

УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06  
 УЧАСТЬ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ НИРОК В РЕГУЛЯЦІЇ  
 ЕКСПРЕСІЇ ДЕЯКИХ РЕЦЕПТОРІВ ІМУНОЦИТІВ.

Л.Е.Весніна, І.П.Кайдашев.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава.

Велика кількість досліджень не дозволяє ставити під сумнів існування особого класу біологічно активних молекул - регуляторних пептидів (РП). Створені в процесі еволюції як перші координатори життєдіяльності, які мають багатосторонню гнучкість і легко синтезуються [19], пептиди стали носіями та передавачами міжклітинної інформації [1,2].

Так, зокрема, виділені із різних органів у вигляді сукупного клітинного пула, пептиди здійснюють перенос специфічної інформації, необхідної для нормального функціонування, розвитку і взаємодії клітинних популяцій [7]. РП відносяться до медіаторної ланки системи біорегуляції і приймають участь у механізмі міжгенних взаємодій на рівні популяцій спеціалізованих клітин [8,9].

РП мають виражений імуномодулюючий, регенераторний вплив, і багато з них є органоспецифічними. РП, виділені з імунокомпетентних клітин, здійснюють виражений вплив на проліферацію та диференціювання Т- і В-лімфоцитів, посилюють експресію і щільність рецепторів [7].

Деякі пептидні комплекси можуть відновлювати стан природної імунологічної толерантності [18,20], впливати на активність імунних клітин, модулювати співвідношення Т-хелперів/індукторів (ОКТ 4+) і Т-супресорів/кілерів (ОКТ 8+) [3].

При дослідженні інших органоспецифічних пептидів, виділених, наприклад, з коркової речовини нирок, було встановлено відновлення імунологічної толерантності лабораторних тварин до суміші тисанийних антигенів і припущена участь РП в процесі взаємодії Т-клітинного рецептора з його лігандами [4].

Зворотній зв'язок між системою імунитету та пептиднергічною системою регуляції може відбуватися через тимус, бурсу Фабриціуса та наявність циркулюючих аутоантитіл до периферичних пептидів [5,20].

Приведені вище факти, безумовно, свідчать про наявність

взаємов"яку між комплексами тканинних пептидів і діяльністю системи імунітету. Але залишається невідомим, які фактори впливають на зустріч і формування комплексу пептид-імуноцит, які мембранні структури адійснюють рецещію?

Метою нашого дослідження стало вивчення впливу пептидного комплексу коркової речовини нирок на експресію рецепторів лімфоцитів.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

В дослідях використовували кров адорових донорів, стабілізовану гепаріном (25 ЕД/мл). Інкубацію з пептидним комплексом, видобутим з коркової речовини нирок за оригінальною методикою [11], проводили на протяжі 60 хвилин при температурі 37°С. Дозу пептидів використовували з розрахунку 0,05 мкг/мл; 0,12 мкг/мл і 0,5 мкг/мл. В якості контролю використовували фізіологічний розчин у відповідному об'ємі.

Суспензію мононуклеарів периферичної крові видобували за стандартною методикою в градієнті густини фіколл-триомбрат з наступним відмиванням в фосфатно-сольовому буфері (буфер Дальбекко А), рН 7,2 [14]. Кількість клітин в суспензії при підраховуванні в камері Горяєва в середньому становила  $1-1,5 \cdot 10^6$  в 1 мл [6].

За допомогою реакції непрямої імуофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл ІСО-86 (CD 4) проти Т-хелперів/індукторів, ІСО-31 (CD 8) проти Т-супресорів/цитотоксичних клітин, ІСО-90 (CD 3) проти загальних Т-клітин, ІСО-91 (CD 22) проти В-лімфоцитів, ІСО-1 (HLA-Dr) проти активних Т-клітин, В-лімфоцитів, моноцитів, визначали відповідні фракції лімфоцитів. В якості других антитіл використовували антитіла, пов'язані з ФІЦ, проти F(ab)<sub>2</sub>-фрагментів. Реєстрацію зеленої флюоресценції флюоресцеїніаціоціанату (ФІЦ) проводили на мікроскопі "Льюам-РВ". Результати оцінювали за яркістю флюоресценції: власну флюоресценцію клітин вважали негативною реакцією (-); виражену флюоресценцію - позитивною реакцією і поділяли в балах (+; ++; +++) [10]. За характером флюоресценції виділяли дифузний тип, коли рівномірно світилась уся клітина; дифузну флюоресценцію мембрани; групування рецепторів у вигляді окремих кластерів, кепів і петчів; місяцеподібне розташування. Флюоресцентна мікроскопія мембранних маркерів

клітин поєднувалась з морфологічним контролем у прохідному світлі.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Використання моноклональних антитіл (МКА) проти CD 3 показало значне підвищення відсотку клітин, які світяться з 66% у контрольній групі до 78% при використанні пептида у дозі 0,05 мкг/мл і 100% в дозі 0,5 мкг/мл. Відповідно, середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) збільшувався з 1,17 у контрольній групі до 1,24 і 1,69. Характер флюоресценції також змінився - збільшився відсоток дифузної флюоресценції з 12% у контролі до 26% і 33% (відповідно доза пептиду складала 0,05 мкг/мл і 0,5 мкг/мл). Цікавим є поява кеппінгу середньої інтенсивності флюоресценції (++) при інкубуванні крові з пептидом в дозі 0,05 і 0,5 мкг/мл, підвищення майже в два рази відсотка клітин з кластеризацією рецепторів (++) та кеппінгом сильною флюоресценції (+++).

Дослідження експресії CD 4 дозволило виявити зміни у флюоресценції клітин, які інкубували з пептидом в дозі 0,05 і 0,12 мкг/мл. Підвищувався загальний відсоток клітин з флюоресценцією з 49% до 57% і 55% (СЦК 0,73 і 0,76 проти 0,58 початкового). Звертає на себе увагу збільшення кластеризації рецепторів слабого та середнього ступеня флюоресценції (0,05 мкг/мл) та поява флюоресценції у вигляді петчів (+, ++).

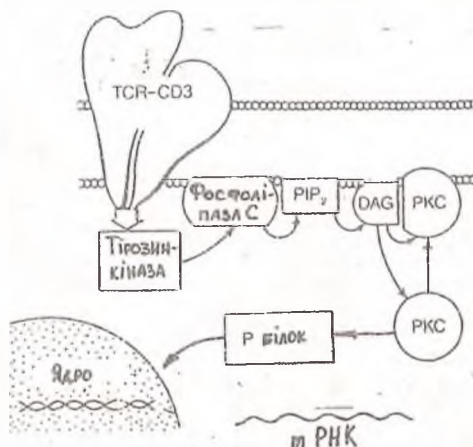
Маркування клітин МКА проти CD 8 виявило збільшення загального відсотку клітин з флюоресценцією при інкубуванні з пептидом в дозі 0,05 мкг/мл і зменшення в дозі 0,5 мкг/мл. Збільшився відсоток клітин з кеппінгом рецепторів слабого ступеня флюоресценції (+) і зменшився - сильного ступеня (+++). Інкубування крові з пептидом в дозі 0,5 мкг/мл викликало значне збільшення петчів (++,+++).

При використанні МКА проти HLA-Dr збільшився відсоток клітин з флюоресценцією при використанні дози пептиду 0,12 і 0,5 мкг/мл. Є характерним виражене підвищення кеппінгу та кластеризації рецепторів (++).

Натомість, при дослідженні мембранних маркерів CD 22 відмічалось зниження відсотку клітин з флюоресценцією.

Рецепторний апарат клітин - динамічна, лабільна і високо-коселективна система, яка забезпечує як комунікацію клітин

зовнішнім середовищем, так і регуляцію їх функціональної активності. Дія на клітинні ряди біологічно активних сполук - гормонів, антигенів, лектинів, пов'язана з утворенням агрегованих ліганд-рецепторних комплексів (кластерів мембранних рецепторів) та їхнім перерозподілом у площині мембрани і трансмембранним переміщенням [13]. Згідно наших досліджень, під впливом пептидного комплексу широку спостерігалась зміна експресії специфічних рецепторів лімфоцитів, перегрупування (келпінг, петч, місяцеподібне розташування) та поява нових кластерів.



Мал. 1. Спрощена схема активації лімфоцитів за допомогою TCR-CD 3 комплексу:

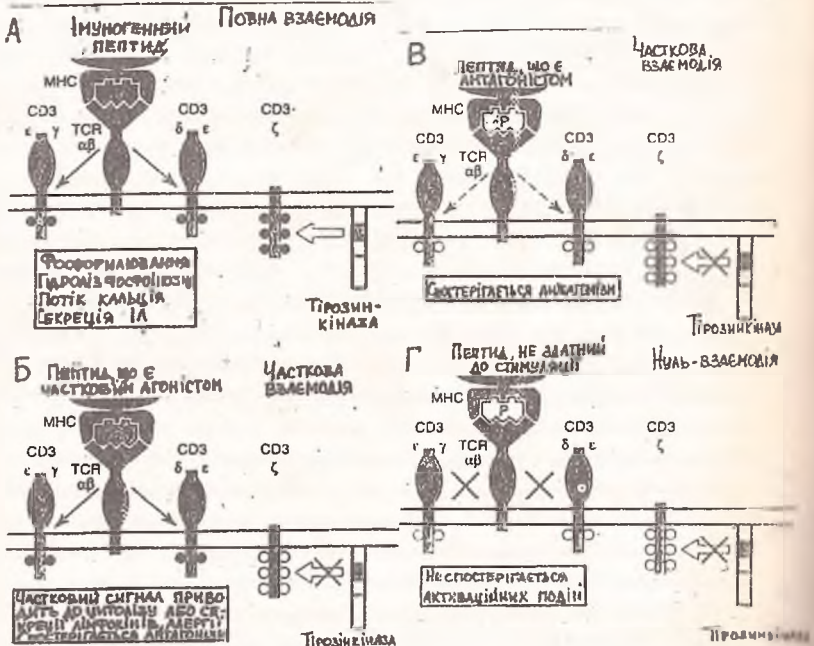
PIP - фосфатиділінозітол 4,5 біфосфат;

DAG - діацилгліцерол; PKC - протеїнкіназа С.

Неважко помітити, що дія пептидного комплексу була спрямована на рецепторні структури переважно Т-клітин (CD 3, CD 4, CD 8, HLA-Dr). Така дія супроводжувалась дозозалежним посиленням їх експресії та зміною функціонального стану.

Враховуючи, що CD 3 приймає участь у формуванні Т-клітинного рецептора (TCR), вірогідно припустити, що посилення експресії CD 3 супроводжується подібними змінами стану TCR (Мал. 1) [15]. Такі зміни приводять до посилення експресії молекул HLA-Dr на мембранах лімфоцитів, що є характерним для активованих Т-клітин. Очевидно, такі зміни більш властиві для

T-хелперів/індукторів (CD 4), ніж T-супресорів/ефекторів (CD 8). Очевидно, це пояснюється різним характером взаємодії пептидів з цими клітинами (пептиди представлені T-хелперам у контексті ГРГС II класу, а T-супресорам - ГРГС I класу). У такому випадку задіюється відкритий питання: взаємодіють пептиди з T-клітинами самостійно чи у контексті молекул ГРГС? Якщо пептид взаємодіє з молекулою ГРГС, то як введений у середовище вільний пептид взаємодіє з молекулою ГРГС, в яку у фізіологічних умовах вже вбудований пептид? На це запитання можуть дати відповідь роботи Баєвського Інституту Імунології, в яких показано, що на поверхні антиген-презентуючих клітин майже завжди існують (особливо в умовах низьких температур) вільні від пептида молекули ГРГС, але вельми не стабільні. Стабілізація настає після взаємодії з пептидами. Утворений комплекс пептид-ГРГС може взаємодіяти з великою кількістю TCR.



Мал. 2. Модель презентації пептидних лігандів, які призводять до різних відповідей T-клітинами.



отже має мале число лігандів взаємодіє з великим числом рецепторів [22].

Взаємодія пептид-ІКРС комплексу з TCR може приводити до різних наслідків (Мал. 2) [16], від повної активації T-клітин до нуль-реакції.

Таким чином, комплекс пептидів коркової речовини нирок може викликати зміни функціонального стану T-клітин, яке супроводжується посиленням експресії TCR-CD 3 комплексу, утворенням кластерів мембранних рецепторів. При цьому активаційні події стосуються переважно T-клітин, які несуть CD 4, але не CD 8. CD 22-позитивні клітини відповідають зниженням експресії у відповідь на дію пептидного комплексу.

Ці дані свідчать, що тканинні пептидні комплекси адатні змінювати стан клітин імунної системи, адіюючи зв'язок між спеціалізованими паренхіматозними клітинами та імуніцитами.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Алмарин И.П. Перспективы практического применения и некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов //Вопр. мед. химии.- 1984.- N 3.- С. 2-7.
2. Алмарин И.П., Обухова М.Д. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность //Биохимия. - 1988.- В.51, N 4. - С. 531-545.
3. Иммунология гормонов тимуса /Гриязевич Ю.А., Чеботарев В.Ф., Никольский И.С. - К.: Здоров'я, 1989.- С. 125-149.
4. Кайдашев И.П. Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите //Физиол. журн.- 1993.- 39, N 5-6.- С. 52-56.
5. Кайдашев И.П., Катрушев А.В., Цебринский О.И., Милденко В.И. К механизму действия тканевых полипептидов //Физиология и патология гемостаза: Сб. тез. Всесоюз. конф.- Полтава, 1991.- С. 32-34.
6. Лимфоциты. Методы. /Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.- 392 с.
7. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем - цитокедины //Усп. совр.биологии.-1983.-96. N 6.- С. 339-352.
8. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Кожемякин А.Л., Кожемякин Л.А. Влияние полипептидного фактора тимуса на систему циклических нуклеотидов иммунокомпетентных клеток //Вопр. мед. химии.- 1982.- N 4.- С. 114-118.
9. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Кузник Б.И. и др.Влияние полипептидов, выделенных из костного мозга, на иммунитет и гемостаз //Гематология и трансфузиология.- 1984.- N 4.- С. 35-37.

- 10.Современные проблемы ревматологии: Науч. обзор /Под ред. В.А.Насоной.- М., 1974.
- 11.Способ одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію /А. с. N 94052089.
- 12.Структурные основы действия пептидных и белковых иммунорегуляторов. /Под ред. Р.И.Чипенса.- Рига: Зинатне, 1990.- 260 с.
- 13.Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. Кластеры мембранных рецепторов и их движение в клетках //Успехи совр. биологии.- 1990.- Т. 109.- N 2.- С. 206-218.
- 14.Boyum A. //Scan.J.Clin.Lab. Invest.- 1968.-21. - Suppl.-97.- p.77.
- 15.Damjanovich S., Szollosi J., Tron L. Transmembrane signalling in T cells //Immunol. Today.- 1992.- V.13, N 8.- P. A12-A15.
- 16.Evavold B.D., Sloan-Lancaster J., Allen P.M. Ticking the TCR: selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands //Immunol. Today.- 1993.- V. 14, N 12.- P. 602-612.
- 17.Leibnitz R. The inhibitory role of self peptides in allogenic responses //Ann. Report Basel Inst. for Immunol.- 1995.- P. 41
- 18.Nadel J.A. Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation in airways //Allergologie.- 1989.- 12, Sondernum.- P. 136-138.
- 19.Roth Y., Le Roith D., Collier E.S. et al. Evolutionary origins of neuropeptides hormones and receptors; possible applications to immunology //J. Immunology.- 1985.- 135, N 2.- P. 770-776.
- 20.Schild H., Rotzschke O., Kalbacher H., Rammensee H.-G. Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation //Science.- 1990.- 247, N 4960.- P. 1587-1589.
- 21.Stotz S., Palmer E. How do TCRs recognize antagonistic peptides? //Ann. Report Basel Inst. for Immunol.- 1995.- P. 41.
- 22.Valitutti S., Lanzavecchia A. A kinetic model for TCR agonism and antagonism //Ann. Report Basel Inst. for Immunol.- 1995.- P. 40-41.