

Д.Э. Веснина

## ЭФФЕКТ РЕМОДУЛЯЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕПТИДНЫМ КОМПЛЕКСОМ ПОЧЕК

Украинская медицинская стоматологическая академия, Полтава, Украина

**Реферат.** В работе изучено влияние пептидного комплекса, выделенного из коркового вещества почек на восстановление рецепторного профиля мембран лимфоцитов, предварительно обработанных трипсином. Согласно полученным результатам, предварительная обработка лимфоцитов трипсином привела к достоверному снижению экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, CD3, CD4 и CD8, за исключением CD72. Добавление в среду инкубации пептидного комплекса почек приводило к восстановлению экспрессии поверхностных иммуноглобулинов, CD3, CD4, дальнейшее увеличение уровня флюоресценции CD72+ клеток. Наблюдалось повышение подвижности рецепторов в плоскости мембраны с формированием группировок в виде цепочек, кластеров и пэтчей. Предполагается, что воздействие пептидного комплекса реализуется на уровне клеточной мембраны, в результате чего на поверхности клетки начинают экспрессироваться рецепторы, до того погруженные в мембрану. Вторым возможным механизмом действия пептидного комплекса является ускорение сборки и транслокации на клеточную мембрану рецепторных молекул.

**Ключевые слова:** рецепторы лимфоцитов, экспрессия, пептиды, трипсин

Поверхностный рецепторный аппарат клетки является основой важнейших гомеостатических механизмов клеточного и субклеточного уровней организации, который обеспечивает восприятие и передачу информации клетке для формирования адекватной ответной реакции при воздействии на нее различных сигналов. Наиболее широкий спектр рецепторов, по-видимому, наблюдается у лимфоидных клеток [7]. Эта особенность позволяет им обеспечивать как коммуникацию клетки с внешней средой, так и поддержание ее функциональной активности на должном уровне.

Способность изменять состояние рецепторного аппарата иммунокомпетентных клеток является важнейшим аспектом действия многих препаратов с иммуномодулирующими свойствами, и, в частности, особого класса веществ полипептидной природы, объединенных общим названием «регуляторные пептиды». Внимание исследователей к проблеме изучения регуляторных пептидов (РП) можно объяснить не только их ведущей ролью в процессе становления и регуляции иммунитета, в патогенезе заболеваний иммунной природы, но и широким применением в клинике в качестве иммуномодулирующих препаратов.

Так, пептидный комплекс тимуса — тималин при взаимодействии с поверхностной мембраной Т-лимфоцитов активирует экспрессию специфических рецепторов, повышает их функциональную активность [33]. Другой пептидный препарат тимуса — тактивин и миелопид представляющий собой низкомолекулярные пептиды костного мозга, вызывают снижение экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов В-клеток здо-

ровых доноров, больных хроническим лимфолейкозом, В-клеточной лимфоидной лимфосаркомой [5]. Изучение другого пептидного комплекса, полученного из коркового вещества почек, позволило отметить усиление экспрессии поверхностных антигенных рецепторов преимущественно Т-клеток (CD3, CD4, CD8) и HLA-DR [2].

Однако, остается невыясненным механизм такого влияния РП на рецепторный аппарат иммунокомпетентных клеток. В предыдущих исследованиях [1, 2] было высказано предложение, что пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек, оказывает мембранотропное действие на лимфоциты, модулируя экспрессию поверхностных антигенных детерминант. В организме иммуноглобулины, рецепторы Т-клеток, другие рецепторные клеточные структуры лимфоидных и нелимфоидных тканей организма могут подвергаться гидролизу под действием таких протеаз, как плазмин, тромбин [9]. В настоящей работе мы поставили цель изучить, как влияет пептидный комплекс на восстановление рецепторного профиля мембран лимфоцитов, предварительно обработанных сериновой протеиназой — трипсином.

**Материал и методы**

В работе использовали пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек по оригинальной методике [10]. Согласно методу, экстракцию тканей проводили органической галогенсодержащей кислотой в присутствии катионов двухвалентных металлов с последующим

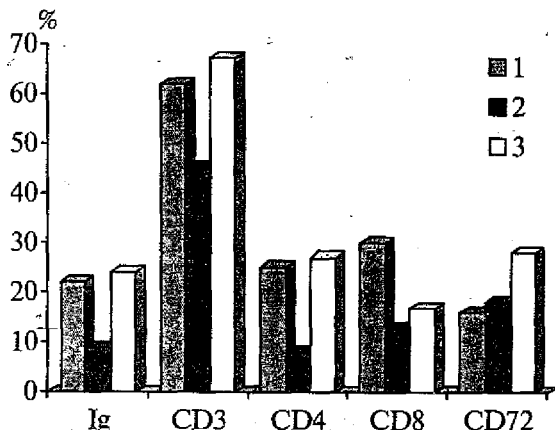


Рис. 1. Влияние пептидного комплекса почек на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов, предварительно обработанных трипсином. По оси ординат — процент клеток с флюоресценцией; по оси абсцисс — распределение по группам: 1 — исходный уровень флюоресценции, 2 — уровень флюоресценции при добавлении в суспензию лимфоцитов трипсина, 3 — уровень флюоресценции при добавлении в суспензию предварительно обработанных трипсином лимфоцитов пептидного комплекса почек.

осаждением пептидов органическим растворителем с добавочной очисткой путем гельфильтрации для выделения пептидов с молекулярной массой меньше 10 кД. Дозы пептидного комплекса, вносимые в инкубационную среду составили 0,05; 0,12 и 0,5 мкг/мл. Трипсин («Sigma», США) использовали в концентрации 1 мг/мл [5].

Сусензию мононуклеаров получали из периферической крови здоровых доноров, стабилизированной гепарином (25 ЕД/мл) по методу Веуот Г43 путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-триомбразт ( $d=1,077 \text{ г/см}^3$ ) с последующим отмыванием в фосфатно-солевом буфере при pH 7,2. Лимфоциты в конечной концентрации (1-1,5)·10<sup>6</sup>/мл культивировали в среде 199 («Sigma», США) с 10% инактивированной телячьей сывороткой («Bio Mark Inc», Украина). Уровень жизнеспособности клеток в тесте с трипановым синим составил в среднем 95%.

Инкубацию клеток с трипсином проводили в течение 1 часа при 37°C. В опытных пробах после отмывания мононуклеаров путем центрифугирования в фосфатно-солевом буфере дополнительно вводили пептидный комплекс почек и продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 1 часа. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буфер.

Экспрессию поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов определяли в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием антител против иммуноглобулинов А, М, G («Sapofl», Франция). В тесте непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител LT3 (CD3), LT4 (CD4), LT8 (CD8), 3F3 (CD72) выявляли экспрессию соответствующих антигенных детерминант мононуклеарных клеток. В качестве вторых антител использовали анти-F(ab<sub>2</sub>)- антитела, конъюгированные с флюоресцеиниаотиоцианатом (ТОО «Сорбент», Россия).

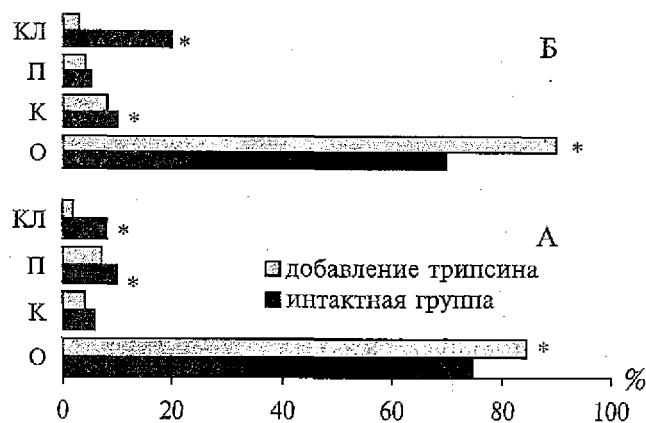


Рис. 2. Мембранная флюоресценция лимфоцитов, несущих поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы (А) и CD8+ (Б) -лимфоцитов в интактной группе и при добавлении трипсина

Здесь и в рис.3 по оси ординат — процент клеток с флюоресценцией; по оси абсцисс — виды перегруппировок рецепторов: О — клетки, у которых отсутствует флюоресценция, К — кэпы, П — пэтчи, КЛ — кластеры.

\* — изменения достоверны по отношению к интактной группе,  $p < 0,05$ .

Экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов оценивали по изменению уровня и характера флюоресценции соответствующих моноклональных антител. Результаты оценивали на люминесцентном микроскопе «Люам Р-8», подсчитывая число светящихся клеток на 200 клеток и выражали в процентах. При оценке результатов учитывали общее число светящихся клеток, дифференцировали степень флюоресценции, выделяя слабую, среднюю и сильную степени в баллах, типы перегруппировок рецепторов в плоскости мембраны в виде кэпов, кластеров, пэтчей. Морфологический контроль клеток осуществляли в фазовом контрасте. Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

#### Результаты и обсуждение

Предварительная обработка лимфоцитов трипсином в дозе 1 мг/мл в течение 1 ч привела к достоверному снижению экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов на 13%, CD3 на 19%, CD4 на -17%, CD8 на 19%. (рис 1). На поверхности CD72<sup>+</sup> клеток изменения уровня экспрессии рецепторов не наблюдалось.

Следует отметить, что помимо уменьшения уровня флюоресценции нами была отмечена перегруппировка рецепторов в плоскости мембраны: уменьшение числа пэтчей и исчезновение кластеров поверхностных иммуноглобулинов, подобно этому снималось образование кэпов и кластеров CD4 и CD8 (рис.2). В этой серии наблюдалось снижение интенсивности флюоресценции клеток, что, в целом, свидетельствует об уменьшении плотности рецепторов на мембране в результате действия трипсина.

В предыдущих исследованиях пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек оказывал в опытах *in vitro* стимулирующее действие на экспрессию поверхностных рецепторов преимущественно Т-клеток [2]. В данном исследовании добавление в среду инкубации пептидного комплекса почек также приводило к восстановлению исходного уровня экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, CD3, CD4, вызывало тенденцию к увеличе-

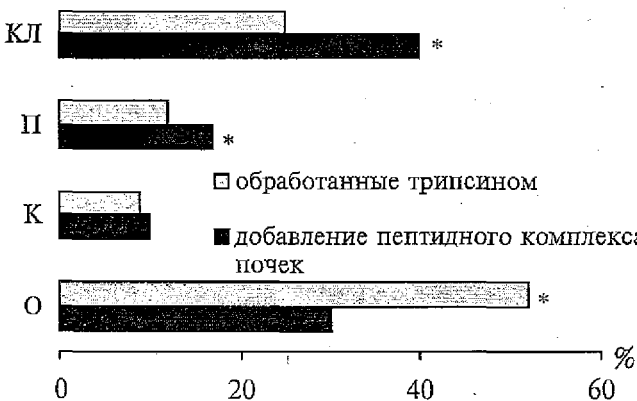


Рис. 3. Мембранная флюоресценция CD3+ —лимфоцитов, обработанных трипсином и при добавлении пептидного комплекса почек.

\* — изменения достоверны по отношению к группе с добавлением пептидного комплекса почек,  $p < 0,05$ .

нию экспрессии CDS (рис. 1). Клетки, несущие антигенную детерминанту CD72, под действием пептидного комплекса увеличивали уровень флуоресценции с 18% до 31%. Мы наблюдали и повышение подвижности рецепторов в плоскости мембраны с формированием группировок. Для CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> -клеток отмечено увеличение образования кэпов, кластеров и пэччей, для клеток, несущих поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы-кэпов и пэччей (рис. 3).

Использованный нами а-трипсин (ЕС 3.4.21.4) принадлежит к классу сериновых протеиназ, обладающих способностью расщеплять пептидные связи, образованные лизином и аргинином. Исследованные нами рецепторы CD3, CD4, CD8 и мембранные иммуноглобулины по своей структуре относятся к суперсемейству иммуноглобулинов, и, следовательно, могут подвергаться воздействию такой протеиназы, как трипсин. Исключение составляет молекула CD72, которая относится к лектинам С-типа [8].

Таким образом, пептидный комплекс, полученный из коркового вещества почек, способствует восстановлению экспрессии рецепторов лимфоцитов, удаленных трипсином с клеточной поверхности. По нашему мнению, воздействие пептидного комплекса реализуется на уровне клеточной мембраны, в результате чего на поверхности клетки начинают экспрессироваться рецепторы, до того погруженные в мембрану. Вторым возможным механизмом действия пептидного комплекса является ускорение сборки и транслокации на клеточную мембрану рецепторных молекул, что подтверждается усилением под действием препарата экспрессии молекул CD72, которые не подвергаются расщеплению трипсином.

L.E. Vesnina

### Modulatory Effect of Renal Peptide Complex on Membrane Receptors of Lymphocytes

The present work was designed to study an effect of renal peptide complex, obtained from adrenal cortical tissue on renewal of membrane receptors profile in lymphocytes predominantly exposed to trypsin. As was shown, exposition to proteolytic enzyme led to statistically significant lowering in expression of CD3, CD4 and CD8 types of lymphocyte membrane receptors, but not CD72 type. Adding the renal peptide complex to cultural medium caused enhancement of CD3 and CD4 membrane immune globulins expression and led to further fluorescence elevation produced by CD72-positive cells. Intramembrane mobility of receptors was increased; its formed kepi-like groups, clusters and patches. The results obtained allowed authors to suppose that action of the renal peptide complex is realized at the membrane level. The latter led to expression of the receptors, which were submerged previously into deeper membrane sublayers. Another possible mechanism of the renal peptide complex action may be connected with acceleration of synthesis and

translocation of receptor proteins into the lymphocyte membrane. (Arch. Clin. Exp. Med.— 2000.— Vol. 9, № 3. — P. 353-355).

**Key words:** lymphocyte receptors, expression, peptides, trypsin

Л.Е. Веснина

### Эффект ремодуляції поверхневих рецепторів лімфоцитів пептидним комплексом нирок

В роботі вивчався вплив пептидного комплексу, отриманого з кіркової речовини нирок на відновлення рецепторного профілю мембран лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином. Як показали дослідження, попередня обробка лімфоцитів трипсином привела до вірогідного зниження експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3, CD4 і CD8, за винятком CD72. Додавання в середовище інкубації пептидного комплексу нирок приводило до відновлення експресії поверхневих імуноглобулінів, CD3, CD4, подальше збільшення рівня флуоресценції CD72+ клітин. Спостерігалось підвищення рухливості рецепторів в площині мембрани з формуванням груп у вигляді кепів, кластерів і пэччей. Можливо, дія пептидного комплексу реалізується на рівні клітинної мембрани, в результаті чого на поверхні клітини починається експресія рецепторів, до того заглиблених в мембрану. Другим можливим механізмом дії пептидного комплексу є прискорення збірки і транслокації на клітинну мембрану рецепторних молекул. (Арх. клін. експ. мед.— 2000.— Т.9, № 3.— С. 353-355).

### ЛІТЕРАТУРА

1. Веснина Л.Е. Изменение экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия а-интерферона // Проблемы экологии та медицини.—1997,— Т.1, N 1-2.— С.32-34.
2. Веснина Л.З., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лейкоцитов /Иммунология.— «1998.— N 4.— С. 13-16.
3. Иммунобиология гормонов тимуса /Гриневич Ю.А., Чеботарев В.Ф. Никольский И. С. — К.; Здоров'я, 1989.— С. 125-149.
4. Лимфоциты. Методы. /Под ред. Дж. Клауса.— М.: Мир, 1990.—392 с.
5. Луцк М.Д., Е.Н. Панасюк, Луцк А.Д. Лектины.— Львов: Вища школа, 1981.— 155 с.
6. Маркова Т.П. Сравнительное изучение влияния миелогида и тактивина на рецепторы В-клеток. Иммунология.— 1995.— N 1.—С. 59-61.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.М. Иммуногенетика и искусственные антигены. М.: Медицина, 1983.— 256 с.
8. Сидоренко С.П. Поверхностные антигены клеток человека. систематизированные международными рабочими совещаниями по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека // Иммунология та алергологія.— 1998.— N 3,— С. 16-38.
9. Скворцов В.Т. Влияние вариабельных пептидов (аффимеров) легких цепей иммуноглобулинов человека на синтез ДНК лимфоидными клетками in vitro Иммунология.— 1995.— N 8.— С. 18-21
10. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію —А. с. N 94052069.

Надійшла до редакції: 15.01.2000.