

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ РЯДА ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ УФ- ОБЛУЧЕНИЯ ИХ СУСПЕНЗИЙ

Артюхов В.Г.¹, Путинцева О.В.¹, Дубова С.М.¹,
Брагина В.А.²

¹ ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Россия

² ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж, Россия

Резюме. С помощью метода лазерной проточной цитофлуориметрии изучено влияние УФ-излучения (240-390 нм) в дозах 151÷1359 Дж/м² на уровень экспрессии ряда поверхностных молекул (CD2-, CD11a-, CD3-, CD4-, CD8-маркеров) Т-лимфоцитов крови человека. Установлено, что УФ-излучение в диапазоне доз 151-906 Дж/м² способствует увеличению уровня экспрессии CD3-, CD4-, CD8-маркеров Т-лимфоцитов крови человека. Показано, что уровень экспрессии CD2- и CD11a-молекул межклеточной адгезии Т-лимфоцитами крови человека после воздействия УФ-света в дозах 151-906 Дж/м² сохранялся на таковом для интактных клеток. Выявлено, что УФ-излучение в дозе 1359 Дж/м² индуцирует уменьшение уровня экспрессии CD2-, CD11a- и CD3-маркеров и увеличение ко-рецепторных CD4- и CD8-молекул Т-лимфоцитами.

Ключевые слова: экспрессия, молекулы межклеточной адгезии, CD3-, CD4-, CD8-маркеры, УФ-свет

Адрес для переписки:

Артюхов Валерий Григорьевич
д.б.н., профессор, кафедра биофизики
и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Воронежский
государственный университет»
394006, Россия, г. Воронеж, Университетская
площадь, 1.
Тел.: 8 (4732) 20-85-86.
Факс: 8 (4732) 20-83-08.
E-mail: avg@main.vsu.ru

Авторы:

Артюхов В.Г. — д.б.н., профессор, кафедра
биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВПО
«Воронежский государственный университет»,
г. Воронеж
Путинцева О.В. — д.б.н., профессор, кафедра
биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВПО
«Воронежский государственный университет»,
г. Воронеж
Дубова С.М. — к.б.н., кафедра биофизики
и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Воронежский
государственный университет», г. Воронеж
Брагина В.А. — к.б.н., кафедра патологической
физиологии ГБОУ ВПО «Воронежская
государственная медицинская академия им.
Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж

Поступила 08.02.2013

Отправлена на доработку 15.02.2013

Принята к печати 05.03.2013

CHANGING EXPRESSION OF SOME MOLECULES ON THE SURFACE OF HUMAN BLOOD T-LYMPHOCYTES UPON UV-IRRADIATION OF CELL SUSPENSIONS

Artuykhov V.G.^a, Putintseva O.V.^a, Dubova S.M.^a,
Bragina V.A.^b

^a Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

^b Voronezh State Medical Academy of N.N. Burdenko of Russian Federation Health Ministry, Voronezh, Russian Federation

Abstract. We have studied effects of UV irradiation (240-390 nm) at a dose range of 151 to 1359 J/m² upon expression levels of different surface markers (CD2, CD11a, CD3, CD4, CD8) of human blood T lymphocytes by means of laser flow cytometry. It is revealed that UV-irradiation at the doses of 151 to 906 J/m² caused increased expression of CD3, CD4, CD8 membrane markers of the T-lymphocytes. Meanwhile, it was shown that expression levels of CD2 and CD11a adhesion molecules on T-lymphocytes after exposure to UV-irradiation (151 to 906 J/m²) remained similar to those for intact cells. UV-irradiation at a dose of 1359 J/m² was shown to reduce expression of CD2, CD11a and CD3 markers, along with increased expression level of CD4 and CD8 co-receptor molecules at the T-lymphocytes. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 4, pp 361-368)

Keywords: expression, adhesion molecules, CD3, CD4, CD8 markers, UV-light

Address for correspondence:

Artuykhov Valery G.
PhD, MD, Professor, Department of Biophysics and
Biotechnology, Voronezh State University
394006, Russian Federation, Voronezh, University sq., 1.
Phone: 7 (4732) 20-85-86.
Fax: 7 (4732) 20-83-08.
E-mail: avg@main.vsu.ru

Received 08.02.2013
Revision received 15.02.2013
Accepted 05.03.2013

Authors:

Artuykhov V.G., PhD, MD (Biology), Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh
State University, Voronezh
Putintseva O.V., PhD, MD (Biology), Professor,
Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh
State University, Voronezh
Dubova S.M., PhD (Biology), Department of
Biophysics and Biotechnology, Voronezh State
University, Voronezh
Bragina V.A., PhD (Biology), Department of
Pathological Physiology, Voronezh N.N. Burdenko
State Medical Academy, Voronezh

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, реагирующих иммунокомпетентных клеток [1, 8].

На начальных этапах активационного процесса происходит взаимная ориентация контактирующих клеток за счет взаимодействий CD2-рецепторов Т-лимфоцитов и CD58-маркеров антигенпрезентирующей клетки (АПК). Эти связи в дальнейшем позволяют Т-лимфоцитам реагировать на более низкие концентрации антигенов [8, 9]. Ведущую роль в прекращении перемещения клеток и, соответственно, образовании более прочного контакта играет формирование связи между β_2 -интегрином LFA-1 (CD11a/CD18) лимфоцитов и молекулой ICAM-1 АПК [8, 9]. Далее в течение следующего часа осуществляются события взаимной активации контактирующих клеток, сопровождаемые распознаванием TCR Т-клеток МНС-пептидного комплекса АПК [8, 10]. Данный процесс протекает при непосредственном участии CD3-комплекса, основными функциями которого являются обеспечение проведения активационного сигнала от TCR внутрь клетки и регуляция экспрессии TCR на поверхности мембран лимфоцитов [7, 10]. Эффективность такого распознавания обеспечивается корцепторными молекулами CD4 и CD8, обладающими сродством к молекулам МНС II/I класса и экспрессируемые Т-хелперами и цитотоксическими Т-лимфоцитами соответственно [11, 12, 14].

Известно, что отсутствие или незначительный уровень экспрессии функционально значимых молекул на поверхности иммуноцитов при различных патологиях ведут к ослаблению процессов передачи сигнала внутрь клетки и к снижению интенсивности иммунного ответа на попадание чужеродного антигена.

В клинической практике для коррекции нарушений в работе иммунной системы больных используется метод АУФОК-терапии (аутогенной трансфузии УФ-облученной крови). При проведении этого метода были установлены такие лечебные эффекты, как бактерицидный, противовоспалительный, иммунокорректирующий, комплексный иммуностимулирующий и др. [3, 5, 6].

Однако механизмы модулирующего действия УФ-излучения, связанные с изменением структурно-функционального состояния лимфоцитарных клеток человека, требуют дальнейшего изучения, что позволит разработать методы направленной иммунокоррекции различных патоло-

гических состояний организма при проведении АУФОК-терапии.

В связи с вышесказанным с помощью метода лазерной проточной цитофлуориметрии было исследовано влияние УФ-света (240–390 нм) в диапазоне доз 151–1359 Дж/м² на изменение уровня экспрессии ряда поверхностных молекул (CD2-, CD11a-, CD3-, CD4-, CD8-маркеров) Т-лимфоцитов крови человека.

Материалы и методы

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$).

Облучение суспензий клеток проводили сверху светом ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм в термостатируемой (37 °С) стеклянной кювете при постоянном перемешивании. Интенсивность облучения составляла 151 Дж/м² в минуту на расстоянии 0,23 м от оси лампы до объекта. Время экспозиции составило 1, 3, 6 и 9 минут, что соответствовало дозам облучения 151, 453, 906 и 1359 Дж/м².

Образцы лимфоцитов инкубировали в среде RPMI 1640, содержащей 1% раствор L-глутамин, 5×10^{-5} моль/л β -меркаптоэтанола («Sigma», США), NEPER («Serva», Германия), 10% эмбриональную телячью сыворотку, в течение 24 ч при 37 °С в 5% среде CO₂.

Для определения уровня экспрессии изучаемых маркеров на поверхности мембран нативных и фотомодифицированных Т-лимфоцитов применяли метод проточной цитофлуориметрии. Для анализа уровня экспрессии CD2-, CD11a- и CD29-маркеров цитометрические исследования проводились с применением проточного цитометра «EPICS XL-MCL» (Beckman Coulter, США), с использованием следующих моноклональных антител, меченных флуорохромами: CD2-FITC (IgG2a), CD11a-FITC (IgG1), CD29-FITC (IgG1), CD3-PE (IgG1) и соответствующие изотипические контроли Neg.Ctrl.-FITC (IgG2a) / Neg.Ctrl.-PE (IgG1), Neg.Ctrl.-FITC (IgG1) / Neg.Ctrl.-PE (IgG1) (все Becton Coulter, США).

При исследовании уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-рецепторов лимфоцитами применяли проточный цитометр «CyFlow space» («Partec», Германия) с использованием моноклональных антител LT3, LT4, LT8, меченных флуорофором – FITC (ООО «Сорбент», Москва). В качестве изотипического контроля применяли IgG-FITC.

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.

Результаты и обсуждение

Выявлено, что облучение клеток УФ-светом в дозах 151-906 Дж/м² не приводило к статистически достоверным изменениям средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD3⁺CD2⁺ и CD3⁺CD11a⁺ лимфоцитов (рис. 1, 2). УФ-свет в наибольшей из используемых нами доз облучения (1359 Дж/м²) оказывал депрессивное действие на тестируемый показатель, что выражалось в уменьшении его значения на 27% и 22% соответственно по сравнению с интактными клетками.

Анализ уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-маркеров на поверхности фотомодифицированных Т-лимфоцитов показал следующее. СИФ CD3⁺ клеток после действия на смесь лимфоци-

тов УФ-света в дозах 151-906 Дж/м² повышалась на 12, 11 и 15% , а в дозе 1359 Дж/м² – снижалась на 10% относительно нативных клеток (рис. 3). УФ-свет во всех используемых дозах индуцировал увеличение СИФ CD4⁺Т-лимфоцитов на 20-30%, а CD8⁺Т-клеток – на 16-34% соответственно относительно немодифицированных образцов (рис. 3).

Итак, УФ-излучение в малых и средних дозах (151, 453 и 906 Дж/м²) оказывает иммуностимулирующее действие на уровень экспрессии CD3-, CD4- и CD8-молекул, а в большой дозе (1359 Дж/м²) может как повышать (CD4- и CD8-маркеры), так и снижать (CD3-комплексы, CD2- и CD11a-маркеры) количество анализируемых молекул на поверхности мембран Т-клеток.

Повышение уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-рецепторов фотомодифицированными Т-лимфоцитами может быть обусловлено активацией синтеза *de novo* исследуемых молекул, высвобождением из мембраны предсуществующих

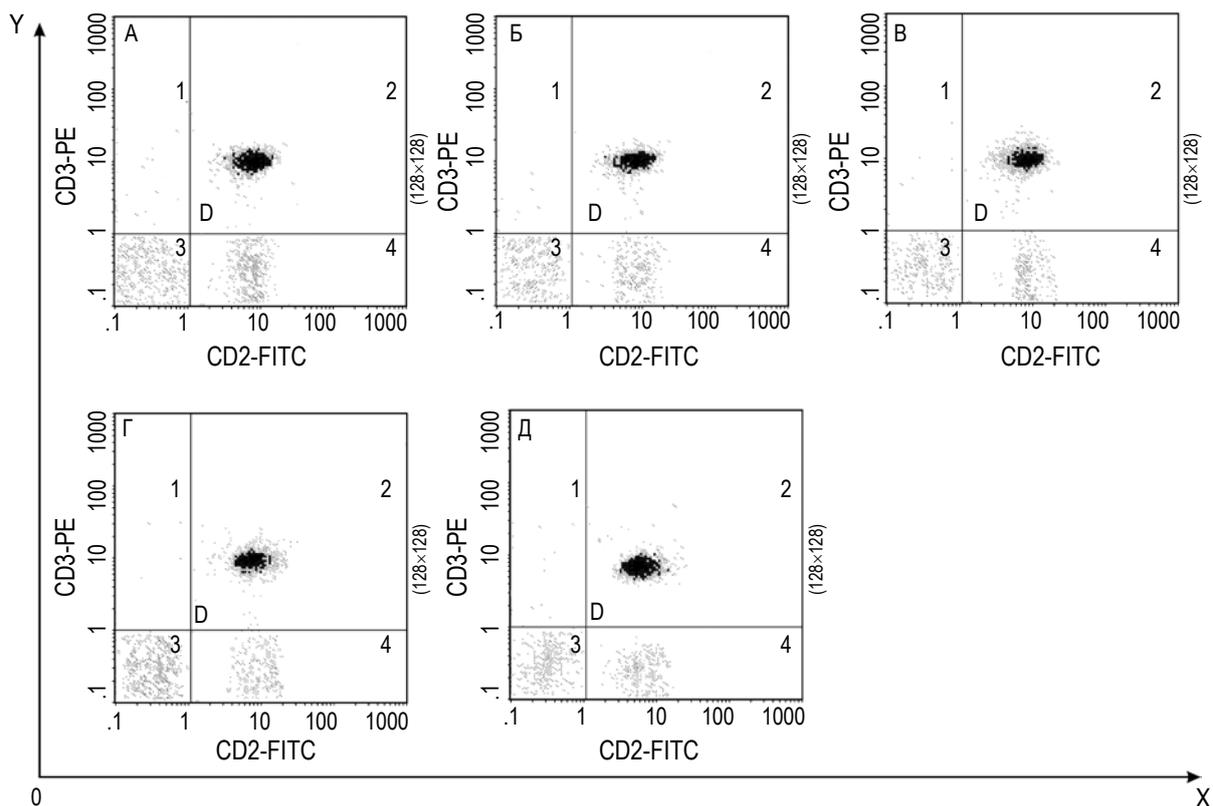


Рисунок 1. Двухпараметрические гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови, модифицированных УФ-светом, с использованием моноклональных антител против CD3- и CD2-молекул, меченных PE и FITC

Примечание. По осям OX и OY отражена интенсивность флуоресценции от антител против CD2- и CD3-антигенов соответственно:

А) интактные Т-лимфоциты; Б) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 151 Дж/м²; В) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 453 Дж/м²; Г) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 906 Дж/м²; Д) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 1359 Дж/м².

Квадранты: D1 – CD3⁺CD2⁻ лимфоциты; D2 – CD3⁺CD2⁺ лимфоциты; D3 – CD3⁻CD2⁻ лимфоциты; D4 – CD3⁻CD2⁺ лимфоциты; в % указано содержание клеток в квадранте дубль-положительных клеток.

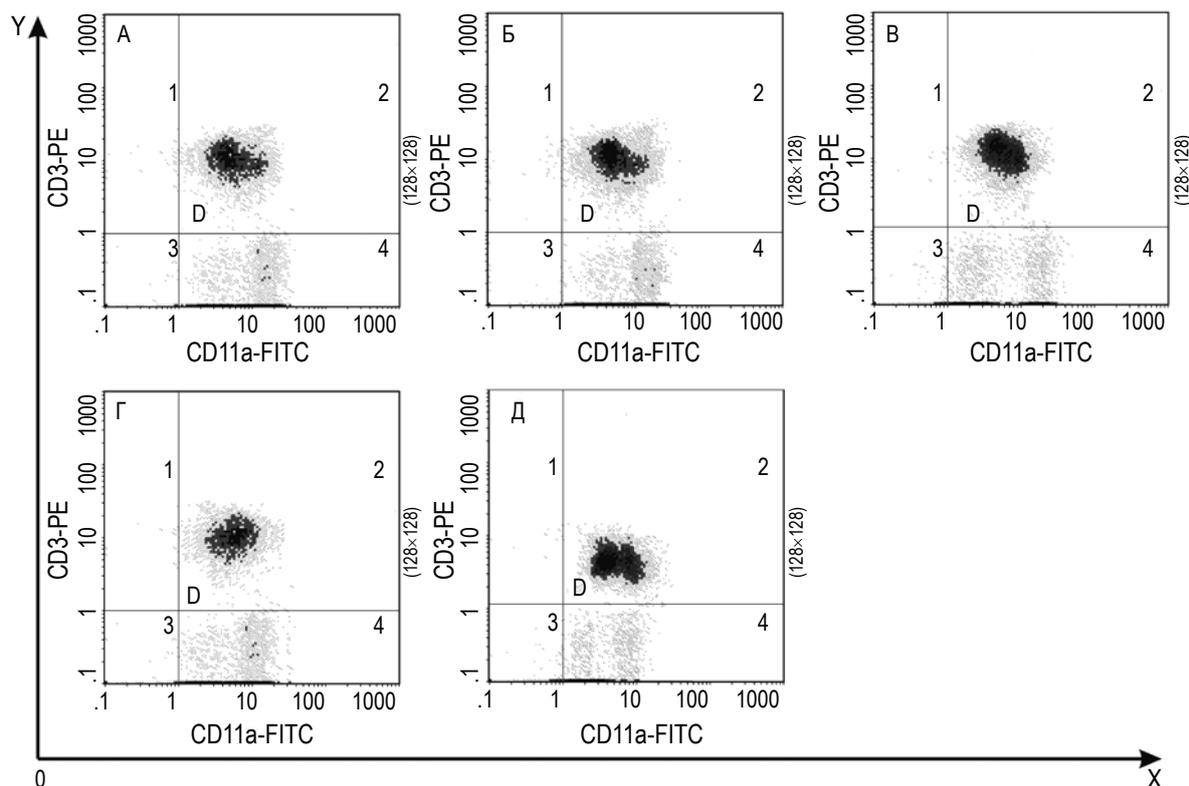


Рисунок 2. Двухпараметрические гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови, модифицированных УФ-светом, с использованием моноклональных антител против CD3- и CD11a-молекул, меченных PE и FITC

Примечание. По осям OX и OY отражена интенсивность флуоресценции от антител против CD11a- и CD3-антигенов соответственно: А) интактные Т-лимфоциты; Б) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 151 Дж/м²; В) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 453 Дж/м²; Г) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 906 Дж/м²; Д) Т-лимфоциты, облученные УФ-светом в дозе 1359 Дж/м². Квадранты: D1 – CD3⁺CD11a⁻ лимфоциты; D2 – CD3⁺CD11a⁺ лимфоциты; D3 – CD3⁻CD11a⁻ лимфоциты; D4 – CD3⁻CD11a⁺ лимфоциты; в % указано содержание клеток в квадранте дубль-положительных клеток.

ших рецепторов, изменением их конформации под воздействием УФ-излучения с увеличением способности последних связывать специфические моноклональные антитела. Выявленное нами снижение тестируемого показателя, по-видимому, связано с тем, что УФ-свет в дозе 1359 Дж/м² вызывает активацию процессов, способствующих уменьшению экспрессии CD2-, CD11a- и CD3-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 [2, 4].

Известно, что УФ-излучение индуцирует протекание в мембранах клеток ряда фотохимических реакций, в частности пероксидного фотоокисления липидов (ПФОЛ) при непо-

средственном участии активных форм кислорода [1]. 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) [4, 13, 16]. Эти факторы связываются с промоторным участком гена и запускают транскрипцию, а следовательно, и трансляцию соответствующих белков [15]. Предположительно, в наших экспериментах, именно с ходом вышеописанных реакций в фотомодифицированных клетках связаны наблюдаемые нами изменения экспрессии мембранных молекул иммунокомпетентными клетками.

Таким образом, использование метода проточной цитофлуориметрии позволило нам установить, что УФ-свет (240-390 нм) в дозах 151÷1359 Дж/м² модифицирует структурное состояние лимфоцитарных мембран и тем самым

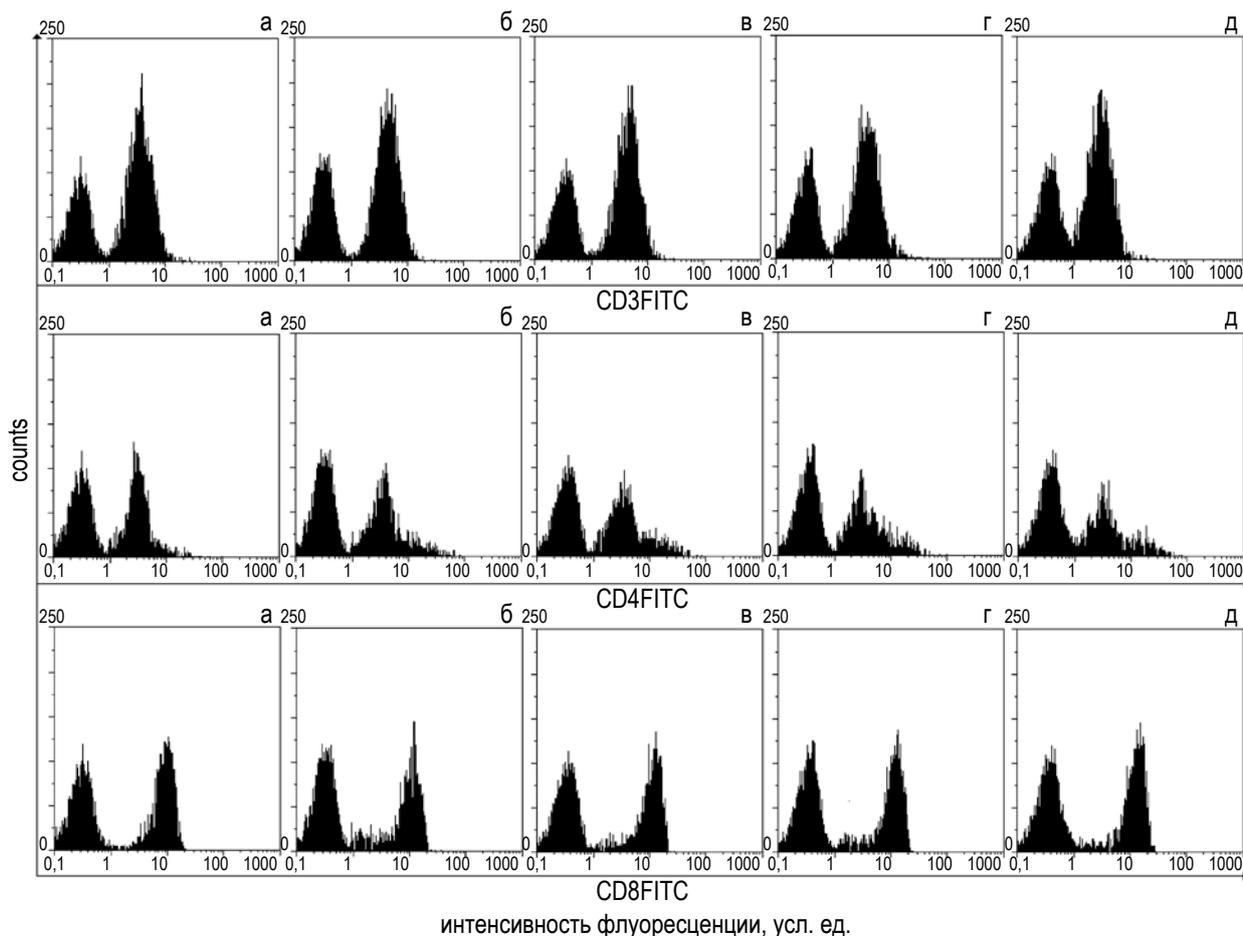


Рисунок 3. Изменение уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-маркеров на поверхности лимфоцитов крови человека, модифицированных УФ-светом (гистограммы, слева – изотип-контроль, справа – специфическая окраска: клетки, с которыми связывается значительное количество ФИТЦ-меченных антител против CD3-/CD4-/CD8-маркеров): а – нативные клетки; б, в, г, д – УФ-облученные лимфоциты в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² соответственно

индуцирует изменение поверхностного фенотипа и рецепторных свойств мембран иммунокомпетентных клеток, что отразится на их способности выполнять свои иммунологические функции [1].

Анализ экспериментальных данных показал, что уровень экспрессии молекул межклеточной адгезии (CD2- и CD11a-маркеры) Т-лимфоцитами крови человека не изменялся после воздействия УФ-света в дозах 151-906 Дж/м². Это, вероятно, будет способствовать сохранению стабильных межклеточных контактов в условиях более широкого колебания физико-химических показателей окружающей среды клеток. В то же время фотоиндуцированное увеличение уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-маркеров, по-видимому, будет способствовать усилению антигенраспознающей способности Т-клеток, хелперной и цитотоксической активности субпопуляций лимфоцитов за счет повышения эффективности взаимодействия TCR-CD3 с комплексом пептид-МНС I/II-класса при реализации иммунного ответа.

Снижение уровня экспрессии CD2-, CD11a- и CD3-рецепторов после действия УФ-света в максимальной дозе (1359 Дж/м²), вероятно, может приводить к ингибированию процессов межклеточных взаимодействий иммуноцитов и вызывать угнетение процессов проведения активационного сигнала от TCR внутрь клетки и распознавания Т-лимфоцитами чужеродного антигена при взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками и, как следствие, к торможению развития иммунных реакций.

Результаты изучения индуцированных УФ-светом изменений структурно-функционального состояния иммуноцитов важны для понимания тонких механизмов саморегуляции и функционирования компонентов иммунной системы в норме и при патологии. Полученные экспериментальные данные могут способствовать разработке новых подходов к иммунокоррекции отдельных звеньев иммунного ответа при различных патологических состояниях организма при проведении АУФОК-терапии.

Список литературы

1. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Структурно-функциональное состояние биомембран и межклеточные взаимодействия. — Воронеж: Издательство Воронежского университета, 2008. — 156 с.
2. 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.
3. Волгарева Е.В., Волгарев А.П., Самойлова К.А. Влияние УФ-облучения и УФ-облученной аутологичной крови на функциональное состояние лимфоцитов периферической крови человека // Цитология. — 1990. — Т. 32, № 12. — С. 1217-1223.
4. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса // Вопросы медицинской химии. — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561-581.
5. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия. — М.: Медицина, 2001. — 392 с.
6. Самойлова К.А. Триггерные механизмы лечебного эффекта облучения крови УФ лучами // Цитология. — 1991. — Т. 33, № 9. — С. 101-102.
7. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука, 2001. — 390 с.
8. Ярилин А.А. Иммунный синапс как структурная основа презентации антигена // Иммунология. — 2003. — № 6. — С. 347-350.
9. Ярилин А.А. Симбиотические взаимоотношения клеток иммунной системы // Иммунология. — 2001. — № 4. — С. 16-20.

Ссылки 10-16 см. в References (стр. 367-368). See References for numbers 10-16 at pp. 367-368.

References

1. Artyukhov V.G., Nakvasina M.A. Strukturno-funktsional'noe sostoyanie biomembran i mezhkletochnye vzaimodeystviya [Structurally functional condition of biomembranes and intercellular interactions]. *Voronezh, Izdatel'stvo Voronezhskogo universiteta — Publishing House of Voronezh State University, 2008. 156 p.*
2. Artsishevskaya R.A., Mironova A.P., Samoylova K.A. Desorbtsiya glikoproteinov s poverkhnosti limfotsitov perifericheskoy krovi cheloveka posle oblucheniya korotkovolnovymi UF luchami [Desorption of glycoproteins from lymphocytes surface of humans peripheral blood after radiation by short-wave UV-light]. *Tsitologiya — Cytology, 1984, vol. 26, no. 2, pp. 209-214.*
3. Volgareva E.V., Volgarev A.P., Samoylova K.A. Vliyanie UF-oblucheniya i UF-obluchennoy autologichnoy krovi na funktsional'noe sostoyanie limfotsitov perifericheskoy krovi cheloveka [Influence of UV-irradiation and UV-irradiating autology blood on functional condition of lymphocytes from humans peripheral blood]. *Tsitologiya — Cytology, 1990, vol. 32, no. 12, pp. 1217-1223.*
4. Dubinina E.E. Rol' aktivnykh form kisloroda v kachestve signal'nykh molekul v metabolizme tkaney pri sostoyanii okislitel'nogo stressa [Role of reactive oxygen species as signal molecules in tissues metabolism at a condition of an oxidizing stress]. *Voprosy meditsinskoy khimii — Problems of Medical Chemistry, 2001, vol. 47, no. 6, pp. 561-581.*
5. Karandashov V.I., Petukhov E.B., Zrodnikov V.S. Fototerapiya [Phototherapy]. *Moscow, Medicine, 2001. 392 p.*
6. Samoylova K.A. Triggernye mekhanizmy lechebnogo effekta oblucheniya krovi UF luchami [Trigger mechanisms in medical effect of bloods UV-irradiation]. *Tsitologiya — Cytology, 1991, vol. 33, no. 9, pp. 101-102.*
7. Freydlin I.S., Totolian A.A. Kletki immunnoy sistemy [Immune systems cells]. *St. Petersburg, Science, 2001. 390 p.*
8. Yarilin A.A. Immunnyy sinaps kak strukturnaya osnova prezentatsii antigena [Immune synapse as structural basis of antigenes presentation]. *Immunologiya — Immunology, 2003, no. 6, pp. 347-350.*
9. Yarilin A.A. Simbioticheskie vzaimootnosheniya kletok immunnoy sistemy [Symbiotic relationship of immune systems cells]. *Immunologiya — Immunology, 2001, no. 4, pp. 16-20.*
10. Arnett K.L., Harrison S.C., Wiley D.C. Crystal structure of a human CD3- ϵ/δ dimer in complex with a UCHL1 single-chain antibody fragment. *PNAS., 2004, vol. 101, no. 46, pp. 16268-16273.*
11. Delaire S., Huang Y.H., Chan S.W., Robey E.A. Dynamic repositioning of CD4 and CD8 genes during T cell development. *J. Exp. Med., 2004, vol. 200, no. 11, pp. 1427-1435.*
12. Huang H., Hao S., Li F., Ye Z., Yang J., Xiang J. CD4⁺ Th1 cells promote CD8⁺ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology, 2006, vol. 120, pp. 148-159.*

13. Janssen-Heininger Y.M.W., Poynter M.E., Baeuerle P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, vol. 28, pp. 1317-1327.
14. Kitchen S.G., Whitmire J.K., Jones N.R., Galic Z., Kitchen C.M.R., Ahmed R., Zack J.A. The CD4 molecule on CD8⁺ T lymphocytes directly enhances the immune response to viral and cellular antigens. *PNAS.*, 2005, vol. 102, no. 10, pp. 3794-3799.
15. Legrand-Poels S., Schoonbroodt S., Matroule J.-Y., Piette J. NF- κ B: an important transcription factor in photobiology. *J. Photochem. Photobiol.*, 1998, vol. 45, pp. 1-8.
16. Schulze-Osthoff K., Los M., Baeuerle P. Redox signaling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 1995, vol. 50, pp. 735-741.