



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53122 (13) A

(51) 7 A61K35/23

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ПОВЕРХНЕВИХ РЕЦЕПТОРІВ ЛІМФОЦИТІВ

1

2

(21) 2002032132

(22) 18 03 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Весніна Людмила Едуардівна, Кайдашев Ігор Петрович

(73) Весніна Людмила Едуардівна, Кайдашев Ігор Петрович

(57) Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів, який включає інкубування in vitro по-

передньо відмитих лімфоцитів з пептидним екстрактом та оцінку його впливу на лімфоцити, який відрізняється тим, що як пептидний екстракт використовують пептидний екстракт паренхиматозного органа з широким спектром біологічної активності, а вплив оцінюють за зміною характеру експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл

Винахід відноситься до галузей біології та медицини та може бути використаний для фармакологічного моделювання функціональної активності лімфоцитів периферійної крові

Поверхневий рецепторний апарат, найбільш поширений у лімфоцитів, [Петров Р В, Хаитов Р М, Атауллаханов Р И. Иммуногенетика и искусственные антигены М. Медицина, 1983 — 256 с.] забезпечує необхідний рівень життєдіяльності, можливість відповіді на зовнішні подразники, та в цілому відображає функціональний стан клітини. Зміна кількості та стану поверхневих рецепторів лімфоцитів можлива не тільки під час імунної відповіді, але й може стати результатом впливу різних речовин ендogenous або екзогенного походження [Иммунология / Под ред. У. Пола — М., 1987 — т. 1]

Відомі способи зміни експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією низькомолекулярних пептидних комплексів, таких, як тімалін [Морозов В Г, Хавинсон В Х, Писарев О А. Выделение из тимуса и изучение природы фактора, стимулирующего иммуногенез // Докл. АН СССР — 1977 — т. 233, № 3 — С. 491 - 494], вилон [Сизоненко В А, Варфоломеев А Р. Биорегулирующая терапия при термической травме / Чита. Поиск, 1999 — 159 с.], епіталамін [Загородняя Э Д. Применение цитомединов в акушерско-гинекологической практике // Роль пептидных биорегуляторов (цитомединов) в регуляции гомеостаза Л., 1987 — С. 38 - 39. Загородняя Э Д. Коррекция нарушений иммунитета и гемостаза при гестозах препаратами эпифиза // Пептидные биорегуляторы - цито-

медины С - П, 1992 — С. 61 - 62]

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів, що включає інкубування in vitro попередньо відмитих 0,5% гідролізатом лактальбуміна в розчині Хенкса лімфоцитів з пептидним екстрактом кісткового мозку (мієлопідом) у співвідношенні 40, 80 та 160мкг на 3×10^6 лімфоцитів. Інкубування проводили в пластмасових пробірках фірми "Falcon" 0,5 годин при 37°C, 0,5 годин при 4°C та 18 годин при 4°C. Після інкубування проби відмивали холодним гідролізатом лактальбуміна і ставили реакцію імунофлюоресценції або розеткоутворення з мишачими еритроцитами [П. П. Маркова. Сравнительное изучение влияния миелопоида и тактивина на рецепторы В-клеток // Иммунология — 1995 — № 1 — С. 59 - 61]

Недоліками існуючого способу є використання пептидного екстракту, отриманого із кісткового мозку, що потребує різних умов інкубації, що не дає можливості врахування змін функціонального стану клітин, дослідити зміну стану поверхневих рецепторів після дії інших чинників

В основу винаходу поставлено завдання створити спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів шляхом удосконалення відомого способу, досягти можливості визначення змін функціонального стану лімфоцитів периферійної крові за фізіологічних умов та на фоні дії різних чинників

Поставлене завдання вирішують створенням способу моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів, що включає інкубування in vitro попередньо відмитих лімфоцитів з пептидним екстрак-

(19) UA (11) 53122 (13) A

том та оцінку його впливу на лімфоцити, який відрізняється тим, що згідно винаходу, в якості пептидного екстракту використовують пептидний екстракт паренхіматозного органу з широким спектром біологічної активності, а вплив оцінюють за зміною характеру експресії поверхневих рецепторів з використанням моноклональних антитіл

Спосіб, який заявляється, здійснюється наступним чином: з периферійної крові донорів отримували суспензію лімфоцитів шляхом центрифугування у градієнті густини фікол-триомбраз, з наступним відмиванням у фосфатно-сольовому буфері. Лімфоцити у кінцевій концентрації $1 - 1,5 \times 10^6$ /мл культивували у середовищі 199 ("Sigma") з 10% інактивованою телячою сироваткою. Інкубацію клітин з пептидним комплексом нирок в дозі 0,05, 0,12 та 0,5 мкг/мл протягом 60 хвилин при 37°C проводили безпосередньо з інтактними лімфоцитами або після попередньої інкубації з фізіологічно-активними речовинами. В якості контролю використовували фосфатно-сольовий буфер. Експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів оцінювали за допомогою реакцій прямої та непрямой імунофлюоресценції на мікроскопі "Люмам - Р8" за зміною рівня та характеру флюоресценції відповідних антитіл. Підраховували кількість клітин, що світяться, на 200 клітин та визначали у відсотках. Для оцінки рівня експресії рахували загальну кількість клітин, що світяться, та диференціювали ступінь флюоресценції, виділяючи такі групи: перша група - клітини, у яких відсутня флюоресценція (0 балів), друга група - слабкий ступінь флюоресценції (1 бал), третя група - середній ступінь флюоресценції (2 бали), четверта група - сильний ступінь флюоресценції (3 бали) [Современные проблемы

ревматологии. Науч. обзор / Под ред. В.А. Насоновой — М., 1974]. За відсутність флюоресценції приймали наявність власної флюоресценції (дуже слабка світіння). Зміну функціональної активності клітин оцінювали шляхом визначення типів перероблення рецепторів у площині мембрани. Низький рівень функціональної активності визначається дифузним типом світіння, коли рецептори рівномірно розподілені у площині мембрани. Підвищення функціональної активності реєструється, коли рецептори перерозподіляються, формуючи кепи (у вигляді "шапочки"), кластери (групи рецепторів) та петчі (у вигляді плям) [Иммунология / Под ред. У. Пола — М., 1987 — т. 1].

Використання запропонованого способу показало, що пептидний комплекс, отриманий з кіркової речовини нирок, впливає на рецепторний апарат переважно Т-клітин (CD3, CD4, CD8) та HLA-Dr, що супроводжується дозозалежним підсиленням їх експресії та зміною функціонального стану. Спостерігалось підвищення кількості клітин з переробленням рецепторів у вигляді кепів, петчів, поява нових кластерів.

Враховуючи, що в організмі існує ціла сіть ендогенних імуномодуляторів - лімфокінів, монокінів, інтерлейкінів, інтерферонів, які відіграють важливу роль при фізіологічних та патологічних реакціях, ми дослідили, як діє пептидний комплекс нирок на стан поверхневих рецепторів лімфоцитів на фоні α -інтерферону. Попередня інкубація мононуклеарних клітин з α -інтерфероном протягом 60 хвилин при 37°C в кінцевій концентрації 100 МО/мл призвела до зниження рівня експресії антигенних детермінант CD3, CD4, CD8 та HLA-Dr (Табл.)

Таблиця

Вплив пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів на фоні дії α -інтерферона

| Досліджувані групи | Експресія поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів, % | | | | |
|--|--|---------------|--------------|--------------|---------------|
| | CD3 | CD4 | CD8 | HLA-Dr | CD 72 |
| Інтактні клітини | 59,8 ± 2,48 | 44,4 ± 1,52 | 46,8 ± 1,44 | 26,2 ± 2,56 | 14,4 ± 0,88 |
| Клітини, інкубовані з α -інтерфероном | 33,4 ± 1,92* | 16,0 ± 1,20* | 37,6 ± 0,88* | 21,4 ± 1,12 | 21,0 ± 0,40* |
| Клітини, інкубовані з α -інтерфероном та пептидним комплексом нирок | 49,2 ± 1,44** | 32,8 ± 2,32** | 44,4 ± 0,88* | 29,0 ± 0,40* | 26,0 ± 1,20** |

Примітка * - $p < 0,05$

Під впливом α -інтерферона практично зникали клітини з дифузним типом світіння, зменшилась кількість CD3+ клітин, які формують на мембрані кепи слабого та середнього ступеня флюоресценції, петчі всіх ступенів світіння. У два рази порівняно з висхідним рівнем зменшилась кількість CD4+ клітин, які утворювали на мембрані кепи слабого та середнього ступеня флюоресценції, на 13% знизився рівень утворення петчів середнього ступеня світіння. Східні зміни спостерігались на CD8+ та HLA-Dr+ клітинах. Для В-клітин (CD72+) підвищувався загальний рівень флюоресценції, збільшувалась кількість клітин з переробленням

рецепторів у вигляді кепів та петчів середнього ступеня світіння.

Додавання до суспензії преінкубованих з α -інтерфероном лімфоцитів пептидного комплексу з кіркової речовини нирок призводило до підвищення експресії усіх досліджуваних рецепторів (Табл.). Кількість клітин, які експресують HLA-Dr та CD72, не тільки відновлювалась, але й збільшилась вище висхідного рівня. Спостерігався перерозподіл інтенсивності світіння клітин в бік сильного ступеня - кількість CD8+ - клітин, які характеризувались сильним ступенем флюоресценції (3 бала), збільшилась у 2,9 рази, а HLA-Dr+ - у 2,2 рази. Під впли-

вом пептидного комплексу збільшилась кількість CD3+ і HLA-Dr+ - клітин, які формують на мембрані петчи слабкого та середнього ступеня флюоресценції. Для CD8+ и CD22+ - клітин спостерігалось збільшення перегрупвань рецепторів у вигляді петчів та кепів середнього та сильного ступеня світіння, підвищилась кількість CD4+ - клітин з кластерами середнього ступеня світіння.

Таким чином, пептидний комплекс нирок виявляє антагонізм по відношенню до дії α -

інтерферона на експресію мембранних маркерів T-клітин (CD3+, CD4+, CD8+) і синергізм - B-клітин (CD72+). Властивість відновлювати знижену під впливом α -інтерферона експресію досліджуваних рецепторів дозволяє припустити, що пептидний комплекс нирок реалізує свої ефекти моделювання рецепторів на мембранному рівні, сприяючи появі на мембрані заглиблених в II шар рецепторів, або впливаючи на процеси синтезу та транспорту на мембрану нових рецепторних молекул.