

© Ножинова О.А., Весніна Л.Е., Губенко І.Я., Беркало Л.В., Кайдашев І.П.

УДК 576.367:612.017.1

ДІЯ ПЕПТИДНОКОМПЛЕКСУ ТИМУСУ ~ ТИМАЛІНУ НА ПРОЦЕСИ АПОПТОЗУ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ В УМОВАХ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПОЗАКЛІТИННОГО КАЛЬЦІЮ

Ножинова О.А., Весніна Л.Е., Губенко І.Я., Беркало Л.В., Кайдашев І.П.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Изучено влияние пептидного комплекса тимуса – тималина на процессы апоптоза лимфоцитов периферической крови при связывании внеклеточного кальция с помощью этилендиаминтетра-уксусной кислоты (ЭДТА). Установлено, что действие ЭДТА не приводило к усилению процессов апоптоза периферических лимфоцитов, поэтому было предположено, что снижение поступления кальция из внеклеточной среды, вследствие связывания его ЭДТА, предупреждает развитие апоптотических процессов. Выявлено, что тималин действовал однонаправленно, снижая готовность клеток к апоптозу путем влияния на внутриклеточный каскад реакций связанных с активацией протеинкиназы С.

Вивчення дії регуляторних пептидів, що синтезуються в тимусі, на процеси апоптозу клітин імунної системи, зокрема, лімфоцитів периферійної крові, показало, що в організмі є потужна система пептидних біорегуляторів, яка направлена на зниження процесів апоптозу лімфоцитів периферійної крові. В проведених дослідженнях було відмічено, що регуляторні пептиди виділені з тимусу (тималін) та коркової речовини нирок взаємодіють з імункомпетентними клітинами, здійснюють свою імунотулюючу дію шляхом впливу на певні етапи передачі активуючого сигналу всередину клітини [2,73].

Відомо, що апоптоз – активна форма реакції клітин не тільки на несприятливі чинники, але і на фізіологічні, в тому числі активуючі фактори. Одним з таких факторів для тимоцитів та циркулюючого пулу лімфоцитів є комплекс пептидів тимусу – тималін, який при взаємодії з поверхневою мембраною лімфоцитів активує експресію специфічних рецепторів [113]. Передача сигналу з активованого рецептора до генетичного апарату відбувається за допомогою внутрішньоклітинних регуляторних систем, серед яких можливо виділити систему, що пов'язана з універсальним регулятором активності клітин – іонами кальцію. Кальцій-залежні регуляторні процеси є важливими для усіх проявів життєдіяльності, що включає клітинний цикл, проліферацію тканин, збудження нервових та м'язових клітин і т. ін. [4].

Однією з умов розвитку апоптозу може бути внутрішньоклітинне підвищення рівня кальцію, що пов'язане з надходженням кальцію в клітину через кальцієві канали плазматичної мембрани або мобілізацією з внутрішньоклітинних депо. Підвищення цитозольної концентрації кальцію активує Са – залежну фосфоліпазу, що призводить до порушення структури клітинних мембран, функції мітохондрій та зниженню ефекту окиснювального фосфорилування [63]. Кальцій підсилює активність серинових та цистеїнових протеїназ і гран-

зимів, що діють на заключній стадії клітинного лізису [3]. Ряд спостережень показали, що роль кальцій – хелатуючих речовин в попередженні апоптозу є суперечливою. Механізм, за допомогою якого іони кальцію можуть регулювати фрагментацію ДНК під час апоптозу, залишається нез'ясованим [5].

Метою даного дослідження було вивчення впливу низькомолекулярного комплексу пептидів тимусу - тималіну на процеси апоптозу лімфоцитів периферійної крові донорів в умовах зв'язування позаклітинного кальцію.

Матеріали та методи

Для вирішення поставлених задач було проведено експериментальні дослідження на крові 10 донорів віком 25-31 рік.

Об'єктом дослідження були лімфоцити периферійної крові донорів. Забір крові проводили натщесерце з кубітальної вени за допомогою одноразових пластикових шприців в центрифужні сіліконовані пробірки з розчином гепарину (25 ОД на 1 мл крові). Потім отримували суспензію лімфоцитів шляхом інкубації при 37°C на протязі 1 години з додаванням 1,8% розчину декстрану (Fluka) в співвідношенні 2:1, з наступною дворазовою відмивкою фізіологічним розчином (0,15 М хлориду натрію) та подальшим ресуспендуванням. Кількість клітин в суспензії при підрахунку в камері Горяєва складала в середньому $4,7 \times 10^9$ клітин.

Для подальшого дослідження суспензію клітин інкубували 24 години при температурі 37°C в середовищі RPMI-1640 (ІПВЗ, Москва) з додаванням 10% телячої сироватки (BioMark, Україна) і антибіотиків: пеніциліну (1 мкг/мл) та стрептоміцину (0,5 мкг/мл).

В першій серії дослідів вивчали процеси апоптозу за фізіологічних умов, використовуючи інтактні донорські лімфоцити, що інкубувалися в середовищі культивування. В другій серії дослідів ми

вивчали рівень апоптозу периферійних лімфоцитів при модуляції активності кальцієвої регуляторної системи. До інкубуємих лімфоцитів додавали хелатор позаклітинного кальцію, етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) (Fluka), в концентрації 9,2 мг/мл.

З метою вивчення впливу регуляторних пептидів на механізми апоптозу периферійних лімфоцитів, до інкубуємих клітин додавали в третій серії дослідів низькомолекулярний комплекс пептидів тимусу - тималін, в концентрації 0,12 мкг/мл. В четвертій серії, для дослідження впливу регуляторних пептидів на процеси апоптозу периферійних лімфоцитів в умовах зв'язування позаклітинного кальцію, додавали до культивуємих клітин послідовно ЕДТА в концентрації 9,2 мг/мл і тималін в концентрації 0,12 мкг/мл.

Вивчали наявність фрагментації ДНК, яка є одним з основних показників розвитку апоптозу. ДНК лімфоцитів виділяли фенол-хлороформним методом та аналізували за допомогою електрофорезу в 1,8% агарозному гелі [13].

Динаміку розщеплення хроматина клітин Ca^{2+} , Mg^{2+} - залежною ендонуклеазою визначали за методом [8], з подальшою визуалізацією продуктів розщеплення ДНК тимусу телят ("Reanal") методом електрофорезу в 0,8% агарозному гелі. Результати досліджень документували за допомогою фотографій.

Непрямим Імунофлюоресцентним методом визначали експресію CD95 на поверхні лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл IT95 (ТзОВ, "Сорбент", Росія) [12]. Клітини з флюоресценцією підраховували за допомогою флюоресцентного мікроскопу "Люам Р-8" під імерсією (об'єктив x100).

Дані досліджень оброблені статистично з використанням коефіцієнту Стьюдента.

Результати дослідження

Як показали наші дослідження, особливої уваги потребує, на наш погляд, виявлена фрагментація ДНК інтактних клітин, що може бути пов'язано з фізіологічною загибеллю клітин імунної системи за типом апоптозу [10]. При цьому підсилення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} - залежної ендонуклеази не відмічалось, а експресія CD95 в цілому відповідала, за даними літератури, іншим клітинам [1].

При внесенні в інкубаційне середовище хелатора позаклітинного кальцію ЕДТА в дозі 9 мг/мл фрагментація ДНК була відсутня (фото 1), активність Ca^{2+} , Mg^{2+} - залежної ендонуклеази не підвищувалась (фото 2), експресія CD95 рецепторів залишалась на рівні інтактних клітин (рис. 1).



Фото 1. Електрофорез ДНК периферійних лімфоцитів донорів під дією ЕДТА і тималіну.

1 – ДНК інтактних клітин; 2 – ДНК лімфоцитів після дії ЕДТА; 3 – ДНК лімфоцитів, що піддавалися дії тималіну; 4 – ДНК лімфоцитів, на які діяв ЕДТА і тималін.



Фото 2. Продукти розщеплення ДНК тимусу телят під дією Ca^{2+} , Mg^{2+} - залежної ендонуклеази периферійних лімфоцитів під дією ЕДТА і тималіна.

1 – продукти розщеплення ДНК тимусу телят Ca^{2+} , Mg^{2+} - залежною ендонуклеазою інтактних лімфоцитів; 2 – під дією ЕДТА; 3 – під дією тималіну; 4 – під дією ЕДТА і тималіну;

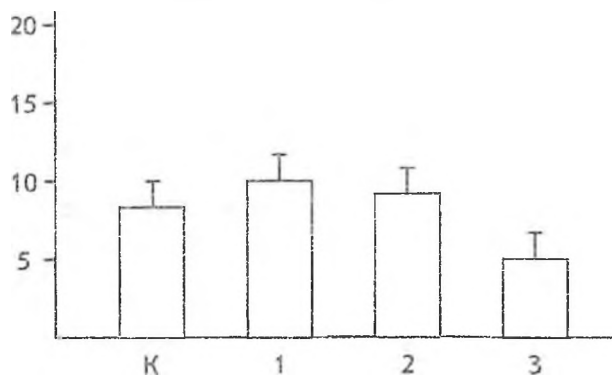


Рисунок 1. Експресія CD95 на поверхні лімфоцитів периферійної крові донорів під дією тималіну в умовах зв'язування позаклітинного кальцію. По осі абсцис показники експресії інтактних лімфоцитів (К), лімфоцитів, на які діяв тималін (1), ЕДТА (2) та їх сумісний вплив (3); по осі ординат – відсоток клітин з флюоресценцією; * – $0,05$.

При вивченні ізольованої дії пептидного комплексу тимусу – тималіну, експресія CD95 не змінювалась, ДНК лімфоцитів при електрофоретичному аналізі не була фрагментована. Не відмічалось підсилення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} - залежної ендонуклеази.

При додаванні в середовище культивування лімфоцитів послідовно ЕДТА і пептидного комплексу тимусу була знижена експресія CD95 по відношенню до інтактних лімфоцитів і по відношенню до ізольованої дії ЕДТА. Відсутня була також

фрагментація ДНК, підсилення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} — залежної ендонуклеази не було виявлено.

Дослідженнями деяких вчених показано, що кальцієвий сигнал ініціює фрагментацію ДНК і загибель клітин, а не є слідством початкового процесу загибелі [5]. В наших дослідженнях дія ЕДТА не призводила до підсилення процесів апоптозу периферійних лімфоцитів. Тому можливо передбачити, що зниження надходження кальцію із позаклітинного середовища, внаслідок зв'язування його ЕДТА, попереджує розвиток апоптотичних процесів.

Як відомо, апоптозу лімфоцитів передують повернення експресія глікопротеїну, що позначений як антиген CD95 (Разантиген), який є рецептором для поки що не охарактеризованого ліганду, що започатковує процес апоптозу [9].

В наших дослідженнях ЕДТА не підвищувала експресію CD95 і не приводила до розвитку типових для апоптозу ознак — деградації ДНК і підсилення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} — залежної ендонуклеази.

Як показали попередні дослідження [7], комплекс регуляторних пептидів тимусу — тималін ефективно попереджує розвиток апоптозу лімфоцитів периферійної крові при підвищенні активації протеїнкінази С, знижує рівень експресії CD95. Активність протеїнкінази С може бути підсилена під дією фарболових ефірів [14,15], а також в разі підвищення концентрації усередині клітини іонів кальцію і активації фосфоліпази С [6].

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що ЕДТА та його похідні, блокуючи вхід іонів кальцію в середину клітини, попереджають фрагментацію ДНК і розвиток апоптозу, а тималін діє односпрямовано, знижує готовність клітин до апоптозу шляхом впливу на внутрішньоклітинний кас-

кад реакцій пов'язаних з активацією протеїнкінази С.

Література

1. Барышников А. Ю., Е. П. Полосухина, Ю. В. Шишкин и др. Новый прогностический маркер острого лимфобластного лейкоза -антиген CD95 (FAS/APO-1) // Гематол. и трансфузиол. — 1998. — Т.43. — №2. — С.8-11.
2. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П., Ножинова О.А., Гейко О.А., Боброва Н.А. Роль протеинкиназы С в механизме действия регуляторных пептидов //Проблеми екології та медицини.— 1999. — Т.3. — №5. — С.50-54.
3. Кудрин А.В., Жаворонков А.А. Роль микроэлементов и кальция в регуляции апоптоза //Успехи современной биологии. — 1998. — Т.118. — вып.5. — С.623-629.
4. Левицкий Д.О. //Кальций и биологические мембраны. — М., — 1990.
5. Матышевская О.П. Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза //Укр. биохим. журнал — 1998. — Т.70. — №5. — С.15-29.
6. Новикова В.С. // Программированная клеточная гибель. — СПб., 1996.
7. Ножинова О.А. Изучение влияния пептидного комплекса тимуса на процессы апоптоза лимфоцитов периферической крови в условиях активации протеинкиназы С // Тез. доп. Физиология і патологія перекисного окислення, гемостазу та імуногенезу.— Полтава, 1998. — С.18.
8. Носов Н.В., Кожура В.Л., Новодержкина И.О. Об инициации апоптоза в гепатоцитах при длительной артериальной гипотензии в постреанимационный период //Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1998. — Т.125. — №3. — С.285-288.
9. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Макарков А.И. Апоптоз лимфоцитов — один из механизмов специфической иммунотерапии atopических заболеваний //Бюл. exper. биол. и мед.— 1998. — Т.125. — №.4.— С.434-436.
10. Робинсон М.В., Труфакин В.А. Апоптоз клеток иммунной системы //Усп. соврем. биол.— 1991.— Т.111.— №2.— С.246-259.
11. Серый С.В., Пасхина Т.Г., Дейгин В.И. и др. Влияние иммуноактивных пептидов тимуса на регенерацию рецепторов тимоцитов //Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов. — Пущино, 1990. — С.163.
12. Фримель Г. // Иммунологические методы.— М., 1987.
13. Azuna G., Onishi G., Sato v., Kizaki H. Effekts of protein Tyrosine Kinase inhibitors with. Different Modes of Action on Teroisomersse activity and Death of IL-2dependent CTLL-2 cell //J.Biochem.— 1995.— №118.— P.312-318.
14. Kizaki H., Tadakuma T. TyiTCyte apoptosis //Microbiol Immunol.— 1993. — №37.— P.917-925.
15. NishimotoY., Onishi Y., Sato Y. and Kizaki H. Protein syntehe-sis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cell //Bull. Tokyo dent. Coil.— 1997.— Vol.38.— N2.— P.133-138.

Summary

ACTION OF THE THYMUS PEPTIDE COMPLEX THYMALIN ON THE APOPTOSIS OF PERIFERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN EXTRACELLULAR CALCIUM BOUND

Nozhinova O.A., Vesnina L.E., Gubenko I.A., Berkalo L.V., Kaidashev I.P.

Influence of the thymus peptide complex — thymalin on the apoptosis of periferal blood lymphocytes in extracellular calcium bound by ethylendiaminetetra-

Acetas acid (EDTA) was studied.

The action of EDTA not intensification of apoptosis of periferal blood lymphocytes. Was supposed, the decreasing entrance calcium from extracellular environment by EDTA bound, prevent the development of apoptosis.

Thymalin one-sided decreasing cellular disposition for apoptosis by influence on intracellular reaction bound of proteinkinase C activation.

Ukrainian Ministry of the Health Public Service

Ukrainian Medical Stomatological Academy,

Shevchenko Str., 23, 36024, Poltava

Матеріал надійшов до редакції 30.08.99.