

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.12.096>

УДК 616.438 : 615.849.19 : 612.017.1

**В.А. Каневский<sup>1</sup>, В.М. Пушкарев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт высоких технологий, Киев

<sup>2</sup> ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ  
им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев

E-mail: [pushkarev.vm@gmail.com](mailto:pushkarev.vm@gmail.com)

## **Влияние облучения лазером проекции тимуса на уровень цитокинов в тканях мышей**

*(Представлено академиком НАН Украины Я.Б. Блюмом)*

*Исследовано действие фемтосекундного перестраиваемого лазера низкой интенсивности на уровень цитокинов в крови, коже и тимусе облученных мышей с акцентом на цитокины и хемокины, определяющие рост, пролиферацию и дифференцировку клеток крови. Показано, что при высокой плотности мощности излучения (20 мВт/см<sup>2</sup>) содержание IL-3, IL-5, эотаксина, G-CSF, GM-CSF и KC значительно увеличивается в вилочковой железе. Сделано предположение, что это связано с реорганизацией процессов созревания клеток в железе после лазерного облучения.*

**Ключевые слова:** *фемтосекундный перестраиваемый лазер низкой интенсивности, тимус, цитокины, хемокины.*

В предварительных опытах на мышах C57BL/6 наблюдалось уменьшение размеров опухоли карциномы Льюиса, количества метастаз и активности матричных металлопротеиназ (MMP2/9) после освещения проекции тимуса мышей фемтосекундным перестраиваемым лазером в ближней ультрафиолетовой и синей области спектра. Для выяснения механизма воздействия лазера на иммунную систему нами изучался уровень цитокинов в крови, коже и тимусе облученных мышей с акцентом на цитокины и хемокины, определяющие рост, пролиферацию и дифференцировку клеток крови, участвующих в воспалительных, защитных иммунных процессах.

В эксперименте исследовались группы мышей C57BL/6 по три особи в каждой. За два дня до эксперимента волосы на грудной клетке животных удаляли, используя специальный крем фирмы Veet. В день эксперимента мышей анестезировали внутривенными инъекциями кетамина и ксилазина и облучали лазером. Через 6 или 24 ч мыши умерщвлялись. Облученный участок кожи в области грудной клетки, вилочковая железа и кровь отбирались для анализа. Образцы кожи и тимуса растирали с помощью гомогенизатора в

1,5 мл простой среды ЕМЕМ (Eagle's minimal essential medium). Осветленный супернатант образцов разливали на аликвоты и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Концентрацию различных цитокинов или хемокинов в осветленных супернатантах измеряли с помощью BioPlex-анализа (BioPlex Pro Mouse Cytokine 23-plex assay). Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя, интенсивность флуоресценции определяли с помощью системы Bio-Plex-200 ("Bio-Rad", США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Plex.

В работе использовали фемтосекундный импульсный, перестраиваемый по частоте лазер ("Coherent", США). Тип лазера — Chameleon Ultra II, Second Harmonic Generator. Параметры лазерного излучения в эксперименте: длина волны излучения — 384 нм; ширина полосы излучения — 2 нм; плотность мощности на единицу площади — 10 и 20 мВт/см<sup>2</sup>; длительность импульса — 140 фс; частота следования импульсов — 80 МГц; диаметр лазерного пятна на поверхности тела животного — 1 см; время облучения — 10 мин (однократно).

Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту. Значения  $P < 0,05$  считали достоверными.

Исследовались цитокины и хемокины, которые контролируют созревание, пролиферацию, дифференцировку и активацию клеток иммунной системы. Некоторые из них участвуют в воспалительных реакциях, но это не является их основной функцией. Ожидалось изменение количества этих факторов в тимусе и крови при воздействии лазера.

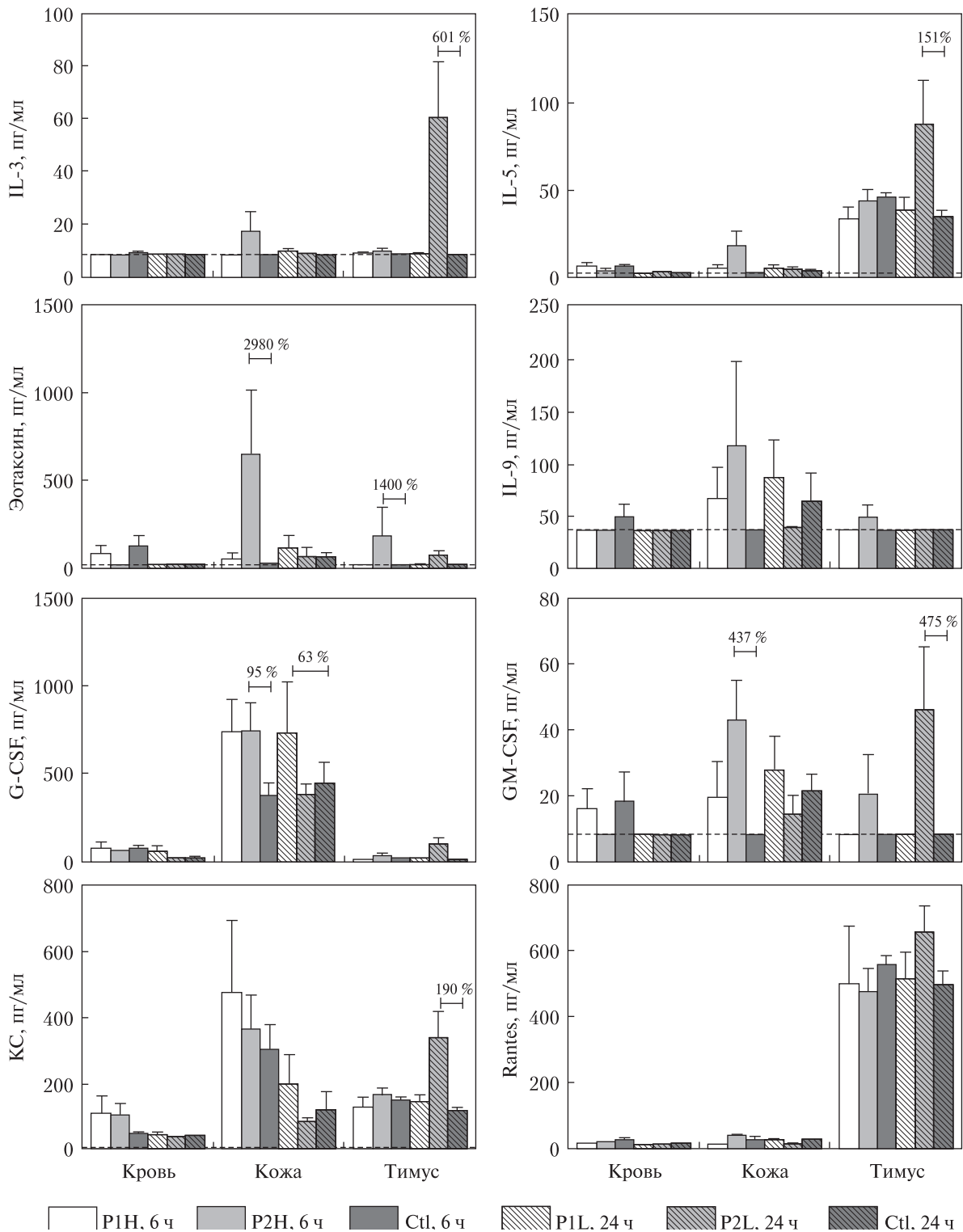
Интерлейкин-3 (IL-3) секретируется базофилами и активированными Т-клетками для поддержания роста и дифференцировки Т-клеток из костного мозга. Он стимулирует дифференцировку мультипотентных кроветворных стволовых клеток в миелоидные клетки-предшественники или, с участием IL-7, в лимфоидные клетки-предшественники. Кроме того, IL-3 стимулирует пролиферацию всех клеток миелоидного происхождения (гранулоциты, моноциты, дендритные клетки) в сочетании с другими цитокинами, такими как эритропоэтин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IL-6. Функция IL-3 сходна с GM-CSF [1].

После лазерного облучения высокой плотностью мощности излучения (20 мВт/см<sup>2</sup>) не наблюдалось никаких изменений в количестве этого цитокина в коже и крови, но в тимусе через 24 ч отмечалось его 6-кратное повышение (рис. 1).

IL-5 продуцируется как кроветворными, так и не кроветворными клетками, включая Т-клетки, гранулоциты, тучные клетки и Т-клетки-хелперы. После связывания с рецептором IL-5 оказывает плеiotропное действие на различные клетки-мишени, в том числе на В-клетки (стимулирует их рост и увеличивает секрецию иммуноглобулина) и базофилы. IL-5 также является ключевым посредником в активации эозинофилов. Действие IL-5 на пролиферацию и дифференцировку опосредуется рецепторами, которые содержат специфичные для IL-5  $\alpha$ - и общие  $\beta$ -субъединицы. Сигналы IL-5 трансдуцируются через сигнальные пути JAK-STAT, Vtk, Ras/Raf-ERK и обеспечивают выживание и функционирование В-клеток и эозинофилов. Сверхэкспрессия IL-5 *in vivo* значительно увеличивает количество эозинофилов и В-клеток [2].

При воздействии высокой плотности мощности излучения лазерного облучения имело место небольшое повышение экспрессии IL-5 в коже и в вилочковой железе (см. рис. 1).

IL-9 — цитокин, продуцируемый Т-клетками, и в частности, CD4<sup>+</sup>-клетками-хелперами, который действует как регулятор разнообразных гемопоэтических клеток. IL-9 был



**Рис. 1.** Уровень цитокинов в крови, коже и тимусе мышей через 6 и 24 ч после лазерного облучения. P1 — плотность мощности излучения 10 мВт/см<sup>2</sup>, P2 — 20 мВт/см<sup>2</sup>

идентифицирован у мышей в качестве фактора роста Т-клеток и является членом общего семейства цитокинов с  $\gamma$ -цепь-рецепторами, включающего IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21. Этот цитокин стимулирует пролиферацию клеток и предотвращает апоптоз. Показано также, что IL-9 ингибирует рост меланомы у мышей. IL-9 вызывает новый интерес ввиду его экспрессии множеством Т-хелперов, включая клетки Th2, Th9, Th17 и Treg. IL-9-индуцированная активация рецептора способствует перекрестному фосфорилированию JAK1 и JAK3, приводящему к активации STAT-комплексов, в частности гомодимеров STAT1, STAT5 и гетеродимеров STAT1–STAT3 [3].

Никаких существенных изменений в количестве IL-9 во всех исследуемых тканях после лазерного облучения не наблюдалось (см. рис. 1).

Эотаксин (CCL11), также известный как эозинофил-хемотаксический фактор, представляет собой небольшой белок, принадлежащий к семейству CC-хемокинов. CCL11 селективно мобилизует эозинофилы, индуцируя их хемотаксис, и участвует в механизмах аллергических реакций. Эффекты CCL11 опосредованы его связыванием с G-белоксодержащими рецепторами — CCR2, CCR3 и CCR5 [4].

Высокая плотность мощности излучения вызвала через 6 ч значительное увеличение количества эотаксина в коже и тимусе мышей (см. рис. 1).

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) представляет собой гликопротеин, который стимулирует продукцию костным мозгом гранулоцитов, стволовых клеток и высвобождение их в кровоток. Этот гликопротеин также стимулирует выживание, пролиферацию, дифференцировку и функционирование предшественников и зрелых нейтрофилов. G-CSF образуется в эндотелии, макрофагах и в ряде других иммунных клеток. Его рецептор присутствует на клетках-предшественниках в костном мозге и в ответ на стимуляцию фактором инициирует их пролиферацию и дифференцировку в зрелые гранулоциты. G-CSF регулирует их с помощью путей передачи сигнала JAK/STAT, Ras/MAPK и PI3K/Akt. G-CSF также является мощным индуктором мобилизации гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга в кровь [5].

Можно отметить увеличение количества цитокина в коже через 6 ч и в тимусе — через 24 ч после лазерной экспозиции (см. рис. 1).

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) — мономерный гликопротеин, секретируемый макрофагами, Т-клетками, тучными клетками, NK-клетками, эндотелиоцитами и фибробластами. GM-CSF представляет собой фактор роста белых клеток крови, стимулирующий стволовые клетки к производству гранулоцитов (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) и моноцитов. Моноциты мигрируют в ткани, где они созревают в макрофаги и дендритные клетки. Это часть иммунного/воспалительного каскада, с помощью которого активация небольшого количества макрофагов приводит к увеличению их численности — важный процесс в борьбе с инфекцией. GM-CSF трансдуцирует свой сигнал через STAT5. GM-CSF также играет роль в эмбриональном развитии, функционируя в качестве эмбриокина, производимого репродуктивным трактом [6].

Характер экспрессии GM-CSF после облучения лазером был сходным с G-CSF, но амплитуда увеличения его количества была значительно больше (см. рис. 1).

КС (CXCL1), принадлежащий к семейству хемокинов CXС, известный еще как GRO1-онкоген, нейтрофилактивирующий белок 3 (NAP-3) и стимулятор роста меланомы (MSG $\alpha$ ). CXCL1 секретируется клетками меланомы человека, обладает митогенными свойствами и участвует в патогенезе меланомы. Он экспрессируется макрофагами, нейтрофилами и эпи-

телиальными клетками и является хемоаттрактантом нейтрофилов. CXCL1 участвует в процессах ангиогенеза, воспаления, заживления ран и онкогенеза. Этот хемокин оказывает свои эффекты путем передачи сигналов через рецептор CXCR2 [7].

Содержание КС заметно повышалось в тимусе через 24 ч после облучения лазером при плотности мощности излучения 20 мВт/см<sup>2</sup> (см. рис. 1).

Хемокин RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) (CCL5) представляет собой небольшой белок (8 кДа), который у человека кодируется геном *CCL5*. Этот белок хемотактичен для Т-клеток, эозинофилов и базофилов, и играет активную роль в мобилизации лейкоцитов в места воспаления. С помощью определенных цитокинов (IL-2 и IFN- $\gamma$ ), которые секретируются Т-клетками, CCL5 индуцирует пролиферацию и активацию определенных НК-клеток с образованием клеток СНАК (CC-chemokine-activated killer). Впоследствии было установлено, что он экспрессируется при множестве заболеваний человека. Экспрессия RANTES регулируется в Т-лимфоцитах KLF13 (Kruppel like factor 13). RANTES, вместе с соответствующими хемокинами MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$ , был идентифицирован как природный ВИЧ-подавляющий фактор, который секретируется активированными CD8<sup>+</sup>-Т-клетками и другими иммунными клетками. CCL5 взаимодействует с рецепторами CCR3, CCR5 и CCR1, а также активирует G-белоксвязанный рецептор GPR75 [8].

После воздействия лазерного излучения высокий уровень экспрессии RANTES наблюдался в тимусе, но каких-либо изменений в содержании хемокина не выявлено.

Следует отметить, что при плотности мощности излучения 20 мВт/см<sup>2</sup> содержание большинства исследованных цитокинов значительно увеличивалось в вилочковой железе. Возможно, это связано с реорганизацией биохимических процессов в тимусе после лазерного облучения. Это подтверждается значительным увеличением количества IL-3, IL-5, эотаксина, G-CSF, GM-CSF и КС в тимусе — факторов, которые могут оказать влияние на дифференциацию и пролиферацию клеток в железе.

Таким образом, лазерное облучение проекции тимуса при плотности мощности излучения 20 мВт/см<sup>2</sup> определенно вызывает значительные изменения статуса цитокинов в тимусе.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Hara T., Miyajima A. Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis // *Stem Cells*. — 1996. — **14**, No 6. — P. 605–618.
2. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* — 2011. — **87**, No 8. — P. 463–485.
3. Purwar R., Schlapbach C., Xiao S. et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells // *Nat. Med.* — 2012. — **18**, No 8. — P. 1248–1253.
4. Williams T.J. Eotaxin-1 (CCL11) // *Front. Immunol.* — 2015. — **24**, No 6. — 84. doi: 10.3389/fimmu.2015.00084. eCollection 2015.
5. Bendall L.J., Bradstock K.F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2014. — **25**, No 4. — P. 355–367.
6. Van de Laar L., Coffey P.J., Woltman A.M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy // *Blood*. — 2012. — **119**, No 15. — P. 3383–3393.
7. Omari K.M., Lutz S.E., Santambrogio L. Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1 // *Am. J. Pathol.* — 2009. — **174**, No 1. — P. 164–176.
8. Levy J.A. The unexpected pleiotropic activities of RANTES // *J. Immunol.* — 2009. — **182**, No 7. — P. 3945–3946.

## REFERENCES

1. Hara T., Miyajima A. Stem Cells, 1996, **14**, No 6: 605-618.
2. Takatsu K. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 2011, **87**, No 8: 463-485.
3. Purwar R., Schlapbach C., Xiao S. et al. Nat. Med., 2012, **18**, No 8: 1248-1253.
4. Williams T.J. Front. Immunol., 2015, **24**, No 6: 84, doi: 10.3389/fimmu.2015.00084. eCollection 2015.
5. Bendall L.J., Bradstock K.F. Cytokine Growth Factor Rev., 2014, **25**, No 4: 355-367.
6. Van de Laar L., Coffey P.J., Woltman A.M. Blood, 2012, **119**, No 15: 3383-3393.
7. Omari K.M., Lutz S.E., Santambrogio L. Am. J. Pathol., 2009, **174**, No 1: 164-176.
8. Levy J.A. J. Immunol., 2009, **182**, No 7: 3945-3946.

Поступило в редакцію 21.07.2016

V.A. Kanevskyi<sup>1</sup>, V.M. Pushkarev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут високих технологій, Київ

<sup>2</sup> ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України", Київ

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

### ВПЛИВ ОПРОМІНЕННЯ ЛАЗЕРОМ ПРОЕКЦІЇ ТИМУСА НА РІВЕНЬ ЦИТОКІНІВ У ТКАНИНАХ МИШЕЙ

*Досліджено дію фемтосекундного багатоканального лазера низької інтенсивності на рівень цитокінів у крові, шкірі і тимусі опромінених мишей з акцентом на цитокіни і хемокіни, що визначають ріст, проліферацію і диференціювання клітин крові. Показано, що висока щільність потужності випромінювання (20 мВт/см<sup>2</sup>) призводить до значного збільшення вмісту ІЛ-3, ІЛ-5, еотаксину, G-CSF, GM-CSF і KC у вилочковій залозі. Висловлено припущення, що це пов'язано з реорганізацією процесів визрівання клітин у залозі після лазерного опромінення.*

**Ключові слова:** фемтосекундний багатоканальний лазер низької інтенсивності, тимус, цитокіни, хемокіни.

V.A. Kanevskyi<sup>1</sup>, V.M. Pushkarev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of High Technologies, Kiev

<sup>2</sup> V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine, Kiev

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

### EFFECT OF LASER IRRADIATION OF THE THYMUS PROJECTION ON THE LEVEL OF CYTOKINES IN MICE TISSUES

*The low-intensity femtosecond multichannel laser action upon the levels of cytokines in blood, skin, and thymus of irradiated mice with emphasis on cytokines and chemokines that determine the growth, proliferation, and differentiation of blood cells is studied. At a high-intensity irradiation (20 mW/cm<sup>2</sup>), the content of IL-3, IL-5, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, and KC significantly increases in thymus. It is assumed that this is due to the cell maturation reorganization in gland after the laser irradiation.*

**Keywords:** low-intensity femtosecond multichannel laser, thymus, cytokines, chemokines.