

УДК 612.017.1:578.74

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ ЛИМФОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2005 г. В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, Л.И. Попова, М.С. Трубицына

Воронежский государственный университет

При помощи методов иммуноферментного анализа, колориметрического МТТ-теста, локального гемолиза и определения жизнеспособности клеток исследованы структурно-функциональные модификации лимфоцитов периферической крови человека в условиях экзогенной генерации активных форм кислорода: супероксидного анион-радикала, пероксида водорода, гидроксильного радикала, синглетного кислорода.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время особое внимание исследователей уделяется изучению свойств важнейших клеточных и молекулярных компонентов иммунной системы, которые, будучи наиболее разносторонними и мощным механизмом защиты у высших организмов, осуществляют контроль за генетическим постоянством внутренней среды организма (иммунологический надзор).

Экзогенные факторы, как физические, так и химические, неизбежно приводят к модификации состояния компонентов иммунной системы, а, следовательно, и к изменению их функциональной активности. Лимфоциты занимают одну из самых активных позиций в системе гуморально-клеточной кооперации крови. Это делает их уникальной мишенью для действия различных физико-химических агентов. В живых организмах постоянно протекают реакции с образованием активированных кислородных метаболитов (АКМ): супероксидного анион-радикала (O_2^-), синглетного кислорода (1O_2), гидроксильного радикала (OH^\bullet), пероксидных радикалов и др. С другой стороны, в различных фотоиндуцированных процессах в биосистемах могут генерироваться активные формы кислорода (АФК), способные модифицировать структурно-функциональное состояние макромолекул и клеток. Однако сведения об активации кислорода в нефагоцитирующих клетках весьма разрозненны, отсутствуют детальные представления о механизмах генерации АФК клетками иммунной системы и о влиянии этих высокорекреационноспособных метаболитов на структурно-функциональные свойства лимфоцитов.

В связи с этим представляется целесообразным проведение исследований, направленных на выявление возможного модулирующего действия АФК на лимфоцитарные клетки человека.

В настоящей статье представлены результаты экспериментов по изучению структурно-функциональных изменений лимфоцитов крови человека в условиях экзогенной генерации некоторых активных форм кислорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились лимфоциты, выделенные из гепаринизированной крови доноров.

Иммуноциты получали путем центрифугирования донорской крови в градиенте плотности фиколлурографина ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) /1/. Рабочая концентрация лимфоцитов составляла $2 \cdot 10^6$, 10^6 , $4 \cdot 10^4$ кл/мл.

Определение цитотоксической активности лимфоцитов осуществляли при помощи колориметрического МТТ-анализа, основанного на селективной способности живых клеток редуцировать желтую растворимую в воде соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромид (МТТ) в фиолетово-синий нерастворимый в воде осадок формазана. В экспериментах в качестве антигенов использовали асцитную карциному Эрлиха, культивируемую в лабораторных мышках линии SHK. Лимфоциты инкубировали с клетками асцитной карциномы Эрлиха в течение 20 ч при 37°C , 5% CO_2 и 90% относительной влажности в соотношении эффектор-мишень (э/м)=1,6. Все эксперименты проводили на 96-луночных иммунологических планшетах («Медполимер», Москва). Суспензию раковых клеток в культуральной среде RPMI-1640 вносили в объеме 80 мкл на лунку, а лимфоциты в растворе Хенкса – в объеме 10 мкл. После периода инкубации лимфоцитов с клетками карциномы Эрлиха в каждую лунку добавляли 10 мкл МТТ (“Sigma”, Германия) в концентрации $2,4 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Затем проводили инкубацию в течение 4 ч при 37°C в темноте. Осадок

кристаллов формазана, образующихся в ходе предыдущей инкубации, растворяли путем добавления в каждую лунку 100 мкл окисленного изопропилового спирта (0,04 н HCl в пропаноле). Добавление HCl обусловлено необходимостью перевода фенолового красного в культивационной среде в окисленную форму с максимумом поглощения $\lambda=557$ нм. Полное растворение красителя достигали с помощью перемешивания в планшетном шейкере в течение 15 мин при 700 об/мин (37 °С). Оптическую плотность системы регистрировали на вертикальном фотометре АИФР-0,1 “Униплан” при длине волны 492 нм. Процент цитотоксичности лимфоцитов рассчитывали по формуле:

$$\% = \left[1 - \frac{A_{r+1} - A_1}{A_r} \right] \cdot 100\%,$$

где A – оптическая плотность, r – раковые клетки, l – лимфоциты.

Разделение лимфоцитов на Т- и В- клеточные суспензии осуществляли по методу Terasaki /2/, основанному на различной способности отдельных популяций лимфоцитов сорбироваться на волокнах синтетической нейлоновой ваты.

Для оценки антителообразующей способности лимфоцитов использовали метод локального гемолиза (ЛГ). Этот метод основан на способности лимфоцитов секретировать антитела в окружающую среду, которые в присутствии комплемента вызывают лизис клеток-мишеней (эритроциты барана – Э.Б.) с образованием зон гемолиза.

Определение жизнеспособности клеток по включению трипанового голубого учитывает состояние цитоплазматической мембраны – интактна она или повреждена. Трипановый голубой не проникает сквозь мембраны живых клеток, мертвые клетки им окрашиваются /3/.

Определение концентрации ФНО- α в лизатах нативных и модифицированных АФК лимфоцитов проводили при помощи ИФА-тест-системы (ООО «Протеиновый контур», СПб) на основе связывания моноклональных антител к ФНО- α человека /4/. Метод ИФА был использован нами для определения уровня Fc-рецепторов, CD56- и CD8-маркеров на поверхности нативных и модифицированных воздействием АФК лимфоцитов. Иммуноферментный анализ проводили на отечественных плоскодонных полистироловых планшетах (“Медполимер”, Москва).

Для образования в системе синглетного кислорода облучали суспензию лимфоцитов красным светом (устройство “Улокс”) в присутствии метиленового голубого (10^{-6} моль/л). $OH\cdot$ радикалы генерировали в присутствии ионов металлов переменной валентности (Fe^{2+}) и пероксида водорода по механиз-

му Фентона. Супероксидный анион-радикал получали при помощи системы рибофлавин-ТЕМЕД, облучаемой видимым светом. Пероксид водорода добавляли к клеточной суспензии в конечной концентрации 10^{-6} моль/л.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью пакета прикладных статистических программ «Statistica».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны результаты изучения уровня цитотоксической активности лимфоцитов человека по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха в условиях экзогенной генерации АФК. Из анализа полученных данных следует, что в условиях генерации синглетного кислорода и гидроксильного радикала не происходит изменений величины изучаемого параметра по отношению к таковой для интактных клеток. В условиях экзогенной генерации супероксидного анион-радикала и при добавлении пероксида водорода (10^{-6} моль/л) наблюдается статистически достоверное снижение уровня функциональной активности лимфоцитов соответственно на 9 и 33 % по сравнению с контролем. Эти данные не противоречат результатам исследований /5/, согласно которым функциональная активность лимфоцитов человека существенно снижалась при инкубации клеток с экзогенными супероксидными анион-радикалами, генерируемыми в реакции ксантин – ксантиноксидаза. При этом последствия окислительного

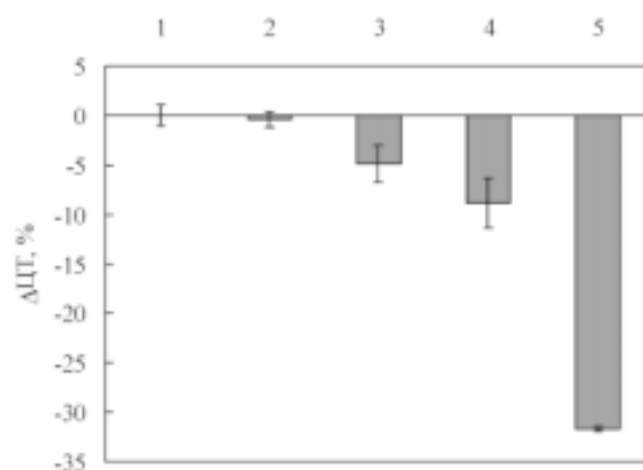


Рис. 1. Уровень цитотоксической активности лимфоцитов человека по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха в условиях генерации активных форм кислорода. Обозначения: 1 – цитотоксическая активность нативных лимфоцитов; величина цитотоксичности лимфоцитов в присутствии: 2 – синглетного кислорода; 3 – гидроксильного радикала; 4 – супероксидного анион-радикала; 5 – пероксида водорода.

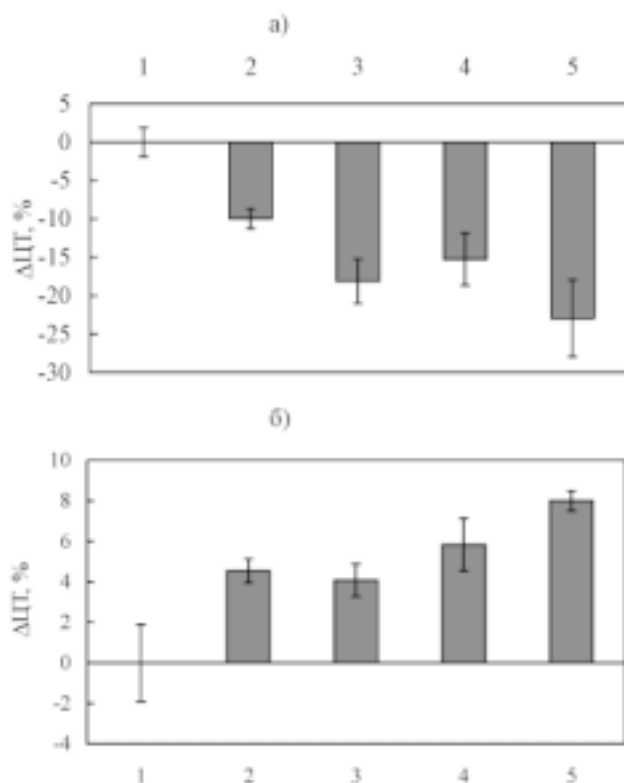


Рис. 2. Уровень цитотоксической активности Т-лимфоцитов человека по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха в условиях генерации активных форм кислорода.

Обозначения:

1 – цитотоксическая активность нативных лимфоцитов; величина цитотоксичности лимфоцитов в присутствии: 2 – синглетного кислорода; 3 – гидроксильного радикала; 4 – супероксидного анион-радикала; 5 – пероксида водорода.

а) – первая группа доноров, б) – вторая группа доноров.

стресса легко предотвращались с помощью перехватчиков АФК. В то же время имеется информация о том, что супероксидный анион-радикал играет определенную роль в регуляции роста и дифференцировки В-лимфоцитов, активации Т-лимфоцитов /7/.

С целью получения более подробной информации о механизмах модифицирующего действия АФК на функциональные свойства лимфоцитов были исследованы изменения цитотоксической активности Т-лимфоцитов по отношению к опухолевым клеткам в условиях экзогенной генерации АФК (рис. 2). По характеру изменений величин изучаемого параметра доноры были разделены на две группы. Для первой группы доноров (рис. 2, а), составляющих большинство, уровень цитотоксичности модифицированных иммуноцитов статистически достоверно снижался на 10, 18, 15 и 22% по отношению к такому же для контрольных образцов в условиях генерации синглетного кислорода, гидроксильного ради-

кала, супероксидного анион-радикала и пероксида водорода соответственно. Таким образом, в целом направление изменений функциональных свойств смеси лимфоцитов и их Т-популяции при воздействии АФК (рис. 1 и 2, а) совпадает, что обусловлено, по-видимому, превалирующим вкладом Т-клеток в процессы модификации цитотоксической активности иммуноцитов в условиях генерации АКМ. Для второй группы доноров (рис. 2, б) наблюдалось незначительное повышение активности Т-лимфоцитов при воздействии активных кислородных метаболитов. Эти результаты согласуются с данными /6/, согласно которым пероксид водорода и гидроксильные радикалы способны оказывать стимулирующее действие на лимфоциты. Стимулирующий эффект ОН-радикалов связывают с их способностью активировать гуанилатциклазу /6/. Согласно современным представлениям, АФК способны выступать в роли вторичных мессенджеров, обеспечивающих адекватную реакцию клетки на изменение условий среды. Можно предположить, что воздействие АФК приводит к нарушению системы функционирования передачи внешнего сигнала внутрь клетки, следствием которого является изменение функциональных свойств лимфоцитов и их Т-популяции.

Нами исследован уровень антителообразующей способности В-лимфоцитов по отношению к иммуноглобулину класса G (рис. 3).

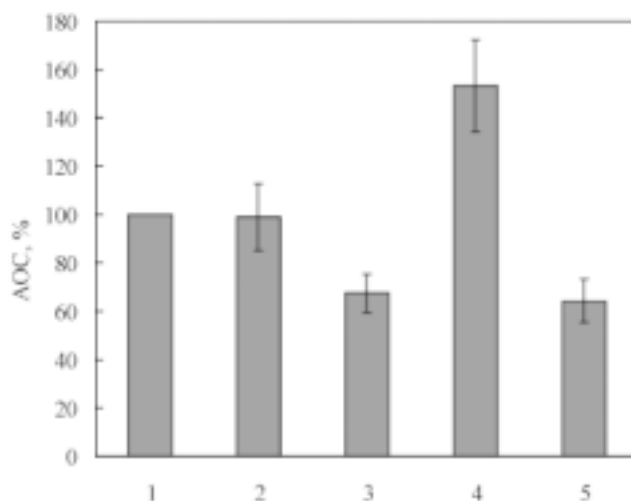


Рис. 3. Антителообразующая способность (по Ig G) В-лимфоцитов, модифицированных активными формами кислорода.

Обозначения:

1 – антителообразующая способность (АОС) нативных лимфоцитов; величина АОС лимфоцитов в присутствии: 2 – синглетного кислорода; 3 – гидроксильного радикала; 4 – супероксидного анион-радикала; 5 – пероксида водорода.

Антителообразующая способность В-лимфоцитов по отношению к иммуноглобулинам класса G (рис. 3) в условиях генерации гидроксильного радикала и пероксида водорода статистически достоверно снижается по сравнению с уровнем контрольного образца, синглетный кислород не влияет на величину изучаемого параметра. Воздействие супероксидного анион-радикала на лимфоциты стимулирует антителопродуцирующую способность В-клеток в отношении Ig G.

По-видимому, АФК непосредственно или опосредованно через продукты ПОЛ и оксидативной модификации белков индуцируют нарушение структурно-функционального состояния В-клеточного рецептора для антигена и других белковых компонентов каскада передачи внешнего сигнала в клетку. Следствием этих процессов и являются разнонаправленные изменения уровня продукции антител G в условиях генерации различных активных форм кислорода.

Таким образом, нами выявлено, что экзогенно генерируемый синглетный кислород не влияет на функциональные свойства Т- и В-лимфоцитов. Возможно, вследствие малых величин пробега и времени жизни синглетный кислород акцептируется компонентами плазматической мембраны лимфоцитарных клеток, не связанными с процессами активации иммуноцитов, их цитотоксического действия и продукции антител. Воздействие супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала и пероксида водорода индуцирует разнонаправленные изменения активности исследуемых клеток, связанные, по-видимому, с особенностями структурно-функционального состояния их поверхностных мембранных структур.

Установлено, что лимфоциты являются весьма устойчивыми к воздействию активированных кислородных метаболитов. Можно предположить, что высокая резистентность лимфоцитов к воздействию АФК связана с наличием в этих клетках и их мембранах компонентов ферментативной и неферментативной антиоксидантных систем, дезактивирующих высокореакционноспособные активированные кислородные метаболиты и свободно-радикальные продукты превращения мембранных белков и липидов [8]. Кроме того, величины концентрации АФК, генерируемых в данных условиях эксперимента, могут быть недостаточными для нарушения структурного состояния лимфоцитарных клеток и их мембран.

Исследованы изменения жизнеспособности лимфоцитов человека, индуцированные воздействием АФК, после 20 часов инкубации клеток в питательной среде. Выбор такого временного интервала для оценки изменений исследуемого параметра был

обусловлен тем, что период времени – 20 часов, используется для определения функциональной (цитотоксической) активности лимфоцитов человека по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха. Выявлено, что воздействие синглетного кислорода и пероксида водорода на лимфоцитарные клетки не влияет на уровень их жизнеспособности. В условиях экзогенной генерации гидроксильного радикала и супероксидного анион-радикала наблюдается статистически достоверное снижение величины исследуемого параметра по отношению к контрольному образцу (немодифицированные клетки).

Повреждающее действие супероксидного анион-радикала может быть связано с нарушением структуры ДНК непосредственно или опосредованно с участием вторичных радикалов, воздействующих на ДНК. Супероксидный радикал может вызывать деполимеризацию кислых полисахаридов, инициирует ПОЛ в мембранах лимфоцитов. Гидроксильный радикал также повреждает нуклеиновые кислоты, оказывая как мутационное, так и летальное действие на клетку, инициирует реакции ПОЛ, инактивирует ферменты.

Следовательно, наблюдаемое нами снижение цитотоксической активности смеси лимфоцитов в условиях экзогенной генерации супероксидного и гидроксильного радикалов может быть, наряду с другими причинами, обусловлено и снижением количества жизнеспособных клеток. По-видимому, отсутствие изменений или снижение цитотоксической активности и антителообразующей способности Т- и В-лимфоцитов в условиях экзогенной генерации некоторых АФК является результатом одновременного протекания процессов активации или ингибирования отдельных видов активности Т-, В-клеток и НК и доминирования вклада того или иного процесса в общей картине изменений функциональных свойств иммунокомпетентных клеток.

Разрушение опухолевых клеток происходит с участием растворимых факторов, синтезируемых иммуноцитами, и, в частности, фактора некроза опухоли. В связи с отсутствием сведений о синтезе ФНО- α в условиях экзогенной генерации активных форм кислорода нами исследованы изменения уровня продукции этого цитокина (ФНО- α), индуцированные воздействием пероксида водорода, гидроксильного и супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода. Полученные результаты показаны на рис. 4.

Обработка лимфоцитов раствором пероксида водорода (10^{-6} моль/л) с их последующей 20-часовой инкубацией индуцирует снижение уровня синтеза ФНО- α на $11,6 \pm 1,4\%$ по отношению к таковому для контрольного образца (100%). В условиях генерации супероксидного анион-радикала и гидроксильно-

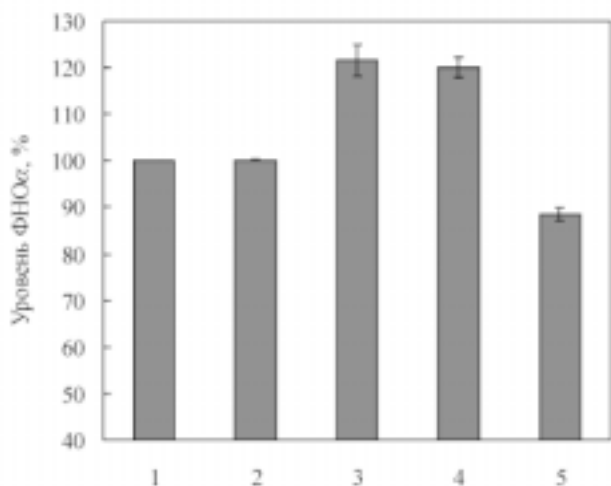


Рис. 4. Изменение уровня продукции ФНО-α лимфоцитами после воздействия активных форм кислорода
Обозначения:

1 – уровень синтеза нативными лимфоцитами ФНО-α; степень продукции ФНО-α лимфоцитами в присутствии: 2 – синглетного кислорода; 3 – гидроксильного радикала; 4 – супероксидного анион-радикала; 5 – пероксида водорода.

го радикала наблюдается повышение величины изучаемого параметра соответственно на $20,1 \pm 2,2$ % и $21,6 \pm 3,3$ % по сравнению с немодифицированными лимфоцитами. При воздействии синглетного кислорода не выявлены статистически достоверные изменения уровня синтеза ФНО-α по отношению к контролю.

Таким образом, модуляция уровня продукции ФНО-α лимфоцитами под влиянием пероксида водорода может осуществляться как в результате его диффузии внутрь клетки и изменения активности генов, так и за счет модификации мембранных компонентов, участвующих в процессе передачи сигнала в клетку. Действие гидроксильного радикала, по всей вероятности, проявляется за счет его высокой способности к оксидативной модификации поверхностных мембранных структур. Супероксидный анион-радикал, не проникающий через мембраны, воздействует также, как и ОН-радикал, на поверхностные компоненты клетки. Синглетный кислород способен к диффузии, но, по-видимому, за счет малого времени жизни, преимущественно модифицирует мембранные компоненты передачи сигнала.

С целью выявления взаимосвязи изменений функциональной активности иммунцитов человека с процессами модификации отдельных компонентов их мембран исследован уровень поверхностных маркеров лимфоцитарных клеток Fc-рецепторов, CD56, CD8 в условиях воздействия активных форм кислорода.

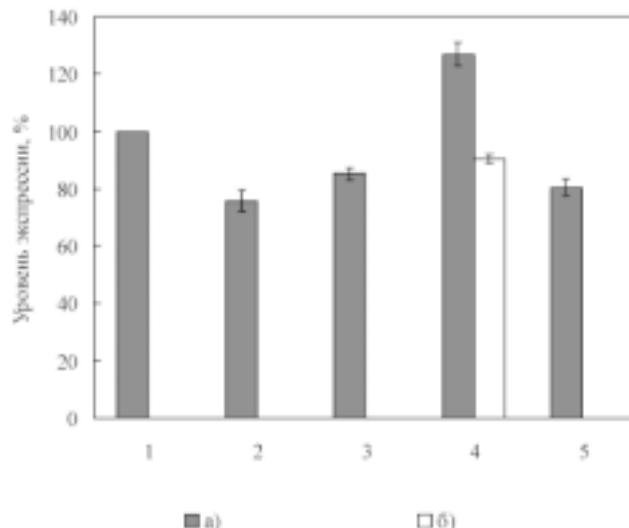


Рис. 5. Изменение уровня экспрессии Fc-рецепторов лимфоцитов в условиях генерации активных форм кислорода
Обозначения:

1 – контроль (нативные лимфоциты); уровень экспрессии Fc-рецепторов в условиях генерации: 2 – синглетного кислорода; 3 – гидроксильного радикала; 4 – супероксидного анион-радикала; 5 – пероксида водорода.

При изучении уровня экспрессии Fc-рецепторов лимфоцитов в условиях генерации синглетного молекулярного кислорода выявлено (рис. 5), что у большинства доноров (22 донора) наблюдается статистически достоверное снижение величины изучаемого параметра по отношению к контролю (100%). Лишь у 5 доноров было зарегистрировано повышение уровня экспрессии Fc-рецепторов в среднем на 11 %.

В условиях экзогенной генерации гидроксильного радикала у большинства доноров (21 донор) также обнаружено снижение величины исследуемого показателя на 15 % по сравнению с контролем (рис. 5). У 3 доноров уровень экспрессии Fc-рецепторов повышался на 9 % по сравнению с немодифицированными иммунocyтaми.

По характеру изменений уровня экспрессии Fc-рецепторов в условиях воздействия супероксидного анион-радикала (рис. 5) нами были выделены две группы доноров: в первой (14 доноров) наблюдалось повышение величины изучаемого параметра на 27 % по отношению к таковой для контрольных образцов; во второй (14 доноров) – снижение на 10 %.

При добавлении пероксида водорода к суспензии лимфоцитов у большинства доноров (18 доноров) было выявлено уменьшение уровня экспрессии Fc-рецепторов на 19 % по сравнению с интактными иммунocyтaми (рис. 5). У 6 доноров величина изучаемого параметра незначительно повышалась на 8 % по отношению к таковой для немодифицирован-

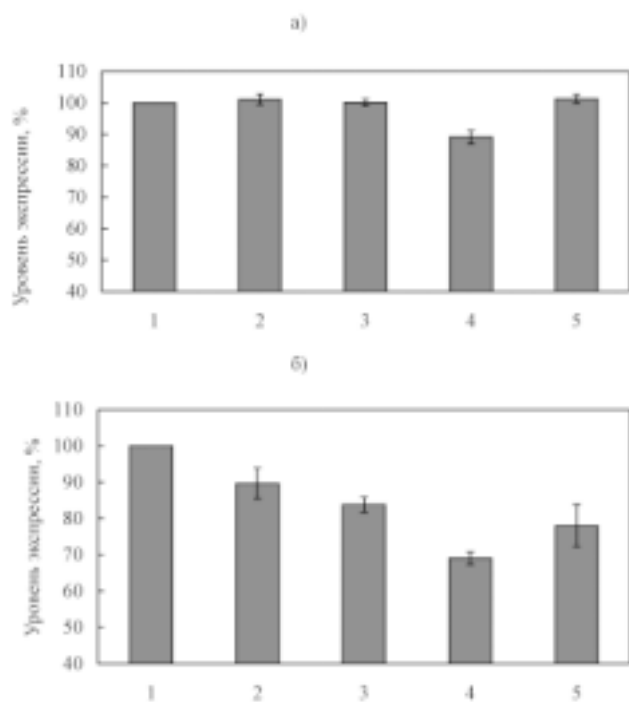


Рис. 6. Изменение уровня экспрессии CD56 лимфоцитов в условиях генерации активных форм кислорода
Обозначения:

1 – контроль (нативные лимфоциты);
уровень экспрессии CD56 в условиях генерации:
2 – синглетного кислорода; 3 – гидроксильного радикала;
4 – супероксидного анион-радикала; 5 – пероксида водорода.
а) – первая группа доноров, б) – вторая группа доноров.

ных клеток. Следовательно, нами выявлены изменения уровня экспрессии Fc-рецепторов при воздействии АФК, что свидетельствует в пользу представлений о модификации поверхности иммуноцитов активными кислородными частицами. У большинства доноров наблюдалось снижение уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитарной мембраны, что коррелирует с результатами исследования функциональных свойств лимфоцитарных клеток в условиях экзогенной генерации АФК.

При изучении уровня экспрессии CD56 лимфоцитов в условиях генерации АФК также выявлены две группы доноров, различающиеся по характеру ответной реакции на воздействие активированных кислородных метаболитов (рис. 6). Для 1 группы доноров обнаружено, что уровень экспрессии CD56 в условиях воздействия супероксидного анион-радикала снижается на 11 % по отношению к контролю, в то время как другие формы АФК не влияют на величину изучаемого параметра. Для второй группы отмечается снижение уровня экспрессии CD56 в условиях генерации всех АФК.

Полученные данные указывают на то, что воздействие АФК на смесь лимфоцитов индуцирует

изменения структурного состояния плазматических мембран натуральных киллеров, определяющие, наряду с другими причинами, направленность изменений функциональной активности смеси лимфоцитов в условиях экзогенной генерации АКМ.

Результаты исследования уровня экспрессии CD8 Т-лимфоцитов в условиях воздействия АФК показали, что величина изучаемого параметра модифицированных образцов практически не отличается от таковой для контроля. Полученные данные указывают на высокую степень устойчивости молекул CD8 и его ближайшего «окружения» к оксидативной модификации лимфоцитарных клеток.

По-видимому, в условиях генерации АФК выявляются изменения уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитарных мембран в основном Т-клеток и натуральных киллеров – Fc-рецепторов и CD56, определяющие характер модификации функциональных свойств иммуноцитов под влиянием активных кислородных частиц.

Итак, можно заключить, что АФК выступают в роли факторов, избирательно модулирующих структурно-функциональное состояние отдельных компонентов Т-, В-лимфоцитов и НК, и, тем самым, регулирующих активность ключевых факторов иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антитела. Методы. В 2 ч. – Ч. 2. / Под ред. Д. Кэтти. – М.: Мир, 1991. – 380 с.
2. Зарецкая Ю. М. Клиническая иммуногенетика / Ю. М. Зарецкая. – М.: Медицина, 1983. – 208 с.
3. Лимфоциты: Методы / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 395 с.
4. Теория и практика иммуноферментного анализа / Под ред. А.М. Егорова. – М.: Высшая школа, 1991. – 228 с.
5. Sagone A.L., Kamps S. and Cambell R. Photochem. Photobiol. 1978. V.28. P. 909–915.
6. Zoschke D.C. and Staite N.D. Supression of human lymphocyte proliferation by aktivated neutrophils or H₂O₂: surviving cells have an altered T helper / T suppressor ratio and an increased resistance to secondary oxidant exposure // Clin. Immunol. and Immunopathol. – 1987. – Vol. 42. – P. 160-170.
7. Зенков Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова // М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». – 2001. – 343с.
8. Дмитриев Е.В. Модуляция структурно-функциональных изменений мембран Т- и В-лимфоцитов крови человека некоторыми химическими и физическими агентами.: Дис. ... канд. биол. наук / Е.В. Дмитриев. – Воронеж, 2003. – 174 с.