

# УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ НЕКОТОРЫХ АДГЕЗИВНЫХ МОЛЕКУЛ ИНТАКТНЫМИ И УФ-ОБЛУЧЕННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

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

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

**Резюме.** С помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа показана различная УФ-чувствительность адгезивных молекул (CD2, CD11a и CD29) мембран Т-лимфоцитов. Установлена фоторезистентность CD2- и CD11a-антигенов по отношению к действию УФ-света в дозах 151-906 Дж/м<sup>2</sup>; большая доза УФ-излучения (1359 Дж/м<sup>2</sup>) оказывает депрессивное действие на уровень их экспрессии. Выявлено иммуномодулирующее влияние УФ-света на экспрессию трансмембранного белка CD29 Т-клетками. Проанализирована зависимость между аминокислотным составом и фоточувствительностью CD2-, CD11a- и CD29-антигенов Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** адгезивные молекулы, экспрессия, фоточувствительность, ИФА.

*Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Dubova S.M.*

## EXPRESSION LEVELS OF SOME ADHESION MOLECULES IN THE INTACT AND UV-IRRADIATED T-LYMPHOCYTES FROM HUMAN BLOOD

**Abstract.** While employing an enzyme linked immunosorbent assay, it was shown that UV-sensitivity is different for various adhesion molecules (CD2, CD11a and CD29) at the membranes of T-lymphocytes. Relative photoresistance of CD2 and CD11a antigens to UV irradiation was established at the doses range of 151 to 906 J/m<sup>2</sup>, a large dose of UV-irradiation (1359 J/m<sup>2</sup>) exerted a suppressive effect upon their expression level. An immunomodulatory action of UV-radiation was revealed upon expression of CD29 transmembrane protein by T-cells. A dependence between amino acid structure and photosensitivity of CD2, CD11a and CD29 antigens of T lymphocytes is analyzed and discussed. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 1, pp 79-84)

## Введение

Необходимым условием для реализации иммунного ответа организма на введение чужеродного антигена является взаимодействие иммунокомпетентных клеток друг с другом при комплементарном реагировании адгезивных молекул на их поверхности. Начальные этапы «симбиотических» взаимоотношений клеток иммунной системы и конкретные адгезивные молекулы, принимающие в них участие, в настоящее время достаточно хорошо изучены [18, 19, 29].

### Адрес для переписки:

Артюхов Валерий Григорьевич,  
ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», кафедра биофизики и биотехнологии  
394006, г. Воронеж, Университетская площадь, 1.  
Тел.: (4732)20-85-86.  
Факс: (4732)20-83-08.  
E-mail: avg@main.vsu.ru

Процесс активации реагирующих клеток начинается с образования связи между CD2-рецепторами Т-лимфоцитов и их лигандами на антигенпредставляющих клетках (АПК) — CD58-молекулами [19, 24, 25, 28]. Данная пара маркеров обеспечивает слабое взаимодействие между клетками и их первоначальную взаимную ориентацию. Следующим этапом активационного процесса является реагирование LFA-1-рецепторов Т-лимфоцитов с ICAM-1-молекулами АПК, что способствует прекращению перемещения клеток относительно друг друга и инициирует формирование стабильных зон контакта между Т-клетками и АПК [23, 25-27]. Последнее служит основой иммунного распознавания Т-лимфоцитами чужеродного антигенного пептида [19, 21]. Данный процесс сопровождается изменением конформации маркеров LFA-1 и связь между клетками становится более сильной и продолжительной. В течение следующего

часа осуществляются события взаимной активации контактирующих клеток [21, 23]. Затем активированные Т-лимфоциты мигрируют в окружающие ткани при участии VLA (CD49/CD29) интегринов, экспрессирующихся на их мембранах и обеспечивающих взаимодействие клеток с экстрацеллюлярным матриксом [19, 20, 22].

В современной клинической практике широко применяется оптическое излучение различного спектрального диапазона, в частности УФ-свет. Для коррекции нарушений в работе иммунной системы больных с различной этиологией используется метод аутоотрансфузии УФ-облученной крови. При модификации крови УФ-излучением происходят структурно-функциональные изменения поверхности иммунокомпетентных клеток, что существенно влияет на уровень экспрессии ряда поверхностных антигенов и рецепторов [2, 4, 10, 13-16].

В связи с вышеизложенным определенный интерес представляет изучение влияния УФ-света на экспрессию некоторых адгезивных молекул (CD2, CD11a и CD29) мембранами Т-лимфоцитов крови человека, посредством которых осуществляются начальные этапы взаимодействия между клетками в процессе активации работы иммунной системы.

## Материалы и методы

Лимфоциты выделяли из дефибринированной крови 16 доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho = 1,077$  г/мл) [1]. Разделение смеси клеток на Т-и В-субпопуляции осуществляли по методу Р. Terasaki [9].

Полученную суспензию Т-лимфоцитов в объеме 2 мл облучали в термостатируемой (37 °С) 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<sup>2</sup> в минуту на расстоянии 0,23 м от объекта. Время экспозиции составляло 1, 3, 6 и 9 минут, что соответствовало дозам облучения 151, 453, 906 и 1359 Дж/м<sup>2</sup>.

Для определения уровня экспрессии изучаемых маркеров на поверхности мембран нативных и фотомодифицированных Т-лимфоцитов применяли метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа, который проводили на плоскодонных полистирольных планшетах («Медполимер», Москва). В работе использовали моноклональные антитела серии LT2, LT11a и LT29 к CD2-антигену, CD11a-субъединице LFA-1 и CD29-субъединице VLA-рецепторов человека, соответственно, 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  $\lambda = 492$  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.

## Результаты

Нами было установлено, что уровень экспрессии CD2- и CD11a-маркеров на поверхности мембран нативных Т-лимфоцитов крови доноров в среднем составил  $0,427 \pm 0,050$  отн. ед. и  $0,292 \pm 0,018$  отн. ед. соответственно (рис. 1). Воздействие УФ-излучения в диапазоне доз 151-906 Дж/м<sup>2</sup> на суспензию Т-клеток не приводило к статистически достоверным изменениям уровня экспрессии изучаемых антигенов по сравнению с нативными образцами. Облучение Т-лимфоцитов максимальной из используемых нами доз УФ-света (1359 Дж/м<sup>2</sup>) способствовало снижению ИФА-сигнала на 20,8% и на 18,2% соответственно относительно контроля.

По характеру ответа CD29-антигенов на модификацию Т-лимфоцитов 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  $0,188 \pm 0,014$  отн. ед. (рис. 2). Облучение суспензии иммунокомпетентных клеток УФ-светом в дозах 151, 453 и 906 Дж/м<sup>2</sup> способствовало усилению ИФА-сигнала на 25%, 21% и 29% соответственно по сравнению с необлученными лимфоцитами. Максимальная доза УФ-света (1359 Дж/м<sup>2</sup>) не вызвала статистически достоверных изменений уровня экспрессии CD29-молекул Т-лимфоцитами относительно контрольных образцов.

Во II группу вошли 6 доноров, уровень экспрессии CD29 молекул нативными Т-лимфоцитами которых был изначально выше, чем у лиц первой группы, и в среднем составил  $0,246 \pm 0,023$  отн. ед. (рис. 2). Облучение образцов Т-клеток УФ-светом во всем используемом диапазоне доз (151-1359 Дж/м<sup>2</sup>) индуцировало падение экспрессии исследуемых молекул на 26%, 18%, 20% и 39% соответственно по сравнению с контролем.

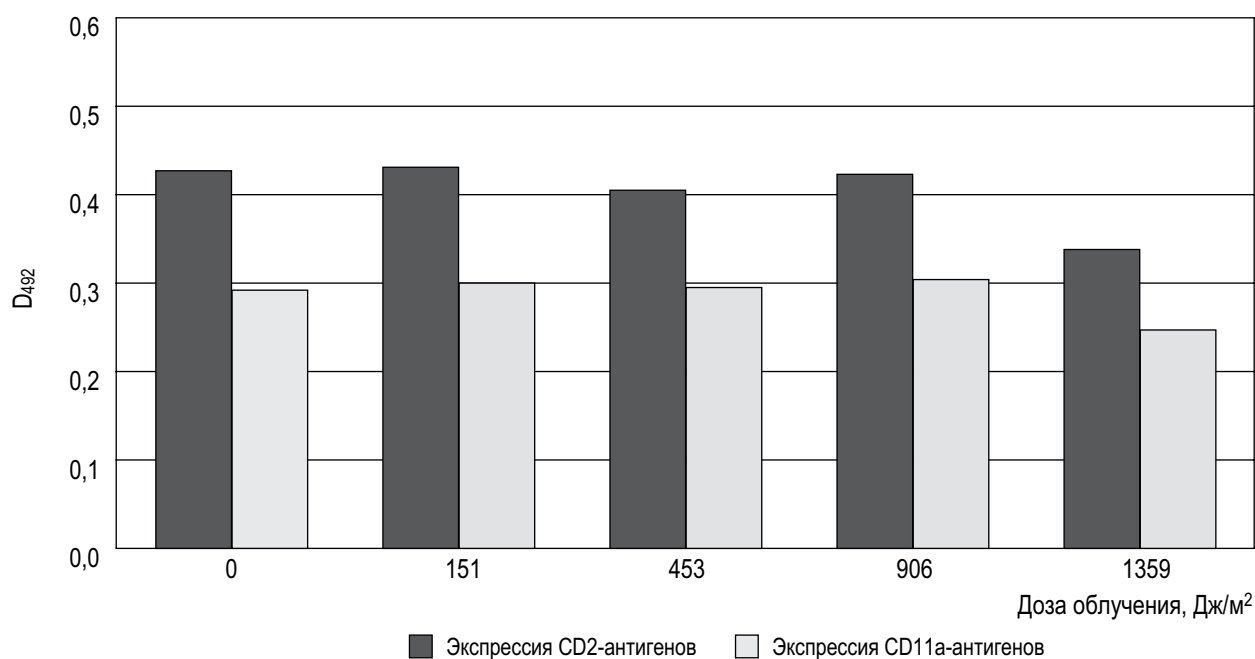


Рисунок 1. Изменение уровня экспрессии CD2 и CD11a молекул мембранами Т-лимфоцитов под действием УФ-излучения

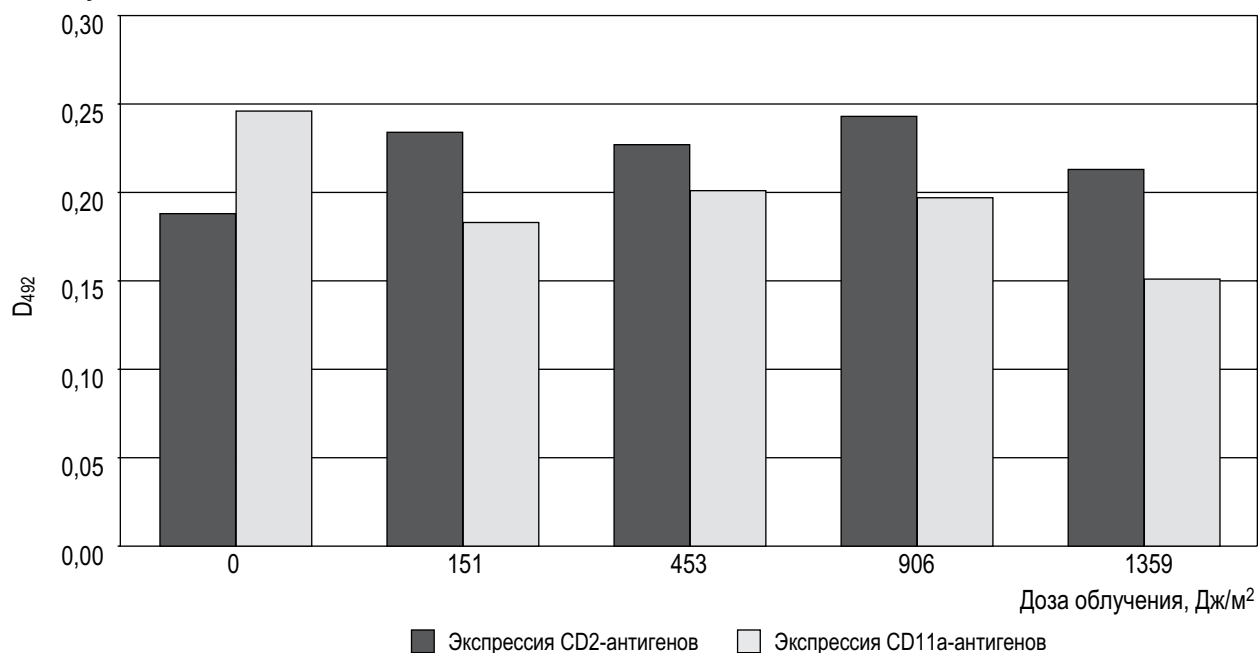


Рисунок 2. Влияние УФ-света на уровень экспрессии CD29-молекул мембранами Т-лимфоцитов

## Обсуждение

CD2-рецептор представляет собой трансмембранный гликопротеид, состоящий из 324 аминокислотных остатков (АО). Его внеклеточная область содержит 2 дисульфидных мостика.

Маркер LFA-1 образован двумя субъединицами — CD11a и CD18, — из которых более специфичной является первая. Она включает в себя 1145 АО и образует 7 дисульфидных связей.

VLA (CD49/CD29) рецепторы, так же как и предыдущий маркер, состоят из 2 субъединиц.

Общей для данных рецепторов является трансмембранная молекула CD29, полипептидная (ПП) цепь которой насчитывает 778 АО и имеет во внеклеточном регионе 28 дисульфидных связей.

Основными хромофорами УФ-света в белковых молекулах являются ароматические и серосодержащие аминокислотные остатки — фенилаланин, тирозин, триптофан, цистеин и метионин [7, 8, 11, 17]. В связи с этим нами была проанализирована первичная структура CD2-, CD29- и CD11a-антигенов для выяснения зависимости между аминокислотным

составом их ПП цепей и степени ответной реакции изучаемых антигенов на воздействие широкого диапазона доз УФ-света (240-390 нм).

В таблице 1 представлено содержание потенциальных фотохромофоров в ПП цепях (взяты из Protein Data Base) исследуемых антигенов. Анализ данных этой таблицы показывает, что количество ароматических и серосодержащих АО возрастает в ряду: CD2-рецептор (26) → CD29-антиген (119) → CD11a-молекула (136). Однако процентное содержание акцепторов УФ-света относительно общего числа АО ПП цепи составляет 8, 15 и 12%, соответственно, т.е. является максимальным в молекуле CD29.

Таким образом, молекулы CD29-антигена имеют наибольшее число дисульфидных связей и самое высокое процентное содержание хромофоров УФ-излучения по сравнению с другими исследованными нами молекулами. Возможно, именно с этим связана высокая чувствительность CD29-маркеров и фоторезистентность CD2- и CD11a-молекул по отношению к действию УФ-света в дозах 151-906 Дж/м<sup>2</sup>. Проведенный нами сравнительный анализ влияния различных доз УФ-света на уровень экспрессии исследуемых антигенов, представленный в таблице 2, также подтверждает повышенную фотоллабильность молекул CD29-антигена Т-лимфоцитов.

Кроме того, нами была выявлена зависимость между исходным уровнем экспрессии CD29-маркера и ответной реакцией его молекул на воздействие УФ-излучения: тестируемый показатель возрастал после УФ-облучения Т-лимфоцитов у доноров с исходно низкими и снижался у лиц с исходно высокими его значениями. Следовательно, облучение Т-лимфоцитов УФ-светом в дозах 151-1359 Дж/м<sup>2</sup> оказывало иммуномодулирующее действие на экспрессию CD29-молекул на поверхности мембран исследуемых клеток.

Выявленное нами на поверхности мембран УФ-облученных Т-клеток понижение уровня экспрессии CD2- и CD11a-маркеров (1359 Дж/м<sup>2</sup>) и CD29-молекул доноров II группы (151-1359 Дж/м<sup>2</sup>) может быть обусловлено процессами десорбции иммунных маркеров [5, 12], а также изменением конформации фотомодифицированных молекул, что, вероятно, затрудняет их взаимодействие со специфическими антителами. Повышение экспрессии CD29-молекул I группы доноров после УФ-облучения иммунокомпетентных клеток может быть связано с экспонированием на поверхность мембраны ранее недоступных предсуществующих маркеров и/или синтезом de novo их молекул. Разнонаправленные изменения (повышение или снижение экспрессии) состояния поверхностных антигенов могут быть обусловлены процессами пероксид-

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЯХ CD2 МОЛЕКУЛЫ, CD11-СУБЪЕДИНИЦЕ LFA-1-РЕЦЕПТОРА И CD29-СУБЪЕДИНИЦЕ VLA-РЕЦЕПТОРОВ**

Рецепторная молекула	CD2	CD11a	CD29
Общее кол-во а.о. в ПП, шт.	324	1145	778
Кол-во тирозинов (Tyr), шт.	6	31	23
Кол-во метионинов (Met), шт.	3	22	11
Кол-во цистеинов (Cys), шт.	5	21	55
Кол-во триптофанов (Trp), шт.	4	9	3
Кол-во фенилаланинов (Phe), шт.	8	53	27
Общее кол-во ароматических и серосодержащих АО в ПП цепи, шт.	26	136	119
Кол-во ароматических и серосодержащих АО в ПП цепи, %	8	12	15
Кол-во дисульфидных связей (-S-S-) в молекуле, шт.	2	7	28

**ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ НЕКОТОРЫХ МАРКЕРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ УФ-СВЕТА (240-390 НМ) В % ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТРОЛЮ**

Анализируемый показатель	Доза УФ-света, Дж/м <sup>2</sup>			
	151	453	906	1359
CD2	–	–	–	20,8 ↓
CD11a	–	–	–	18,2 ↓
CD29 (1 группа доноров)	25 ↑	21 ↑	29 ↑	–
CD29 (2 группа доноров)	26 ↓	18 ↓	20 ↓	39 ↓

**Примечание.** ↑ – увеличение уровня экспрессии молекул на поверхности мембран Т-лимфоцитов; ↓ – снижение уровня экспрессии молекул на поверхности мембран Т-лимфоцитов.

ного фотоокисления липидов, индуцированными в мембранах клеток УФ-излучением [3, 7, 17].

Снижение уровня экспрессии исследуемых маркеров (CD2, CD11a и CD29) Т-лимфоцитами в результате протекания вышеописанных процессов может привести к угнетению реакций формирования ориентировочных и стабильных зон контакта между клетками, связывания клеток с внеклеточным матриксом, а также к изменению процесса миграции лимфоцитов в окружающие ткани и, как следствие, к торможению развития иммунного ответа. Увеличение экспрессии CD29-антигенов фотомодифицированными Т-клетками некоторых доноров, вероятно, будет сопровождаться противоположными эффектами: более быстрым переходом активированных Т-лимфоцитов через эндотелиальный барьер и более прочным их взаимодействием с экстрацеллюлярным матриксом.

Итак, анализ полученных результатов показал, что УФ-свет (240-390 нм) в дозе 1359 Дж/м<sup>2</sup> оказывает иммунодепрессивное действие на уровень экспрессии CD2- и CD11a-молекул, а в дозах 151-1359 Дж/м<sup>2</sup> — иммуномодулирующее влияние на экспрессию CD29-антигенов, следствием чего может быть изменение способности иммунных клеток взаимодействовать друг с другом и с клетками организма в ходе развития ответной реакции иммунной системы на экзо- и эндогенные стимулы.

## Список литературы

1. Антитела. Методы. Кн. 2: Пер. с англ. / Под ред. Д. Кэтти. — М.: Мир, 1991. — 384 с.
2. Артюхов В.Г., Гусинская В.В., Михилева Е.А. Изменения локализации CR1-рецепторов на поверхности нейтрофильных лейкоцитов, индуцированные УФ-светом // Иммунология. — 2006. — Т. 27, № 1. — С. 6-9.
3. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2000. — 296 с.
4. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Дмитриев Е.В. Влияние ультрафиолетового излучения на структурно-функциональное состояние Т- и В-лимфоцитов крови человека // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2003. — № 1. — С. 82-86.
5. Арцишевская Р.А., Миронова А.П., Самойлова К.А. Десорбция гликопротеинов с поверхности лимфоцитов периферической крови человека после облучения коротковолновыми УФ-лучами // Цитология. — 1984. — Т. 26, № 2. — С. 209-214.
6. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. — 1994. — Т. 114, № 6. — С. 741-752.
7. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. — М.: Дрофа, 2006. — 286 с.
8. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Лекции по медицинской биофизике. — М.: Изд-во Моск. ун-та: Академкнига, 2007. — 432 с.
9. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
10. Колтаков И.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В. Экспрессия CD3-маркеров на поверхности мембран Т-лимфоцитов в условиях УФ-облучения // Тезисы докл. XX съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. — М., 4-8 июня 2007. — М.: Издательский дом «Русский врач», 2007. — С. 273.
11. Конев С.В., Волотовский И.Д. Фотобиология. — Минск.: Изд-во БГУ, 1979. — 383 с.
12. Крыленков В.А., Брудная М.С., Комиссарчик Я.Ю. Электронно-микроскопическое исследование поверхности необлученных и УФ-облученных лимфоцитов крови человека // Цитология. — 1983. — Т. 25, № 4. — С. 476-479.
13. Оболенская К.Д., Гамова И.М., Самойлова К.А. Изменение экспрессии мембранных рецепторов иммунокомпетентных клеток крови, индуцированные различными методами фотомодификации крови // Цитология. — 1991. — Т. 33, № 9. — С. 63.
14. Оболенская К.Д., Гамова И.М., Самойлова К.А., Глазанова Т.В., Бубнова Л.Н. Увеличение экспрессии мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток после УФ-облучения крови в терапевтической дозе и ретрансфузии УФ-облученной крови // Цитология. — 1991. — Т. 33, № 9. — С. 92.
15. Путинцева О.В., Артюхов В.Г., Коломыцева М.П. О регуляции уровня экспрессии антигенов локуса В ГКГС мембран лимфоцитов различными дозами УФ-света // Проблемы теоретической биофизики: Тезисы докл. Международной школы. — М., 15-20 июня 1998. — М., 1998. — С. 163.
16. Путинцева О.В., Артюхов В.Г., Дмитриев Е.В. Влияние УФ-облучения В-лимфоцитов крови человека на экспрессию в них некоторых антигенов и рецепторов // Цитология. — 2001. — Т. 43, № 4. — С. 364-365.
17. Рошупкин Д.И., Артюхов В.Г. Основы фотобиофизики. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1997. — 116 с.
18. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. — СПб.: Наука, 2001. — Т. 1, 2. — 390 с.

19. Ярилин А.А. Симбиотические взаимоотношения клеток иммунной системы // Иммунология. — 2001. — № 4. — С. 16-20.
20. Arroyo A.G., Sanchez-Mateos P., Campanero M.R., Martin-Padura I., Dejana E., Sanchez-Madrid F. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit // J. Cell Biol. — 1992. — Vol. 117, N 3. — P. 659-670.
21. Damle N.K., Klussman K., Aruffo A. Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T-cells // J. Immunol. — 1992. — Vol. 148, N 3. — P. 665-671.
22. Faveeuw C., Di Mauro M.E., Price A.A., Ager A. Roles of alpha(4) integrins/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 in the binding and transendothelial migration of T-lymphocytes and T-lymphoblasts across high endothelial venules // Int. Immunol. — 2000. — Vol. 12, N 3. — P. 241-251.
23. Gaillard T., Martin E., San Sebastian E., Cossío F.P., Lopez X., Dejaegere A., Stote R.H. Comparative normal mode analysis of LFA-1 integrin I-domains // J. Mol. Biol. — 2007. — Vol. 374, N 1. — P. 231-249.
24. Huet S., Boumsell L., Raynal B., Degos L., Dausset J., Bernard A. Role in T-cell activation for HLA class I molecules from accessory cells: further distinction between activation signals delivered to T-cells via CD2 and CD3 molecules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84, N 20. — P. 7222-7226.
25. Makgoba M.W., Sanders M.E., Shaw S. The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition // Immunol. Today. — 1989. — Vol. 10, N 12. — P. 417-422.
26. Nurmi S.M., Autero M., Raunio A.K., Gahmberg C.G., Fagerholm S.C. Phosphorylation of the LFA-1 integrin beta2-chain on Thr-758 leads to adhesion, Rac-1/Cdc42 activation, and stimulation of CD69 expression in human T-cells // J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 282, N 2. — P. 968-975.
27. Smith A., Stanley P., Jones K., Svensson L., McDowall A., Hogg N. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration // Immunol. Rev. — 2007. — Vol. 218. — P. 135-146.
28. Wang J., Smolyar A., Tan K., Liu J., Kim M., Sun Z.J., Wagner G., Reinherz E.L. Structure of a Heterophilic Adhesion Complex between the Human CD2 and CD58 (LFA-3) Counterreceptors // Cell. — 1999. — Vol. 97. — P. 791-803.
29. Yong K., Khwaja A. Leucocyte cellular adhesion molecules // Blood Rev. — 1990. — Vol. 4, N 4. — P. 211-225.

поступила в редакцию 25.08.2008

принята к печати 04.09.2008