

О.В. Долга, Н.М. Жолобак, М.Я. Співак, І.С. Магура

Вплив α/β -інтерферону на електрофоретичну рухомість Т-лімфоцитів мишей

Методом мікроелектрофореза досліджували ранні зміни поверхнового заряду Т-лімфоцитів селезінки мишей, індукційовані мишинім α/β -інтерфероном (α/β -ІФН). Показано, що в перші години впливу α/β -ІФН достовірно збільшує абсолютне значення електрофоретичної подвижності Т-лімфоцитів порівняно з контролем. Ефект α/β -ІФН залежить від його концентрації в інкубаційній середі та тривалості впливу. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що сумарний негативний поверхновий заряд стимульованих α/β -ІФН Т-лімфоцитів більший, ніж контрольних клітин.

ВСТУП

Інтерферони (ІФН) займають особливе місце серед відомих цитокінів. Для них характерним є широкий спектр біологічної дії на різні типи клітин. ІФН виявляють антивірусну, антипроліферативну та імунорегуляторну активність, що є умовою їх успішного застосування для лікування вірусних інфекцій, пухлинних захворювань, імунокорекції [1, 7]. Зв'язування ІФН зі специфічними рецепторами на поверхні мембрани є сигналом для запуску в клітині цілої низки біохімічних реакцій, які забезпечують реалізацію його біологічних ефектів. Одночасно змінюються хімічні, фізичні та морфологічні властивості самої мембрани. Під впливом ІФН у лімфобластодібних клітинах мишей змінюється експресія поверхневих антигенів, збільшується густина плазматичної мембрани та кількість виявлених методом заморожених сколів внутрішньомембранних гранул [17, 18].

Однією із найголовніших фізико-хімічних властивостей плазматичної мембрани, яка відображає її функціональний і структурний стан, є поверхневий заряд. Відповідно до сучасних уявлень він бере участь у регуляції багатьох процесів. Серед них –

адгезія та агрегація клітин, міжклітинна взаємодія [9, 19, 22], функціонування іонних каналів [21], активність зв'язаних із мембраною ферментів [3], поверхневий натяг плазматичної мембрани [23]. Від густини поверхневого заряду залежить електрофоретична рухомість клітини. Даних про вплив ІФН на електрофоретичну рухомість клітин мало. Відомо, що він збільшує електрофоретичну рухомість культивованих у суспензії фібробластів L мишей [20] і клітин ембріональної нервової тканини людини на ранніх етапах нейрогенезу [11]. Фізіологічне значення індукційованих ІФН змін властивостей плазматичної мембрани до кінця не зрозуміле, хоча їх роль у реалізації біологічної активності не викликає сумнівів.

Мета цієї роботи – дослідити зміни електрофоретичної рухомості лімфоцитів селезінки мишей у перші години після впливу α/β -ІФН.

МЕТОДИКА

Індукцію ІФН- α/β в клітинах селезінки мишей проводили в 24-лункових планшетах "COSTAR", використовуючи суспензію вірусу хвороби Ньюкастла в 9–10-добових

курячих ембріонах [8]. У лунки планшета вносили 10 мкл суспензії вірусу в робочій дозі 10–100 ТЦД₅₀/0,1 мл та 990 мкл середовища культивування, що містило спленоцити мишей у кількості 10⁶ клітин/мл, та інкубували при 37°C протягом 24 год у вологонасиченій атмосфері з постійним вмістом CO₂ (5 %). Після закінчення індукції середовище культивування центрифугували протягом 10 хв при 400 g. Вірус хвороби Ньюкастла інактивували у надосаді, що був відібраний у стерильний посуд. Для цього надосад підкислювали розчином 0,1 моль/л HCl до значення 2,0, витримували при 4°C 48–72 год. Після закінчення інактивації вірусу рН середовища, що містило ІФН, доводили до значення 7,0 за допомогою 0,1 моль/л NaOH. Титр індукованого ІФН визначали за загальноприйнятими методами [8] в культурі клітин L929 проти вірусу везикулярного стоматиту. Титр ІФН становив 5·10³ МО/мл.

Лімфоцити отримували із селезінки мишей лінії СВА віком 8 тиж [12] і розділяли на колонках з нейлоною ватою [13]. Кількість Т-лімфоцитів у збагаченій таким чином суспензії клітин була не менше ніж 80 % [5].

Цілісність плазматичної мембрани досліджуваних лімфоцитів визначали за відсутністю зафарбовування клітин трипановим синім [12]. У всіх випадках кількість клітин з непошкодженою мембраною була не менше ніж 95 %.

Лімфоцити (10⁶ клітин/мл) інкубували за наявності α/β -ІФН при 37°C протягом вказаного часу у збалансованому сольовому розчині такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 2,5 CaCl₂ – 2,0, MgCl₂ – 1,0, тріс-HCl – 10,0 (рН 7,4), глюкоза – 5,0.

Потім лімфоцити відмивали за допомогою двократного центрифугування (10 хв, 400 g) у розчині, який містив (ммоль/л) KCl – 2,5, CaCl₂ – 2,0, тріс-HCl – 10,0 (рН 7,4), глюкоза – 280. Електрофоретичну рухомість клітин вимірювали в тому самому розчині при 20°C [4].

Статистичний аналіз результатів проводили, використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel 97 та OriginPro 7.0. Рівень достовірності при оцінці істинного значення вимірюваної величини електрофоретичної рухомості становив 95 %. Дані представлені як середнє \pm помилка середнього. Для визначення достовірності відмінності при порівнянні середніх значень використовували критерій t Стьюдента; відмінності вважали достовірними при P < 0,01.

РЕЗУЛЬТАТИ

У перші години після впливу α/β -ІФН спостерігали збільшення абсолютного значення електрофоретичної рухомості Т-лімфоцитів селезінки миші. Частотні гістограми електрофоретичної рухомості до та після обробки лімфоцитів α/β -ІФН (300 МО/мл) протягом 2 год при 37 °C представлено на рис. 1. Абсолютне значення електрофоретичної рухомості контрольних клітин становило 1,02 мкм·см·В⁻¹·с⁻¹ \pm 0,03 мкм·см·В⁻¹·с⁻¹, а активованих α/β -ІФН лімфоцитів – 1,26 мкм·см·В⁻¹·с⁻¹ \pm 0,03 мкм·см·В⁻¹·с⁻¹ (P<0,001).

Ефект α/β -ІФН залежав від його концентрації в інкубаційному середовищі. В інтервалі концентрацій α/β -ІФН 10–1000 МО/мл ми спостерігали дозозалежне збільшення абсолютного значення електрофоретичної рухомості (рис. 2). Лімфоцити інкубували з α/β -ІФН 2 год при 37 °C у збалансованому сольовому розчині.

Результати вимірювання електрофоретичної рухомості Т-клітин після початку впливу α/β -ІФН (1000 МО/мл) наведено на рис. 3. В інтервалі 1–6 год абсолютне значення електрофоретичної рухомості лімфоцитів, активованих α/β -ІФН, було достовірно (P<0,001) більшим, ніж контрольних клітин і через 6 год наближалось до стаціонарного рівня. На підставі отриманих результатів можна зробити висновок про те, що сумарний негативний поверх-

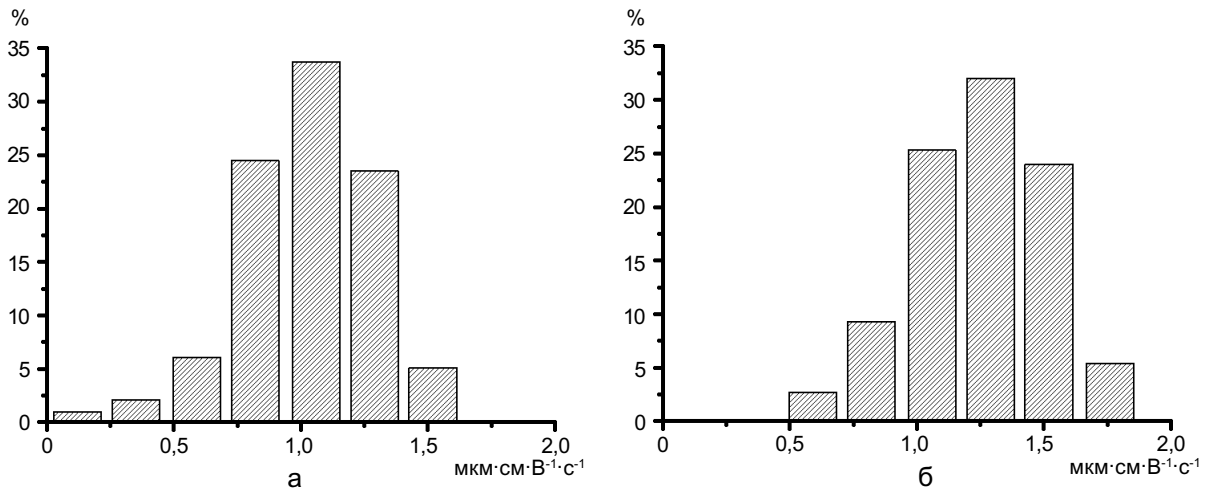


Рис. 1. Частотні гістограми електрофоретичної рухомості Т-лімфоцитів селезінки мишей: а – контроль; б – після обробки α/β-ІФН

невий заряд стимульованих α/β-ІФН Т-лімфоцитів більший, ніж контрольних клітин, і припустити, що під впливом α/β-ІФН змінюються фізико-хімічні властивості поверхневої мембрани Т-лімфоцитів.

ОБГОВОРЕННЯ

Активація лімфоцитів ІФН – складний процес, більшість ключових подій якого локалізується на плазматичній мембрані та визначається функціонуванням асоційованих з мембраною молекул [10, 14]. Взає-

модію ІФН з клітинами поділяють на дві стадії: адсорбцію та зв'язування з рецепторами на клітинній поверхні. Адсорбція ІФН сягає максимуму через 15–30 хв при 37°C і є неспецифічним процесом [6]. Біологічний ефект визначається адсорбованими молекулами ІФН, які зв'язуються зі специфічними високоафінними рецепторами на поверхні клітини. Саме зв'язування ІФН з рецепторами відіграє роль першого сигналу при активації лімфоцитів. Цей сигнал запускає зміни в клітині, які і викликають перехід неактивного лімфоцита в активно функціо-

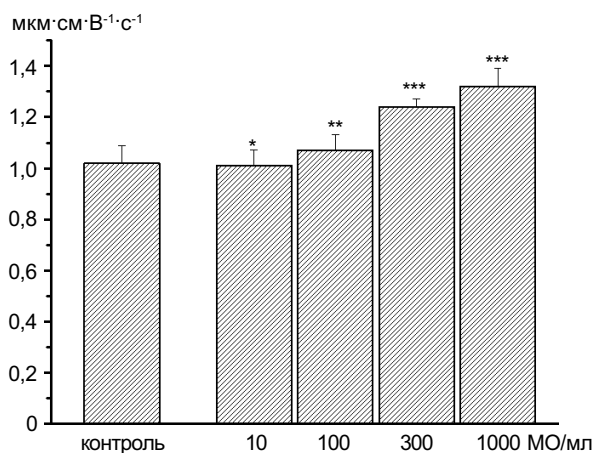


Рис. 2. Вплив різних концентрацій α/β-ІФН на електрофоретичну рухомість Т-лімфоцитів селезінки мишей.* відмінності між середніми значеннями недовісні; ** P<0,01, *** P<0,001 у порівнянні з контролем

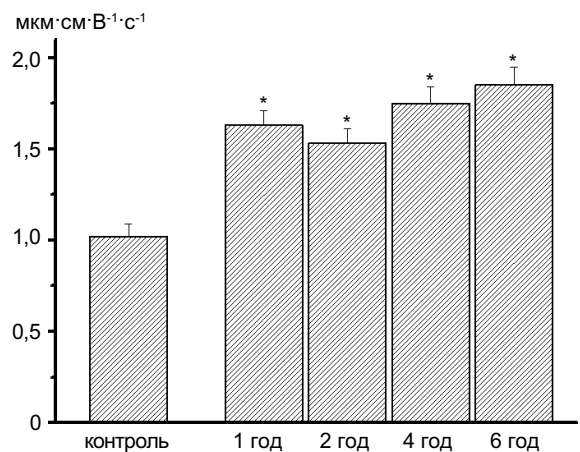


Рис. 3. Середні значення електрофоретичної рухомості Т-лімфоцитів селезінки мишей в різні моменти часу від початку впливу α/β-ІФН.* P<0,001 у порівнянні з контролем

нуючий.

В експериментах з конкурентного зв'язування було показано, що α - та β -ІФН мають спільні рецептори, які відрізняються від рецепторів γ -ІФН [15]. Зв'язування мічених ^{125}I молекул ІФН зі специфічними рецепторами збільшується протягом першої години, а потім упродовж наступних кількох годин знижується. Після зв'язування ІФН з рецепторами відбувається його швидке поглинання клітиною за допомогою ендочитозу [16, 24].

В наших експериментах спостерігалось залежне від дози збільшення абсолютного значення електрофоретичної рухомості Т-лімфоцитів протягом 6 год після початку впливу α/β -ІФН. Цей часовий інтервал значно перевищує час, коли неспецифічна адсорбція ІФН і його зв'язування сягають максимальних значень. Саме тому можна припустити, що зміна електрофоретичної рухомості зумовлена не лише процесами адсорбції та зв'язування ІФН з поверхнею клітини. Найімовірніше, що основною причиною збільшення електрофоретичної рухомості є зміна молекулярного складу плазматичної мембрани [18].

Отримані результати є без сумніву дуже цікавими, оскільки від значення поверхневого заряду залежить поверхневий потенціал, який, у свою чергу, визначає локальну концентрацію іонів і заряджених біологічних молекул [19]. Крім того, мембрана лімфоцитів містить системи (іонні канали, ферменти), функціонування яких пов'язане з активацією лімфоцитів і може модулюватися зміною густини поверхневого заряду [3, 21].

Результати наших досліджень *in vitro* важливі з точки зору оцінки імуномодуючої активності ІФН і його індукторів *in vivo*. Відомо, що при різних інфекційних захворюваннях, як правило, знижується електрофоретична рухомість лімфоцитів крові. Імуномодуюча терапія уrogenітальних (хламідіоз, кандидоз, герпес),

кишкових (гострі кишкові захворювання, викликані ентеропатогенними *E.coli*, сальмонельоз) та інших інфекцій (дифтерія, інфекційний мононуклеоз) із використанням індуктора ІФН – циклоферону – супроводжувалася відновленням електрофоретичної рухомості лімфоцитів крові до контрольного рівня [2].

E.V. Dolgaya, N.M. Zholobak, N.Ya. Spivak, I.S. Magura

α/β -INTERFERON EFFECTS ON ELECTROPHORETIC MOBILITY OF MURINE T LYMPHOCYTES

α/β -Interferon (α/β -IFN)-induced early changes in the electrophoretic mobility (EPM) of murine splenic T lymphocytes were studied by the microelectrophoresis technique. It has been found that α/β -IFN-treated T lymphocytes have a greater EPM than control cells within first hours of α/β -IFN addition. This change in EPM depends on the concentration of α/β -IFN in the medium and the duration of α/β -IFN interaction with the cells. It is concluded that the α/β -IFN-treated cells have a greater net negative charge of the cell surface than control cells.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virusology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоцкий С.М., Спивак Н.Я. Интерфероны: биологические и клинические эффекты. – К.: Фитосоциентр, 2006. – 288 с.
2. Вихрев Д.В., Журавель В.А., Стукова Н.Ю. и др. Эффективность мониторинга изменений иммунологического гомеостаза при инфекционных заболеваниях методом свободного распределительного клеточного электрофореза // Мед. иммунология. – 2001. – 3, №2. – С. 216.
3. Гринштейн С.В., Кост О.А. Структурно-функциональные особенности мембранных белков // Успехи биол. химии. – 2001. – 41. – С.77–104.
4. Долгая Е.В., Миронов С.Л., Погорелая Н.Х. Исследования поверхностного заряда нейронов спинальных ганглиев крыс при помощи метода микроэлектрофореза // Нейрофизиология. – 1984. – 16, №2. – С.176–182.
5. Долгая Е.В., Крылова И.В., Рожманова О.М. Изменение электрофоретической подвижности Т-лимфо-

- цитов мыши под влиянием конканавалина А // Биол. мембраны. – 1991. – **8**, №7. – С.755–762.
6. Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Интерферон и его индукторы. – М.: Медицина, 1980. – 176 с.
 7. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. – М.: Медицина, 1996. – 240 с.
 8. Лазаренко Л.Н., Спивак Н.Я., Михайленко О.М. и др. Продукция интерферонов в клетках периферической крови. – В кн.: Папилломавирусная инфекция и система интерферона. – К.: Фитосоциентр, 2008. – 288 с.
 9. Мирошников Ф.И., Фоменков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. – М.: Наука, 1986. – 184 с.
 10. Петров Р.В., Атауллаханов Р.И. Биохимия мембран. Кн. 9. Клеточные мембраны и иммунитет. – М.: Высш. шк., 1991. – 144 с.
 11. Рожманова О.М., Долгая Е.В., Стельмах Л.Н. и др. Влияние ИФН α на клетки эмбриональной нервной ткани человека на ранних этапах нейрогенеза // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2004. – **36**, №5-6. – С.363–369.
 12. Хант С. Выделение лимфоцитов и вспомогательных клеток. – В кн.: Лимфоциты. Методы / Ред. Дж. Клаус; Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – С.15–68.
 13. Эккерт Р. Разделение клеток иммунной системы. – В кн.: Иммунологические методы / Ред. Фримель Г.; Пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – С.226–253.
 14. Эшмен Р. Активация лимфоцитов. – В кн.: Иммунология: В 3-х т. Т. 1. / Ред. Пол У.; Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – С.414–469.
 15. Branca A.A., Baglioni C. Evidence that types I and II interferons have different receptors // Nature. – 1981. – **294**, №5843. – P.768–770.
 16. Branca A.A., D'Alessandro S.B., Baglioni C. Internalization and degradation of human alpha-A interferon bound to bovine MDBK // J. Interferon Res. – 1983. – **3**, №4. – P.465–471.
 17. Chang E.H., Jay F.T., Friedman R.M. Physical, morphological, and biochemical alterations in the membrane of AKR mouse cells after interferon treatment // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1978. – **75**, №4. – P.1859–1863.
 18. Friedman R.M. Interferon action and the cell surface // Pharmacol. Ther. – A 2. – 1978. – P.425–438.
 19. James A.M. Molecular aspects of biological surfaces // Chem. Soc. Rev. – 1979. – **8**, №3 – P. 389–418.
 20. Knight Jr. E., Korant B.D. A cell surface alteration in mouse L cells induced by interferon // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1977. – **74**, №2. – P.707–713.
 21. Latorre R., Labarca P., Naranjo D. Surface charge effects on ion conduction in ion channels // Methods Enzymol. – 1992. – **207**. – P.471–501.
 22. Mehrishi J. N., Bauer J. Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge // Electrophoresis. – 2002. – **23**, №13 – P.1984–1994.
 23. Zhang P.C., Keleshian A.M., Sachs F. Voltage-induced membrane movement // Nature. – 2001. – **413**, № 6854. – P.428–432.
 24. Zoon K.C., Arnheiter H., Zur Nedden D. et al. Human interferon alpha enters cells by receptor-mediated endocytosis // Virology. – 1983. – **130**, №1. – P.195–203.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
 Ін-т мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного
 НАН України, Київ
 E-mail: dolgaya@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
 редакції 10.09.2008*