

ВПЛИВ ТКАНИННИХ ПЕПТИДІВ НА АКТИВАЦІЙНО-ІНДУКОВАНИЙ АПОПТОЗ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ

Ножинова О.А., Рябенко В.В.

Українська медична стоматологічна академія, Полтава

Внаслідок широкого використання пептидних препаратів в клінічній практиці в якості імуномодуляторів, особливої уваги набуває питання вивчення їх впливу на апоптоз імунокомпетентних клітин.

Виходячи з різниць в механізмах формування імунних порушень наприклад, імунодефіцит (негативні наслідки активації, апоптоз) або аутоімунітет, алергія (позитивна активація, дефект апоптозу), слід пам'ятати, що лікарські препарати, які здійснюють позитивний ефект при аутоімунній патології, можуть вести до загибелі клітин при імунодефіцитних станах [6]. Наприклад, було показано, що трипептид неоген підсилює апоптоз та знижує проліферацію стимульованих периферійних Т-клітин, що необхідно враховувати при його призначенні, як імуномодулятора [5]. Сьогодні за допомогою пептидів з відомою амінокислотною послідовністю вдається змінювати функційний стан клітин від анергії до активації різного ступеня [9,10,12].

Апоптоз залежить від співвідношення факторів, що викликають та попереджують його, а також від регуляторних внутрішньо-оклітинних механізмів [1].

Метою даної роботи було вивчення впливу тканинних пептидів тимусу (тімалін) та пептидного комплексу нирок (ПКН) на активаційно-індукований апоптоз периферійних лімфоцитів в умовах регуляції активності їх внутрішньооклітинних регуляторних систем.

Матеріали та методи. Досліджували комерційний препарат пептидів тимусу – тімалін (Росія, Санкт-Петербург) та пептидний комплекс нирок, що був отриманий авторським методом [7].

Мононуклеарні клітини виділяли з периферійної крові донорів, с табілізованої гепарином, за допомогою градієнту густини фіколурографін [4]. Клітини 5-7*10⁶/мл, інкубували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, ЮшМ II EPES, 100 мкг/мл гентаміцину при 37°C. В якості мітогена використовували фітогемаглютинін (ФГА) в кінцевій концентрації 10 мкг/мл. Дексаметазон, 4-фарбол-12-міріст-13-ацетат(ФМА), іонофор A23187 (Sigma) і натрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кис-

лоти (ЕДТА) (Serva) додавали до інкубаційного середовища в кінцевій концентрації $10^{-7}M$, 5нг/мл, 200 нМ, 9,2 мг/мл відповідно та обидва препарати пептидів в кінцевій концентрації 0,12 мкг/мл через 72 години від початку інкубації клітин з ФГА і продовжували інкубувати 24 години при $37^{\circ}C$.

Визначали абсолютну кількість клітин та відсоток мертвих клітин [4], експресію CD95, p53, bcl-2 імуноцитохімічним методом [8].

Результати досліджень оброблені статистично з використанням коефіцієнту Стьюдента.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень виявлено, що активація лімфоцитів периферійної крові ФГА призводила до помірного збільшення загальної кількості клітин, але при цьому підвищувався відсоток мертвих клітин (рис.1). Підсилювалась експресія p53, експресія CD95 і bcl-2 не змінювалась в порівнянні з клітинами, що культивували 72 години без додавання ФГА (інтактні клітини) (таб.1).

Таблиця 1.

Імуноцитохімічний аналіз активованих ФГА лімфоцитів периферійної крові при дексаметазон-індукованому апоптозі та дії ФМА.

Групи впливу	Вивчаємі маркери		
	CD95	p53	bcl-2
Інтактні клітини	16 ± 0,57	3,45 ± 0,3	29 + 1,5
Контроль ФГА	16,5 ± 0,96	8,2 + 0,22	23 + 1,4
Контроль тималін	16,5 + 0,65	7,2 + 0,36	32 + 1,6*
Контроль пептидів нирок	15,0 + 0,59	8,2 + 0,29	35 + 1,5*
Дексаметазон	24,8 + 0,81 *	16,5 + 0,46 *	16 + 1,4 *
Дексаметазон+тималін	16 + 0,57 **	9,1 + 0,36 **	35 + 1,7 **
Дексаметазон+пептиди нирок	13,5 ± 0,54**	7,5 ± 0,4 **	39,5 ± 1,5 **
ФМА	22 + 0,93 *	11,8 ± 0,49	16,5 ± 1,6 *
ФМА+тималін	18 + 0,63	5,6 + 0,31 ***	36 + 1,8 ***
ФМА+пептиди нирок	18,5 + 0,76	7 + 0,24 ***	34 + 1,7 ***

Примітка: n=6; * - p<0,05 у порівнянні з контролем ФГА; ** - p<0,05 у порівнянні з дією дексаметазону; *** - p<0,05 у порівнянні з дією ФМА.

При вивченні впливу тканинних пептидів на активовані ФГА лімфоцити периферійної крові виявлено зменшення відсотку мертвих клітин (рис.1). Експресія p53 залишалась на рівні активованих клітин. Відмічалось підсилення експресії bcl-2 (таб.1).

У наступній частині досліджень вивчали вплив ФМА та дексаметазону на активовані лімфоцити периферійної крові. Активна протеїнкіназа С за допомогою фарболового ефіру призводила до збільшення експресії CD95, зменшення експресії bcl-2 (таб.1). Спо-

стерігалось зниження абсолютної кількості клітин та підвищення відсотку мертвих клітин, що також відмічалось при дії дексаметазону на активовані клітини (рис. 1). Дексаметазон-оброблені активовані лімфоцити периферійної крові, мали високий рівень експресії CD95 і p53 та низький - експресії bcl-2 (таб.1).

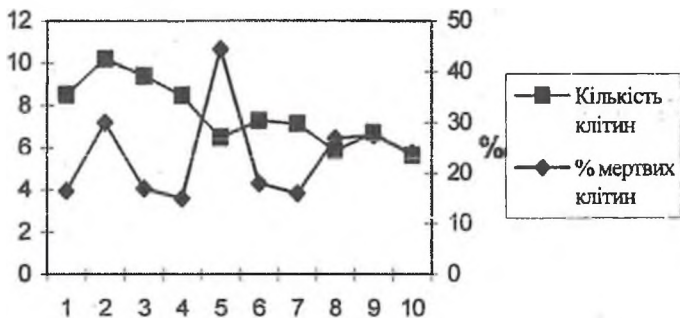


Рис.1.Зміни абсолютної кількості (10⁶/мл) та відсотку мертвих активованих лімфоцитів периферійної крові при дексаметазон-індукованому апоптозі та дії ФМА.

По осі абсцис: 1- інтактні клітини; 2- ФМА; 3- тімалін; 4- пептидний комплекс нирок; 5- дексаметазон; 6- дексаметазон і тімалін; 7- дексаметазон і пептидний комплекс нирок; 8- ФМА; 9- ФМА і тімалін; 10- ФМА і пептидний комплекс нирок.

Далі аналізували можливість модуляції процесів апоптозу в активованих лімфоцитах периферійної крові, оброблених дексаметазоном та ФМА при їхньому культивуванні в присутності тімаліна і ПКН. В цих умовах комплекси пептидів сповільнювали дексаметазон-індукований апоптоз активованих клітин, що підтверджувалось зменшенням відсотку мертвих клітин (рис.1). Тімалін та ПКН збільшували експресію bcl-2 молекул та знижували експресію CD95 і p53 (таб. 1). Дія пептидних комплексів в умовах активації протеїнкінази С не приводила до значних змін у кількості клітин та відсотку мертвих клітин (рис. 1). Подібно попередній серії, тімалін та ПКН збільшували експресію bcl-2 (таб. 1).

Для визначення механізмів, що задіяні в розвитку процесів апоптозу активованих лімфоцитів периферійної крові, досліджували вплив ЕДТА, іонофора A23187, тімаліну і пептидного комплексу нирок. Кальцієвий іонофор A23187 не викликав підвищення відсотку мертвих клітин, але знижував абсолютну кількість активованих клітин (рис.2). Цікаво, що у відповідь на обробку іонофором в комбінації з пептидними комплексами підвищувалася абсолютна кількість клітин та експре-

сія bcl-2 (таб.2). При інкубації з ЕДТА спостерігалось збільшення відсотку мертвих клітин (рис.2) та значне зниження рівня експресії bcl-2 (таб.2). Введення тканинних пептидів на фоні зв'язування позаклітинного кальцію ЕДТА, призводило до збільшення експресії bcl-2 (таб.2), зменшення відсотку мертвих клітин (рис.2).

Таблиця 2.
Імуноцитохімічний аналіз активованих ФГА лімфоцитів периферійної крові при іонофор-індукованому апоптозі та дії ЕДТА

Групи впливу	Вивчаємі маркери		
	CD95	p53	Bcl-2
Інтактні клітини	15,8 ± 0,6	4,0 ± 0,35	28 ± 1,5
Контроль ФГА	17,5 ± 0,9	8,6 ± 0,3	24 ± 2,0
Контроль тималін	16,0 ± 0,7	7,7 ± 0,4	33 ± 2,5*
Контроль пептидів нирок	14,8 ± 0,5	8,5 ± 0,5	36 ± 1,8*
Іонофор	18 ± 0,61	8,9 ± 0,53	24 ± 1,0
Іонофор+тималін	15 ± 0,73	5,9 ± 0,41	30 ± 1,7***
Іонофор+пептиди нирок	16 ± 0,57	5,8 ± 0,38	31 ± 1,6***
ЕДТА	16 ± 0,83	9,4 ± 0,32	17 ± 1,4*
ЕДТА+тималін	16,5 ± 0,76	9,0 ± 0,20	33 ± 1,2**
ЕДТА+пептиди нирок	15,5 ± 0,87	8,6 ± 0,3	32 ± 1,5**

Примітка: n=6; *, p<0,05 у порівнянні з контролем ФГА; **, p<0,05 у порівнянні з дією ЕДТА; ***, p<0,05 у порівнянні з дією іонофору.

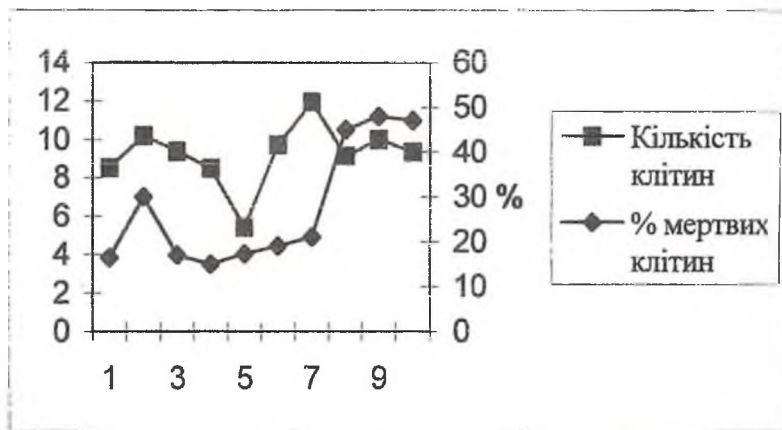


Рис.2. Зміни абсолютної кількості (10⁶/мл) та відсотку мертвих активованих лімфоцитів периферійної крові при іонофор-індукованому апоптозі та дії ЕДТА

Активация лімфоцитів периферійної крові різними стимулами (антигенами, мітогенами, деякими цитокінами та іншими факторами) може ініціювати смерть більшості активованих клітин. Апоптоз зрілих Т-лімфоцитів при їх активації отримав назву активаційно-індукованої загибелі

клітин. Було показано, що загибель клітин в стимульованих культурах мононуклеарів периферійної крові ФГА відбувається за механізмом апоптозу [3]. В наших дослідженнях активація лімфоцитів периферійної крові сприяла підвищенню абсолютної кількості клітин та разом з цим більш активному видаленню активованих лімфоцитів периферійної крові шляхом апоптозу, оскільки супроводжувалась підвищенням експресії p53.

Одним з механізмів апоптозу імункомпетентних клітин є взаємодія рецептора Fas(CD95 або APO-1) з його лігандом. Fas задіяний в само-знешкодженні активованих клітин і, таким чином, в пригніченні надлишкової імунної відповіді [11]. Як показали наші дослідження, при дії дексаметазону, фарболового ефіру підвищувалась загибель активованих клітин шляхом апоптозу, про що свідчило підвищення експресії CD95 та p53, а також зниження експресії bcl-2. Це підтверджувалось зменшенням абсолютної кількості клітин та підвищенням відсотку мертвих клітин.

Як відомо, процеси прогресії апоптозу модулюються за допомогою bcl-2 родини генів. Протоонкогени цієї родини існують в різних типах клітин у вигляді димерів і в залежності від комбінації між членами родини можуть виступати як інгібітори, так і промотори апоптозу. Такі з них, як Bcl-xl, Bax та сам Bcl-2 попереджують розвиток апоптотичних процесів [2]. В нашій роботі підсилення апоптозу у відповідь на дію ЕДТА, може бути пов'язано з пригніченням блокуючого впливу bcl-2, внаслідок зниження його експресії.

Дослідження впливу пептидних комплексів, що виділені із тканин, на апоптоз активованих ФГА лімфоцитів периферійної крові показало, що пептидні комплекси з тимусу та нирки не стимулюють апоптоз активованих клітин, що може бути пов'язано з високим рівнем експресії bcl-2 при їх дії. Вивчаємі тканинні пептиди ефективно запобігають розвитку апоптозу при дії апоптоз-стимулюючих чинників, внаслідок підсилення активності bcl-2 родини генів.

Отримані дані відкривають нові можливості в використанні досліджуваних пептидів для лікування захворювань, в патогенезі яких важливу роль відіграє активація апоптозу, що потребує подальшого спеціального вивчення.

Висновки:

1. Активація лімфоцитів периферійної крові сприяє підвищенню абсолютної кількості клітин та разом з цим більш активному видаленню активованих клітин шляхом апоптозу.

2. Під дією апоптоз-стимулюючих чинників зростала загибель активованих клітин шляхом апоптозу, внаслідок зниження експресії bcl-2, а також підвищення експресії CD95 і p53 під дією дексаметазону та ФМА.

3. Тканинні пептиди не стимулюють активаційно-індукований апоптоз лімфоцитів периферійної крові та ефективно запобігають його розвитку внаслідок підсилення активності bcl-2 родини генів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кайдашев И.П. Апоптоз как общебиологический процесс // Проблемы экологии та медицины.-1998.-Т.2,№5-6.-С.9-13

2. Кайдашев І.П., Ножинова О.А., Рябенко В.В. Необхідність комплексного підходу до вивчення апоптозу лімфоїдних клітин // Імунологія та алергологія.-2000.-№4.-С.

3. Лепнина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В. и др. Краткосрочная стимуляция in vitro как модель активационного апоптоза периферических Т-клеток //Иммунология.- №1.-2000.- С.30-32

4. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса.-М.:Мир,1990.-395с.

5. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеева М.И., Ярилина А.А., Ярилин А.А. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т- лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология.- 1999.- №2.- С. 20-23;

6. Сепиашвили Р.И. и соавт. Апоптоз в иммунологических процессах //Аллергология и иммунология.-2000.-т.1,№1.-С.15-23

7. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має ре-генераторну та модулюючу дію / А.С. №940520.

8. Hartmann K.-U. Immunohistology.In: Lefkovits I. Ed. Immunology Methods Manual. London: Academic Press, 1997:1227-37.

9. Iwabushi K., Nakayama K., Mc Coy R.L., Wang F., Nishimura T., Habu S., Murphy K.M., Loh D.Y. Cellular and peptide requirements for in vitro clonal deletion of immature thymocytes// Proc. Natl. Acad Sci.-1992.-89:19.-P.9000-4;

10. Levelt C.N., Mizoguchi E., Huang X., Zacks R., Bhan A.K., Tonegawa S. Inhibition of intrathymic T cell development by expression of a transgenic antagonist peptide //Proc. Natl. Acad Sci.-1998.-95:24.-P.14349-54.]

11.Nagata S., Coldstein P. The Fas death factor//Cell. 1995. V.267.P.1449-1456

12.Nishimura Y,Chen Y.Z.,Kanai T.,Yokomizo H.,Matsuoka T.,Matsushita S.//Modification of human T-cell responses by altered peptide ligands: a new approach to antigen specific modification. - Intern Med.-1998.-37.-P.804-17.