

## FEATURES OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE IMMUNE SYSTEM IN PERSONS SUBJECTED TO CHRONIC RADIATION EXPOSURE IN UTERO IN THE REMOTE PERIOD

Akleyev A. A.

*Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, Southern-Urals  
State Medical University of the RF Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia*

The embryonic and fetal tissues are more radiosensitive than the tissues of an adult organism. Therefore, intrauterine irradiation is a greater danger compared to irradiation in the postnatal period. A complex assessment of the functional state of the immune system was carried out in the period of the long-term effects of chronic radiation exposure in persons irradiated *in utero* and in early childhood. Various violations of the immune system are shown in persons irradiated in the antenatal period of development, compared with people irradiated in the postnatal period.

*Key words:* radiation, immunity, intrauterine exposure

## РОЛЬ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ДЕГРАНУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Асадуллина И. А.<sup>1</sup>, Серебрякова М. К.<sup>1</sup>, Кудрявцев И. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; <sup>2</sup>ФГБУ «НИИ онкологии  
им. Н. Н. Петрова» Минздрова России, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время метаболизм нуклеотидов вызывает большой интерес в контексте регуляции функций иммунокомпетентных клеток при воспалении. Именно аденозинтрифосфату приписываются множество эффектов, обуславливающих хемотаксис, активацию, дегрануляцию различных субпопуляций лейкоцитов. В данном исследовании было изучено влияние АТФ на дегрануляцию нейтрофилов, а также различных субпопуляций моноцитов периферической крови человека *in vitro* при помощи метода проточной цитометрии. Нами показано, что добавление АТФ в концентрациях 1 мМ и 0,1 мМ вызывало достоверное повышение уровня экспрессии маркера дегрануляции CD66b на нейтрофилах. Повышение уровня экспрессии маркера дегрануляции CD63 на субпопуляции «классических» моноцитов, экспрессирующих CD14, показано лишь на сроке 15 мин инкубации, тогда как субпопуляции «неклассических» моноцитов, экспрессирующих CD16, не ответили на внесение данного стимулятора.

*Ключевые слова:* аденозинтрифосфат, проточная цитометрия, дегрануляция, моноциты, нейтрофилы

**Введение.** Функции АТФ как внеклеточного посредника известны уже более 30 лет после работ Джеффри Бёрнстока, показавшего роль АТФ как передатчика сигнала по нервному волокну [3]. В нормальных условиях клетки млекопитающих содержат от 1 до 10 мМ АТФ в цитоплазме, однако при патологических состояниях, в процессе активации, дегрануляции или апоптоза АТФ высвобождается из клеток во внеклеточное пространство [13]. Эффекты АТФ проявляет посредством связывания с так называемыми P2-рецепторами,

подразделяющимися на подсемейства P2X и P2Y-рецепторов. Связывание с лигандом приводит к открытию ионного канала, сформированного субъединицами P2X-рецептора и проницаемого для ионов. Ток натрия и кальция внутрь клетки и выход калия из неё ведет к деполяризации мембраны и активации кальций-зависимых сигнальных путей, обуславливающих различные эффекты АТФ [11].

После достижения очагов воспаления, где концентрация АТФ самая высокая, создаются условия для проявления бактерицидной функ-

ции моноцитов и нейтрофилов. Первым шагом в реализации защитной функции нейтрофилов является фагоцитоз патогена. Этот процесс стимулируется даже при низких концентрациях АТФ и АДФ; один из механизмов этого эффекта был представлен посредством активации рецепторов к комплементу [10]. Внеклеточный АТФ в микромолярных концентрациях стимулирует дегрануляцию азурофильных и специфических гранул, повышает продукцию активных форм кислорода ( $O_2^-$  и  $H_2O_2$ ), вероятно, путем активации P2Y<sub>2</sub>-рецепторов [4]. Важную роль в реализации бактерицидной функции играет P2X-рецептор: связывание его с лигандом приводит к мобилизации микробицидных агентов и активации реакций окислительно-взрыва. В миллимолярных концентрациях внеклеточный АТФ может индуцировать продукцию реактивных радикалов кислорода через рецептор P2X<sub>7</sub> даже в неактивированных нейтрофилах [12]. Удаление нейтрофилов из очага воспаления реализуется путем апоптоза с последующим поглощением их макрофагами. Внеклеточный АТФ в микромолярных концентрациях способен замедлять апоптоз нейтрофилов и продлевать продолжительность их функциональной жизни, действуя совместно с гранулоцитарно-макрофагальным колоние-стимулирующим фактором – GM-CSF [5].

Особую роль в процессе воспаления играет влияние АТФ на секреторную функцию моноцитов и макрофагов. Активация синтеза и секреции растворимых медиаторов находится под контролем таких транскрипционных факторов, как NFκB и AP-1. NFκB активируется в моноцитах/макрофагах через стимуляцию P2X<sub>7</sub>-рецепторов связыванием их с АТФ и АДФ на покоящихся клетках, либо через активацию P2Y<sub>6</sub>-рецептора посредством УТФ на клетках, активированных ЛПС [1]. Показано участие P2-рецепторов в стимуляции секреции провоспалительных цитокинов, в частности, IL-1, и определен механизм этого процесса. Активация синтеза и секреции растворимых медиаторов находится под контролем таких транскрипционных факторов, как AP-1 и NFκB. Последний активируется в моноцитах/макрофагах через стимуляцию P2X<sub>7</sub>-рецепторов связыванием их с АТФ и АДФ на покоящихся клетках, либо через активацию P2Y<sub>6</sub>-рецептора посредством УТФ на клетках, активированных ЛПС [1]. Показано участие P2-рецепторов в стимуляции секреции провоспалительных цитокинов,

в частности, IL-1, и определен механизм этого процесса. Известно, что ЛПС-индуцированное высвобождение IL-1 из макрофагов – медленный и малоэффективный процесс, приводящий к образованию и выходу из клетки высокомолекулярного предшественника-процитокина. Для того, чтобы вызвать секрецию низкомолекулярного биологически активного цитокина, необходим дополнительный сигнал, которым и является внеклеточный АТФ [7]. Блокирование P2X<sub>7</sub>-рецепторов моноклональными антителами нарушает процесс созревания и секреции молекулы IL-1 [2].

Помимо этого, бактерицидные свойства макрофагов могут усиливаться за счет повышения внутриклеточного  $Ca^{2+}$  посредством активации P2Y-рецепторов, а также увеличения продукции супероксиданиона, вызванного связыванием АТФ. Колебания концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и мембранного потенциала клетки, вызываемые АТФ, способствуют продукции IL-6 [6].

Стимуляция моноцитов/макрофагов внеклеточными нуклеотидами через P2X-рецептор совместно с коэкспрессией ЛПС или других РАМР активирует индуцибельную NO-синтазу – фермента, являющегося ключевым в реализации бактерицидной функции фагоцитов [8]. АТФ обладает не только провоспалительной, но и противовоспалительной активностью: в моноцитах он ингибирует продукцию некоторых провоспалительных цитокинов, таких, как TNFα, усиливая при этом высвобождение противовоспалительного IL-10 [9].

В настоящее время АТФ рассматривают как один из главных регуляторов процесса воспаления из-за его активного участия в метаболизме иммунокомпетентных клеток. Целью работы являлся анализ роли АТФ в регуляции функциональной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила гепарин-стабилизированная периферическая кровь условно здоровых добровольцев (n=6). Забор крови производился непосредственно перед постановкой эксперимента с помощью вакуумных систем забора крови («C.D.Rich», Китай). Кровь распределяли по цитометрическим пробиркам, в каждую помещалась порция крови объемом 50 мкл. Во все пробы вносились стимуляторы по 5 мкл в определенных конечных концентрациях: АТФ – 1мМ и 0,1мМ; VzATP («Tocris Bioscience», Великобри-

тания) – 0,1мМ; иономицин («Sigma-Aldrich», США) – 1мкг/мл; в контрольные пробы не вносились никаких веществ. Время инкубации со стимуляторами составляло 15, 30 и 45 минут при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По завершении инкубации образцы окрашивались смесью антител (все антитела производства «Becton Coulter», США) в составе: CD66b-FITC, CD63-PE, CD14-APC, CD16-PC7, CD45-APC-AF750. Для оценки спонтанного связывания антител применяли соответствующие изотипические контроли. Удаление эритроцитов из образцов проводили при помощи коммерческого лизирующего раствора OptLyse B («Becton Coulter», США) в соответствии с рекомендациями производителя. По завершении лизиса эритроцитов образцы однократно отмывали избытком забуференного фосфатами физиологического (PBS) раствора (330г 7 мин). Удаляли надосадочную жидкость, а клетки ресуспендировали в 300 мкл PBS с добавлением 2% формалином («Sigma-Aldrich», США), после чего производился анализ проб на проточном цитометре.

Уровень дегрануляции клеток оценивался по величине средней геометрической флуоресценции антител CD63 и CD66b, как специфических маркеров дегрануляции; субпопуляционный состав клеток в пробах определялся с помощью оценки экспрессии специфических поверхностных маркеров: CD45, CD14 и CD16. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США), а обработку данных проводили при помощи программы Kaluza™ v.1.2. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции (MFI), которые соответствовали геометрической средней интенсивности флуоресцентного сигнала (Geo-Mean), а обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) с применением t-критерия Стьюдента. Во всех экспериментах различия между контролем и опытом считались статистически достоверными только для  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** При оценке уровня экспрессии CD66b на нейтрофилах в случае спонтанной экспрессии (8,64 MFI) и при внесении стимулятора в обеих концентрациях наблюдалось увеличение уровня экспрессии данного маркера (19,65 MFI для АТФ 0,1мМ и 16 MFI для АТФ 1мМ). Отличие опыта от контроля достоверно на всех временных точках. Отличий между концентрациями АТФ не выявлено. Полученные данные совпадают

в литературными: уровень экспрессии CD66b существенно повышается при активации нейтрофилов; за счет гомотипических взаимодействий и связывания с CD66c данный маркер играет ведущую роль в формировании агрегатов нейтрофилов (Schmidt et al., 2012). Так как CD66b локализован внутри нейтрофилов в составе мембран их специфических гранул, в процессе дегрануляции он переходит в состав плазматической мембраны и становится доступен для связывания соответствующими антителами (Ducker, Skubitz, 1992).

На популяции моноцитов была обнаружена описанная ранее в литературе гетерогенность данных клеток. Нами были обнаружены три субпопуляции моноцитов, названные условно: «классические» с фенотипом CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>, «переходные» CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и «неклассические» CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>high</sup>. Дальнейший анализ проводился соответственно выявленным популяциям. На тотальной популяции моноцитов показано повышение экспрессии маркера дегрануляции CD63 с 6,67 MFI до 10,6 MFI (для АТФ 0,1мМ) и 9,87 MFI (для АТФ 1мМ), но только на сроке инкубации 15 минут. При более длительной инкубации достоверных отличий не наблюдалось. Большую часть тотальной популяции моноцитов составляют так называемые «классические» моноциты, высоко экспрессирующие CD14 и низко – CD16. Аналогично данным по общей популяции, на этих клетках отмечалось достоверное повышение экспрессии маркера дегрануляции CD63 на сроке инкубации 15 минут с 6,95 MFI до 11,25 и 10,5 MFI соответственно. Субпопуляция моноцитов, высоко экспрессирующая и CD14, и CD16, была обозначена, как популяция «переходных» моноцитов. Данная популяция ответила повышением уровня экспрессии CD63 при АТФ в конечной концентрации 0,1 мМ лишь на сроке 15 минут с 9,95 до 16,63 MFI. Остальные контрольные точки не давали достоверных результатов. Также не наблюдалось ответа на внесение стимуляторов со стороны третьей субпопуляции, у которой сохраняется высокая экспрессия CD16, но снижается экспрессия CD14 – так называемые «неклассические» моноциты. Эта популяция не ответила на АТФ ни на одном сроке инкубации.

Также прослеживаются функциональные отличия субпопуляций моноцитов в контексте ответа на АТФ. Нами показано, что «классические» моноциты достоверно отвечают на стимуляцию АТФ в концентрациях 0,1мМ и 1мМ,

в то время, как популяции, экспрессирующие CD16, не отвечают увеличением дегрануляции в ответ на данный стимулятор. Это может быть связано с тем, что этим популяциям в разных источниках приписывают провоспалительные функции, так как пул данных клеток увеличивается при различных воспалительных заболеваниях, следовательно, эти клетки первыми приходят в очаг воспаления, находятся в преактивированном состоянии и не нуждаются в дополнительной активации, таким образом, не способны отвечать на стимуляцию АТФ (Ziegler-Heitbrock, 2007).

**Заключение.** Нейтрофильные гранулоциты способны к активации и дегрануляции в ответ на появление экзогенного АТФ в среде, а также только «классические» моноциты способны дегранулировать в ответ на данный стимулятор; в то время, как популяции, экспрессирующие CD16 не отвечают на стимуляцию АТФ, что вероятнее всего связано с их преактивированным состоянием.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bours M. J. L., Swennen E. L. R., Di Virgilio F. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology and Therapeutics*. 2006. 112(2). 358-404.
2. Buell G., Chessell I. P., Michel D. et al. Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood*. 1998. 92. 3521-3528.
3. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 1972. 24.- P. 509-581.
4. Cockcroft S., Stutchfield J. ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C. *FEBS Lett.* 1989. 245. 25-29.
5. Gasmi L., McLennan A. G., Edwards S. W. Neutrophil apoptosis is delayed by the diadenosine polyphosphates, Ap5A and Ap6A: synergism with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br. J. Haematol.* 1996. 95. 637-639
6. Hanley P. J., Musset B., Renigunta V. et al. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *PNAS*. 2004. 101. 9479-9484
7. Hogquist K. A., Unanue E. R., Chaplin D. D. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 1991. 147. 2181-2186.
8. Hu Y., Fiset P. L., Denlinger L. C. et al. Receptor Modulation of Lipopolysaccharide Signaling and Inducible Nitric-oxide Synthase Expression in RAW 264.7 Macrophages. *J. Biol. Chem.* 1998. 273. 27170-27175
9. Kaufmann A., Musset B., Limberg S. H. et al. "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 2005. 280. 32459-32467
10. Miyabe K., Sakamoto N., Wu Y. H. et al. Effects of platelet release products on neutrophilic phagocytosis and complement receptors. *Thromb. Res.* 2004. 114. 23-36
11. North R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 2002. 82. 1013-1067.
12. Suh B. C., Kim J. S., Namgung U. et al. P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J. Immunol.* 2001. 166. 6754-6763.
13. Vitiello L., Gorini S., Rosano G., la Sala A. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*. 2012. 120(3). 511-518.

### THE ROLE OF ADENOSINTRIPHOSPHATE IN THE REGULATION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILES AND MONOCYTES DEGRANULATION *IN VITRO*

Asadullina I. A.<sup>1</sup>, Serebryakova M. K.<sup>1</sup>, Kudryavtsev I. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine; <sup>2</sup>N. N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia

At present, the metabolism of nucleotides is of great interest in the context of the regulation of functions of immunocompetent cells in inflammation. It is adenosine triphosphate that is attributed to many effects that cause chemotaxis, activation, degranulation of various subpopulations of leukocytes. In this study, the effect of ATP on the degranulation of neutrophils and various subpopulations of human peripheral blood monocytes *in vitro* was studied using flow cytometry. We have shown that the addition of ATP at concentrations of 1 mM and 0.1 mM caused a significant increase in the expression level of the CD66b degranulation marker on neutrophils. An increase in the expression level of the CD63 degranulation marker on a subpopulation of "classical" monocytes expressing CD14 is shown only at the time of 15 min of incubation, while subpopulations of "nonclassical" monocytes expressing CD16 did not respond to the application of this stimulant.

**Key words:** adenosine triphosphate, flow cytometry, degranulation, monocytes, neutrophils