

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD8 РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

О. И. Бахметьева, О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 27.05.2011 г.

Аннотация. С помощью метода непрямого твердофазного иммуноферментного анализа было исследовано влияние оксида углерода (II) в различном интервале времени на уровень экспрессии CD8 рецепторов на мембранах лимфоцитов крови человека. Установлено, что после инкубирования лимфоцитов в атмосфере CO в течение 5÷90 минут не наблюдалось изменений количества CD8 молекул на поверхности мембран иммунокомпетентных клеток. Однако после 24 ч. инкубации CO-модифицированных образцов выявлена различная чувствительность CD8 молекул к воздействию монооксида углерода. Так, у лиц с исходно более высоким содержанием CD8 маркеров в нативных образцах отмечается снижение, а у лиц с исходно низким уровнем — повышение анализируемого показателя.

Ключевые слова: экспрессия, лимфоциты, иммуноферментный анализ, CD8 рецепторы.

Abstract. By method of indirect firm-phase immunoenzyme analysis influence carbon oxide (II) in various interval of time for level of expression CD8 receptors on lymphocytes membranes of human blood has been studied. It is established, that after incubation of lymphocytes in atmosphere CO during 5÷90 minutes it was not observed changes of quantity CD8 molecules on a surface of immunocompetent cells membranes. However, after 24 hours incubation CO-samples various sensitivity CD8 molecules to influence of carbon monoxide is revealed. So, at persons with initially higher maintenance of CD8 markers in native samples it is observed decreasing, and at persons with initially low level it is marked increasing of an analyzed indicator.

Keywords: expression, lymphocytes, immunoenzyme analysis, CD8 receptors.

Лимфоциты — один из видов клеток защитной системы организма, которые обеспечивают клеточные и гуморальные формы иммунного ответа. В механизме реализации клеточного иммунитета принимают активное участие цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), которые называются CD8+ Т-клетками. Они способны осуществлять прямой лизис клеток-мишеней, выделяя литические гранулы и цитокины. Кроме того, реализация цитотоксической (апоптогенной) активности ЦТЛ осуществляется путем экзоцитоза цитолитических ферментов — перфоринов и гранзимов [5]. Посредством перфоринов в мембране клетки-мишени образуются поры, через которые поступают гранзимы, напрямую активирующие каспазы-8, -3 и запускающие таким образом каскад внутриклеточных разрушений [6].

Структура CD8 рецептора достаточно хорошо изучена, он относится к суперсемейству иммуноглобулинов, представляет собой гетеродимер гликопротеина, состоящий из двух полипептидных цепей (α и β). Обе цепи димера имеют по одному

Ig-подобному внеклеточному домену V-типа, который соединен с трансмембранной частью молекулы с помощью длинного спейсерного участка. Последний содержит в α -цепи 50, а в β -цепи — 30 аминокислотных остатков [4].

CD8 антиген экспрессируется у человека на Т-лимфоцитах (почти исключительно на супрессорах/киллерах), а также на части НК [2]. Его функция как корецептора реализуется в процессе антигенного распознавания. После взаимодействия Т-клеточного рецептора с антигенным лигандом происходит контакт альфа- и бета-доменов CD8 с альфа3-доменом молекулы I класса МНС. Образовавшийся молекулярный комплекс является условием передачи через корецептор CD8 сигнала внутрь клетки.

Большой вред окружающей среде наносят различные источники газообразных выбросов (промышленные предприятия, транспорт, пожары), благодаря которым в атмосферу попадает значительное количество вредных веществ, к одним из которых относится угарный газ (оксид углерода (II), монооксид углерода, CO). Чрезмерное воздействие CO может приводить к изменению функцио-

нирования систем иммунитета, а, возможно, и к гибели иммунокомпетентных клеток. Необходимость коррекции поражений иммуноцитов крови, как в случае хронических интоксикаций, так и при острых отравлениях, является актуальной проблемой в лечении подобного рода нарушений иммунной системы.

В связи с вышеизложенным нами было исследовано влияние оксида углерода (II) на уровень экспрессии CD8 рецепторов на поверхности лимфоцитов крови человека, суспендированных в растворе Хэнкса, после их пребывания в течение разного интервала времени в атмосфере CO до и после их суточного термостатирования.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проводили на суспензии лимфоцитов крови 8 доноров. Выделение лимфоцитов из крови осуществляли седиментацией (300 г, 15 минут) в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) по методу А. Воуин [1]. Рабочая концентрация иммуноцитов составила $4 \cdot 10^4$ клеток/мл. Оксид углерода (II) получали лабораторным способом в результате разложения муравьиной кислоты при действии концентрированной серной кислоты [3]. Время инкубации иммунокомпетентных клеток в атмосфере CO составило от 5 до 90 минут. Нативные и CO-модифицированные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в течение 24 ч. в термостате при температуре 37 °C (термостат ТС-80М, 5% CO₂ и 95% относительной влажности). Уровень экспрессии CD8 рецепторов на поверхности мембран лимфоцитов определяли методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. В работе были использованы моноклональные антитела серии LT8 против CD8 маркеров человека и конъюгат козьих антител против IgG мыши с пероксидазой хрена («Сорбент», Москва). В качестве субстрата для пероксидазы использовали раствор орто-фенилендиаминдигидрохлорида в цитратно-ацетатном буфере (pH 5,0) с добавлением 0,2% раствора пероксида водорода. Результаты учитывали спектрофотометрически ($\lambda = 492 \text{ нм}$) на вертикальном фотометре «Униплан» (Пикон, Москва) и выражали в единицах оптической плотности.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладной программы Microsoft Excel 2007.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По уровню экспрессии и характеру ответа CD8 антигенов на модификацию лимфоцитов оксидом

углерода (II) доноры были разделены на две группы.

Уровень экспрессии CD8 молекул на поверхности мембран интактных клеток I группы доноров составил в среднем $0,313 \pm 0,041$ опт. ед. Инкубирование суспензии клеток в атмосфере CO 5÷90 минут не приводило к статистически значимым изменениям ИФА-показателя по сравнению с контрольным образцом, то есть количество CD8 молекул на мембранах клеток, модифицированных CO в течение исследуемого диапазона времени не изменилось.

После суточного нахождения нативных объектов в термостате мы зарегистрировали статистически достоверное снижение уровня экспрессии CD8 молекул до значения $0,183 \pm 0,029$ опт.ед. (на 41,5% по сравнению с интактными клетками). У лимфоцитов, CO-модифицированных в течение 5÷90 мин, и подвергшихся суточному инкубированию в термостате, также наблюдалось уменьшение количества CD8 маркеров на поверхности мембран лимфоцитов на 16—42% (рис. 1).

Во II группу вошли доноры, у которых уровень экспрессии CD8 молекул нативных лимфоцитов был изначально меньше, чем у лиц I группы и в среднем составлял $0,239 \pm 0,010$ опт.ед. После инкубирования лимфоцитов в атмосфере оксида углерода (II) в течение 5÷90 мин, также как и у I группы доноров, не происходило статистически значимых изменений количества CD8 антигенов на поверхности мембран лимфоцитов относительно контрольных образцов. Суточная инкубация интактных клеток этой группы доноров в термостате при 37 °C приводила к статистически достоверному увеличению уровня экспрессии CD8 маркеров лимфоцитарных клеток ($0,292 \pm 0,040$ опт. ед.). 24-часовое нахождение исследуемых CO-модифицированных клеток в термостате индуцировало рост экспрессии исследуемых молекул на 28—64% (рис. 2).

В ходе проведенных нами исследований было показано иммуномодулирующее действие оксида углерода (II) после 24 ч. нахождения CO-модифицированных лимфоцитов в термостате на экспрессию CD8 молекул на поверхности мембран лимфоцитов. Это выражалось в зависимости между исходным уровнем CD8 маркеров и ответной реакцией его молекул на воздействие монооксида углерода: тестируемый показатель снижался после суточного термостатирования модифицированных лимфоцитов у доноров с исходно высокими (I группа) и возрастал у лиц с исходно низкими (II группа) его значениями.

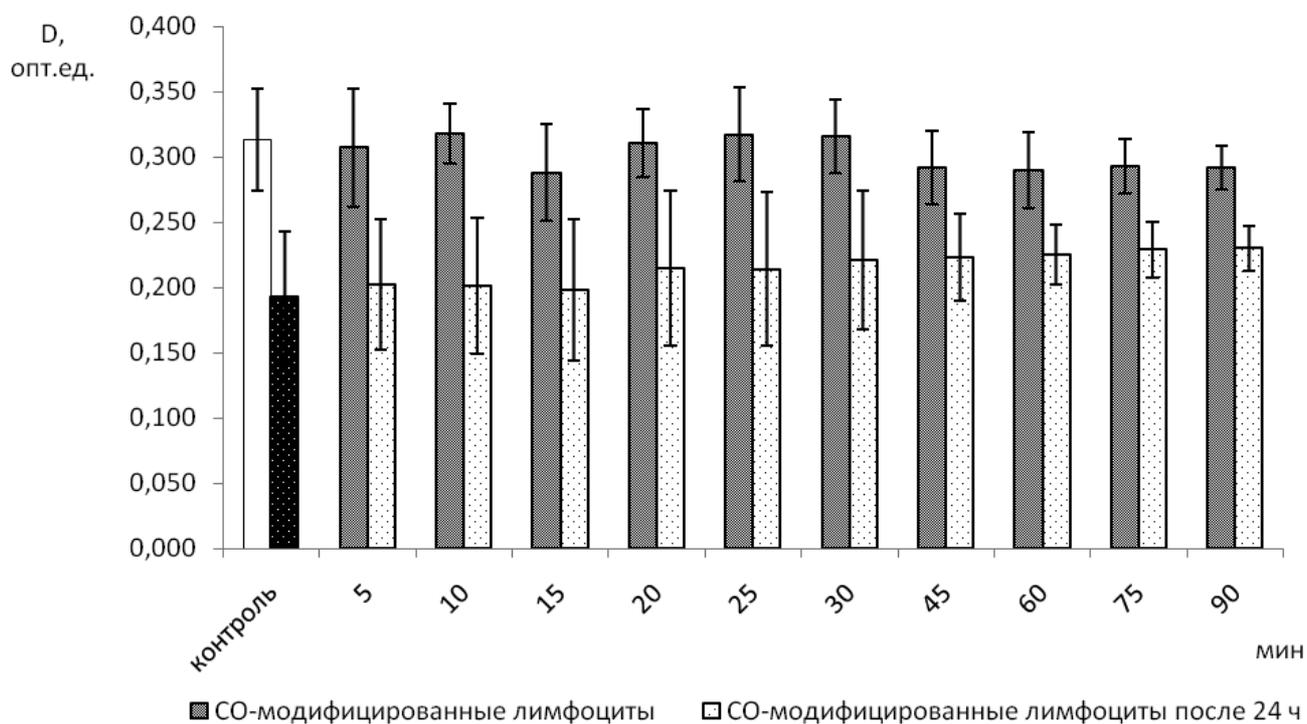


Рис. 1. Уровень экспрессии CD8 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови человека сразу после инкубации и через 24 ч. (I группа)

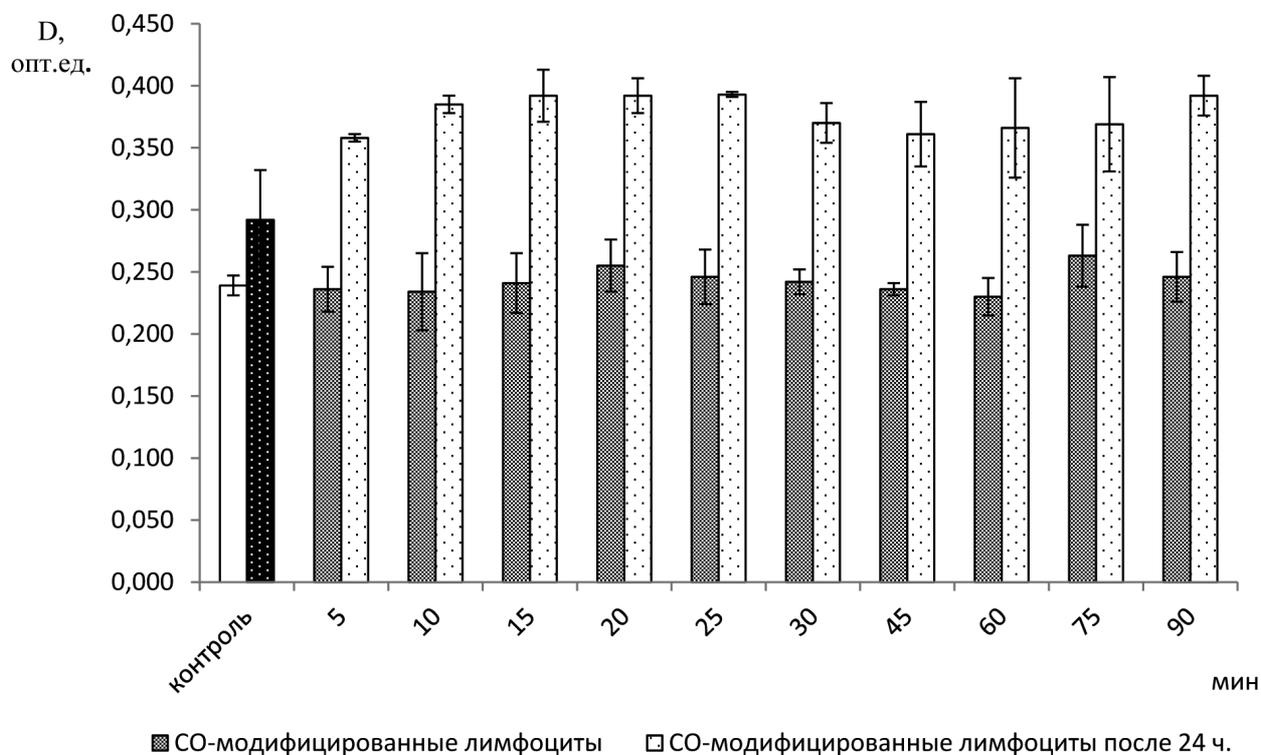


Рис. 2. Уровень экспрессии CD8 рецепторов СО-модифицированных лимфоцитов крови человека сразу после инкубации и через 24 ч. (II группа)

Разнонаправленная ответная реакция иммунных клеток крови человека на воздействие оксида углерода (II), вероятно, обусловлена различной чувствительностью CD8 рецепторов разных групп обследованных лиц.

Таким образом, нами установлено, что оксид углерода (II) существенно модулирует состояние CD8 антигенов мембран лимфоцитов, вызывая неодинаковые изменения экспрессии изучаемой молекулы. Выявленные закономерности изменения маркерной молекулы цитотоксических лимфоцитов в присутствии CO необходимо учитывать при лечении острых отравлений оксидом углерода (II), а так же при анализе хронических CO-интоксикаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антитела. Методы / Под ред. Д. Кэтти: В 2-х кн. — М.: Мир. — кн. 2. — 1991. — 380 с.
2. *Галактионов В. Г.* Иммунология // В. Г. Галактионов. — М.: Изд-во МГУ, 1998. — 480 с.
3. *Грандберг И. И.* Органическая химия / И. И. Грандберг. — М.: Дрофа, 2002. — 672 с.
4. *Путинцева О. В.* Иммунология. Практикум // О. В. Путинцева, В. Г. Артюхов, И. А. Колтаков — Воронеж: Изд-во Воронеж.ун-та, 2008. — 46 с.
5. *Хаитов Р. М.* Иммунология // Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. — М.: Медицина, 2000. — 429 с.
6. *Ярилин А. А.* Основы иммунологии // А. А. Ярилин. — М.: Медицина, 1999. — 606 с.

Бахметьева Ольга Ивановна — аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, e-mail: asp-bpf@rambler.ru

Путинцева Ольга Васильевна — профессор кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

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

Bahmeteva Olga I. — the postgraduate student of biophysics and biotechnology department, The Voronezh State University, e-mail: asp-bpf@rambler.ru

Putintseva Olga V. — the professor of biophysics and biotechnology department, The Voronezh State University

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