

А. А. Шевченко, Е. С. Лобанок, А. В. Воробей

ВЛИЯНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РЕЦЕПТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ

Исследовано влияние освещения суспензии лимфоцитов в присутствии сенсibilизаторов (гематопорфирина и мероцианина 540) на индуцируемую фитогемагглютинином агрегацию клеток и кэппинг лектиновых рецепторов. Обнаружено увеличение скорости обоих процессов при нелетальных дозах освещения. Обсуждается возможная роль поврежденных цитоскелетных белков в фотомодификации рецепторных свойств клеток.

Введение. В последние годы бурное развитие получили исследования, направленные на разработку нового метода лечения онкологических и инфекционных заболеваний — фотохимической терапии. В основе метода лежит избирательное связывание некоторых красителей, обладающих фотосенсибилизирующей активностью, в частности, порфиринов [1] и мероцианинов [2], с опухолевыми клетками, вирусами и последующий фотоиндуцируемый их лизис. Одним из недостатков данного подхода является неизбежное повреждение части здоровых клеток организма. Такая «сопутствующая» цитотоксичность красителей-фотосенсибилизаторов представляет определенную опасность ввиду повышенной концентрации в инфекционных и опухолевых очагах иммунокомпетентных клеток. Даже нелитические повреждения последних могут привести к заметным сдвигам в состоянии иммунной системы и, следовательно, повлиять на эффективность разрабатываемого метода. Вместе с тем фотосенсибилизированные повреждения иммунокомпетентных клеток пока изучены недостаточно. В настоящей работе исследованы изменения рецепторных свойств лимфоцитов при освещении клеток в присутствии гематопорфирина (Гп) и мероцианина 540 (Мц 540).

Материалы и методы. Лимфоциты периферической крови доноров выделяли в градиенте плотности, используя фиколл-верографию ($\rho = 1,077$) по модифицированной методике [3]. Все исследования выполнены на суспензии клеток ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР), рН 7,4. В работе использовали флуоресцеинизотионат (ФИТЦ), Гп, Мц 540 — все фирмы «Sigma» (США) и фитогемагглютинин (ФГА) — «Биолар» (Россия).

Агглютинацию лимфоцитов регистрировали по изменению поглощения света суспензией клеток (при $\lambda = 650$ нм) после добавления ФГА (30 мкг/мл), образцы постоянно перемешивали, измерения проводили при комнатной температуре. Скорость процесса характеризовали максимальным значением первой производной зависимости оптической плотности суспензии от времени.

Для определения связывания лимфоцитами ФГА клетки инкубировали в присутствии 25 мкг/мл меченого ФИТЦ лектина (ФИТЦ-ФГА) при 4 °С в течение 40 мин, отмывали в ЗФР (400 g, 10 мин) и переводили в 0,1 М NaOH. Количество связанного лектина определяли по интенсивности флуоресценции полученных образцов ($\lambda_{возб} = 495$ нм, $\lambda_{флюор} = 520$ нм). Конъюгат ФИТЦ-ФГА получали, выдерживая ФГА (3,3 мкг/мл) и ФИТЦ (90 мкг/мл) в ЗФР (рН 9,5) при 4 °С в течение суток. Несвязавшийся ФИТЦ удаляли диализом.

Для оценки скорости кэппинга лектиновых рецепторов лимфоциты инкубировали с ФИТЦ-ФГА (250 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С, фиксировали 1 %-м формальдегидом и с использованием флуоресцентной микроскопии получали распределение клеток по интенсивности флуоресценции ФИТЦ-ФГА в образовавшихся кэпах. Проведено четыре опыта, в каждом из которых исследовали по 50 освещенных и контрольных клеток.

Жизнеспособность лимфоцитов определяли по прокраске витальным красителем эозином.

© А. А. Шевченко, Е. С. Лобанок, А. В. Воробей, 1993

Освещение клеточных суспензий проводили в присутствии 2 мкМ Гп или Мц 540, освещенность образца составляла 60 000 лк.

Флуоресцентные измерения выполнены на спектрофлуориметре, собранном на базе двух кварцевых монохроматоров, и флуоресцентном микроскопе Leitz-MPV-2, агглютинацию клеток исследовали на сектrophотометре Hitachi 150-20.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные по влиянию освещения в присутствии Гп на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови и их белковую флуоресценцию. При использованных условиях жизнеспособность клеток начинает снижаться после 8 мин освещения. До этого времени не возрастает и уровень перекисно-

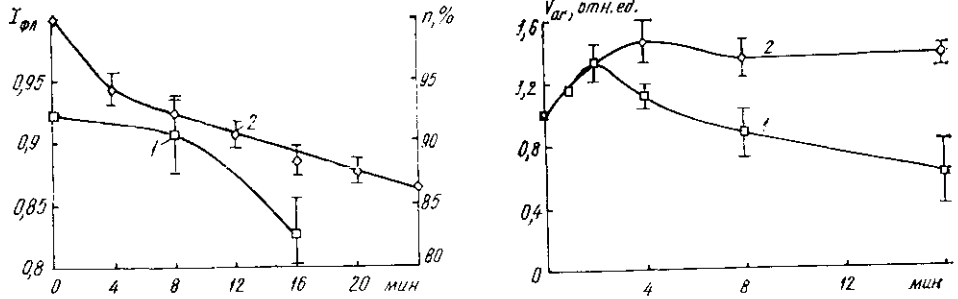


Рис. 1. Зависимости количества жизнеспособных лимфоцитов (1) и интенсивности их белковой флуоресценции (2) от времени освещения суспензии клеток в присутствии Гп

Рис. 2. Зависимости скорости индуцируемой ФГА агглютинации лимфоцитов от времени освещения суспензии клеток в присутствии Гп (1) и Мц540 (2)

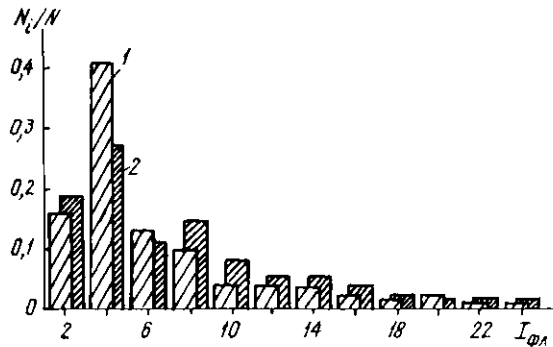
го окисления липидов, регистрируемый по количеству продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, интенсивность же белковой флуоресценции монотонно уменьшается. При больших временах освещения наблюдается фотосенсибилизированная гибель клеток и дальнейшее снижение белковой флуоресценции. Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами ранее данными на эритроцитах [4], фотосенсибилизированный гемолиз которых также имеет лаг-фазу и обусловлен фотоповреждениями мембранных белков. Наличие лаг-фазы позволило исследовать несвязанные с лизисом фотоиндуцированные изменения рецепторных свойств лимфоцитов.

Основная функция иммунокомпетентных клеток реализуется через рецепторные системы их мембран, которые в свою очередь весьма чувствительны к окислительным воздействиям на клетки. Так, одним из ранних ответов при облучении тимоцитов и спленоцитов *in vitro* ионизирующим излучением является изменение способности клеток связывать лектины и скорости митоген-индуцируемой агглютинации [5, 6]. Данные по влиянию фотосенсибилизированного воздействия на ФГА-индуцируемую агглютинацию лимфоцитов представлены на рис. 2. Как видно (кривая 1), при освещении в присутствии Гп в летальных дозах скорость агглютинации клеток снижается, что, вероятно, связано с их гибелью. В области же нелетальных доз наблюдается повышенная агглютинабельность лимфоцитов, что может отражать увеличение их функциональной активности. Сходная и еще более выраженная стимуляция агглютинации зарегистрирована при освещении сенсibilизированных Мц 540 клеток (рис. 2, кривая 2), гибели которых не происходит до 16 мин освещения. Световое воздействие на клетки в отсутствие сенсibilизаторов не влияет на их агглютинабельность. Причиной наблюдаемых изменений могло быть увеличение числа доступных ФГА рецепторов в клеточных мембранах, как это имеет место в случае радиационного воздействия [5], или сродства рецепторов к лектинам из-за фотоиндуцируемой структурной модификации мембран. Проведенное нами исследование показало, однако, что связывание ФГА клетками,

освещенными в присутствии Мц 540 нелетальными дозами, не увеличивалось по сравнению с контролем.

На изолированных эритроцитарных мембранах установлено [7], что высокую чувствительность к фотосенсибилизированному воздействию проявляют примембранные сократительные белки. Поэтому представляло интерес проверить возможную роль данных белков в наблюдаемой фотохимической модификации способности клеток к агглютинации. Известно [8], что цитоскелетные белки регулируют процесс лектин-индуцируемого образования в мембране агрегатов рецепторов — кэпов. Мы исследовали влияние освещения сенсибилизированных Мц 540 лимфоцитов в активирующих агглютинацию дозах на скорость ФГА-индуцируемого кэппинга лектиновых рецепторов. На рис. 3 представлены результаты микрофлюориметрического измерения N_i/N распределения лимфоцитов по интенсивности флуоресценции ФИТЦ-ФГА в кэпах

Рис. 3. Гистограммы распределения лимфоцитов по интенсивности флуоресценции ФИТЦ-меченого ФГА в кэпах, образуемых через 15 мин после добавления лектина к клеткам: 1 — контрольный образец, 2 — образец, освещенный в течение 4 мин в присутствии Мц540



через 15 мин после добавления к клеткам меченого лектина, когда кэппинг еще не завершен. Как видно, в подвергнутом фотосенсибилизированному воздействию образце профиль распределения лимфоцитов сдвинут по отношению к профилю контрольного образца в сторону большей интенсивности флуоресценции в кэпах, что свидетельствует об увеличении скорости кэппинга. Весьма вероятно, что эти изменения обусловлены фотомодификацией цитоскелетных белков клеток, поскольку в литературе имеются сведения об ускорении кэппинга при повреждении данных белков [9].

Возвращаясь к результатам по агглютинации, следует отметить, что при активации лимфоцитов лектинами существует корреляция скорости данного процесса с подвижностью мембранных рецепторов [10] и, следовательно, со скоростью кэппинга. Исходя из этого и учитывая, что увеличение скорости агглютинации клеток и кэппинга мембранных рецепторов происходит при одинаковых дозах освещения, можно предположить, что фотоиндуцируемые изменения обоих процессов обусловлены одной и той же модификацией цитоскелетных белков, управляющих подвижностью рецепторов в мембране.

Альтернативным объяснением наблюдаемой фотомодификации рецепторных свойств лимфоцитов может быть включение генерируемых сенсибилизаторами при освещении активных форм кислорода (АФК) в процесс реализации рецепторного ответа клеток. Ряд литературных данных [11—13] свидетельствует об участии АФК, в частности, супероксидного радикала и синглетного кислорода в активации иммунокомпетентных клеток, в том числе на ранних стадиях ответов лимфоцитов на действие лектинов, включая реакцию агглютинации [13].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что фотосенсибилизированное воздействие на лимфоциты в нелетальных дозах приводит к модификации рецепторных свойств клеток. Наличие таких изменений следует учитывать при выборе оптимальных условий фотохимической терапии заболеваний.

Резюме. Досліджено вплив освітлення суспензії лімфоцитів у присутності сенсибілізаторів (гематопорфірину та мероціаніну 540) на індуковану фітоаглютині-

ном аглютинацію клітин і кепінг лектинових рецепторів. Виявлено збільшення швидкості обох процесів за нелетальних доз освітлення. Обговорюється можлива роль пошкоджень цитоскелетних білків у фотомодифікації рецепторних властивостей клітин.

Summary. Effect of illumination in the presence of the sensitizers (hematoporphyrin and merocyanine 540) on phytohemagglutinin-induced lymphocytes agglutination and lectin receptors capping was studied. The increase of velocity of both processes under non-lethal of illumination has been shown. A possible role of cytoskeletal proteins damage in the photomodification of cell receptor characteristics is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dougherty T. J.* Photodynamic therapy // Clin. in chest med.— 1985.— 6, N 2.— P. 219—236.
2. *Sieber F., Spivak J. L., Sutcliffe A. M.* Selective killing leukemic cells by merocyanine 540-mediated photosensitization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 23.— P. 7584—7587.
3. *Хейфиц Л. Б., Абалякин В. А.* Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл // Лаб. дело.—1973.— № 10.— С. 579—581.
4. *Черницкий Е. А., Воробей А. В.* Фотосенсибилизированные повреждения биологических мембран // Молекуляр. механизмы биол. действия опт. излучения.— М.: Наука, 1988.— С. 102—111.
5. *Kubasova T., Koteles G. J., Varga L. P.* Surface alteration of mammalian cells upon ionizing radiation as detected by a lectine-binding technique. II. Binding of concanavalin A by human blood cell X-irradiated *in vitro* // Int. J. Radiat. Biol.—1981.— 40, N 2.— P. 187—194.
6. *Шуканова Н. А., Лобанок Е. С., Воробей А. В.* Изменение структурно-функциональных параметров мембран тимоцитов при облучении животных // Материалы I науч.-практ. конф.— Минск, 1989.— С. 164—168.
7. *Воробей А. В., Вадецкая Т. Н., Егорова Г. Д., Черницкий Е. А.* Сенсибилизируемые тетрасульфофенилпорфином фотоповреждения эритроцитарных мембран // Вестн АН БССР, сер. биол. наук.—1985.— № 4.— С. 103—105.
8. *Nicolson G. L., Poste G.* The cancer cell: Dynamic aspects and modifications in cell-surface organization // N. Engl. J. Med.—1976.—295, N 4.— P. 197—203.
9. *Loor F.* Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte function // Adv. Immunol.—1980.—30.— P. 1—120.
10. *Patarroyo M., Gahmberg C.-G.* Phorbol 12,13-dibutyrate enhances lateral redistribution of membrane glycoproteins in human blood lymphocytes // Eur. J. Immunol.—1984.—14, N 9.— P. 781—787.
11. *Fidellus R. K.* The generation of oxygen radicals: a positive signal for lymphocyte activation // Cell. Immunol.—1988.—113, N 1.— P. 175—182.
12. *Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н.* Ингибирующее действие перехватчиков активных форм кислорода на эндоцитоз конканавалина А лимфоцитами // Биофизика.— 1987.—32, № 3.— С. 434—437.
13. *Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н., Самаль А. Б.* Роль активных форм кислорода в конканавалин А-индуцированной аглютинации лимфоцитов // Вестник БГУ. Хим. биол. и географ.—1986.— № 3.— С. 47—50.

Инт. фотобиологии АН Беларуси, Минск

Получено 10.05.93

УДК 577.391

В. И. Древаль

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРЫС НА СТРУКТУРУ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ТИМОЦИТОВ

Крыс ежедневно подвергали γ -облучению в дозе 50 Рад и определяли связывание с плазматическими мембранами тимоцитов 1-анилинафталин-8-сульфоната, вязкость липидов с использованием флуоресцентного зонда пирена и константу Штерна-Фольмера для мембранных белков. Полученные данные характеризуют особенности изменения структуры плазматических мембран тимуса в результате компенсаторно-приспособительных реакций организма к действию ионизирующей радиации в малых дозах.

© В. И. Древаль, 1993