

РЕГУЛЯЦИЯ УФ-СВЕТОМ ПРОЦЕССА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С4 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА С ЛИМФОЦИТАРНЫМИ МЕМБРАНАМИ

© 2001 г. В. Г. Артюхов, В.В. Гусинская, Е.А. Рамильцева, Д. А. Черенков

Воронежский государственный университет

С помощью специально разработанных ИФА-тестов было исследовано влияние УФ-света ($75,5 \div 2265$ Дж/м²) на взаимодействие белка С4 с лимфоцитарными мембранами. Показано, что структурно-функциональные УФ-модификации мембран лимфоцитов проявляются в виде усиливающегося с ростом дозы «кэппинг»-эффекта. Малые дозы УФ-облучения ($75,5$ и 755 Дж/м²) приводят к фотоактивации сывороточного С4 с образованием С4а и С4b-субфрагментов, активирующих комплементарный каскад; доза 2265 Дж/м² индуцирует расщепление С4 на неактивные С4с и С4d-субфрагменты. Установлено, что при взаимодействии мембран лимфоцитов с С4 фактором под действием УФ-света определяющий вклад вносят процессы, протекающие в сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ

Белок С4 системы комплемента играет важную роль в нормальной и патологической физиологии человека, являясь ключевым гуморальным звеном в защитных реакциях организма. Он участвует в опсонизации иммунных комплексов, поскольку после активации экспонирует ацилирующую тиоэфирную группу, а после ковалентного связывания на иммунном комплексе или другой мишени является маркером для узнавания CR2-рецепторами в процессах клиренса. При активации системы комплемента С4 участвует в формировании С3- и С5-конвертаз классического пути [1-3].

Естественными регуляторами активности С4 системы комплемента являются растворимые и мембраносвязанные белки, в том числе и гликопротеины – рецептор комплемента CR1, фактор I (С4b/С3b-инактиватор) [4]. Одним из регуляторов общей активности системы комплемента выступает УФ-свет. Рядом авторов показано, что клеточные и гуморальные компоненты крови, подвергнутые УФ-облучению в физиологических дозах могут оказывать регулирующее действие на систему иммунитета организма. Регуляторное воздействие УФ-света на комплекс иммунных реакций организма может способствовать ликвидации его патологического состояния [5-7]. Поэтому изучение фотобиологических реакций иммунокомпетентных клеток, через которые реализуется основная функция иммунитета, является весьма перспективным направлением в рамках терапевтических свойств фотомодифицированных компонентов крови.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение структурно-функциональных фотомодификаций белка С4 системы комплемента и лимфоцитарных мембран, функционирующих отдельно и в комплексе друг с другом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования явились мембраны лимфоцитов и С4 белок системы комплемента сыворотки крови человека. Лимфоциты получали путем центрифугирования донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077$ г/см³) в течение 15 мин при 1500 об/мин на центрифуге МРW-340. Концентрация лимфоцитов составила $2 \cdot 10^5$ клеток/мл. Сыворотку крови доноров разводили фосфатно-солевым буфером (PBS, pH=7,4) в соотношении 1:16. Облучение опытных образцов объемом 2 мл проводили в термостатируемой ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) полусферической формы кювете (площадь облучаемой поверхности 10^{-3} м²) при постоянном перемешивании (магнитная мешалка типа ММЗМ) излучением лампы ДРТ-400 (интенсивность излучения $1,51 \cdot 10^2$ Дж/м² в 1 минуту с учетом расстояния до облучаемого объекта 0,23 м) через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания в области 240-390 нм. Время облучения составило 30 секунд, 5 и 15 минут, что соответствует дозам облучения $75,5$; 755 и 2265 Дж/м².

Изучение иммуносорбционных свойств мембран лимфоцитов, модифицированных УФ-светом, а также УФ-индуцированных структурно-функциональных изменений белка С4 проводили с помощью разработанных нами тестов неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), основанных на определении связывания антител к С4 компоненту комплемента. На поверхность 96-луночных полистироловых планшетов последовательно иммобилизовались лимфоциты ($2 \cdot 10^5$ кл/мл), 1%-ный бычий сывороточный альбумин, сыворотка крови доноров – источник белка С4 в разведении 1:16 с PBS, конъюгат антител с пероксидазой хрена (ПХ) производства МНИИЭМ им.

Г.Н. Габричевского (титр 1:400). После каждого этапа инкубации производили отмывку несвязавшихся компонентов фосфатно-солевым буферным раствором с TWIN-20 (рН 7,4). Субстратная смесь включала H_2O_2 (5 %) и хромоген – ортофенилендиамин (ОФД).

О количестве образовавшихся иммунных комплексов судили по величине оптической плотности окрашенного продукта реакции, регистрируемой при длине волны 492 нм на спектрофотометре Multiscan Titertec plus.

Функциональную активность С4 фактора комплемента определяли модифицированным нами методом гемолитического титрования. Модельная система предусматривала последовательное внесение следующих компонентов: 10 мкл нативной сыворотки крови доноров, 15 мкл нативного или УФ-облученного различными дозами (75,5; 755 и 2265 Дж/м²) раствора белка С4 в концентрации 10^{-6} моль/л (производство МНИ-ИМЭ им. Г.Н. Габричевского), реагент R4, представляющий собой лиофилизированную сыворотку крови человека с инактивированным С4 компонентом (производство Кировского НИИ гематологии и переливания крови), бараньи эритроциты, сенсibilизированные кроличьими антителами (ЕА), и их инкубацию в течение 1 часа при 37°C. Принцип действия реагента основан на восполнении недостающего звена (С4 фактора) комплементарного каскада исследуемой сывороткой и гемолизе эритроцитов по классическому пути активации комплемента [8].

Результаты учитывали визуально по первой лунке с неполным гемолизом эритроцитов. Общую гемолитическую активность выражали в логарифмах по основанию два титра сыворотки ($\log_2 x$).

Статистическую обработку результатов исследований проводили на IBM PS/AT с помощью пакета прикладных статистических программ "Statgrafics". Отличия в контрольных и опытных сериях экспериментов анализировали традиционными способами с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты на основе разработанных нами тестов неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) проводили по следующей схеме (рис 1):

1. Влияние УФ-света на структурно-функциональное состояние белка С4 в системе взаимодействующих с лимфоцитарными мембранами факторов комплемента

В первой серии экспериментов (рис. 1 (1)) было изучено влияние различных доз УФ-света (75,5; 755 и 2265 Дж/м²) на антителосвязывающую способность С4 фактора комплемента в системе взаимодействующих компонентов – мембран лимфоцитов и сыворотки крови доноров ((L+C)*+At(C4)-ПХ). Под антите-

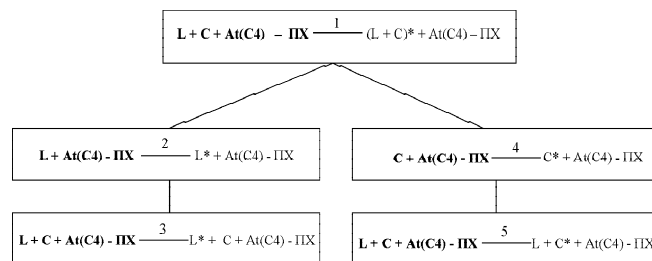


Рис. 1. Схема постановки экспериментов по изучению структурно-функциональных УФ-модификаций белка С4 и лимфоцитарных мембран

Условные обозначения: жирный шрифт – контрольная система, нормальный шрифт – опытная система; L – иммобилизованные нативные лимфоциты крови доноров; C – сыворотка крови доноров; At(C4)-ПХ – конъюгат пероксидазы хрена с антителами к С4 компоненту комплемента; * – УФ-облученный компонент ИФА-системы

лосвязывающей способностью мы подразумевали способность молекул белка С4, абсорбированных на мембранах лимфоцитов в условиях *in vivo* и связавшихся с ними после соединения компонентов в ИФА-системе, акцептировать специфические к нему антитела. При этом на 96-луночные полистироловые планшеты последовательно иммобилизовались нативные и УФ-облученные лимфоциты, 1% раствор БСА, нативная или УФ-облученная сыворотка и конъюгат антител

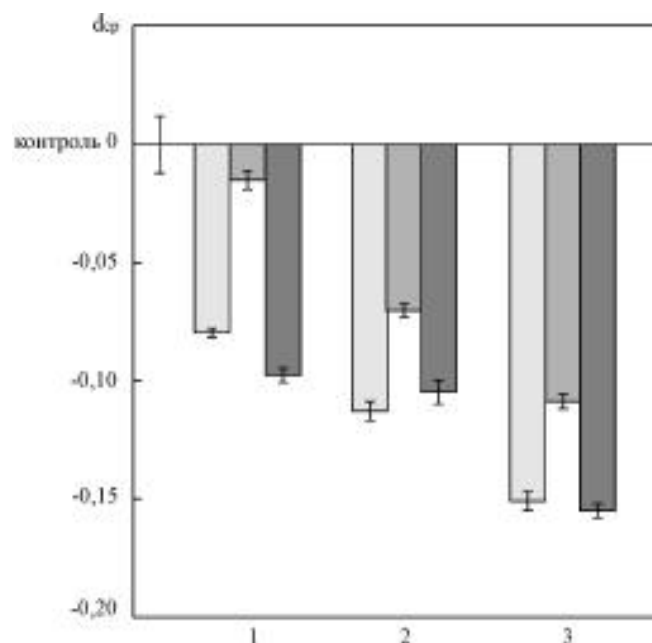


Рис. 2. УФ-индуцированные изменения антителосвязывающей способности свободного и мембраносвязанного С4. Контроль (0) – D_{492} нативной ИФА-системы L+C+At(C4)-ПХ. Здесь и на рис. 3-6: 1 – УФО в дозе 75,5 Дж/м², 2 – 755 Дж/м², 3 – 2265 Дж/м², d_{cp} – средняя разность между значениями D_{492} опытных и контрольных образцов, ед. оптич. плотности

- система (L+C)*+At(C4)-ПХ;
- система L*+C+At(C4)-ПХ;
- система L+C*+At(C4)-ПХ

против С4 с пероксидазой хрена. После УФ-облучения лимфоцитов и сыворотки в указанных дозах в системе (L+C)*+At(C4)-ПХ регистрировалось статистически достоверное ($0,01 > P > 0,001$) падение оптической плотности детектируемого продукта реакции по отношению к системе L+C+At(C4)-ПХ, где все рассматриваемые компоненты являются необлученными (рис. 2). Это указывает на снижение способности находящегося в системе С4 компонента взаимодействовать с антителами против него. Наблюдаемый эффект снижения антителосвязывающей способности С4 в ИФА-системе (L+C)*+At(C4)-ПХ может быть следствием уменьшения количества С4 компонента в УФ-облученной сыворотке и на мембранах УФ-облученных лимфоцитов или в одном из этих компонентов.

В связи с чем нами были проведены эксперименты, позволяющие исключить один из взаимодействующих компонентов системы – лимфоциты или сыворотку, как источник С4 (рис. 1 (2,4)) или же сохранив систему полностью, только один из компонентов подвергнуть УФ-облучению (рис. 1 (3,5)). Таким образом, предполагалось определить вклад фотомодификаций каждого компонента в суммарное УФ-индуцированное изменение антителосвязывающей способности всей системы (L+C)*+At(C4)-ПХ.

2. Влияние УФ-света на функциональное состояние мембраносвязанного С4

О структурно-функциональных фотомодификациях лимфоцитарных мембран судили по изменению антителосвязывающей способности лигандированного на мембранах С4 в ИФА-системе L*+At(C4)-ПХ (рис. 1 (2)). Под лигандированным (мембраносвязанным) С4 мы подразумевали связавшейся с рецептором CR1 в условиях *in vivo* С4 белок системы комплемента [9]. При этом на полистироловые планшеты наносились нативные и УФ-облученные в вышеуказанных дозах компоненты крови доноров, а затем конъюгат. Иммунизация на планшетах УФ-облученных лимфоцитов индуцирует возрастающее с ростом дозы усиление ИФА-сигнала в исследуемой системе (рис. 3), что является результатом увеличения числа сорбированных на лимфоцитарных мембранах антител к С4 компоненту. Это, по всей видимости, обусловлено структурными фотомодификациями лимфоцитарных мембран, которые могут приводить к антигенному дрейфу, изменяя тем самым общую картину набора и локализации антигенных детерминант и рецепторов на поверхности клетки. Результатом такого рода перестроек является “кэппинг”-эффект, который проявляется в формировании рецепторных кластеров и усилении антителосвязывающей способности. С целью выявления способности нативных и УФ-облученных лимфоцитов сорбировать на своей поверхности дополнительное количество С4 компонента ком-

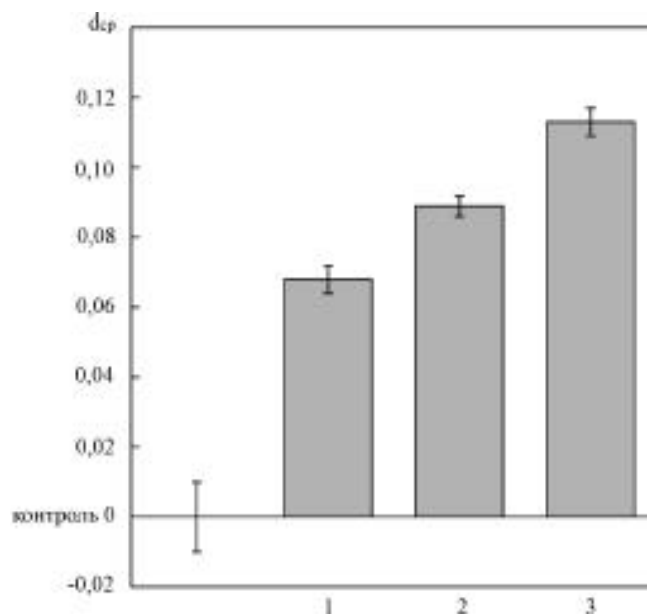


Рис. 3. УФ-индуцированные изменения антителосвязывающей способности мембраносвязанного С4 в системе L*+At(C4)-ПХ. Контроль (0) – D₄₉₂ ИФА-системы L+At(C4)-ПХ

племента была проведена серия экспериментов, где на 96-луночные полистироловые планшеты последовательно наносились нативные или УФ-облученные лимфоциты, нативная сыворотка крови доноров, как источник белка С4, и конъюгат At(C4)-ПХ (рис. 1 (3)).

При дополнительной иммобилизации нативной сыворотки на нативные лимфоциты наблюдалось незначительное повышение ИФА-сигнала в данной системе (сравнить системы L+C+At(C4)-ПХ и L+At(C4)-ПХ, табл.), что свидетельствует о достаточном насыщении мембран нативных лимфоцитов С4 компонентом комплемента и малой сорбции ими С4 из сыворотки.

Таблица

Величины оптической плотности (D₄₉₂) контрольных ИФА-систем

ИФА-система	D ₄₉₂
L+C+At(C4)-ПХ	0,562±0,012
L+At(C4)-ПХ	0,523±0,010
C+At(C4)-ПХ	0,600±0,015

После воздействия УФ-света в дозе 75,5 Дж/м² на мембраны лимфоцитов не происходит статистически достоверного изменения оптической плотности в системе L*+C+At(C4)-ПХ по сравнению с контролем. При УФО лимфоцитов в дозах 755 и 2265 Дж/м² наблюдается резкое снижение ИФА-сигнала, усиливающееся с ростом дозы (рис. 2).

Интересно отметить, что ответные реакции системы L*+C+At(C4)-ПХ обратны ответным реакциям системы L*+At(C4)-ПХ. Таким образом, добавление к облученным лимфоцитам нативной сыворотки, со-

держашей С4, ведет к “снятию” “кэппинг”-эффекта на поверхности лимфоцитарных мембран. Тем самым процессы, протекающие в сыворотке, являются определяющими при взаимодействии УФ-облученных лимфоцитов с С4 компонентом комплемента.

3. Влияние УФ-света на функциональное состояние сывороточного С4

В данной серии экспериментов по изменению антителосвязывающей способности сывороточного С4 судили о фотомодификациях данного компонента, проявляющихся в изменении его структурно-функциональных свойств как по отношению к антителам (С*+At(С4)-ПХ), так и по отношению к мембранам нативных лимфоцитов (L+С*+At(С4)-ПХ) (рис. 1 (4,5)).

В первом случае на полистироловые планшеты последовательно иммобилизовались нативная или УФ-облученная в дозах 75,5; 755 и 2265 Дж/м² сыворотка, являющаяся источником системы комплемента и конъюгат At(С4)-ПХ (рис. 1 (4)).

Воздействие УФ-света в дозах 75,5; 755 и 2265 Дж/м² на сыворотку крови доноров индуцирует усиливающееся с ростом дозы падение ИФА-сигнала в системе С*+At(С4)-ПХ (рис. 1 (4)) по сравнению с нативным контролем, что указывает на снижение антителосвязывающей способности сывороточного С4 (рис. 4).

Изменение функциональной активности УФ-облученного белка С4 исследовали при помощи метода гемолитического титрования. При этом в нативную сыворотку доноров вносили растворы необлученного и УФ-модифицированного различными дозами (75,5; 755 и 2265 Дж/м²) фактора С4. В качестве контроля выступала функциональная активность компонента С4, находящегося в сыворотке.

При внесении раствора нативного белка С4 (10⁻⁶ моль/л) в сыворотку не выявлено изменение его функциональной активности. Следовательно, увеличение общего количества данного белка не приводит к возрастанию числа активных молекул С4 в сыворотке.

Внесение в нативную сыворотку крови раствора модифицированного УФ-излучением белка С4 обуславливает следующий характер изменения общей гемолитической активности входящих в сыворотку компонентов С4: при дозах 75,5 и 755 Дж/м² – повышение в среднем на 0,6 и 1,5 условных единиц соответственно, а при дозе 2265 Дж/м² – понижение примерно на одну условную единицу.

Эффект фотоактивации С4 фактора в малых дозах, по-видимому, связан с облегчением процесса расщепления его молекул на С4а и С4b-субфрагменты, усиливающие общий комплементарный каскад. Наблюдаемое при максимальной дозе УФО падение гемолитической активности С4, очевидно, вызвано активацией под влиянием внесенного в сыворотку раствора УФ-модифицированного белка сывороточ-

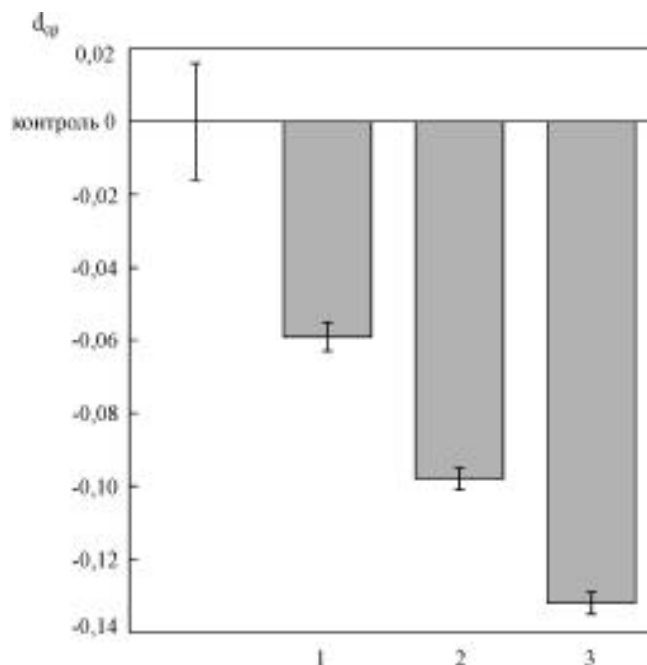


Рис. 4. УФ-индуцированные изменения антителосвязывающей способности свободного С4 в системе С*+At(С4)-ПХ. Контроль (0) – D₄₉₂ ИФА-системы С+At(С4)-ПХ

ных ингибиторов (например, фактора Н и I), расщепляющих С4 на неактивные по отношению к комплементарному каскаду С4с и С4d-субфрагменты.

Следовательно, снижение антителосвязывающей способности при малых дозах УФО (75,5÷755 Дж/м²) сывороточного С4 в системе С*+At(С4)-ПХ связано с его фотоактивацией, проявляющейся в расщеплении под действием С1-эстеразы на С4b и С4а-субфрагменты, обладающие низкой аффинностью по отношению к антителам против С4. При большей дозе (2265 Дж/м²) процессы расщепления С4 углубляются, но с образованием неактивных для комплементарного каскада фрагментов С4с и С4d, что является, видимо, следствием фотоактивации сывороточных ингибиторов (фактора I и С4-связывающего белка).

С целью определения способности УФ-модифицированного С4 компонента взаимодействовать с лимфоцитарной поверхностью была проведена серия экспериментов с сохранением всех компонентов исходной системы, но при этом УФО подвергалась только сыворотка крови доноров (рис. 1 (5)). После УФО сыворотки в дозах 75,5; 755 и 2265 Дж/м² в системе L+С*+At(ПХ) зарегистрированы статистически достоверные (0,001 < P < 0,01) изменения ИФА-сигналов (рис. 2), аналогичные для системы С*+At(С4)-ПХ (рис. 4).

Сходство ответных реакций С4 компонента в указанных системах свидетельствует о том, что в основе их фотомодификаций лежат сходные механизмы, касающиеся самого фактора С4 и процессов его расщепления при малых дозах УФО на субфрагменты С4а и С4b с последующим взаимодействием С4b-

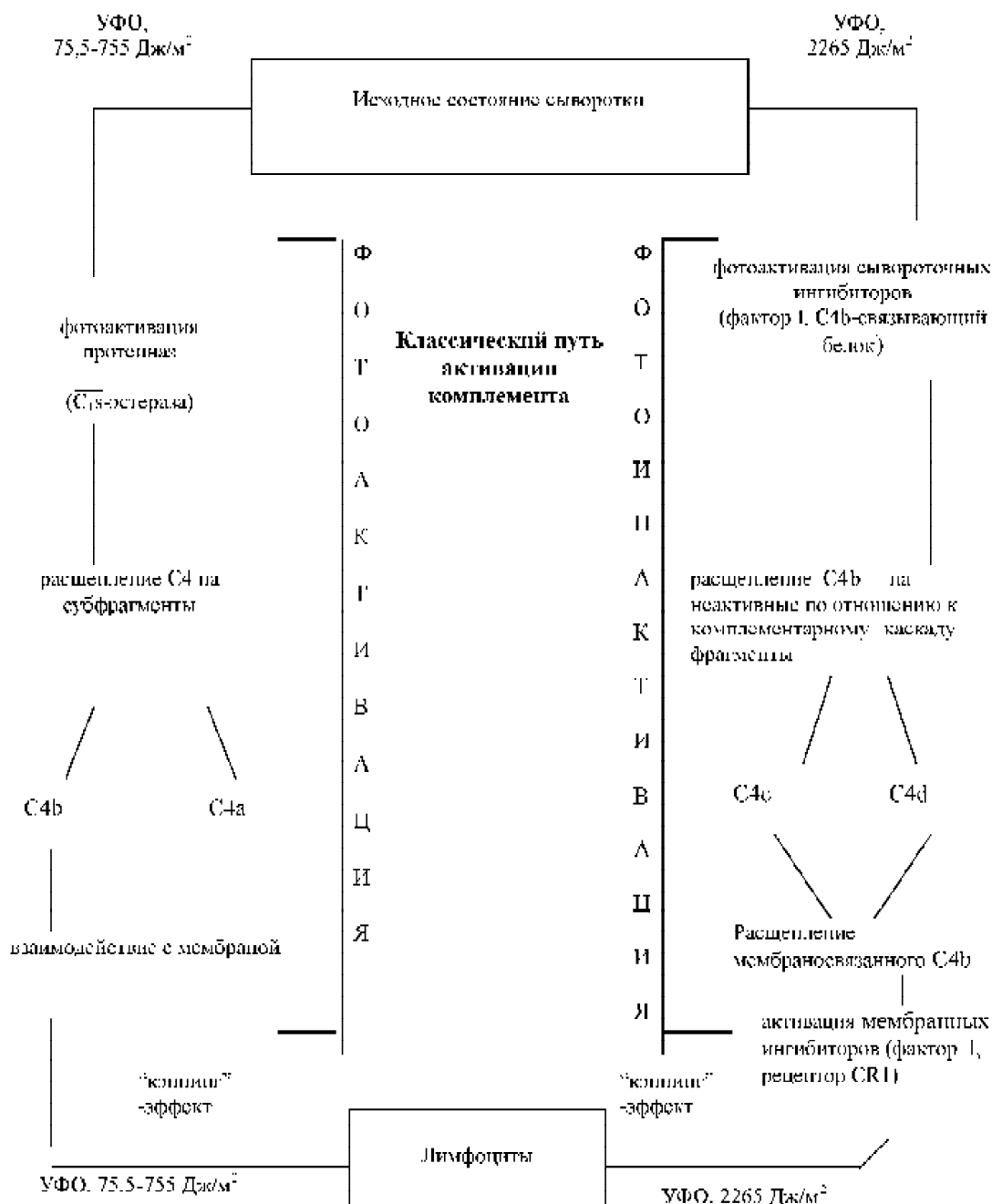


Рис. 5. Схема регуляторного действия УФ-света на процессы взаимодействия C4 компонента комплемента с лимфоцитарными мембранами

субфрагмента с поверхностью лимфоцитов, а при дозе 2265 Дж/м² с фотоактивацией сывороточных ингибиторов. Таким образом, УФО сыворотки в дозах 75,5 и 755 Дж/м² индуцирует активацию сывороточного C4, в результате которой образующийся C4b формирует на лимфоцитарных мембранах кластеры, затрудняющие взаимодействие мембраносвязанного C4 с конъюгатом At(C4)-ПХ. При облучении сыворотки в максимальной дозе (2265 Дж/м²), скорее всего, происходит фотоактивация сывороточных ингибиторов и при этом связанные с рецепторами CR1 молекулы C4 предоставляются фактору I для расщепления на C4c и C4d-субфрагменты.

Суммируя все вышеизложенное, представляется возможным оценить роль различных фотохимических процессов, протекающих в сыворотке и на мембранах лимфоцитов в изменение антителосвязывающей способности всей системы (L+C)*+At(C4)-ПХ. Эффект усиливающегося с ростом дозы УФ-света снижения антителосвязывающей способности C4 в системе из взаимодействующих УФ-облученных компонентов (мембран лимфоцитов и белков системы комплемента) является суммарным и определяется структурно-функциональными фотомодификациями как лимфоцитарных мембран, так и процессами, протекающими в сыворотке крови, при преобладающем вкладе последних.

На основании полученных данных разработана схема возможного регуляторного действия УФ-света на процессы взаимодействия C4 компонента комплемента с лимфоцитарными мембранами (рис. 5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Low S.K.A., Dodds A.W.*// Protein Science. 1997. V.6. P.265-274.
2. *Borsos T., Rapp H.J., Colten H.R.*// J. Immunol. 1970. V.105. P.1439 – 1446.
3. *Козлов Л.В., Лахтин В.М., Скороходова Т.Г. и др.*/ Биорганическая химия. 2000. №7.Т.26. С. 539.
4. *Таран Г.Н.*// Биохимия. 1993. Т.58. №5. С.420-428.
5. *Гусинская В.В.* Анализ УФ-индуцированных структурно-функциональных изменений белков системы комплемента и эритроцитарных мембран: Дисс. ... канд. биол.наук.- Воронеж. 1995.173 с.
6. *Самойлова К.А., Арцишевская Р.А., Оболенская К.Д. и др.*// Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. 1986. С. 236-247.
7. *Крыленков В.А., Огурцов Г.П.*// Иммунофлуоресцентный анализ. 1989. С. 111-114.
8. *Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П.*// Биорганическая химия. 1982. Т.8. С. 652-659.
9. *Ложкина А.Н.*// Успехи современной биологии. 1987. Т. 1. №4. С. 36-54.