

О МЕХАНИЗМЕ МОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА НА СОСТОЯНИЕ АНТИГЕННОГО ПРОФИЛЯ МЕМБРАН Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

С. М. Дубова, О. В. Путинцева, В. Г. Аргюхов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 10.05.10 г.

Аннотация. С помощью твердофазного иммуноферментного анализа исследовано влияние широкого диапазона доз УФ-света (151, 453, 906 и 1359 Дж/м²) и блокатора синтеза белка — циклогексимида (10⁻⁵ моль/л), на уровень экспрессии адгезивных CD2, CD11a и CD29 молекул Т-лимфоцитов человека. Показано иммуносупрессивное действие большой дозы УФ-света (1359 Дж/м²) на уровень экспрессии CD2 и CD11a молекул и иммуномодулирующее влияние УФ-излучения (151, 453, 906 и 1359 Дж/м²) на экспрессию CD29 антигенов мембран Т-лимфоцитов крови доноров. Применение в опытах блокатора синтеза белка — циклогексимида, позволило выявить возможность синтеза *de novo* молекул CD2 и CD11a маркеров при облучении суспензий клеток УФ-светом в дозах 151—906 Дж/м² и 151—453 Дж/м² соответственно, а также CD29 антигенов у I группы доноров при воздействии на иммуноциты всего используемого в работе диапазона доз УФ-света (151—1359 Дж/м²).

Ключевые слова: Т-лимфоциты, адгезивные рецепторы, УФ-свет, циклогексимид, иммуноферментный анализ.

Abstract. It is studied the influence of a wide range of UV-light doses (151, 453, 906 and 1359 J/m²) and inhibitor of protein biosynthesis — cycloheximide (10⁻⁵ m) on the expression level of adhesion molecules (CD2, CD11a and CD29) of human T-lymphocytes by means of enzyme linked immunosorbent assay. It is established immunosuppression action UV-irradiation in maximal doses (1359 J/m²) on expression level of CD2 and CD11a molecules and immunomodulation action UV-light in doses of 151—1359 J/m² on expression level of CD29 antigens on membrane surface of human blood T-lymphocytes. Using inhibitor of protein synthesis — cycloheximide in assay, has allowed to reveal an synthesis possibility *de novo* of molecules CD2 and CD11a markers by irradiating of suspensions of cells UV-light in doses 151—906 J/m² and 151—453 J/m² respectably, and also CD29 antigens in I group of donors by influence UV-light all range of doses, used in work (151—1359 J/m²), on immunocytes.

Keywords: T-lymphocytes, adhesion receptors, UV-light, cycloheximide, enzyme linked immunosorbent assay.

ВВЕДЕНИЕ

Активация Т-лимфоцитов, посредством формирования «иммунного синапса», является одним из ключевых этапов в развитии иммунного ответа организма на введение чужеродного антигена. Этот процесс протекает при непосредственном участии мембранных молекул адгезии реагирующих клеток [1].

На начальных этапах активационного процесса происходит взаимная ориентация контактирующих клеток за счет взаимодействий CD2 рецепторов и CD58 маркеров. (Здесь и далее первыми указаны адгезивные молекулы, экспрессирующиеся на Т-лимфоцитах, вторыми — на антигенпредставляющих клетках (АПК)). Эти связи, в дальнейшем, позволяют Т-лимфоцитам реагировать на более низкие концентрации антигенов [2, 3]. Хотя данный

процесс и обеспечивает сближение клеток на расстояние, необходимое для реализации взаимодействия TCR с молекулами главного комплекса гистосовместимости, однако, оно не создает достаточно сильной адгезии [4]. Ведущую роль в прекращении перемещения клеток и, соответственно, образовании более прочного контакта играет формирование связи между β_2 -интегрином LFA-1 (CD11a/CD18) и молекулой ICAM-1 [5]. Далее в течение следующего часа осуществляются события взаимной активации контактирующих клеток, сопровождаемые распознаванием TCR Т-клеток МНС-пептидного комплекса АПК [6].

На более поздних этапах активированные Т-лимфоциты мигрируют в окружающие ткани при участии β_1 -интегринов CD49/CD29, обеспечивающих взаимодействие клеток с белками экстрацеллюлярного матрикса — ламинином, коллагеном, фибронектином [7].

В настоящее время в медицине для лечения широкого спектра заболеваний с успехом применяется метод аутоотрансфузии УФ-облученной крови. Воздействию УФ-излучения при этом подвергаются все гуморальные и клеточные составляющие крови, в том числе и Т-лимфоциты. При этом мембраны клеток претерпевают существенные структурно-функциональные изменения, вклад в которые, возможно, может вносить синтез и экспрессия на их поверхность вновь образовавшихся рецепторных молекул [8, 9].

В связи с вышеизложенным определенным интерес представляет изучение влияния широкого диапазона доз УФ-света на экспрессию адгезивных CD2, CD11a и CD29 молекул мембранами Т-лимфоцитов крови доноров в присутствии блокатора синтеза белка — циклогексимида.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови 16 доноров методом седиментации на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) [10]. Разделение смеси клеток на Т- и В — субпопуляции осуществляли по методу Р. Terasaki [11].

Полученную суспензию Т-лимфоцитов (2×10^4 кл/мл) в объеме 2 мл облучали в термостатируемой (37°C) стеклянной кювете светом ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240—390 нм. Интенсивность облучения равнялась 151 Дж/м^2 в минуту на расстоянии 0.23 м от объекта. Время экспозиции составляло 1, 3, 6 и 9 мин, что соответствовало дозам облучения 151, 453, 906 и 1359 Дж/м^2 . Инкубацию Т-лимфоцитов с циклогексимидом (10^{-5} моль/л) проводили в питательной среде RPMI 1640 при температуре 37°C в течение 24 ч.

Для определения уровня экспрессии изучаемых маркеров на поверхности мембран нативных и модифицированных Т-лимфоцитов применяли метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа, который проводили на плоскодонных полистирольных планшетах (ООО «Биомедикал», Москва). В работе использовали моноклональные антитела серии LT2, LT11a и LT29 соответственно к CD2 антигену, CD11a субъединице LFA-1 и CD29 субъединице VLA рецепторов человека и конъюгат козьих антител против IgG, меченных пероксидазой хрена (ООО «Сорбент», Москва). В качестве субстрата для фермента использовали раствор ортофенилендиаминдигидрохлорида в цитратно-ацетатном буфере (pH 5.0) с добавлением 0.2 % раствора пероксида водорода.

Результаты учитывали спектрофотометрически при $\lambda = 492 \text{ нм}$ на вертикальном фотометре «Униплан» (Пикон, Москва) и выражали в относительных единицах оптической плотности (отн. ед.).

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.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы нами было установлено, что уровень экспрессии CD2 и CD11a антигенов на поверхности мембран нативных Т-лимфоцитов после точной инкубации в среднем составлял 0.427 ± 0.050 и 0.292 ± 0.018 отн. ед. соответственно (рис. 1 и 2). Воздействие УФ-излучения в диапазоне доз 151—906 Дж/м^2 на суспензию клеток не приводило к статистически достоверным изменениям тестируемого показателя. Облучение иммуноцитов максимальной из используемых нами доз УФ-света (1359 Дж/м^2) способствовало снижению ИФА-сигнала на 20.8 % и 18.2 %, регистрируемого от CD2 и CD11a маркеров соответственно.

Внесение в инкубационную среду блокатора синтеза белка — циклогексимида, способствовало падению экспрессии CD2 маркеров Т-лимфоцитов, предварительно облученных УФ-светом в дозах 151—906 Дж/м^2 , на 21 %, 14 % и 20 % и снижению экспрессии CD11a антигенов в образцах иммуноцитов, облученных УФ-светом в дозах 151 и 453 Дж/м^2 , на 14 % и 17 % по сравнению с соответствующими образцами клеток без ингибитора. Добавление циклогексимида в суспензии нативных лимфоцитов и клеток, модифицированных УФ-светом в дозе 1359 Дж/м^2 , не приводило к статистически достоверным изменениям экспрессии CD2 рецепторов, а также CD11a антигенов во взвешках интактных и фотомодифицированных УФ-излучением в дозах 906 и 1359 Дж/м^2 иммуноцитов.

По характеру ответа CD29 антигенов на модификацию иммунокомпетентных клеток УФ-светом доноры были разделены на две группы. Уровень экспрессии CD29 молекул на поверхности мембран интактных Т-клеток I группы доноров (10 человек) составил в среднем 0.188 ± 0.014 отн. ед. (рис. 3). Облучение суспензии лимфоцитов УФ-светом в дозах 151, 453 и 906 Дж/м^2 способствовало усилению ИФА-сигнала на 25 %, 21 % и 29 % соответ-

ственно по сравнению с необлученными клетками. Максимальная доза УФ-света (1359 Дж/м²) не вызвала статистически достоверных изменений уровня экспрессии CD29 молекул Т-лимфоцитами относительно контрольных образцов. При добавлении в инкубационную смесь нативных клеток циклогексимида не наблюдалось статистически достоверных изменений тестируемого показателя.

Воздействие циклогексимида на иммуноциты, УФ-облученные в дозах 151—1359 Дж/м², приводило к падению экспрессии исследуемых антигенов на 23%, 37%, 36% и 17% соответственно по сравнению с этими же образцами без блокатора.

Во II группу вошли 6 доноров, уровень экспрессии CD29 молекул нативными Т-лимфоцитами которых был изначально выше, чем у лиц первой

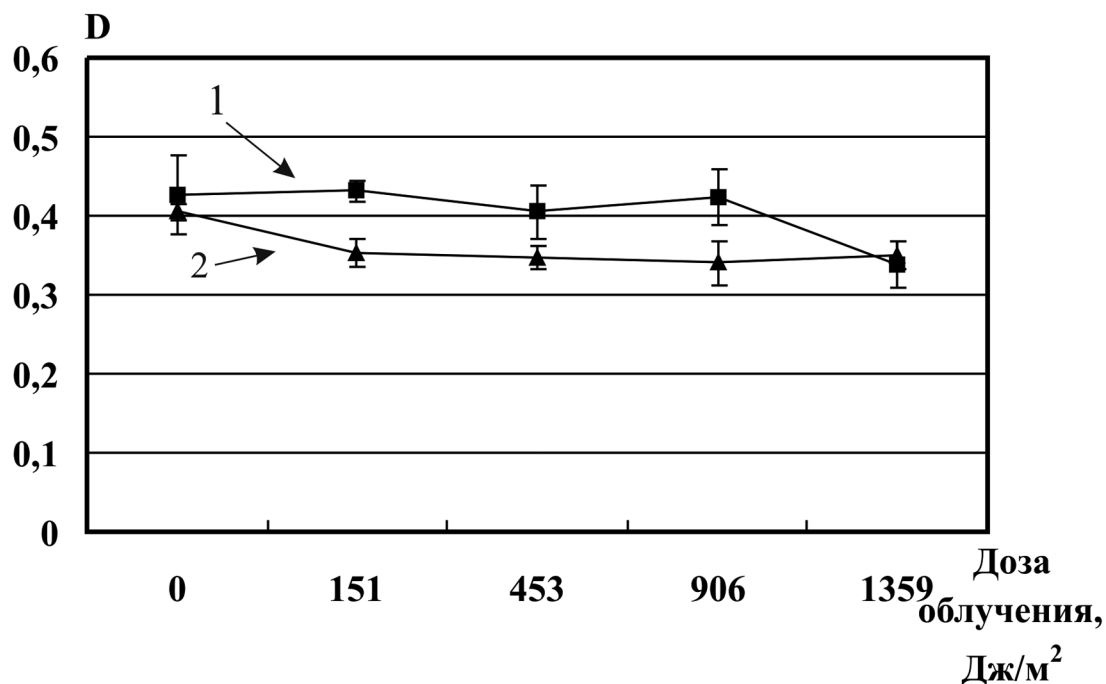


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии CD2 рецепторов УФ-облученными Т-лимфоцитами в присутствии циклогексимида: 1 — нативные Т-лимфоциты; 2 — Т-лимфоциты, модифицированные циклогексимидом

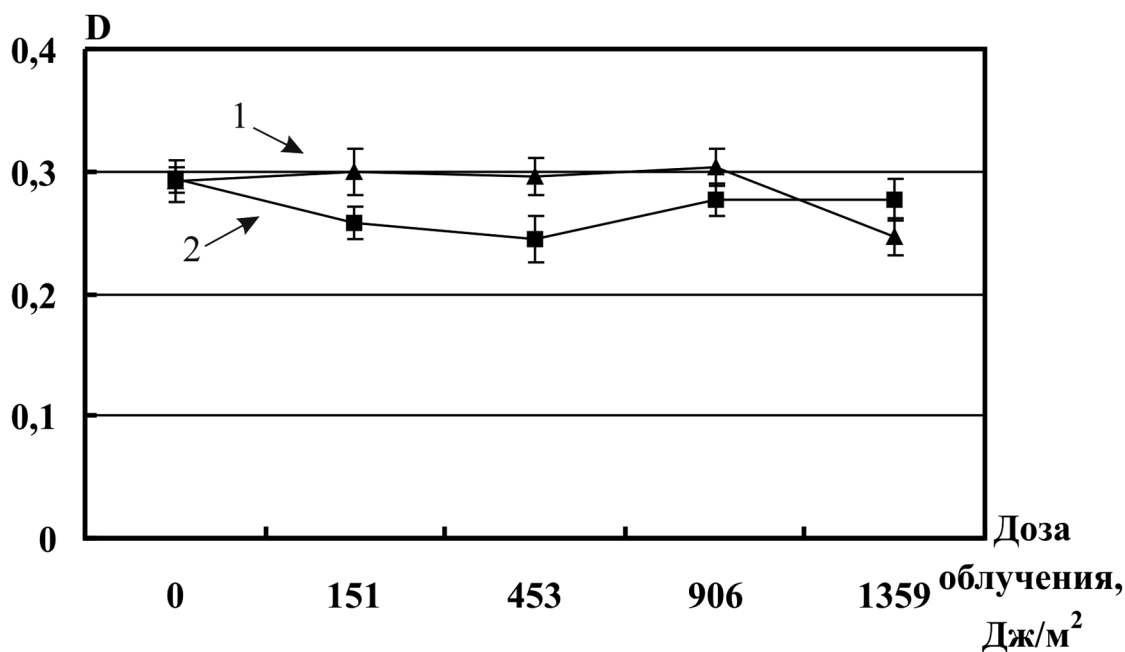


Рис. 2. Влияние УФ-света и циклогексимида на экспрессию CD11a антигенов Т-лимфоцитами человека: 1 — нативные Т-лимфоциты; 2 — Т-лимфоциты, модифицированные циклогексимидом

группы, и в среднем составлял 0.246 ± 0.023 отн. ед. (рис. 4). Облучение образцов Т-клеток УФ-светом во всем используемом диапазоне доз (151—1359 Дж/м²) индуцировало падение экспрессии исследуемых молекул на 26%, 18%, 20% и 39% соответственно по сравнению с контролем. При добавлении циклогексимида в суспензии нативных лимфоцитов и клеток, предварительно облученных

УФ-светом в дозах 151—1359 Дж/м², не наблюдалось статистически достоверных изменений тестируемого показателя относительно этих же образцов без ингибитора.

В ходе проведенных нами исследований было зарегистрировано снижение уровня экспрессии CD2 и CD11a молекул в суспензиях фотомодифицированных клеток, содержащих циклогексимид,

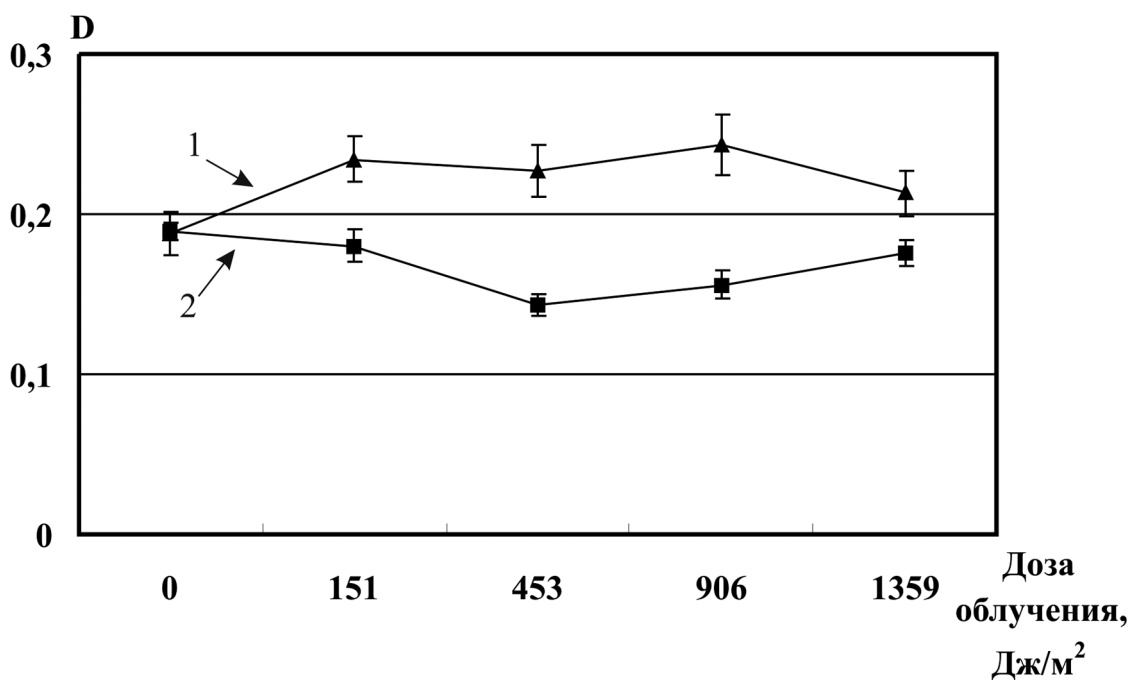


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии CD29 молекул (I группа) после УФ-облучения и в присутствии циклогексимида: 1 — нативные Т-лимфоциты; 2 — Т-лимфоциты, модифицированные циклогексимидом

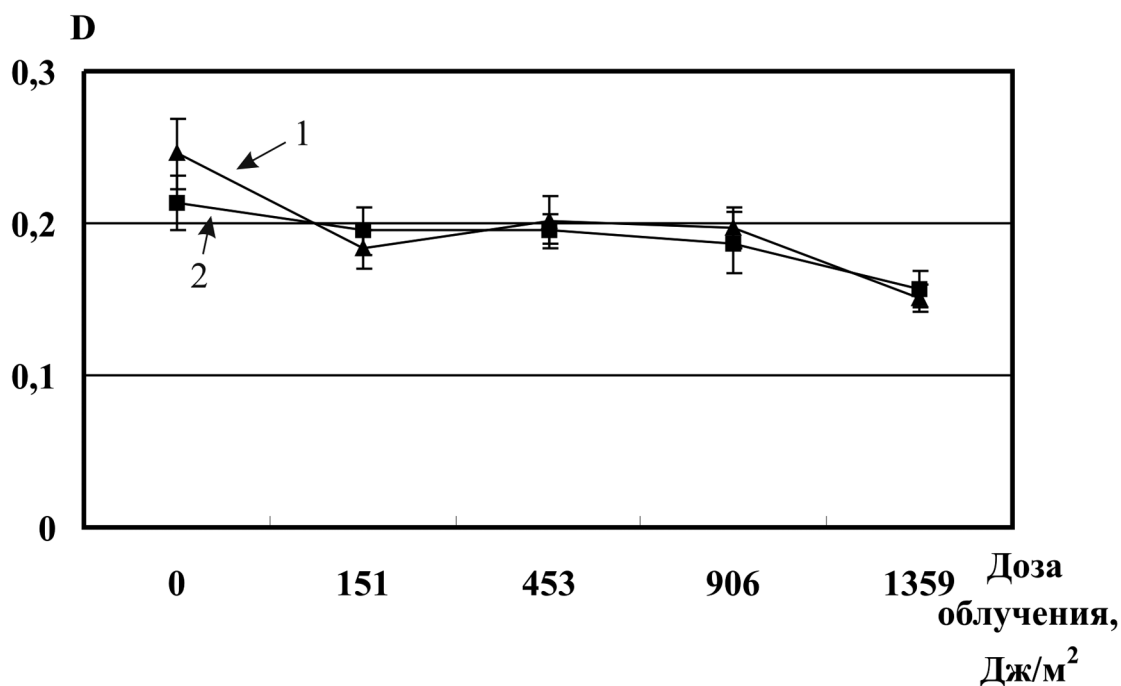


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии CD29 молекул (II группа) после УФ-облучения и в присутствии циклогексимида: 1 — нативные Т-лимфоциты; 2 — Т-лимфоциты, модифицированные циклогексимидом

при сравнении с соответствующими УФ-облученными образцами, и отсутствие статистически достоверных отличий тестируемого параметра при сравнении с нативными лимфоцитами. Это, по-видимому, связано с тем, что начальные этапы после УФ-облучения сопровождаются превалированием процессов, способствующих падению экспрессии CD2 и CD11a маркеров на поверхности мембран Т-лимфоцитов (интернализация маркеров в более глубокие слои мембраны, шеддинг рецепторов с внешних примембранных слоев гликокаликса, экранировка молекул антигенов, изменение конформации исследуемых молекул в результате прямого или опосредованного действия УФ-света). Зарегистрированный нами через сутки возврат показателей уровня экспрессии исследуемых рецепторов до значений контрольных образцов, вероятно, обусловлен активацией белоксинтезирующих систем клеток, что позволяет им в течение последующей 24-часовой инкубации нивелировать негативные последствия влияния УФ-излучения.

В клетках, облученных большими дозами УФ-света (906 и 1359 Дж/м² по отношению к действию на экспрессию CD11a маркеров и 1359 Дж/м² — на экспрессию CD2 рецепторов), данный тип изменений не наблюдается (ИФА-сигнал уменьшается по сравнению с контролем и не отличается от такового соответствующих фотомодифицированных образцов, содержащих ингибитор). Это, вероятно, связано с сильным ингибирующим действием УФ-излучения, препятствующим активации систем синтеза рецепторных молекул в лимфоцитах.

Нами было показано иммуномодулирующее действие УФ-света в дозах 151—1359 Дж/м² на экспрессию CD29 молекул на поверхности мембран Т-лимфоцитов, что выражалось в зависимости между исходным уровнем экспрессии CD29 маркеров и ответной реакцией его молекул на воздействие УФ-излучения: тестируемый показатель возрастал после УФ-облучения Т-лимфоцитов у доноров с исходно низкими (I группа) и снижался у лиц с исходно высокими (II группа) его значениями.

Выявленное нами падение экспрессии CD29 антигенов в образцах иммуноцитов доноров I группы, содержащих циклогексимид, по сравнению с соответствующими УФ-облученными образцами, возможно, указывает на синтез в течение суток новых рецепторных CD29 молекул.

Т-лимфоциты II группы лиц, по всей вероятности, не могут нивелировать депрессивное действие УФ-света в ходе суточной инкубации, что выражается в отсутствии активации процессов синтеза CD29 рецепторов (отсутствие статистически

достоверных изменений экспрессии CD29 молекул в присутствии циклогексимид в образцах фотомодифицированных клеток по сравнению с соответствующими УФ-облученными образцами). Разнонаправленная ответная реакция Т-лимфоцитов доноров на воздействие УФ-излучения, вероятно, обусловлена различной УФ-чувствительностью рецепторсинтезирующих систем разных групп лиц.

Известно, что УФ-излучение индуцирует протекание в мембранах клеток ряда фотохимических реакций, в частности, пероксидного фотоокисления липидов (ПФОЛ) при непосредственном участии активных форм кислорода [12]. Рядом авторов показано, что инициаторы ПФОЛ, в том числе и гидропероксиды липидов, могут выступать в роли вторичных мессенджеров и запускать синтез белков путем активации факторов транскрипции (NF- κ B, AP-1) [13—15]. Эти факторы связываются с промоторным участком гена и запускают транскрипцию, а, следовательно, и трансляцию соответствующих белков [16].

Предположительно, в наших экспериментах, именно с ходом вышеописанных реакций в фотомодифицированных клетках связано образование новых мембранных молекул иммунокомпетентными клетками.

Таким образом, нами было установлено, что УФ-свет существенно модулирует состояние антигенного профиля мембран Т-лимфоцитов, вызывая разнонаправленные изменения экспрессии молекул межклеточной адгезии. Выявленные изменения, возможность активации синтеза *de novo* и экспрессии клетками молекул CD2, CD11a и CD29 антигенов после воздействия широкого диапазона доз УФ-излучения необходимо учитывать при прогнозировании и оценке результатов проведения сеансов аутоотрансфузии УФ-облученной крови в клинике, а также анализе действия больших доз УФ-света на организм человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ярилин А. А. Иммунный синапс как структурная основа презентации антигена / А. А. Ярилин // Иммунология. — 2003. — № 6. — С. 347—350.
2. Van der Merwe P.A. / A Subtle Role for CD2 in T Cell Antigen Recognition / P.A. Van der Merwe // J. Exp. Med. — 1999. — Vol. 190. — N 10. — P. 1371—1374.
3. Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex / M. K. Wild [et al.] // J. Exp. Med. — 1999. — Vol. 190. — P. 31—41.
4. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition / P. A. Van der Merwe. [et al.] // Semin. Immunol. — 2000. — Vol. 12. — P. 5—12.

5. TCR-mediated adhesion of T cell hybridomas to planar bilayers containing purified MHC class II/peptide complexes and receptor shedding during detachment / M. L. Dustin [et al.] // *J. Immunol.* — 1996. — Vol. 157. — P. 2014—2021.
6. Ярилин А. А. Симбиотические взаимоотношения клеток иммунной системы / А. А. Ярилин // *Иммунология.* — 2001. — № 4. — С. 16—20.
7. Боценовский В. А., Барышников А. Ю. Молекулы клеточной адгезии // *Успехи современной биологии.* — 1994. — Т. 114, № 6. — С. 741—752.
8. Артюхов В. Г. Изменения локализации CR1-рецепторов на поверхности нейтрофильных лейкоцитов, индуцированные УФ-светом / В. Г. Артюхов, В. В. Гусинская, Е. А. Михилева // *Иммунология.* — 2006. — № 1. — С. 6—9.
9. Колтаков И. А. Экспрессия CD 3 маркеров на поверхности мембран Т-лимфоцитов в условиях их УФ-облучения / И. А. Колтаков, В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева // XX съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова : М., 2007 г. : тез. докл. — М., 2007. — С.273.
10. Антитела. Методы / под ред. Д. Кэтти: В 2-х кн. — кн. 2 — М.: Мир, 1991. — 380 с.
11. Зарецкая Ю. М. Клиническая иммуногенетика / Ю. М. Зарецкая. — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
12. Артюхов В. Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2000. — 296 с.
13. Janssen-Heininger Y. M. W. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kb / Y. M. W. Janssen-Heininger, M.E. Poynter, P.A. Baeuerle // *Free Radic. Biol. Med.* — 2000. — Vol. 28. — P. 1317—1327.
14. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // *Вопросы медицинской химии.* — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561—581.
15. Schulze-Osthoff K. Redox signaling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in lymphocytes / K. Schulze-Osthoff, M. Los, P. Baeuerle // *Biochem. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 50. — P. 735—741.
16. NF- κ B : an important transcription factor in photobiology / S. Legrand — Poels [et al.] // *J. Photochem. Photobiol.* — 1998. — Vol. 45. — P. 1—8.

Дубова Светлана Михайловна — аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: dubowa.84@mail.ru

Путинцева Ольга Васильевна — профессор кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: bf188@bio.vsu.ru

Артюхов Валерий Григорьевич — заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: avg@main.vsu.ru

Dubova Svetlana M. — the postgraduate student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: dubowa.84@mail.ru

Putintseva Olga V. — the professor of department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: bf188@bio.vsu.ru

Artyukhov Valery G. — the professor, manager department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: avg@main.vsu.ru