона, сопровождается увеличением уровня экспрессии CD3, CD4, CD8 и CD95 маркеров (0,01–1 МЕ/мл), снижением уровня экспрессии CD3, CD95 рецепторов и повышением количества CD8 антигенов (10 и 100 МЕ/мл) на поверхности Т-лимфоцитов крови человека.
8. Установлено, что увеличение уровня экспрессии CD3 комплексов после действия α_{2b}-интерферона в концентрациях 0,01–1 МЕ/мл и CD8 маркеров после действия цитокина в концентрациях 0,1–100 МЕ/мл обусловлено синтезом их новых молекул Т-лимфоцитами.
9. Выявлено, что рекомбинантный α_{2b}-интерферон (0,01–100 МЕ/мл) активирует дозозависимое образование γ-интерферона Т-лимфоцитами крови доноров.
10. Обнаружен рост уровня экспрессии CD19 маркеров на поверхности В-лимфоцитов крови человека после применения рекомбинантного α_{2b}-интерферона в диапазоне концентраций 0,01–100 МЕ/мл, а экспрессии CD20 маркеров - только в концентрациях 0,01 и 0,1 МЕ/мл.
11. Рекомбинантный α_{2b}-интерферон в малых концентрациях (0,01–1 МЕ/мл) индуцирует синтез IgA, в большой концентрации (100 МЕ/мл) - синтез IgG, но не оказывает влияния на синтез IgM В-лимфоцитами крови доноров.
12. Интерферончувствительность фотомодифицированных Т-клеток отличается

от таковой интактных образцов: α -интерферон, добавленный в различных концентрациях к УФ-облученным лимфоцитам, может как активировать, так и подавлять стимулирующее действие УФ-излучения на уровень экспрессии CD8 и CD95 рецепторов на поверхности их мембран, что необходимо учитывать при совместном проведении АУФОК- и цитокинотерапии.

13. α -интерферон в концентрации 100 МЕ/мл нивелирует иммуностимулирующий эффект УФ-облучения ($151\text{--}1359 \text{ Дж/м}^2$) на уровень экспрессии CD95 маркеров Т-лимфоцитами.

14. УФ-излучение ($151\text{--}1359 \text{ Дж/м}^2$) и различные препараты лейкоцитарного и рекомбинантного α -интерферона (0,01–100 МЕ/мл) оказывают значительное влияние на структурно-функциональное состояние иммунокомпетентных клеток и могут выступать в роли факторов, целенаправленно регулирующих уровень интенсивности иммунного ответа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. О коррекции α -интерфероном негативного действия больших доз УФ-света на Т-лимфоциты крови человека / И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина // Владикавказский медико-биологический вестник. – 2007. – Т. VII, № 13. – С. 266–268.

2. Экспрессия CD4 маркеров на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека, модифицированных УФ-светом, α -интерфероном и их совместным воздействием / И.А. Колтаков, В.А. Вдовина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Материалы международной научно-практической конференции «Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине», Ростов-на-Дону, 10-12 октября 2007. – С. 120–122.

3. Влияние интерферона α на уровень экспрессии CD95 рецепторов нативными и УФ-облученными Т-лимфоцитами крови человека / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина, И.А. Колтаков, М.Л. Бычков // Аллергология и иммунология: материалы междунар. конф. "Физиология и патология иммунной системы", IV междунар. конф. по иммунотерапии – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 360.

4. Изменение уровня экспрессии CD4 антигенов на поверхности мембран нативных и УФ-модифицированных Т-лимфоцитов крови человека в присутствии различных концентраций α -интерферона / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, И.А. Колтаков, В.А. Вдовина // Сборник научно-практических работ №2 «Производственная, клиническая и транспортная трансфузиология: этапы реформирования, инфекционная и иммунологическая безопасность, критерии качества». – Воронеж, 2008. – С. 147–151.

5. Иммуоферментное определение уровня экспрессии CD4 антигенов на поверхности фотомодифицированных Т-лимфоцитов крови человека в присутствии α -интерферона / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, И.А. Колтаков, В.А. Вдовина // Рефераты докладов. Второй международный форум «Аналитика и Аналитика», Воронеж, 22-26 сентября 2008. – Т. 2. – С. 513.

6. Исследование фотоиндуцированных изменений уровня экспрессии некоторых мембранных маркеров Т-лимфоцитами крови человека / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, И.А. Колтаков, В.А. Вдовина, С.М. Дубова // Труды Четвертой

международной конференции «Электромагнитные излучения в биологии», Калуга, 21-23 октября 2008. – С. 17-23.

7. Поверхностный фенотип Т-лимфоцитов крови человека в условиях их УФ-облучения / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина, С.М. Дубова, И.А. Колтаков // Научные труды II Съезда физиологов СНГ, Кишинев, 29-31 октября 2008. – С. 157.

8. Изменение уровня экспрессии CD4 антигенов на поверхности мембран нативных Т-клеток крови человека, модифицированных УФ-облученным α -интерфероном / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина, И.А. Колтаков // Сборник материалов международной научной конференции «Биология: теория, практика, эксперимент» – Саранск, 2008. – С. 239-241.

9. Уровень экспрессии CD8 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека, индуцированной УФ-излучением / О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов, В.А. Вдовина, И.А. Колтаков // V Съезд Российского фотобиологического общества, Пушкино, 8-13 июня 2008. – С. 175.

10. Влияние α -интерферона на уровень экспрессии CD95 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека / В.А. Вдовина, О.В. Путинцева, М.Л. Бычков, В.Г. Артюхов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. Выпуск 10 – Воронеж, 2008. – С. 66-68.

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

12. Влияние рекомбинантного α_{25} -интерферона на уровень экспрессии CD8 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов крови человека / В.А. Вдовина // Сборник тезисов Всероссийской школы-семинара для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы». – Белгород, 14-17 октября 2009. – С. 10-12.

13. Влияние α -интерферона на уровень экспрессии CD95 рецепторов на поверхности УФ-облученных Т-лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина, М.Л. Бычков // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. – Воронеж, 2009. – С. 34-37.

14. Изменение уровня экспрессии CD8 антигенов на поверхности мембран нативных и УФ-модифицированных Т-лимфоцитов крови человека в присутствии различных концентраций α -интерферона / В.А. Вдовина // Тезисы докладов Международной научной школы для молодежи «Инновационные технологии в здравоохранении: молекулярная медицина, клеточная терапия, трансплантология, нанотехнологии». Екатеринбург, 9-12 ноября 2009. – С. 50-52.

15. Уровень экспрессии CD19 и CD20 рецепторов на поверхности мембран В-лимфоцитов крови человека, модифицированных различными концентрациями α -интерферона / М.А. Янц, В.А. Вдовина // Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки». – Ярославль, 2009. – С. 88-89.

16. Изменение уровня экспрессии CD8 антигенов на поверхности мембран на-

тивных Т-лимфоцитов крови человека, модифицированных УФ-облученным α -интерфероном / В.А. Вдовина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов / Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования» Т. II. Биологические науки. – УФА, 2010. – С. 140-144.

17. Изменения уровня экспрессии CD19 и CD20 рецепторов на поверхности В-лимфоцитов крови доноров, модифицированных УФ-светом и рекомбинантным α_{2b} -интерфероном / В.А. Вдовина, В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева // Материалы VI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. БФФХ – 2010». Т. 2. Биофизика и биофизическая медицина – Севастополь, 26-30 апреля 2010. – С. 295-298.

18. Влияние различных препаратов интерферона на уровень экспрессии CD95 рецепторов на поверхности мембран Т-лимфоцитов крови человека / В.А. Вдовина // Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 1000-летию г. Ярославля «Актуальные вопросы медицинской науки». – Ярославль, 2010. – С. 96-97.

19. Чувствительность рецепторного аппарата мембран Т-лимфоцитов крови человека к воздействию УФ-света / О.В. Путинцева, С.М. Дубова, В.А. Вдовина, В.Г. Артюхов // Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 23-25 июня 2010. Сборник статей в двух частях, часть 1. – С. 121-123.

20. Действие человеческого лейкоцитарного α -интерферона на уровень экспрессии CD8-рецепторов нативными и УФ-облученными Т-лимфоцитами крови доноров / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, В.А. Вдовина // Иммунология. – 2010. – Т. 31, № 3. – С. 152-153.

21. Анализ процессов биосинтеза CD8 рецепторов на поверхности УФ-облученных Т-лимфоцитов крови человека с использованием анизомицина / В.А. Вдовина, В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева // Тезисы докладов XXI Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, Калуга, 19-25 сентября 2010. – С. 110.

22. Влияние УФ-излучения на процесс синтеза γ -интерферона лимфоцитами крови человека / О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов, В.А. Вдовина, С.М. Дубова // Материалы международной научной конференции «Современные проблемы радиобиологии», Гомель, 14-15 октября 2010. – С. 96-97.

Статьи № 11, 20 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ.

Подписано в печать 28.12.2010 г.

Формат 60 x 84/16. Бумага офсетная. Усл. печ. л. 1,4 Тираж 100 экз. Заказ №45
Отпечатано в типографии Воронежский ЦНТИ – филиал ФГУ «РЭА» Минэнерго России
394036, г. Воронеж, пр. Революции, 30