

В. Г. Артюхов, В. В. Гусинская, Е. А. Михилева

ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ CR1-РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ УФ-СВЕТОМ

Воронежский государственный университет

Методами иммуноферментного (ИФА) и иммунофлюоресцентного анализа исследовано влияние УФ-света (75,5;-2265 Дж/м²) на структурно-функциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов (Нф). Показано, что УФ-модификации рецепторного аппарата Нф проявляются в виде кэппинг-эффекта с преобладающим распределением флюоресцирующих комплексов CR1-рецепторов со связанным С3-фактором комплемента по типу кэп 1/4, увеличивая способность фагоцитов сорбировать антитела к нему. С ростом дозы (2265 Дж/м²) возрастает число клеток с амебовидным кэпом, сопровождающимся, по всей вероятности, уменьшением количества рецепторов на поверхности Нф и снижением их лигандсвязывающей способности. Изменяя локализацию рецепторов с помощью кэппинга, Нф тем самым контролируют свою реактивность.

The UV-irradiation (75,5?-2265 J/m²) influence on structural-functional state of neutrophil leucocytes has been studied by the methods of immunoferrment and immunofluorescent analysis. It has been demonstrated that UV-modifications of neutrophil receptor apparatus are displayed as capping effect with prevalent distribution of immunofluorescent CR1-receptor complex combined with C3-compliment factor by cap 1/4 type and they increase phagocyte capability of antibody sorbing to it. The quantity of cells with amebiform cap which is maybe accompanied with decreasing receptor quantity on neutrophil surface and decreasing their ligand binding ability is rising with dose growth (2265 J/m². When neutrophils change receptor localization with capping help, at the same time they control their reactivity.

Сочетание готового эффекторного потенциала со способностью к быстрой его мобилизации делает нейтрофильные лейкоциты (Нф) одними из главных участников раннего ответа на любые изменения, происходящие в организме. Взаимоотношения клеток с различными внешними стимулами складываются на уровне плазматической мембраны, несущей рецепторы, трансформирующие поступающие сигналы в те или иные клеточные реакции. К важнейшим рецепторам Нф принадлежат структуры, воспринимающие иммунные агрегаты, прежде всего Fc-фрагменты иммуноглобулинов и C3b-фактор комплемента [7]. Они обеспечивают большинство реакций в системе опсонической кооперации, а также подключение фагоцитов в качестве основного эффектора иммунокомплексного воспаления.

Нарушения в системе иммунитета способствуют затяжному течению заболеваний со склонностью к рецидивам, снижению сопротивляемости организма к инфекции и развитию тяжелых осложнений, поэтому проблема иммунокоррекции приобретает все большую значимость в связи с увеличением числа осложненных форм различных заболеваний. Помимо традиционных методов лечения, существуют способы нефармакологической коррекции патологических состояний. Так, терапевтическое действие на организм способно оказывать УФ-свет с длиной волны менее 300 нм. Практически во всех областях медицины с успехом применяют метод аутотрансфузии УФ-облученной крови, так как возникающие при этом эффекты (улучшение реологических, гемостатических свойств крови, коррекция функций иммунной системы, нормализация метаболических нарушений) оказываются благоприятными при многих патологиях. В результате экспериментального исследования механизма действия УФ-излучения на кровь имеются данные о том, что УФ-свет индуцирует изменение внешнего примембранного слоя клеток крови, видоизменяя общую картину антигенных детерминант и экспрессию рецепторов на клеточной поверхности [1].

Изучение фотобиологических реакций иммунокомпетентных клеток, через которые реализуется основная функция иммунитета, является перспективным направлением в рамках исследования терапевтических свойств фотомодифицированных компонентов крови. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение структурно-функциональных фотомодификаций мембран Нф, и, в частности, характера изменений локализации CR1-рецепторов на их поверхности, индуцированные УФ-светом.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования выступали мембраны Нф крови человека. Нф получали центрифугированием гепаринизированной крови доноров на двойном градиенте плотности фиколла — урографина [3]. Выделенные и отмытые клетки суспендировали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, рН 7.4), доводя до рабочей концентрации. Чистота выделенных Нф составила 93%, жизнеспособность, определяемая в тесте с трипановым синим, — не менее 95%. Сыворотку крови (источник C3-фактора комплемента) получали центрифугированием донорской крови.

Облучение исследуемых образцов проводили в термостатируемой ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) кювете излучением ртутно-кварцевой лампы ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой

пропускания в области 240—390 нм. Интенсивность излучения $1,51 \cdot 10^2$ Дж/м² в

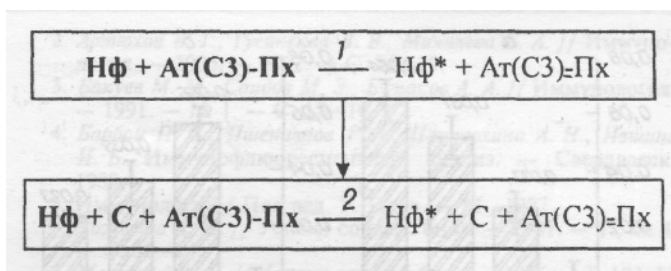


Рис. 1. Схема постановки экспериментов по изучению структурно-функциональных УФ-модификаций мембран Нф.

Жирный шрифт — контрольная система; обычный шрифт — опытная система; Нф — иммобилизованные нативные нейтрофилы крови доноров; С — сыворотка крови доноров; Ат(СЗ)-Пх — антитела к СЗ, конъюгированные с пероксидазой хрена; * — УФ-облученный компонент системы ИФА.

1 мин с учетом расстояния до облучаемого объекта 0,23 м. Дозы облучения составили 75,5, 755 и 2265 Дж/м².

Изучение иммуносорбционных свойств мембран Нф, модифицированных УФ-светом, проводили с помощью разработанного нами теста неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), основанного на определении связывания антител к СЗ-компоненту комплемента [2].

Распределение рецепторов к СЗ-компоненту комплемента (CR1-рецепторов) на поверхности фотомодифицированных клеток исследовали методом прямой иммунофлюоресценции. Для этого Нф суспендировали в полной рабочей среде, состоящей из ФСБ, 0,1% раствора азиды натрия и 1% раствора бычьего альбумина, доводя до концентрации $2-4 \cdot 10^6$ кл/мл. 0,05 мл клеточной суспензии инкубировали с 0,05 мл (титр 1:100) моноклональных антител к СЗ-компоненту комплемента, меченных изотиоцианатом флюоресцеина ("Chemicon", США) в течение 20 мин при 4°C. Затем проводили двукратную отмывку несвязавшихся антител буфером, центрифугируя в течение 5 мин при 1200 об/мин. К осадку отмытых клеток приливали 0,05 мл полной рабочей среды и готовили препарат "раздавленная капля". Для этого суспензию Нф переносили на чистое, тщательно обезжиренное стекло и накрывали покровным стеклом. Препарат просматривали в синевioletовых лучах видимого света (лампа ЛРП-250-3) с помощью люминесцентного микроскопа "Люмам И-3" ("ЛОМО", Россия). В качестве контроля использовали препараты, подготовленные аналогичным образом, за исключением того, что вместо моноклональных антител клетки обрабатывали ФСБ.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Эксперименты на основе разработанного нами теста неконкурентного ИФА проводили по схеме, представленной на рис. 1.

О структурно-функциональных фотомодификациях мембран Нф судили по изменению антитело-связывающей способности связанного с ними белка СЗ в системе теста ИФА $\text{Нф}^* + \text{Ат(СЗ)-Пх}$ (рис. 1(1)). Под мембраносвязанным СЗ подразумевали связавшийся с рецепторами CR1 в условиях *in vivo* белок СЗ системы комплемента [5]. При этом на планшеты наносили нативные или УФ-модифицированные в вышеуказанных дозах Нф, а затем конъюгат. УФ-облучение (75,5, 755 и 2265 Дж/м²) клеток увеличивало количество сорбированных на мембранах Нф антител к СЗ-компоненту, о чем свидетельствовало возрастание с ростом дозы величины оптической плотности в исследуемой системе (рис. 2. а). Ввиду отсутствия в данной системе дополнительного источника СЗ наблюдаемые изменения можно объяснить такого рода структурными фотомодификациями мембран Нф, которые приводят к антигенному дрейфу, меняя общую картину набора и локализации антигенных детерминант и рецепторов на поверхности клетки. Ре-

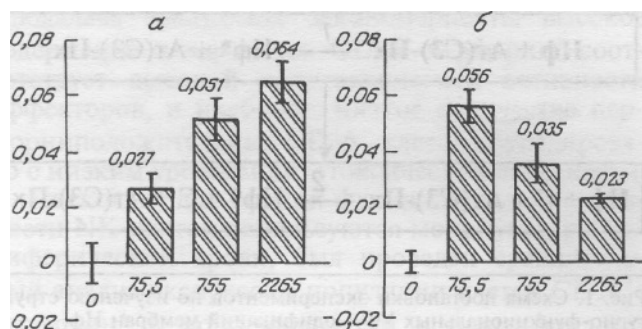


Рис. 2. УФ-индуцированные изменения антителосвязывающей способности Нф в системах ИФА Нф* + Ат(С3)-Пх (а) и Нф* + С + Ат(С3)-Пх (б).

По оси абсцисс — доза облучения УФ-светом (в Дж/м²); по оси ординат — средняя разность (Δ) между значениями Δ_{оп} опытных и контрольных образцов (в ед. опт. пл.); контроль (0) — значение оптической плотности ИФА-системы Нф + Ат(С3)-Пх, 0,354 ± 0,007 (а), и Нф + С + Ат(С3)-Пх, 0,161 ± 0,004 (б).

зультатом такого рода перестроек является демаскировка ранее скрытых рецепторов, а также кэппинг-эффект, который проявляется формированием рецепторных кластеров с лигандированным С3 и усилением его антителосвязывающей способности.

Для выявления способности нативных и УФ-облученных Нф сорбировать на своей поверхности дополнительное количество С3 была проведена серия экспериментов, при которых на планшеты последовательно наносилили нативные или УФ-облученные Нф, нативную сыворотку как источник белка С3 и конъюгат Ат(С3)-Пх (рис. 1(2)). При дополнительной иммобилизации компонентов нативной сыворотки на необлученные Нф наблюдалась снижение их антителосвязывающей способности (ср. системы Нф+С+Ат(С3)-Пх и Нф+Ат(С3)-Пх, см. рис. 2), что может быть обусловлено возможным экранированием мембраносвязанных молекул С3-компонентами сыворотки или действием сывороточных ингибиторов, снижающих общее количество мембраносвязанного С3.

Воздействие УФ-света (75.5, 755 и 2265 Дж/м²) на Нф приводило к достоверному (p < 0.01) повышению оптической плотности в системе ИФА Нф*+С+Ат(С3)-Пх (см. рис. 2, б) по сравнению с контролем Нф+С+Ат(С3)-Пх. Возможно, это связано с увеличением количества адсорбируемого облученными клетками С3-компонента из нативной сыворотки за счет демаскирования рецепторов или с кэппинг-эффектом на мембранах фотомодифицированных Нф.

Для подтверждения предположения о наличии кэппинг-эффекта на поверхности Нф, подвергнутых УФ-облучению, была проведена серия экспериментов с помощью ИФА с использованием антител к CR1, меченных изотиоцианатом флюоресцеина. О количестве кэппирующих Нф судили визуально, подсчитывая число клеток с различными типами распределения флюоресцирующих комплексов.

Нативные иммунциты характеризовались довольно равномерным краевым свечением (рис. 3, а на обложке), являющимся важнейшим отличитель-

ным признаком специфической флюоресценции [4]. УФ-свет вызывал перераспределение рецепторов на мембранах Нф с образованием рецепторных кластеров различных типов (см. рис. 3 на обложке). При этом скопления флюоресцирующих комплексов концентрировались на полюсах клетки в виде кэпов. Перераспределение рецепторов носит неспецифический характер, сопутствуя поляризации Нф, вызываемой различными по природе агентами [10]. Согласно существующей в литературе классификации разных форм кэпов [5], различают кэп 1/2, кэп 1/4, амёбовидный кэп (рис. 3, б, в, г на обложке).

Среди необлученных клеток в состоянии кэппинга находились 9% от общего числа Нф. При действии УФ-света (75.5, 755 и 2265 Дж/м²) количество кэппирующих клеток увеличивалось с ростом дозы (см. таблицу) и составило соответственно 37, 80 и 89%. При малой дозе УФ-излучения преобладало краевое свечение (63%), тогда как при дальнейшем облучении (дозы 755 и 2265 Дж/м²) преобладающим типом распределения флюоресцирующих комплексов являлся кэп 1/4 (42 и 49% соответственно). С увеличением дозы УФ-света возрастало также количество иммунцитов с амёбовидным свечением — с 5 до 27%.

Физиологическая роль кэппинга до настоящего времени окончательно не выявлена, однако есть основания полагать, что этот механизм является сигналом для инициации того или иного физиологического процесса, реализуемого клеткой [8]. Не исключено, что с помощью кэппинга клетка может контролировать клеточную реактивность, доводя концентрацию лиганда до оптимального для иммунного ответа уровня. Так, формирование кэпов по типу кэп 1/4 увеличивает лигандсвязывающую способность Нф по отношению к С3-компоненту комплекта, о чем свидетельствуют данные ИФА (см. рис. 2). При определенной концентрации лигандных молекул наступает полное насыщение рецепторов, связывание их с лигандом прекращается [13]. Удаление связавшихся с лигандом рецепторов с поверхности клеток может осуществляться двумя механизмами. По мере укрупнения (амёбовидный кэп) кластеры подвергаются эндоцитозу, ведущему к структурной изоляции рецептора, к поглощению (интернализации) комплексов рецептор—лиганд [11]. Помимо этого, известен феномен сбрасывания, или шеллинга, рецепторов [9, 12], который по направленности противоположен эндоцитозу, так как после агрегации рецепторы отпочковываются от мембраны в окружающую среду. В целом и эндоцитоз, и шеллинг используются клеткой для регуляции функционирования рецепторного аппарата.

Количество кэппирующих Нф (в %) в условиях УФ-облучения

Доза УФ-облучения, Дж/м ²	Тип распределения флюоресцирующих комплексов			
	краевой	кэп 1/2	кэп 1/4	амёбовидный кэп
0	91		9	
75,5	63	10	12	5
755	20	21	42	17
2265	11	13	49	27

Таким образом, структурно-функциональные фотомодификации мембран НФ проявляются в виде кэппинг-эффекта с образованием рецепторных кластеров с лигандированным СЗ (СЗБ) компонентом системы комплемента при преобладании распределения флюоресцирующих комплексов по типу кэп 1/4, приводя к повышению адгезивных свойств фагоцитов. С ростом дозы УФ-облучения увеличивается процент клеток с амёбовидным кэпом, что может предшествовать структурной изоляции комплекса рецептор-лиганд и как следствие — сокращению числа рецепторов, доступных для взаимодействия с новыми "порциями" лиганда. Изменение локализации рецепторов с лигандированным компонентом является, возможно, одним из способов регуляции клеткой своей восприимчивости к стимулирующим агентам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхов В. Г., Гусинская В. В. // 1-я Всероссийская конф. фотобиологов. — Пущино, 1996. — С. 61—62.
2. Артюхов В. Г., Гусинская В. В., Михалева Е. А. // Иммунология. - 2005. - № 2. - С. 76-79.
3. Бакуев М. М., Саидов М. З., Бутаков А. А. // Иммунология. - 1991 - № 1. - С. 15-16.
4. Барбан П. С., Тиеничное Р. А., Пантюшина А. Н., Ившина И. Б. Иммунофлюоресцентный анализ. — Свердловск, 1988.
5. Иммунология / Под ред. У. Пола. — М., 1987.
6. Ложкина А. Н. // Успехи соврем. биол. — 1987. — Т., № 4. - С. 36-54.
7. Маянский А. Н. // Успехи соврем. биол. — 1986. — Т. 102, № - С. 260-278.
8. Таташвили И. С., Стефани Д. В. // Лаб. дело. - 1989. - № 2. - С. 16-17.
9. Loor F. // Adv. Immunol. - 1980. - Vol. 30. - P. 1-120.
10. Martinet C., Combarb A., Printz-Ane Ch., Printz P. // J. Virol. — 1979. - Vol. 29. - P. 123-133.
11. Niedel J., Wilkinson S., Cuatrecasas P. // J. Biol. Chem. - 1979. - Vol. 254. - P. 10700-10706.
12. Porteu F., Hieblot C. // J. Biol. Chem. - 1994. - Vol. 296. - P. 2834-2840.
13. Schreier G. F., Unanue E. R. // Adv. Immunol. - 1976. - Vol. 24. - P. 37-165.

