

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ CD 2 РЕЦЕПТОРОВ НАТИВНЫМИ И УФ-ОБЛУЧЕННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА И ИХ СПОСОБНОСТЬ ВСТУПАТЬ В РЕАКЦИИ РОЗЕТКООБРАЗОВАНИЯ С ЭРИТРОЦИТАМИ БАРАНА

В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева, И. А. Колтаков, С. М. Дубова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 22.04.2008 г.

Аннотация. С помощью методов непрямого иммуноферментного анализа и E-розеткообразования было изучено влияние УФ-излучения (240—390 нм) в диапазоне доз 151—1359 Дж/м² на уровень экспрессии и функциональную активность CD 2 рецепторов на мембранах Т-лимфоцитов крови человека. Установлено, что облучение Т-лимфоцитов «терапевтическими» дозами УФ-света (151 и 453 Дж/м²) не приводит к статистически достоверным изменениям количества мембранных молекул CD 2 антигенов и степени их аффинности. Воздействие УФ-излучения в дозе 1359 Дж/м² вызывает резкое снижение количества CD 2 маркеров на поверхности Т-клеток и сопровождается уменьшением в суспензии числа Т-лимфоцитов с высокоаффинными CD 2 антигенами при одновременном возрастании количества Т-клеток, не реагирующих с эритроцитами барана. Таким образом, максимальная из используемых нами доз УФ-света (1359 Дж/м²) подавляет экспрессию CD 2 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов и ингибирует функциональную активность этих адгезивных молекул.

Ключевые слова: экспрессия, Т-лимфоциты, иммуноферментный анализ, CD 2 рецепторы

Abstract. The effect of UV-irradiation (240-390nm) in the range of doses from 151 to 1359 J/m² on the CD2 receptor's expression level and functional activity of human blood T-lymphocytes have been investigated by indirect immunoassay and E-precipitation test. It has been established that UV-irradiation of T-lymphocytes in «therapeutic» doses (151 and 453 J/m²) doesn't lead to the statistical alterations of a quantity of membrane CD2 antigen's molecules and a level of their affinity. The effect of UV-irradiation in a dose of 1359 J/m² causes a decrease of a CD2-marker's amount on the surface of T-cells and accompanies by a reduction of T-lymphocyte's quantity with high affinity CD2-antigens with a simultaneous increase of an amount of T-cells, which not react with ovine erythrocytes. Thus the maximal dose of UV-light (1359 J/m²) from used one suppresses the expression of CD2 markers on the T-cell's surface and inhibits the functional activity of these molecules.

Key words: expression, T-lymphocyte, enzymeimmunoassay, CD 2 receptor

Т-лимфоциты принимают активное участие в становлении, формировании и функционировании иммунной системы [9]. Одним из мембранных маркеров Т-клеток является гликопротеин CD 2, который играет определенную роль в адгезионных взаимодействиях Т-лимфоцитов с окружающими клетками. Структура этого рецептора достаточно хорошо изучена, он относится к суперсемейству иммуноглобулинов, состоит из 327 аминокислотных остатков, его молекулярная масса равна 45—46 кДа. Внеклеточная область молекулы содержит два иммуноглобулиноподобных домена (С2- и V-типа) [20] и гомологична с молекулами CD 4 и CD 8 антигенов. N-концевой домен имеет три потенциальных места для N-гликозилирования и не содер-

жит дисульфидных связей между слоями β-структуры [23].

На клеточной мембране Т-лимфоцитов содержится от 83000 до 98000 молекул CD 2. Этот рецептор присутствует на поверхности практически всех зрелых Т-клеток, НК-клеток и тимоцитов. [21, 22].

Контррецептором для CD 2 маркеров на поверхности почти всех типов клеток человека (стромальные клетки, макрофаги, лимфоциты, клетки эпителия и т.д.) служит молекула CD 58. С этим связано участие CD 2 в иммунологических реакциях, требующих межклеточного взаимодействия: в кооперации Т- и В-клеток при индукции образования антител, при образовании конъюгатов между Т-киллерами и клетками-мишенями [7].

В результате взаимодействия CD 2 маркера Т-лимфоцитов с гомологом CD 58 на мембранах эритроцитов барана происходит агрегация этих

© Артюхов В. Г., Путинцева О. В., Колтаков И. А., Дубова С. М., 2008

клеток и формируются розетки, в центре которых находятся Т-клетка, а вокруг нее — присоединившиеся эритроциты. Феномен Е-розеткообразования с успехом используется для оценки адгезивной способности нативных и модифицированных разными факторами Т-лимфоцитов [19].

В последние десятилетия оформился и быстро развивается один из перспективных разделов эфферентной медицины — фотогемотерапия. Весомый вклад в развитие этого направления внесло внедрение в лечебную практику ультрафиолетового облучения крови (УФОК) [11].

В лечебном эффекте УФОК определенное место принадлежит перестройке работы иммунной системы организма [8, 12]. Объектами непосредственного воздействия УФ-облучения являются все компоненты крови, в том числе иммунокомпетентные клетки (лейкоциты) [4—6, 16] и гуморальные факторы иммунитета [2, 3, 17].

Облученная кровь при возвращении в кровяное русло активизирует массу циркулирующих лимфоцитов — это приводит к положительным сдвигам в организме, прежде всего в иммунной системе на уровне пролиферативных и репаративных процессов.

Установлено, что в терапевтической дозе УФОК не вызывает гибели клеток крови, но изменяет структуру и функциональные свойства лейкоцитов (моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов). При использовании метода АУФОК уровень общего количества лейкоцитов повышается в среднем на 25%, а общее количество Т-лимфоцитов увеличивается на 204% относительно исходного состояния [8]. Однако непосредственно после реинфузии облученной крови отмечается снижение уровня лейкоцитов, что, по мнению некоторых исследователей [13, 18], может быть связано с повышением адгезивности лейкоцитов в организме человека.

В связи с вышеизложенным, нами была исследована ответная реакция адгезивных мембранных молекул CD 2 (уровень экспрессии и участие в межклеточных взаимодействиях) Т-лимфоцитов крови доноров после их УФ-облучения.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование проводили на Т-лимфоцитах крови 15 доноров. Выделение лимфоцитов из крови осуществляли методом седиментации на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) по методу А. Воуш [1] в течение 15 мин при 300 g. Разделение лимфоцитов ($4 \cdot 10^9$ клеток/л) на Т- и

В-популяции осуществляли по методу Р. Terasaki [10]. Облучение суспензии Т-клеток проводили светом ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240—390 нм при 37 °С в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м². Уровень экспрессии CD 2 антигенов на поверхности мембран Т-лимфоцитов определяли методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. В работе были использованы моноклональные антитела мыши серии LT2 против CD 2 маркеров человека и конъюгат бараньих антител против IgG мыши с пероксидазой хрена («Сорбент», Москва). В качестве субстрата для пероксидазы использовали раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в цитратно-ацетатном буфере (рН 5,0) с добавлением 0,2% раствора пероксида водорода. Результаты учитывали спектрофотометрически при $\lambda = 450 \text{ нм}$ на вертикальном фотометре «Униплан» (Пикон, Москва) и выражали в единицах оптической плотности.

Одновременно у всех 15 доноров определяли способность Т-лимфоцитов образовывать розетки с эритроцитами барана (ЭБ). Реакцию Е-розеткообразования проводили по методике, описанной в работе [15] с некоторыми модификациями. Для фиксации комплексов Т-лимфоциты — ЭБ был использован 6%-ного раствор ацетальдегида. Взвесь образовавшихся розеток наносили на обезжиренные предметные стекла, подсушивали при комнатной температуре и фиксировали этиловым спиртом. Окраску мазков производили по методу Романовского-Гимза в течение 1—2 мин. Подсчет образовавшихся комплексов осуществляли визуально с использованием иммерсионной микроскопии.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладных программ «Statistica 6.0». Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента. При этом рассчитывали степень варьирования показателя при повторных определениях внутри опыта. Для выяснения зависимости между экспрессией CD 2 маркеров на поверхности мембран УФ-облученных лимфоцитов и количеством фотомодифицированных клеток, несущих различные по аффинности рецепторы, а также зависимости числа Т-клеток с рецепторами различной аффинности от дозы УФ-света нами были рассчитаны коэффициенты парной корреляции Пирсона [14].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методом ИФА было установлено, что уровень экспрессии CD 2 маркеров на поверхности мемб-

ран нативных Т-лимфоцитов крови доноров колебался в пределах от $0,181 \pm 0,013$ до $0,318 \pm 0,022$ и в среднем составлял $0,264 \pm 0,020$.

Воздействие УФ-излучения в дозах от 151 до 906 Дж/м² на суспензию Т-клеток не приводило к статистически достоверным изменениям уровня экспрессии изучаемого антигена по сравнению с контрольным образцом (рис. 1). После облучения Т-лимфоцитов максимальной из используемых нами доз УФ-света (1359 Дж/м²) было выявлено снижение ИФА-сигнала до величины $0,206 \pm 0,017$, что свидетельствует об уменьшении количества CD 2 молекул на мембранах УФ-облученных клеток.

Одновременно с выявлением уровня экспрессии CD 2 рецепторов нами была определена их функциональная активность, а именно способность Т-лимфоцитов участвовать в реакциях розеткообразования. При проведении исследований было обнаружено, что популяция Т-лимфоцитов является неоднородной по типу имеющих CD 2 маркеров к ЭБ. Т-клетки по своей способности взаимодействовать с ЭБ были разделены на три группы. Первая группа включала клетки, несущие на своей поверхности высокоаффинные CD 2 антигены, связывающие более четырех ЭБ. Ко второй группе отнесли лимфоциты, несущие среднеаф-

финные CD 2 рецепторы, которые связывали четыре и менее ЭБ. Третью группу составляли Т-клетки, не вступившие в реакцию розеткообразования, то есть несущие низкоаффинные CD 2 маркеры. Для каждого исследуемого образца было подсчитано 100 клеток.

Нами было установлено, что в контрольных образцах количество клеток с высокоаффинными рецепторами к ЭБ было равно 47 ± 8 . Число клеток со среднеаффинными рецепторами составляло 35 ± 5 . Количество клеток, не вступающих во взаимодействие с ЭБ, равнялось 18 ± 5 . Таким образом, в интактной клеточной суспензии преобладали Т-лимфоциты, присоединяющие более четырех ЭБ. После облучения суспензии клеток УФ-светом в дозах 151—906 Дж/м² не было зарегистрировано статистически достоверных изменений количества клеток, несущих высоко-, средне- и низкоаффинные CD 2 рецепторы (рис. 2).

Однако после воздействия на Т-лимфоциты УФ-света в дозе 1359 Дж/м² наблюдалось резкое снижение до 17 ± 8 числа клеток, несущих высокоаффинные рецепторы, что составляло 36,2 % от значений контрольных образцов. Наряду с этим было зарегистрировано повышение (на 138 %) количества клеток, не вступивших в реакцию ро-

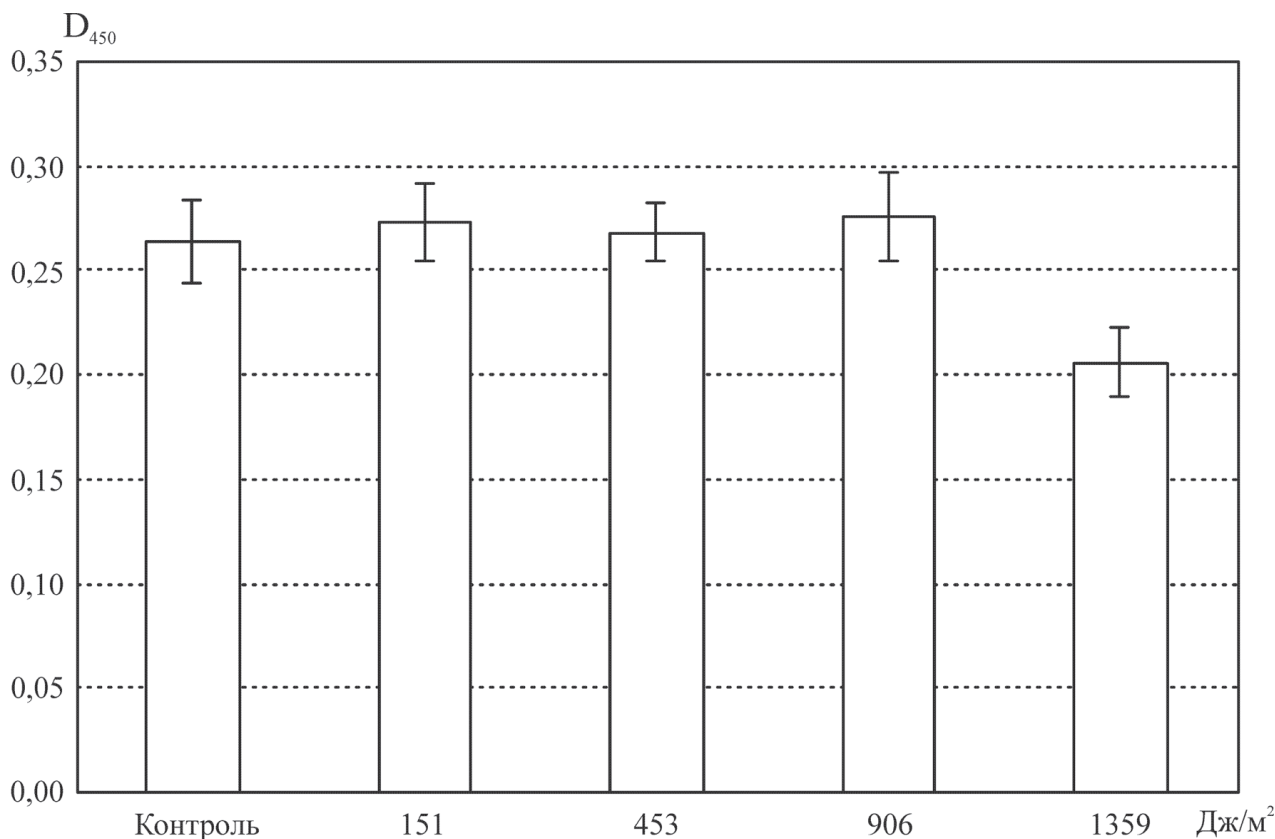


Рис. 1. Влияние УФ-света на экспрессию CD 2 рецепторов Т-лимфоцитами

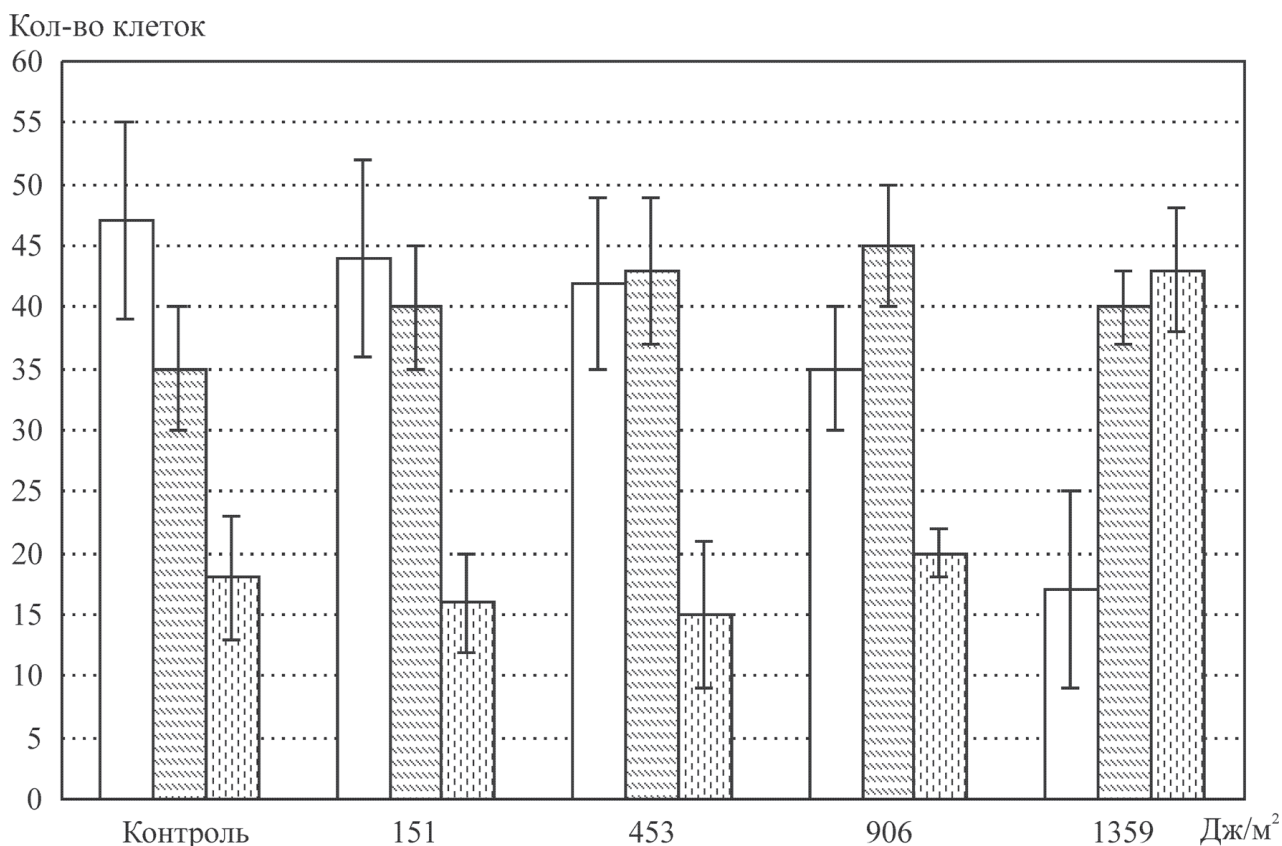


Рис. 2. Влияние УФ-облучения на количество T-лимфоцитов, экспрессирующих CD 2 рецепторы различной аффинности. Обозначения: □ — высокоаффинные CD 2 рецепторы; ▨ — среднеаффинные CD 2 рецепторы; ▩ — низкоаффинные CD 2 рецепторы

зеткообразования. Число клеток со среднеаффинными антигенами оставалось таким же, как в необлученном образце и составляло 40 ± 3 .

Для оценки влияния УФ-света на розеткообразующую способность T-лимфоцитов для каждой из использованных доз УФ-излучения нами были рассчитаны соотношения количества клеток, вступивших в реакцию с ЭБ и клеток, неспособных к розеткообразованию (табл. 1). По величине данного соотношения можно судить о переходе лимфоцитов из группы клеток, несущих высоко- и среднеаффинные рецепторы, в группу клеток, экспрессирующих низкоаффинные CD 2 антигены, под воздействием последовательно увеличивающихся доз УФ-света, то есть о степени влияния различных доз УФ-излучения на изменение функциональной активности CD 2 маркеров. Указанное соотношение для нативных T-лимфоцитов составило 4,6. Для T-клеток, облученных УФ-светом в дозах 151—906 Дж/м², оно равнялось соответственно 5,3; 5,7 и 4,0. После фотомодификации в дозе 1359 Дж/м² данная величина резко уменьшалась и становилась равной 1,3, что свидетельствовало об

увеличении количества клеток, не вступивших в реакцию розеткообразования.

Расчет коэффициентов парной корреляции Пирсона (КК) показал, что зависимость между уровнем экспрессии CD 2 рецепторов на мембранах T-лимфоцитов и числом клеток, несущих высокоаффинные антигены, имеет однонаправленный характер: $КК = 0,87$ ($\alpha = 0,05$).

Для клеток, несущих среднеаффинные рецепторы, рассчитанный КК составлял 0,21 ($\alpha = 0,739$), что свидетельствует о независимом изменении количества данного вида рецепторов и уровня экспрессии CD 2 антигенов на поверхности мембран иммунокомпетентных клеток.

Зависимость между количеством T-клеток, не вступивших в реакции розеткообразования, и уровнем экспрессии CD 2 антигенов имеет разнонаправленный характер: КК равен $-0,97$ ($\alpha = 0,008$).

Разнонаправленный характер был выявлен и для зависимости между числом клеток, несущих высокоаффинные рецепторы, и дозой облучения УФ-света: КК равен $-0,95$ ($\alpha = 0,011$). Для клеток, экспрессирующих средне- и низкоаффинные CD 2

антигены, рассчитанные величины КК при сравнении с дозой УФ-облучения не соответствуют заданному уровню значимости ($\alpha = 0,05$).

Снижение уровня экспрессии CD 2 рецепторов на поверхности мембран Т-лимфоцитов, вызванное ростом дозы УФ-облучения, сопровождается уменьшением количества клеток несущих высокоаффинные рецепторы. Это свидетельствует в пользу того, что возрастание дозы УФ-излучения приводит к затруднению адгезионных взаимодействий между Т-клетками и эритроцитами барана.

Таким образом, комплексное использование двух современных иммунологических методов (ИФА и Е-розеткообразование) позволило нам определить уровень экспрессии и функциональной активности трансмембранных CD 2 рецепторов нативных и фотомодифицированных Т-лимфоцитов крови человека и выявить роль этих адгезивных молекул в изменении структурно-функционального состояния мембран УФ-облученных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в исследуемой суспензии Т-лимфоцитов крови человека преобладают клетки с высокоаффинными CD 2 рецепторами: на их долю приходится 47 % от общего числа клеток.

2. Выявлено, что облучение Т-лимфоцитов «терапевтическими» дозами УФ-света (151 и 453 Дж/м²) не изменяет количество мембранных молекул CD 2 антигенов и не влияет на степень их аффинности.

3. Обнаружено, что воздействие УФ-света в дозе 1359 Дж/м² приводит к резкому снижению количества CD 2 маркеров на поверхности Т-клеток и сопровождается уменьшением в суспензии числа Т-лимфоцитов с высокоаффинными CD 2 антигенами при одновременном возрастании количества Т-клеток, не реагирующих с эритроцитами барана. Следовательно, большие дозы УФ-света подавляют экспрессию CD 2 маркеров на поверхности Т-лимфоцитов, ингибируют их функциональную активность, и в частности снижают способность взаимодействовать с CD 58 молекулами на поверхности мембран эритроцитов барана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антитела. Методы / под ред. Д. Кэтти: В 2-х кн. — кн.2 — М.: Мир, 1991. — 380с.
2. Анализ структурно-функциональных УФ-модификаций сывороточного и связанного с эритроцитарными мембранами С4 компонента комплемента / Артюхов В.Г. [и др.] // IV съезд по радиационным исследованиям (Радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность): Тез. докл. — Т. 3. — М.: 2001. — С. 800.
3. Влияние УФ-света на взаимодействие С4-компонента комплемента с лимфоцитарными мембранами / Артюхов В.Г. [и др.] // Цитология. — 2001. — Т. 43, № 4. — С. 317—318.
4. Артюхов В.Г. Экстракорпоральная ультрафиолетовая и фармакологическая модификация лимфоцитов при лечении больных гормонозависимой бронхиальной астмой / В.Г.Артюхов, И.Е.Лялина, О.В. Башарина // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация. — 2003. — № 1. — С. 26—31.
5. Влияние ультрафиолетового излучения на структурно-функциональное состояние Т- и В-лимфоцитов крови человека / Артюхов В.Г. [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2003. — Т. 43, № 1, — С. 96—101.
6. Влияние ультрафиолетового света и дексаметазона на функциональные свойства лимфоцитов и нейтрофилов / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2005. — Т.45, № 2, — С. 196—200.
7. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов. — М.: Мед. информ. агенство, 2001. — 736 с.
8. Иммуностимулирующее и антиоксидантное действие аутотрансфузии УФ-облученной крови / Вихрев Б.С. [и др.] // Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных: Сб. науч. трудов / под ред. И.Е. Ганелиной, К.А. Самойловой. — Л.: Наука, 1986. — С. 39—40.
9. Галактионов В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. — М.: Academia, 2004. — 522 с.
10. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика / Ю.М. Зарецкая. — М.: Медицина, 1983. — 208с.
11. Карандашов В.И. Ультрафиолетовое облучение крови / В.И. Карандашов, Е.Б. Петухов. — М.: Медицина, 1997. — 224 с.
12. Кукуй Л.И. К вопросу о механизмах клинического эффекта переливания аутокрови, подвергнутой воздействию ультрафиолетовых лучей / Л.И. Кукуй, И. Э. Бурд // Человек и свет. — Саранск, 1982. — С. 53—54.
13. Купновицкая И.Г. Влияние квантовой гемотерапии на состояние клеточного и гуморального иммунитета и морфологию эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца / И.Г. Купновицкая // Врачебное дело. — 1992. — №7. — С. 27—29.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
15. Передерий В.Г. Иммунный статус, критерии его оценки и принципы назначения иммунокорректирующих препаратов / В.Г. Передерий, Н.Г. Бычкова, А.М. Земсков. — Киев, 1989. — 54 с.
16. Рязанцев С.В. Влияние церулоплазмина и УФ-излучения на пероксидазную активность лимфоцитов человека / С.В. Рязанцев, В.Г. Артюхов, О.В. Башарина // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: Тез. Докладов. — Санкт-Петербург, 2003. — С. 60.
17. Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных:

Сб. науч. трудов / Самойлова К.А. [и др.] / под ред. И. Е. Ганелиной, К.А. Самойловой. — Л.: Наука, 1986. — С. 226—237.

18. *Трещинский А.И.* Экстракорпоральное ультрафиолетовое облучение крови / А.И. Трещинский, Г. А. Васильев, Б.С. Шейман // *Врачебное дело.* — 1984. — №3. — С. 11—16.

19. *Ярилин А.А.* Основы иммунологии / А.А. Ярилин — М.: Медицина, 1999. — 608 с.

20. Exon-intron organization and sequence comparison of human and murine T11 (CD2) genes / Diamond D.J. [et

al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1988. — Vol. 85. — P. 1615—1619.

21. *Majeau G.R. [et al.]* // *J. Immunol.* — 1994. — Vol. 152, Issue 6. — P. 2753—2767.

22. *Peterson A.* Monoclonal antibody and ligand binding sites of the T cell erythrocyte receptor (CD2) / A. Peterson, B. Seed // *Nature.* — 1987. — Vol. 329, № 6142. — P. 842—846.

23. *Seed B.* Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure / B. Seed, A. Aruffo // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1987. — Vol. 84. — P. 3365—3369.

Артюхов Валерий Григорьевич — профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, г. Воронеж, Университетская пл., 1, e-mail: avg@main.vsu.ru

Путинцева Ольга Васильевна — доцент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, г. Воронеж, Университетская пл., 1, e-mail: bf188@bio.vsu.ru

Колтаков Игорь Александрович — ассистент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, г. Воронеж, Университетская пл., 1, e-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Дубова Светлана Михайловна — аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, г. Воронеж, Университетская пл., 1, e-mail: bf188@bio.vsu.ru

Artyukhov Valerij G. — the head of the Division, Full Professor, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Russia, Voronezh, Universitetskaya pl.,1, e-mail: avg@main.vsu.ru

Putintseva Olga V. — associate professor, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Russia, Voronezh, Universitetskaya pl.,1, e-mail: bf188@bio.vsu.ru

Koltakov Igor A. — assistant professor, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Russia, Voronezh, Universitetskaya pl.,1, e-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Dubova Svetlana M. — PhD student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Russia, Voronezh, Universitetskaya pl.,1, e-mail: bf188@bio.vsu.ru