

АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ

ВЕСНІНА ЛЮДМИЛА ЕДУАРДІВНА

УДК 612. 112: 615. 36

ФІЗІОЛОГІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ  
МЕМБРАН ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ПЕПТИДНИМ  
КОМПЛЕКСОМ НИРОК

14.03.03 – нормальна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора медичних наук

Київ – 2006

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Вищому державному навчальному закладі України „Українська медична стоматологічна академія” МОЗ України, м. Полтава.

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор

**Кайдашев Ігор Петрович,**

Українська медична стоматологічна академія,  
завідувач Центральної науково-дослідної лабораторії,  
завідувач кафедри внутрішніх хвороб з доглядом за  
хворими

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, старший науковий співробітник

**Горбань Євген Миколайович,**

Інститут геронтології АМН України,  
керівник лабораторії радіології;

доктор медичних наук, професор

**Самохвалов Валерій Гаврилович,**

Харківський державний медичний університет МОЗ України,  
завідувач кафедри нормальної фізіології;

доктор біологічних наук, професор

**Рибальченко Володимир Корнійович,**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Кабінету міністрів України,  
завідувач відділу цитофізіології

Провідна установа: Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України,  
кафедра нормальної фізіології

Захист відбудеться “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2006 р. о \_\_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.551.01 при Інституті геронтології АМН України за адресою: 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту геронтології АМН України (04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67).

Автореферат розісланий “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2006 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат медичних наук

Потапенко Р.І.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Взаємодія нервової, імунної та ендокринної систем регуляції є основою механізмів адаптації організму до дії фізіологічних стимулів та патогенних факторів [Абрамов А.В., Колесник Ю.М., 2004]. Ця взаємодія спрямована на підтримку цілісності багатоклітинного організму, забезпечує тонку координацію процесів біосинтезу, обміну та відтворення генетичної інформації [Хавинсон В.Х. и др., 2002], а її підґрунтя є єдиний механізм хімічної регуляції, який забезпечує продукцію та секрецію низки клітинних медіаторів – пептидних гормонів і цитокінів (інтерлейкінів, хемокінів, факторів росту), об'єднаних назвою “регуляторні пептиди” [Гомазков О.А., 1991; Кайдашев І.П., 2000].

Регуляторні пептиди (РП) відіграють важливу роль у підтримці гомеостазу, бо беруть безпосередню участь у формуванні компенсаторно-приспосувальних реакцій організму на стресорний вплив та порушення гомеостатичного балансу [Кузник Б.И. и др., 1998; Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., 2001; Хавинсон В.Х. и др. 2002; Хантов Р.М., Пинегин Б.В., 2003]. Основу пептидергічної регуляції складає загальний тип отримання та переносу інформації на субклітинному, клітинному та тканинному рівнях, бо еволюційно саме за пептидними молекулами була закріплена функція носіїв та передавачів міжклітинної інформації [Ашмарин И.П., Обухова М.Д., 1986; Ашмарин И.П. и др., 1989; Хавинсон В.Х. и др., 2002].

Із концепцією пептидергічної регуляції цілком узгоджуються біологічні ефекти пептидного комплексу, отриманого з кіркової речовини нирок (ПКН) за оригінальним методом [Кайдашев І.П., 1992-2000]. ПКН впливає на функціональний стан нирок, зокрема процеси реабсорбції і секреції [Квак О.В.; Кайдашев І.П., 2000], здійснює модулюючий вплив на процеси апоптозу лімфоцитів периферійної крові [Ножинова О.А., 2003] та тимоцитів [Рябенко В.В., 2004], відновлює природну імунологічну толерантність лабораторних тварин до ниркових антигенів при аутоімунному нефриті, що дало можливість передбачити участь пептидів у процесі взаємодії Т-клітинного рецептора з його лігандами [Кайдашев І.П., 1993]. Встановлено, що ПКН має однакові хроматографічні характеристики з отриманими Falk K. та співавт. (1991) ендogenous пептидами, зв'язаними з молекулами головного комплексу гістосумісності (ГКГС), та представлений переважно пептидами, які пов'язані з молекулами ГКГС І класу [Кайдашев І.П., 2000]. У той же час відомо, що пептиди ГКГС здатні змінювати перебіг імунологічних реакцій на всіх рівнях від тимусу до периферійних лімфоцитів [Bian H. et al., 1998; Fayen J. et al., 1999], підтримувати багатоклітинність організмів [Кайдашев І.П., 2000] та проявляти свою біологічну активність у тісній взаємодії з іншими пептидними системами. Визначена можливість зворотнього зв'язку між системою імунітету і пептидергічною системою регуляції за участю тимуса, бурси Фабриціуса та циркулюючих аутоантитіл до периферійних пептидів [Кайдашев І.П., 2000; Schild H. et al., 1990].

Разом з тим залишаються нерозкритими тонкі механізми взаємодії між РП та імунокомпетентними клітинами. Перебіг імунних реакцій, регуляція клітинного поділу, процесів диференціювання, міжклітинних взаємодій, підтримка життєдіяльності клітини опосередковується складною системою сигнальних шляхів, які передають зовнішні сигнали усередину клітини та цілим каскадом сигнальних білків, які доставляють їх до специфічних мишеней у цитоплазмі або ядрі [Белюсова А.К., 1999]. Сучасний рівень досліджень дозволяє визначити не тільки те, яким сигнальним шляхом реалізується вплив пептидів, але й кінцеву мету цього впливу, зокрема специфічний вплив на експресію генів для пептидних біорегуляторів вілону та епіталону, здатність підсилювати активність нейтральної сфінгомієлінази для вілону [Анисимов С.В. и др., 2002; Хавинсон В.Х. и др., 2002].

Однак остаточно не з'ясовано, яким чином реалізується дія пептидних речовин на рівні плазматичної мембрани та рецепторного апарату, які визначають функціональну активність імунокомпетентних клітин. Враховуючи, що на кількість та стан поверхневих рецепторів лімфоцитів можуть впливати різні речовини ендogenousного або екзогенного походження [Пол У., 1987-1988; Якобияк М., 2004], зокрема тканинні пептидні комплекси - епіталамін, тималін [Загородня Э.Д., 1992; Кузник Б.И. и др., 1998], тактивін, мієлопід [Маркова Т.П., 1995; Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., 2003], дослідження механізмів реалізації такого впливу дозволить значно розширити уявлення про пептидергічну регуляцію функціонального стану лімфоцитів та дозволить обґрунтувати можливість використання пептидних екстрактів органів нелімфоїдного походження в якості імуномодулюючих засобів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є самостійним фрагментом науково-дослідної роботи Української медичної стоматологічної академії “Вивчення механізмів взаємодії тканинних пептидів і імунокомпетентних клітин” (№ держреєстрації 0197U014012). Автор є відповідальним виконавцем даної теми.

**Мета і задачі дослідження.** Встановити механізми регуляції функціонального стану мембран лімфоцитів периферійної крові пептидним комплексом нирок на основі модуляції активності окремих ланок основних шляхів сигнальної трансдукції з метою поглиблення знань щодо фізіологічної регуляції стану клітин імунної системи.

У відповідності з метою визначено наступні задачі:

1. Розробити спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів для оцінки функціонального стану лімфоцитів за зміною характеру експресії поверхневих мембранних рецепторів.
2. Встановити та дослідити вплив пептидного комплексу нирок на функціональний стан плазматичної мембрани інтактних лімфоцитів за фізіологічних умов.

3. Визначити участь ендогенних імуномодуляторів у реалізації впливу пептидного комплексу нирок на функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів периферійної крові.
4. Визначити можливість залучення пептидним комплексом нирок окремих шляхів сигнальної трансдукції для внутрішньоклітинної реалізації ефектів у лімфоцитах периферійної крові.
5. Визначити вплив пептидного комплексу нирок на функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів периферійної крові за умов видалення рецепторів та пригнічення клітинного метаболізму.
6. Визначити роль процесів фосфорилювання за участю тирозинових протеїнкіназ в механізмах реалізації імуномодуючих ефектів пептидного комплексу нирок та особливості рецепторної взаємодії пептидного комплексу нирок з поверхневими рецепторами лімфоцитів.
7. Порівняти особливості впливу пептидного комплексу нирок на функціональний стан мембран лімфоцитів периферійної крові з впливами пептидного комплексу тимуса - тималіна.

*Об'єкт дослідження* - пептидна регуляція функціонального стану лімфоцитів периферійної крові.

*Предмет дослідження* - регуляція функціонального стану плазматичної мембрани лімфоцитів периферійної крові пептидним комплексом нирок за фізіологічних умов, за умов дії ендогенних імуномодуляторів та при модуляції активності окремих ланок основних шляхів сигнальної трансдукції.

*Методи дослідження* - для виконання поставлених у роботі завдань розроблено методичний підхід, в якому функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів модулювали за допомогою використання речовин з визначеними механізмами дії - імуномодуляторами ендогенного походження, індукторами та інгібіторами окремих ланок основних шляхів сигнальної трансдукції, інгібіторами клітинного метаболізму. Порівнювали механізм дії ПКН з дією пептидного комплексу центрального походження - тималіну. Функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів оцінювали методом прямого та непрямого імунофлюоресцентного аналізу, лазерної проточної цитофлюориметрії, фазово-контрастної мікроскопії. Участь процесів фосфорилювання в трансдукції пептидного сигналу визначали за допомогою методу дот-блотінгу. Результати оброблено з використанням загальноприйнятих статистичних методів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше доведена можливість фізіологічної регуляції функціонального стану мембран лімфоцитів периферійної крові пептидним комплексом, отриманим з тканин органу нелімфоїдного походження – кіркової речовини нирок. Вперше для розв'язання наукової проблеми фізіологічної регуляції використано методичний підхід, згідно якого функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів модулювали речовинами з

дослідженими механізмами дії та проводили порівняння механізму дії ПКН з дією пептидного комплексу центрального походження - тималіну.

Вперше обґрунтована єдність механізмів, завдяки яким відбувається реалізація біологічної дії пептидного комплексу, отриманого з кіркової речовини нирок та пептидного комплексу центрального походження – тималіну. Вперше встановлено, що за фізіологічних умов регулюючий вплив ПКН реалізується за рахунок зміни рівня та характеру експресії поверхневих мембранних рецепторів лімфоцитів. ПКН та тималін впливають на функціональну активність лімфоцитів опосередковано через зміну перегрупувань рецепторів у площині мембрани. Отримали подальшого розвитку дані стосовно регулюючого впливу тималіну на функціональний стан мембран лімфоцитів за фізіологічних умов.

Встановлено, що за умов дії ендогенних імуномодуляторів ПКН та тималін здатні здійснювати модулюючий вплив на функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів. Вперше встановлено, що стимулююча дія ПКН та тималіну на експресію мембранних рецепторів лімфоцитів не залежить від зміни рівня іонів кальцію як усередині клітини, так і в позаклітинному просторі, та є опосередкованою властивістю пептидних речовин відновлювати необхідний рівень кальцію всередині клітини аналогічно дії кальцієвого іонофору A23187. Вперше доведено, що за умов активації протеїнкіназної сигнальної системи ПКН та тималін виявляють до неї функціональну антагоністичну дію та здійснюють переважно стимулюючий вплив на пригнічений уабаїном функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів.

Вперше встановлено, що за умов попереднього видалення рецепторів з поверхні мембрани ПКН відновлює експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів. За умов пригнічення метаболічних процесів у клітині ПКН та тималін здатні здійснювати переважно стимулюючий вплив на функціональний стан плазматичної мембрани лімфоцитів, який є максимальним при комплексній дії – при попередньому видаленні рецепторів та пригнічення клітинного метаболізму.

Вперше визначено, що до трансдукції сигналу ПКН у клітину залучені процеси фосфорилювання за тирозиновими залишками, які відбуваються на початкових та більш віддалених за часом етапах реалізації біологічної дії. Вперше доведена наявність на поверхні плазматичної мембрани лімфоцитів периферійної крові специфічних рецепторів з низькою афінністю до ПКН.

**Практичне значення одержаних результатів.** Проведені експериментальні дослідження мають теоретичне і практичне значення в різних галузях медицини: нормальній та патологічній фізіології, експериментальній та клінічній імунології, біохімії.

Розроблено спосіб оцінки функціонального стану мембран лімфоцитів шляхом реєстрації зміни експресії мембранних рецепторів лімфоцитів за дії пептидного комплексу нирок (декларацийний патент України на винахід 53122А, 7 А 61К35/23,

15.01.2003), який може бути використаний для оцінки функціонального стану імункомпетентних клітин за умов дії різних речовин та скринінгу біологічно активних сполук.

Проведені експериментальні дослідження сприяли новим уявленням стосовно фармакологічної активності речовин. Результати дослідження механізмів дії ПКН (лікарська речовина “Нефролат”) є фрагментом його доклінічних випробувань за темою МОЗ України “Проведення доклінічних іспитів та вивчення основних механізмів дії нових лікарських засобів, видобутих з тваринної сировини для лікування аутоімунних, травматичних та онкологічних захворювань організму” (№ держреєстрації 0195U026214). Отримані дані визначають перспективність подальшого дослідження імунomodуючих властивостей пептидного комплексу нирок. Результати роботи розширюють та доповнюють знання стосовно механізмів імунomodуючої дії тималіну та визначають необхідність їх врахування в клінічній практиці при призначенні тималіну в комплексній терапії з модуляторами рівня кальцію, іншими імунomodуляторами, цитостатичними препаратами.

**Впровадження результатів досліджень у практику.** За матеріалами дисертаційної роботи отримано деклараційний патент України на винахід. Результати досліджень знайшли відображення у монографії “Регуляція активності мембрани та процесів апоптозу лімфоїдних клітин тканинними пептидами” (Боброва Н.О., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. та інші /Під ред. І.П.Кайдашева.- 2004).

Розроблений спосіб оцінки функціонального стану мембран лімфоцитів впроваджено в практику проведення лабораторних досліджень у Харківському інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Результати дослідження використовуються у навчальному процесі при викладанні лекційного курсу та лабораторних заняттях на кафедрах нормальної фізіології, патологічної фізіології, мікробіології, вірусології та імунології, біологічної хімії Української медичної стоматологічної академії, кафедрах нормальної фізіології Запорізького, Харківського, Кримського державних медичних університетів та Дніпропетровської державної медичної академії, на кафедрі патологічної фізіології Луганського державного медичного університету, кафедрі фізіотерапії, пульмонології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням, проведеним на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Української медичної стоматологічної академії. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз літератури з даної проблеми, сформульовані мета і задачі, розроблено програму досліджень. Самостійно виконані імунofлюоресцентні, цитofлюориметричні, молекулярно-біологічні дослідження. Фрагмент досліджень на інтактних клітинах виконано спільно з д.мед.н., професором І.П. Кайдашевим. Дисертантом самостійно проаналізовано отримані результати та здійснено їх

інтерпретацію, розроблено основні положення та висновки роботи. Автор висловлює подяку науковим співробітникам Центральної науково-дослідної лабораторії к.м.н. О.А. Шликовій та Н.Л. Куценко за технічну допомогу.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційного дослідження доповідались та обговорювались на XV з'їзді Українського фізіологічного товариства (Донецьк, 1998); I Національному конгресі з клінічної імунології, алергології та імунореабілітації (Алушта, 1998); конференціях молодих вчених “Фізіологія і патологія перекисного окислення, гемостазу і імуногенезу” (Полтава, 1997, 1998, 1999); III Міжнародному медичному конгресі студентів молодих вчених (Тернопіль, 1999); IV Українській науково-практичній конференції з актуальних питань алергології та клінічної імунології (Київ, 1999); XIX Конгресі Європейської Академії алергології і клінічної імунології (Лісабон, Португалія, 2000); III з'їзді імунологів і алергологів країн СНД (Сочі, Росія, 2000); VII Конгресі Польського товариства алергологів (Лодзь, Польща, 2000); IV з'їзді імунологів і алергологів країн СНД (Москва, Росія, 2001); XXI Конгресі Європейської Академії алергології і клінічної імунології (Неаполь, Італія, 2002); розширеному засіданні апробаційної вченої ради №1 при Українській медичній стоматологічній академії (Полтава, 2005).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 35 наукових робіт, у тому числі 21 стаття у фахових наукових журналах (з них 3 статті у журналах Російської Федерації), розділ у монографії, 12 тез, отримано деклараційний патент на винахід.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація викладена на 241 сторінці друкованого тексту, складається із вступу, огляду літератури, розділу “Матеріали і методи дослідження”, 5 розділів власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, переліку використаних джерел. який містить 243 роботи вітчизняних та 145 робіт іноземних авторів.

Робота ілюстрована 43 таблицями, 23 рисунками, 2 фото.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Об'єкти і методи досліджень.** Експериментальні дослідження проведено на 584 зразках периферійної крові здорових донорів віком 21-40 років. Суспензії лімфоцитів отримували за стандартним методом [Клаус Дж., 1990] центрифугуванням у градієнті густини фікол-триомбрас ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ) із наступним відмиванням у фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4. Кількість клітин у суспензії становила в середньому  $1-1,5 \times 10^6/\text{мл}$  [Меньшиков В.В., 1987].

У роботі використано пептидний комплекс, отриманий із кіркової речовини нирок свиней та великої рогатої худоби за оригінальним методом [Кайдашев І.П. і ін., 1996]. Згідно методу, обробку тканин кіркової речовини нирок проводили органічним розчинником для знежирення, пермеабілізації мембран та денатурації



високомолекулярних білків. Екстракцію проводили трифтороцтовою кислотою в присутності  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  та  $\text{MgCl}_2$  та преципітували органічним розчинником для незворотньої денатурації частини білків, виділення з екстракту преципітованих пептидів. У результаті висушування, перерозчинення та ультрафільтрації на кінцевому етапі одержували пептидні молекули з молекулярною вагою менше 10 кДа [Кайдашев І.П. і ін., 1996].

Отриманий екстракт давав позитивну біуретову реакцію, мав спектр поглинання в УФ-області з максимумом 210-220 нм, характерний для пептидного зв'язку. Порівняння даних високоефективної рідинної хроматографії екстракту з екстрактами, отриманими за методом K. Falk et al. (1991), визначило подібність цих пептидних сумішей для HLA-DR5 та DR1 [Falk K. et al., 1991]. Гель-хроматографією визначено дві основні фракції з молекулярною масою 4 та 8 кДа. При проведенні електрофорезу в поліакриламідному гелі визначено чотири основних фракції. При дослідженні амінокислотного складу ПКН виявлено високу відносну кількість глутамінової, аспарагінової кислот, аргініну та лізину. Ідентифіковано окремі найбільш багаточисленні фракції пептидної суміші: іпсилон-ланцюг гемоглобіну (55-66, 56-66), альфа-ланцюг гемоглобіну (48-61), убіквітин (1-20) [Кайдашев І.П., 1995].

Як препарат порівняння було використано комплекс пептидів тимуса – тималін, виробництва заводу медичних препаратів (Санкт-Петербург, Росія).

Суспензію лімфоцитів інкубували у середовищі 199 (Sigma, USA) з 10% інактивованою телячою сироваткою (Bio Mark Inc, Україна) при 37°C. При тривалих інкубаціях використовували середовище RPMI-1640 (Gibco BRL, Scotland) із додаванням 10% інактивованої телячої сироватки (Bio Mark Inc, Україна), 10 мМ HEPES (Sigma, USA) та 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ДНЦЛЗ, Україна).

Інкубацію інтактних клітин з ПКН та тималіном у кінцевих концентраціях 0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл проводили протягом 30, 60 хвилин та 24 годин при 37°C, в подальших серіях використовували максимально ефективну концентрацію (табл. 1).

Таблиця 1.

Серії експериментальних досліджень з інтактними клітинами та при використанні ендогенних імуномодуляторів

Експериментальна модель	Кінцева концентрація речовини на 1 мл суспензії клітин
1	2
1. Дослідження впливу ПКН та тималіну на інтактні лімфоцити при інкубації протягом 30 хвилин [Маркова Т.П., 1995] Інтактні клітини (n=5) Клітини, інкубовані з ПКН протягом 30 хвилин (n=5)	0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл ПКН

1	2
Клітини, інкубовані з тималіном протягом 30 хвилин (n=5)	0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл тималіну
2. Дослідження впливу ПКН та тималіну на інтактні лімфоцити при інкубації протягом 60 хвилин [Кайдашев І.П., 1999; Поверенный А.М. и др., 2002] Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з тималіном протягом 60 хвилин (n=6)	0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл ПКН 0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл тималіну
3. Дослідження впливу ПКН та тималіну на інтактні лімфоцити при інкубації протягом 24 годин [Рябенко В.В. і ін., 1999; Ножинова О.А. і ін., 2000] Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з ПКН протягом 24 годин (n=6) Клітини, інкубовані з тималіном протягом 24 годин (n=6)	0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл ПКН 0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл тималіну
4. Дослідження впливу ПКН та тималіну на фоні дії ІЛ-2 Інтактні клітини (n=7) Клітини, інкубовані з ІЛ-2 протягом 60 хвилин (n=7) Клітини, інкубовані з ІЛ-2 та ПКН протягом 60 хвилин (n=7) Клітини, інкубовані з ІЛ-2 та тималіном протягом 60 хвилин (n=7)	ІЛ-2 (1:8) [Клаус Дж., 1990] ІЛ-2 (1:8); 0,5 мкг/мл ПКН ІЛ-2 (1:8); 0,5 мкг/мл тималіну
5. Дослідження впливу ПКН та тималіну на фоні дії гідрокортизону Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з гідрокортизоном протягом 30 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з гідрокортизоном протягом 30 хвилин і ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з гідрокортизоном протягом 30 хвилин і тималіном протягом 60 хвилин (n=6)	10 <sup>-5</sup> М гідрокортизону [Йегер Л., 1986] 10 <sup>-5</sup> М гідрокортизону; 0,12 мкг/мл ПКН 10 <sup>-5</sup> М гідрокортизону; 0,12 мкг/мл тималіну
6. Дослідження впливу ПКН та тималіну на фоні дії α-ІФН Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з α-ІФН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з α-ІФН та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з α-ІФН та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)	100 МО/мл α-ІФН [Авдєєва Ж.И. и др., 1987] 100 МО/мл α-ІФН; 0,05 мкг/мл ПКН 100 МО/мл α-ІФН; 0,05 мкг/мл тималіну

В якості контролю використовували фосфатно-сольовий буфер.

Згідно методичного підходу дослідження молекулярних механізмів дії ПКН та тималіна проводили з використанням ендогенних імуномодуляторів (табл. 1), індукторів та інгібіторів внутрішньоклітинних регуляторних систем (табл. 2), шлях

Таблиця 2.

Серії експериментальних досліджень з використанням індукторів та інгібіторів внутрішньоклітинних регуляторних систем

Експериментальна модель	Кінцева концентрація речовини на 1 мл суспензії клітин
1	2
1. Дослідження впливу верапамілу і фенігідину на інтактні лімфоцити Інтактні клітини (n=5) Клітини, інкубовані з верапамілом протягом 60 хвилин (n=5) Клітини, інкубовані з фенігідином протягом 60 хвилин (n=5)	0,01; 0,025 та 0,05 мг/мл верапамілу 0,002; 0,004 та 0,024 мг/мл фенігідину [Чекман И.С. и др., 1986]
2. Дослідження впливу ПКН та тималіну за умов зв'язування позаклітинного кальцію ЕДТА Інтактні клітини (n=5) Клітини, інкубовані з ЕДТА протягом 60 хвилин (n=5) Клітини, інкубовані з ЕДТА та ПКН протягом 60 хвилин (n=5) Клітини, інкубовані з ЕДТА та тималіном протягом 60 хвилин (n=5)	2,5×10 <sup>-3</sup> М ЕДТА [Клаус Дж., 1990] 2,5×10 <sup>-3</sup> М ЕДТА; 0,12 мкг/мл ПКН 2,5×10 <sup>-3</sup> М ЕДТА; 0,12 мкг/мл тималіну
3. Дослідження впливу ПКН та тималіну за умов зв'язування внутрішньоклітинного кальцію ВАРТА Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з ВАРТА 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з ВАРТА та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з ВАРТА та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)	2×10 <sup>-2</sup> М ВАРТА [Nishimoto Y. et al., 1997] 2×10 <sup>-2</sup> М ВАРТА; 0,5 мкг/мл ПКН 2×10 <sup>-2</sup> М ВАРТА; 0,5 мкг/мл тималіну
4. Дослідження впливу ПКН та тималіну на фоні дії кальцієвого іонофору А 23187 Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з А23187 протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з А23187 та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з А 23187 та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)	1×10 <sup>-7</sup> М іонофору [Nishimoto Y. et al., 1997] 1×10 <sup>-7</sup> М іонофору; 0,5 мкг/мл ПКН 1×10 <sup>-7</sup> М іонофору; 0,5 мкг/мл тималіну

1	2
<p>5. Дослідження впливу ПКН та тималіну за умов активації протеїнкінази С Інтактні клітини (n=5) Клітини, інкубовані з ФМА протягом 2 годин (n=5) Клітини, інкубовані з ФМА протягом 2 годин та ПКН протягом 60 хвилин (n=5) Клітини, інкубовані з ФМА протягом 2 годин та тималіном протягом 60 хвилин (n=5)</p>	<p><math>8,1 \times 10^{-9}</math> М ФМА [Nishimoto Y. et al., 1997] <math>8,1 \times 10^{-9}</math> М ФМА; 0,12 мкг/мл ПКН <math>8,1 \times 10^{-9}</math> М ФМА; 0,12 мкг/мл тималіну</p>
<p>6. Дослідження впливу ПКН та тималіну за умов пригнічення активності <math>\text{Na}^+, \text{K}^+</math>-АТФази Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з уабаїном протягом 30 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з уабаїном протягом 30 хвилин та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з уабаїном протягом 30 хвилин та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)</p>	<p><math>2 \times 10^{-3}</math> М/л уабаїну [Герасев А.Д. и др., 2003] <math>2 \times 10^{-3}</math> М/л уабаїну; 0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл ПКН <math>2 \times 10^{-3}</math> М/л уабаїну; 0,05 мкг/мл тималіну</p>
<p>7. Вплив ПКН та тималіну на фоні дії трипсину Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з трипсином (n=6) Клітини, інкубовані з трипсином та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з трипсином та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)</p>	<p>1 мг/мл трипсину [Луцик М.Д. и др., 1981] 1 мг/мл трипсину; 0,5 мкг/мл ПКН 1 мг/мл трипсину; 0,5 мкг/мл тималіну</p>
<p>8. Вплив ПКН та тималіну на фоні дії метотрексату Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з метотрексатом протягом 6 годин (n=6) Клітини, інкубовані з метотрексатом протягом 6 годин та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з метотрексатом протягом 6 годин та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)</p>	<p>1 мг/мл метотрексату [Чскман И.С. и др., 1986] 1 мг/мл метотрексату; 0,5 мкг/мл ПКН 1 мг/мл метотрексату; 0,5 мкг/мл тималіну</p>
<p>9. Вплив ПКН та тималіну на фоні дії трипсину і метотрексату Інтактні клітини (n=6) Клітини, інкубовані з трипсином і метотрексатом протягом 6 годин (n=6) Клітини, інкубовані з трипсином, метотрексатом протягом 6 годин та ПКН протягом 60 хвилин (n=6) Клітини, інкубовані з трипсином, метотрексатом протягом 6 годин та тималіном протягом 60 хвилин (n=6)</p>	<p>1 мг/мл трипсину + метотрексат 1 мг/мл трипсину + метотрексат; 0,5 мкг/мл ПКН 1 мг/мл трипсину + метотрексат; 0,5 мкг/мл тималіну</p>

сигнальної трансдукції яких достатньо вивчений [Теппермен Дж., Теппермен Х., 1989].

Інкубацію клітин з ПКН та тималіном проводили безпосередньо з інтактними лімфоцитами або після попередньої інкубації з фізіологічно-активними речовинами (табл. 2).

Моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів проводили за власно розробленим способом (деклараційний патент України на винахід 53122А, 7 А 61К35/23, 15.01.2003), що включає інкубування *in vitro* попередньо відмитих лімфоцитів з ПКН та оцінку його впливу на лімфоцити шляхом реєстрації зміни характеру експресії поверхневих мембранних рецепторів. Зміну функціональної активності лімфоцитів реєстрували за рівнем та характером флюоресценції поверхневих рецепторів за допомогою прямого та непрямого імунофлюоресцентного аналізу [Фримель Г., 1987].

У реакції прямої імунофлюоресценції використано антитіла проти мембранних імуноглобулінів А,М,С людини, кон'юговані з флюоресцеїнізотіаціанатом (ФІТЦ) (Sanofi, France). Для непрямої імунофлюоресценції - моноклональні антитіла до кластерів диференціювання найбільш важливих субпопуляцій імуноцитів [Сидоренко С.П., 1998]: LT3 (CD3), LT4 (CD4), LT8 (CD8), LT22 (CD22), 3F3 (CD72), LT-DR (HLA-DR) та кон'юговані з ФІТЦ анти-F(ab)<sub>2</sub>-антитіла виробництва ТОВ "Сорбент", Росія.

Флюоресценцію реєстрували за допомогою мікроскопа "Люам-Р8" (ЛОМО, Росія) з одночасним контролем у фазовому контрасті. Визначали кількість клітин з флюоресценцією у відсотках та типи перегрупувань рецепторів: дифузний тип, коли рецептори рівномірно розподілені у площині мембрани, кластери (окремі невеликі групи рецепторів), петчі (плями, більш впорядкована форма кластерів) та кепи ("капелюшок") [Пол У., 1987-1988]. Основою такого групування стало визначення початкового етапу активації Т- та В-лімфоцитів, який складається з агрегації мембранних рецепторів за активної участі цитоскелету [Пол У., 1987-1988; Acuto O., Cantrell D., 2000; Faruki S. et al., 2000; Holowka D. et al., 2000], та залучення на цьому етапі ліпідних рафтів як структурної платформи сигнальних каскадів [Alonso M.A., Millan J., 2001; Norejsi V., 2004]. Життєздатність клітин визначали в тесті з трипановим синім [Клаус Дж., 1990].

Для визначення наявності на поверхні лімфоцитів рецепторів до ПКН та тималіну, їх мітили ФІТЦ та родаміном ізотіаціанатом (ТРІТЦ) (ICN Pharmaceutical, USA). Лімфоцити інкубували з ТРІТЦ-ПКН і ФІТЦ-тималіном (100 мкг/мл) та оцінювали флюоресценцію на мікроскопі "Люам-Р8". Для визначення специфічності зв'язування з клітиною-мішенню до інкубаційної суміші додавали надлишок немічених ПКН та тималіну (100 мкг - 2,5 мг). Константу дисоціації (Kd) визначали за методом Скетчарда [Луцик М.Д. и др., 1981].

При визначенні клітин-мішеней для ПКН проводили подвійне імунофлюоресцентне фарбування з використанням ТРІТЦ-ПКН (10 мкг) та ФІТЦ-мічених моноклональних антитіл проти CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, HLA-DR та CD95 у необхідному розведенні. Реєстрували подвійне зв'язування на мікроскопі "Люмам-Р8".

Для дослідження ролі процесів фосфорилування за тирозином у трансдукції пептидного сигналу визначали вплив ПКН на інтактні клітини та на попередньо оброблені ФМА ( $8,1 \times 10^{-9}$  М) [Nishimoto Y. et al., 1997]. Клітини інкубували з ПКН (0,5 мкг/мл) протягом 3, 10, 15 та 60 хвилин при 37°C [Pedersen A.E. et al., 1998; Ruhwald M. et al., 1999]. Лімфоцити маркували анти-фосфотирозиновими антитілами, клон РТ66 (Sigma, USA) та F(ab)<sub>2</sub>-ФІТЦ-антитілами до імуноглобулінів М і G миші (Caltag lab, USA). На проточному лазерному цитофлюориметрі Coulter EPIX LX MSL (Beckman Coulter, USA) аналізували рівень інтенсивності флюоресценції по каналу FL-1 та визначали у вигляді однопараметричних гістограм, які відображають розподіл клітин за інтенсивністю флюоресценції ФІТЦ.

Для вивчення віддалених за часом процесів фосфорилування за допомогою дот-блотінгу [Lefkovits Ed., 1997] використовували моноклональні антитіла до фосфотирозину (Sigma, USA); біотинільовані антимишачі антитіла (Sigma, USA) в розведенні 1:1000; екстравідін-пероксидазні антитіла (Sigma, USA) в розведенні 1:500. Лімфоцити в концентрації  $5 \times 10^6$ /мл в середовищі MEM інкубували з ПКН (0,12 мкг/мл) протягом 30; 60; 90; 120 хвилин; 6 та 24 години при 37°C. Отримане зображення на нітроцелюлозній смужці сканували.

Отримані результати були статистично оброблені з використанням стандартних методів. Проводили порівняння сукупностей з попарно пов'язаними варіантами з використанням t-критерія для попарно-зв'язаних величин та непараметричного t-критерія Вілкоксона [Славин М.Б., 1989; Боровиков В.П., 2000].

## РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вирішення проблеми фізіологічної регуляції функціонального стану мембран лімфоцитів периферійної крові ПКН потребувало комплексного методичного підходу. Для оцінки функціонального стану мембран лімфоцитів розроблено спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів [Весніна Л.Е., Кайдашев І.П., 2003], який дозволив визначати не тільки зміну рівня експресії специфічних поверхневих кластерів диференціювання CD (експресія яких є проявом зміни функціональної активності клітини [Пол У., 1987-1988]) під впливом пептидних речовин, але й характер перегрупувань рецепторів у площині мембрани. На початкових етапах методичний підхід був спрямований на з'ясування особливостей впливу ПКН та тималіну на інтактні клітини за фізіологічних умов та визначення рівня взаємодії (мембранний, внутрішньоклітинний), що в подальшому було

підтверджено використанням ендогенних імуномодуляторів з відомими мембранорецепторними механізмами взаємодії. На наступних етапах досліджень застосування індукторів та інгібіторів окремих ланок основних шляхів сигнальної трансдукції дало можливість визначити використання цих шляхів пептидними речовинами, а застосування інгібіторів клітинного метаболізму - можливість залучення більш віддалених за часом внутрішньоклітинних синтетичних процесів. Для мембраноопосередкованого впливу методично обґрунтованим є дослідження параметрів рецепторної взаємодії пептидних речовин та залучення процесів фосфорилювання для трансдукції пептидного сигналу.

Відповідно до методичного підходу встановлено, що ПКН за умов 30 хвилинної інкубації з інтактними лімфоцитами стимулював зростання рівня експресії антигенних детермінант, зокрема в максимальній концентрації 0,5 мкг/мл – зростання рівня CD3 на 15,68%, CD4 – на 27,62%, CD8 – на 45,31%, CD72 - на 45,31% та HLA-DR – у 2 рази ( $p < 0,05$ ). 60-хвилинна інкубація з ПКН характеризувалась переважною стимуляцією експресії CD3, CD4, CD8 та HLA-DR, зниженням експресії CD22 ( $p < 0,05$ ). Інкубація лімфоцитів з ПКН протягом 24 годин виявила стимулюючий вплив переважно на антигенні детермінанти CD3, CD4, CD8 та HLA-DR, пригнічуючий – на експресію CD72.

Інкубація з тималіном 30 та 60 хвилин характеризувалась достовірним підвищенням рівня експресії CD3 та CD4 при використанні максимальної та середньої (0,12 мкг/мл) концентрації, для молекул CD8 та HLA-DR стимуляція експресії спостерігалась лише при максимальній або середній концентрації тималіну, експресія CD72 переважно знижувалась. При інкубації з тималіном протягом 24 годин зростав рівень експресії CD3, CD4, CD8 та HLA-DR ( $p < 0,05$ ). Взагалі, і ПКН, і тималін виявляли переважно стимулюючу дію на функціональну активність мембран лімфоцитів.

Таким чином, визначено, що дія ПКН спрямована на рецепторні структури переважно Т-клітин (CD3, CD4, CD8) та HLA-DR, що супроводжується дозозалежним підсиленням їх експресії та зміною функціонального стану. Враховуючи, що молекула CD3 бере участь у формуванні Т-клітинного рецептору (TCR), очевидно, що посилення експресії CD3 супроводжується подібними змінами стану з боку TCR [Damjanovich S. et al., 1992]. Такі зміни призводять до посилення експресії молекул HLA-DR на мембрані лімфоцитів, що є характерним для активованих Т-клітин.

Поверхнева структура клітин регулюється динамічними взаємодіями між білками цитоскелету та мембраною [Семенов А.В., 2002]. Координована агрегація рецепторів відбувається, як правило, у вигляді кластерів, кепів або петчів, що забезпечується їх асоціацією з філаментами клітини, найбільш динамічною структурою, яка спроможна до перебудови у секундні інтервали часу [Семенов А.В., 2003].

Нами отримані дані, що пептидні комплекси нирок та тимуса модулюють перегрупування антигенних детермінант у площині мембрани інтактних клітин. 30-ти хвилинна інкубація з ПКН характеризувалась достовірним зростанням кепів з молекул CD3 (максимальна та середня концентрації), зростанням рівня кластерів CD4 та HLA-DR, петчів CD8 при використанні ПКН у всіх трьох концентраціях. На відміну від ПКН, тималін значно меншим чином стимулював перегрупування. Годинна інкубація з ПКН відзначалась особливістю – наявністю значного рівня дифузного світіння мембрани, навпаки, при використанні тималіну переважали різні перегрупування. Інкубація протягом 24 годин з ПКН дозволила виявити досить незначну кількість поодиноких перегрупувань. Тималін в залежності від концентрації значним чином змінював перегрупування - збільшувався рівень кепів та кластерів CD3 і CD8, петчів, кластерів та кепів CD4.

Таким чином, ПКН та тималін мають здатність стимулювати функціональну активність інтактних лімфоцитів за рахунок зміни рівня експресії поверхневих рецепторів та їх перегрупувань у площині мембрани. Дія пептидних комплексів реалізується мембраноопосередковано - на ранніх етапах сприйняття клітиною активуючого сигналу (30 та 60 хвилин інкубації) за рахунок мобілізації вже існуючих рецепторних структур і на більш віддалених етапах (24 години інкубації), коли окрім звільнення мембранного пулу рецепторів, вочевидь, залучаються внутрішньоклітинні процеси обміну рецепторів. Змінюючи співвідношення в системі “дифузне світіння мембрани – кластери – петчі – кели”, пептидні речовини тим самим модулюють визначеність функціональної активності лімфоцитів та таким чином здатні впливати на початковий етап формування контактного сайту TCR з антиген-презентуючою клітиною. Порівняння дії ПКН та тималіну виявило, що переважно стимулюючий вплив на функціональний стан мембран лімфоцитів реалізується опосередковано подібними механізмами.

Дослідження механізмів взаємодії РП з клітинами імунної системи потребує обов'язкового врахування існуючої мережі інших ендogenous біорегуляторів – цитокінів [Тодоріко Л.Д., Рихліцька К.В., 2004; Ahmed S. et al., 2000], зокрема, інтерлейкіну-2 (ІЛ-2), фактора росту Т-клітин [Бережная Н.М., Горецкий Б.А., 1992; Ветра Я.Я. и др., 2000]. Біологічна дія ІЛ-2 реалізується шляхом агрегації субодиниць рецепторів – CD25, CD122, CD132, загальних для всіх типів клітин [Ляшенко А.А., Уваров В.Ю., 2001], з подальшим розгортанням каскадних реакцій, які призводять до зміни активності геному [Тодоріко Л.Д., Рихліцька К.В., 2004].

Результати дослідження свідчать, що на фоні підвищення рівня експресії під дією ІЛ-2 ПКН та тималін опосередковують трансдукцію активаційного сигналу у клітину шляхом збільшення рівня експресії CD3. В CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup>-клітинах, які, до речі, є CD3-позитивними, ПКН та тималін пригнічують експресію цих рецепторних молекул на мембрані. На нашу думку, відмінності впливу ПКН на експресію окремих антигенних детермінант опосередковані відмінністю саме початкових



етапів трансдукції активаційного сигналу через антигенні рецептори CD3 та CD4/CD8, та наявністю у складі ПКН фракцій з прямою протилежною дією [Кайдашев І.П., 1995].

На відміну від ІЛ-2, переважно депресивна імуномодулююча дія властива глюкокортикоїдним гормонам, які пригнічують продукцію цитокінів - ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10, інтерферону  $\gamma$ , ІЛ-1, ГМ-КСФ, фактора некрозу пухлини  $\alpha$ , послаблюють експресію молекул ГКГС на антигенпрезентуючих клітинах, пригнічують проліферативну відповідь Т-лімфоцитів на активацію [Ashwell J.D. et al., 2000; Bessler H. et al., 2001; Irakam A. et al., 2002].

У наших дослідженнях гідрокортизон викликав зниження експресії антигенних детермінант, за винятком HLA-DR, та зниження перегрупувань рецепторів. ПКН перешкоджав впливу гідрокортизону на експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3 та CD8 і викликав пригнічення експресії CD4, CD72 та HLA-DR, збільшував утворення кластерів та петчів.

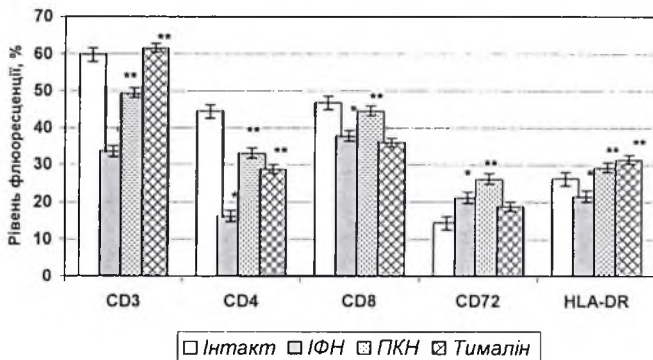


Рис. 1. Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією ПКН та тималіну при попередній інкубації з  $\alpha$ -ІФН.

Досліджені групи: Інтакт – інтактні клітини; ІФН – клітини, інкубовані з  $\alpha$ -ІФН (100 МО/мл); ПКН – клітини, послідовно інкубовані з  $\alpha$ -ІФН та ПКН (0,05 мкг/мл); Тималін – клітини, послідовно інкубовані з  $\alpha$ -ІФН та тималіном (0,05 мкг/мл).

Для тималіну отримано подібний результат по відношенню до антигенних детермінант CD3 та CD8 (підвищення експресії), HLA-DR (зниження експресії), але при підвищенні експресії CD4. Характер перегрупувань рецепторів під впливом тималіну був подібний.

Плазматичній мембрані відводиться першочергова роль у реалізації специфічних та неспецифічних негеномних ефектів стероїдів [Сергеев П.В., Духанін А.С., 2002]. Результати нашого дослідження ще раз свідчать про мембраноопосередкованість впливу ПКН та тималіну, що дає можливість змінювати

перебіг раннях етапів трансдукції зовнішнього сигналу в імунокомпетентних клітинах за рахунок, по-перше, зміни спряження мембранних рецепторів з G-білками та ефекторними молекулами, та, по-друге, можливої модуляції активності ключових ферментів сигнальної трансдукції, зокрема процесів тирозинового фосфорилування TCR-асоційованих субстратів [Laethem F.V. et al., 2001].

Фосфорилування тирозинових основ внутрішньоклітинної частини більшості цитокінових рецепторів взагалі є ключовим моментом у формуванні цитокінового сигналу [Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г., 2000], у тому числі і для  $\alpha$ -ІФН [Ляшенко А.А., Уваров В.Ю., 2001]. Передача сигналу від рецептора  $\alpha$ -ІФН (CD118) до ядра пов'язана із специфічними тирозинкіназами Jak-сімейства, асоційованими з рецепторами мембрани Jak1 и TYK2 [Shuai K. et al., 1994].

У наших дослідях ПКН відновлював знижену під впливом  $\alpha$ -ІФН експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3, CD4, CD8, збільшував - CD72, тобто діяв як антагоніст по відношенню до  $\alpha$ -ІФН стосовно маркерів Т-клітин (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) і синергіст - В-клітин (CD72<sup>+</sup>). Додавання ПКН сприяло збільшенню рівня кспів із молекул CD4, CD8, CD72; збільшенню петчів з молекул CD3, CD4 та HLA-DR; зниженню кількості кластерів HLA-DR. Тималін стимулював експресію CD3, CD4 та HLA-DR та взагалі зберігав загальну тенденцію змін, спрямовану на відновлення рівня експресії (рис. 1).

Для використаних нами імуномодуляторів визначено мембрано-рецепторний механізм взаємодії з клітиною-мішенню та досліджено основні етапи сигнальної трансдукції. В межах родини цитокіни мають високий рівень гомології послідовностей, належать до одного класу просторових структур, мають однакові клітини-мішені та використовують рецептори, які однакові для всіх представників родини, або містять загальну трансдукторну одиницю [Ляшенко А.А., Уваров В.Ю., 2001]. Цілком вірогідно, що дія пептидних речовин спрямована на загальний початковий етап сигнальної трансдукції, який на мембрані опосередковується послідовною взаємодією декількох протеїнтирозинкіназ. Також можливе використання пептидними речовинами сигнальних шляхів цитокінів, як запропонована для тимодепресиву дія, опосередкована рецепторами цитокінів після їх активації, коли в низьких концентраціях він стимулює, а у великих – блокує надходження сигналів від відповідних факторів росту [Владимирская Е.Б. и др., 1999].

На наш погляд, не є випадковим підвищення рівня експресії CD3, яке відбувалось при використанні ПКН та тималіну на фоні дії ІЛ-2, гідрокортизону,  $\alpha$ -ІФН. Антигенна детермінанта CD3 є компонентом мультимолекулярного комплексу TCR-CD3 та обов'язковим компонентом мембранних рафтів. Очевидно, високий рівень експресії CD3 за умов різних впливів підтримується пептидними речовинами, забезпечує взаємодію з корецепторами активації та функціональну активність.

Таким чином, ПКН та тималін впливають на функціональну активність мембран лімфоцитів периферійної крові за умов дії ендогенних імуномодуляторів - модулюють рівень експресії поверхневих рецепторів, зокрема, стимулюють експресію CD3 у всіх серіях, регулюють перегрупкування у площині мембрани. Враховуючи використання імуномодулюючих речовин з визначеним механізмом дії, можна вважати, що результати підтверджують мембраноопосередкованість впливів пептидних речовин, та дію на початкові етапи сигнальної трансдукції.

Для визначення ролі  $Ca^{2+}$ -залежної сигнальної системи, яка має важливе значення в контролі активації, диференціації, програмованої загибелі клітин [Гребиньк Д.М. и др., 2005], в механізмах дії пептидних речовин було досліджено вплив ПКН та тималіну при зв'язуванні позаклітинного або внутрішньоклітинного кальцію та при використанні кальцієвого іонофору.

Лімфоцити мають широкий спектр іонних каналів, які беруть участь в регуляції їх функціональної активності [Cahalan M.D. et al., 2001; Lewis R.S., 2001]. В наших дослідженнях блокада повільних каналів і ділянок зв'язування  $Ca^{2+}$  на мембрані верапамілом та фенігідином знижувала рівень експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, що відображало зниження функціональної активності лімфоцитів.

Враховуючи, що після швидкого транзитного підйому [ $Ca^{2+}$ ], внаслідок звільнення із внутрішньоклітинних депо починається тривале (більше 30 хвилин) надходження  $Ca^{2+}$  ззовні, ми дослідили вплив ПКН та тималіну за умов хелатування позаклітинного  $Ca^{2+}$  динатрієвою сіллю етилендіамінотетраоцтової кислоти – ЕДТА (рис. 2). За умов зв'язування позаклітинного кальцію ПКН та тималін відновлювали

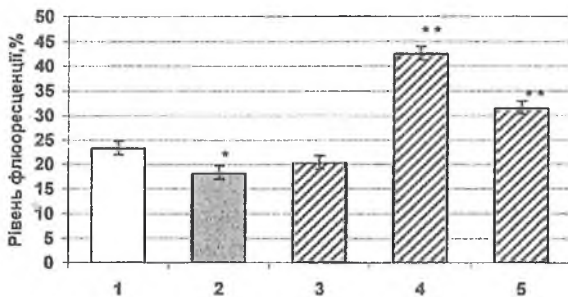


Рис. 2. Зміна експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів під дією ПКН при попередній інкубації з ЕДТА.

Досліджені групи: 1 – інтактна; 2 – інкубація з ЕДТА ( $2,5 \times 10^{-3}$  М); 3,4,5, - інкубація з ПКН в концентраціях 0,05; 0,12; 0,5 мкг/мл відповідно на фоні дії ЕДТА.

\* -  $p < 0,05$  - вірогідність розбіжностей між інтактними лімфоцитами, та лімфоцитами, інкубованими з ЕДТА; \*\* -  $p < 0,05$  вірогідність розбіжностей між лімфоцитами, які інкубували з ЕДТА та лімфоцитами, які інкубували з ПКН у різних концентраціях на фоні дії ЕДТА.

знижений рівень експресії та перегрупування, що свідчить про незалежність впливу пептидних комплексів від рівня позаклітинного кальцію.

Активация лімфоцитів супроводжується обов'язковим підвищенням внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [Quintana A. et al., 2005]. Хелатор внутрішньоклітинного кальцію 1,2-біс(О-амінофеноксі)-етан- $\text{N,N,N,N}$ -тетраоцтова кислота (ВАРТА) знижував рівень експресії поверхневих імуноглобулінів, антигенних детермінант CD3, CD4, CD72 та HLA-DR, рівень кластерів CD3 та CD4, кепів HLA-DR. ПКН на фоні дії ВАРТА збільшував експресію CD4 на 42,16% та CD72 у 4,8 рази, тималін – підвищував експресію CD3 на 24,12% та CD4 у 2,2 рази. ПКН та тималін модулювали перегрупування рецепторів. При повній блокаді внутрішньо- і позаклітинного кальцію (ЕДТА+ВАРТА) ПКН стимулював високий рівень експресії поверхневих імуноглобулінів та перегрупування у площині мембрани. Таким чином, дія пептидних речовин не залежить від концентрації внутрішньоцитозольного кальцію і від його надходження з позаклітинного простору.

Використання кальцієвого іонофору А 23187 показало, що пептидні речовини виявляють синергізм з його дією, викликаючи подальше зростання експресії. ПКН підвищував рівень експресії всіх детермінант, збільшував кількість петчів з молекул CD3 та CD72, петчів та кластерів з молекул CD4, кластерів - HLA-DR. Використання тималіну показало достовірне підвищення рівня експресії CD3, CD4, CD72, HLA-DR та активне перегрупування. Цілком вірогідно, що дослідженим пептидним речовинам притаманна властивість відновлювати необхідний рівень кальцію всередині клітини, коли є можливим підвищення проникності мембрани для іонів кальцію не тільки завдяки іонофору, але й пептидним речовинам, опосередковано прямим впливом ПКН та тималіну на зміну конформації іонних транспортних систем для кальцію і його надходження до клітини. Для деяких нейропептидів, зокрема окситоцину, показана дія на плазматичну мембрану з утворенням за допомогою молекули пептиду іонних каналів при її надходженні в ліпідний матрикс [Рыбальченко В.К., 1988; Кайдашев И.П. и др., 2003]. Участь в ранніх етапах активації кальцієвих каналів Т-лімфоцитів пояснюється імуномодулююча дія мілопептида-1 [Молотковская И.М. и др., 1998].

Проведення сигналів через різні рецепторні системи визначає загальні окремі етапи активації, які реалізуються за допомогою однакових біохімічних механізмів, серед яких фосфорилювання білків, утворення вторинних месенджерів та активація протеїнкінази С (ПКС) [Сидорова Е.В., 1995], яка відіграє ключову роль в забезпеченні життєздатності клітини за різних умов, опосередковуючи швидку мобілізацію багатьох систем [Штиль А.А., 2001]. Активация ПКС за допомогою форболового ефіру 4-форбол-12-мірістат-13-ацетату - ФМА виявила підвищення функціональної активності мембран лімфоцитів - підсилення експресії поверхневих рецепторів CD3, CD4, CD8 та CD72, а також поверхневих імуноглобулінів. ПКН та

тималін перешкождали впливу ФМА, виявили односпрямовану дію та пригнічували експресію. Зокрема, ПКН знижував експресію CD4 на 22,91%, CD8 на 13,26%, CD72 на 24,32%, поверхневих імуноглобулінових рецепторів на 39,20%, викликав подальше зниження експресії HLA-DR на 33,33% ( $p < 0,05$ ). Тималін знижував експресію CD3 на 11,22%, CD4 на 35,24%, поверхневих імуноглобулінів на 13,57%. Також зменшувалось утворення окремих груп рецепторів.

Таким чином, ПКН та тималін виявили антагонізм по відношенню до ФМА, на що вказує відміна підвищення рівня експресії рецепторів на поверхні лімфоцитів. На наш погляд, враховуючи, що ПКС контролює значну частину сигнальних шляхів від комплексу TCR-CD3 та асоційована з ліпідними рафтами, неможливо повністю виключити реалізацію пептидного сигналу залученням певних етапів протеїнкіназного механізму. По-перше, визначено принаймні 12 ізоформ ПКС, серед яких є як форбол-чутливі ізоформи (як  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ), так і не чутливі [Ohno S., 1997], тобто вплив ПКН та тималіну може здійснюватися через форбол-нечутливі ізоформи ПКС. По-друге, пептидні комплекси можуть діяти подібно до ФМА, викликаючи подальшу тривалу активацію протеїнкінази C, її гіперактивацію та виснаження. На наш погляд, вплив пептидних комплексів може реалізуватись на етапах активації тирозинових протеїнкіназ Fyn і Lck, ZAP-70, що передує активації ПКС, або опосередковано іншими сигнальними системами.

З діяльністю ПКС-залежної сигнальної системи перегукується функціонування мембраноз'язаного ферменту  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази. Визначено, що більша частина подій, які відбуваються після взаємодії  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази із специфічним блокаторм убаїном, не залежить від змін внутрішньоклітинних концентрацій  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$ , а зумовлена безпосередньою взаємодією  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази з іншими білками клітини [Лопина О.Д., 2005], зокрема, з Src-кіназою [Хіе Z., 2003].

У наших дослідженнях убаїн знижував рівень функціональної активності клітин, що свідчить про необхідність нормального функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази на початкових мембраноопосередкованих етапах формування сигнального каскаду та трансдукції сигналу у клітину. Слід також відзначити різний вплив на експресію антигенних детермінант CD3 (збільшення експресії) та CD4, CD8 (зниження), що свідчить про відмінності початкових етапів сигнальної трансдукції, що опосередковані цими молекулами. ПКН стимулював рівень експресії CD4, CD8, поверхневих імуноглобулінів та CD72, різноспрямовано змінював експресію CD3 та активізував перегрупування. Тималін достовірно збільшував експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів, однак напрямом змін експресії інших антигенних детермінант зберігався.

Таким чином, ПКН та тималін перешкождали інгібуючому впливу убаїну на функціональну активність мембран лімфоцитів периферійної крові. Результати досліджень за умов блокади мембраноз'язаного ферменту  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази свідчать,

що безсумнівним залишається мембранний рівень первинної взаємодії пептидних комплексів з імунокомпетентними клітинами, після реалізації якого відбувається вплив або на певні ферментні системи мембрани, або на певні елементи сигнальних шляхів. Враховуючи залежність функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази від стану її ліпідного мікрооточення, вірогідним можна вважати безпосередній вплив пептидних комплексів на ліпідний матрикс, як, наприклад, неопосередковане рецепторами пригнічення  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази сарколеми міоцитів окситоцином [Рыбальченко В.К., 1987]. Кінцевий результат такого впливу – реактивація  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази. Очевидно, вплив ПКН та тималіну може бути опосередкованим іншими сигнальними шляхами.

В цілому, результати наведених двох серій свідчать, що досліджені пептидні комплекси реалізують свою біологічну дію не одним певним механізмом, а задіюють водночас декілька шляхів.

Для підтвердження можливої нереперторної дії досліджених пептидних комплексів проведено визначення впливу ПКН та тималіну на функціональну активність лімфоцитів за умов попереднього видалення з мембрани поверхневих рецепторів. Нами використано  $\alpha$ -трипсин (ЕС 3.4.21.4), серинова протеїназа, що розщеплює пептидні зв'язки, утворені лізином і аргініном [Gonias S.L., Pizzo S.V., 1983]. Під впливом трипсину знижувалась експресія поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3, CD4 та CD8, зменшувалась кількість перегруповань. ПКН відновлював початковий рівень експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3, CD4, збільшував CD72, стимулював перегруповання. Можливість стимулювати експресію поверхневих рецепторів показана для поліпептидних препаратів тимогену, тимопоетину, тималіну,  $\alpha$ 1-тимозину, які значно прискорювали появу рецепторів на клітинах тимусу, попередньо оброблених трипсином [Гриневич Ю.А. и др., 1989; Серый С.В. и др., 1990]. У наших дослідженнях тималін відновлював експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів, підвищував рівень петчів з імуноглобулінових молекул, CD3, кепів та кластерів з молекул CD4, кластерів CD8.

Таким чином, ПКН та тималін відновлювали функціональну активність лімфоцитів, вочевидь, на початкових етапах за рахунок мобілізації рецепторів, заглиблених у товщу мембрани, а в подальшому, в разі необхідності, залучаючи внутрішньоклітинний пул рецепторів (прискорення транспортування на клітинну поверхню нових рецепторних молекул). На користь цього свідчить підсилення під дією ПКН експресії молекул CD72, які не розщеплюються трипсином.

Відновлення рецепторів за умов попереднього видалення дає підставу вважати, не відкидаючи повністю взаємодію з власними рецепторами, які, наприклад, не підлягають дії трипсину, або взаємодію з рецепторами інших біологічно активних речовин, що на перший план виступає нереперторний механізм взаємодії пептидних комплексів з мембраною [Островська Г.В., 2005]. Такий

мембраноопосередкований механізм допускає прямий вплив на мембрану, коли занурені в ліпідний матрикс молекули регуляторних пептидів отримують можливість взаємодії з експонованими в товщі мембрани сайтами різних білків, зокрема, мембранозв'язаних ферментів та рецепторів інших біологічно активних речовин [Мураневич С.А., 1993].

Щоб підтвердити можливість залучення ПКН та тималіном внутрішньоклітинного пулу рецепторів, було проведено дослідження за умов блокування метаболічних процесів у клітині за допомогою структурного аналога фолієвої кислоти - метотрексату.

Незважаючи на те, що механізм дії метотрексату достатньо досліджений, продовжуються роботи по вивченню його дії за умов патологічних станів, наприклад, ревматоїдного артриту, коли основними факторами дії стають пригнічення Т-клітинної проліферації, опосередковане впливом на пуриновий та піримідиновий метаболізм, пригнічення реакцій трансметиловання, які необхідні для надання Т-клітинній цитотоксичності та інші [Cronstein B.N., 2005]. Цитотоксичні властивості антиметаболітів базуються на пригніченні синтезу геномної ДНК або РНК та, як наслідок – на гальмуванні проліферації та диференціювання лімфоцитів. При цьому на систему Т-лімфоцитів антиметаболіти та алкілюючі агенти діють значно ефективніше та стабільніше, ніж на систему гуморального імунітету [Pleyer U. et al., 1999].

Дійсно, обробка лімфоцитів метотрексатом показала пригнічення експресії поверхневих імуноглобулінових молекул, CD8, CD72 та найбільш значимим чином - антигенних детермінант CD3, зниження кількості перегрупвань. Додавання в середовище інкубації тималіну та ПКН супроводжувалось відновленням експресії поверхневих рецепторів та активізацією перегрупвань. Отримані дані стали основою припущення, що дія пептидних комплексів відбувається не тільки на поверхні мембрани, але й на етапі мобілізації пептидними комплексами нирок та тимусу внутрішньоклітинного пулу рецепторів (ремоделювання мембранних рецепторів шляхом мобілізації вже синтезованих рецепторів, або впливом на внутрішньоклітинний рівень утворення рецепторів - прискорення сборки та транспортування на клітинну поверхню нових рецепторних молекул).

На користь цього свідчать також результати дослідження за умов послідовного видалення рецепторів з поверхні обробкою трипсином та інкубації з метотрексатом, коли при видаленні рецепторів з поверхні мембрани механізми відновлення рецепторного профілю переключаються до залучення переважно внутрішньоклітинного пулу рецепторів.

Подвійна обробка клітин протеолітичним ферментом та блокатором клітинного метаболізму досить глибоко порушувала функціональний стан лімфоцитів, істотно пригнічуючи рівень експресії поверхневих антигенних детермінант. Так, якщо порівняти зниження експресії, яке відбулось за умов

обробки клітин тільки метотрексатом, з результатами подвійної обробки (трипсин, метотрексат), зниження рівня експресії було більшим приблизно у 2-3 рази. Під дією ПКН підвищувався рівень поверхневих імуноглобулінів, CD3, CD8 та CD72, тималіну - поверхневих імуноглобулінів, CD8, HLA-DR, що супроводжувалось підвищенням кількості петчів, кластерів та кепів. Слід зазначити, що в серії з використанням окремо метотрексату дія пептидних комплексів не так значуща, як при послідовній обробці клітин трипсином та метотрексатом.

Таким чином, за умов послідовного видалення рецепторів з поверхні мембрани та блокування метаболічних процесів усередині клітини за допомогою метотрексату ПКН та тималін відновлювали експресію досліджених рецепторів, діючи односпрямовано. Для ПКН відновлювальний ефект більш виражений. На нашу думку, відновлення пулу рецепторів відбувається за рахунок мобілізації внутрішньомембранних молекул та залучення внутрішньоклітинного пулу рецепторів. Враховуючи особливості механізму дії метотрексату, зокрема пригнічення синтезу геномної ДНК або РНК, що є основою цитотоксичності антиметаболітів, ми не можемо обмежити дію ПКН та тималіну лише мембранним рівнем. Вочевидь, пригнічення метаболічних процесів може торкатися процесів синтезу нових рецепторних молекул, тож, вплив пептидних речовин відбувається на етапах прискорення сборки та доставки нових рецепторних молекул на мембрану. Механізм реалізації такого впливу, враховуючи можливість втрати власних рецепторів для пептидних речовин у результаті обробки клітин трипсином, для ПКН та тималіну, вочевидь, переважно опосередкований нерцепторним прямим впливом на ліпідний матрикс мембрани.

Отримані результати відносно мембраноопосередкованих впливів ПКН та тималіну, можливість модуляції ними початкових етапів сигнальної трансдукції, вимагають з'ясувати наявність специфічних рецепторів, що проводили, ґрунтуючись на концепції "формалізації" пептидної суміші близьких за амінокислотною послідовністю та фізико-хімічними властивостями речовин для аналізу механізмів їх дії [Кайдашев И.П., 1996; Ramensee H.-G. et al., 1993] у трьох серіях.

За допомогою ТРІТЦ-міченого ПКН виявлені низькоафінні рецептори, специфічність яких підтверджено відсутністю зв'язування з надлишком неміченого ПКН та перехресного зв'язування з тималіном. ПКН має властивість взаємодіяти в середньому з 38% (36-42%) клітин, які переважно несуть маркери HLA-DR, CD3, CD16, CD4 та в меншій мірі CD8 та CD95. ФІТЦ-тималін взаємодіє в середньому з 17,7% (16-19%) лімфоцитів, опосередковано рецепторами, специфічність яких підтверджено додаванням надлишку неміченого тималіну.

Константа дисоціації за методом Скетчарда становила  $2,5 \times 10^{-7}$  М для ПКН та  $1 \times 10^{-6}$  М для тималіну, що характеризує рецептори до пептидів, які є складовими комплексу, як низькоафінні. На наш погляд, низька афінність зв'язування ПКН з рецептором свідчить, що рецептор може бути наданий молекулами ГКГС. Це



дозволяє в процесі взаємодії пептидного комплексу не тільки займати вільні від пептиду молекули ГКГС на поверхні клітини (взаємодія пептид-агоніст-молекула ГКГС), але й витіснити з карману Бьоркмана інший пептид, ще більш низькоафінний, та реалізувати свою біологічну дію шляхом проведення активаційного сигналу.

Фосфорилування білків за залишками тирозину, яке регулюється узгодженою дією тирозинкіназ і тирозинфосфатаз [Hermiston M.L. et al., 2002], є ключовим регуляторним механізмом для фізіологічних процесів росту, диференціювання, регуляції клітинного циклу та функціонування елементів цитоскелету [Palacios E.H., Weiss A., 2004]. Вплив регуляторних пептидів на процеси трансдукції сигналів за допомогою процесів фосфорилування підтверджена для ангіотензину II [Li X. et al., 1998] та протимозину  $\alpha$  [Vega F.V. et al., 1998].

Відповідно задачам було визначено роль процесів фосфорилування внутрішньоклітинних білків за тирозином в реалізації мембраноопосередкованої дії ПКН. Аналіз інтенсивності флюоресценції за допомогою гістограм показав, що протягом перших трьох хвилин початкова базальна інтенсивність експресії фосфотирозину практично не змінювалась. Помітне зростання інтенсивності експресії молекул фосфотирозину під впливом ПКН спостерігалось через 10 хвилин інкубації (рис. 3) та досягало максимального значення на фоні попередньої стимуляції за допомогою ФМА. 15-хвилинна інкубація сприяла помітному зростанню експресії фосфотирозину під впливом ПКН на фоні попередньої обробки ФМА.



Рис. 3. Гістограма зміни рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом ПКН (інкубація 10 хвилин).

По осі абсцис (FL-1) – інтенсивність зеленої флюоресценції ФІТЦ (вміст фосфотирозину); по осі ординат (Events) – кількість клітин з наданим рівнем флюоресценції: 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, оброблені ПКН (0,5 мкг/мл).

Додавання поліпептидних факторів росту до клітин-мішеней сприяє початку тирозин-специфічного фосфорилювання білків плазматичної мембрани протягом перших 1-2 хвилин [Ek B. et al., 1982; Deuel T.F., Huang J.S., 1984]. Вибраний нами час інкубації підтверджує можливість мембраноопосередкованого впливу ПКН на початкові етапи сигнальної трансдукції, зокрема на роботу ферментів з тирозинкіназною активністю. Зміни рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом ПКН при інкубації 60 хвилин практично не спостерігалось.

Методом дот-блотінгу показано можливість протікання процесів фосфорилювання у лімфоцитах під впливом ПКН за більш тривалий час. Найбільш інтенсивне забарвлення смужок нітроцелюлози (максимальний рівень експресії внутрішньоклітинного фосфотирозину) спостерігалось при інкубації лімфоцитів з ПКН протягом 120 хвилин, середня інтенсивність забарвлення - при інкубації протягом 6 та 24 години, що свідчить про можливий вплив ПКН на етапи сигнальної трансдукції, які реалізуються на рівні ферментативних каскадів, що взаємодіють з ядерними факторами транскрипції.

Таким чином, ПКН залучає процеси фосфорилювання мембранних білків лімфоцитів за залишками тирозину для реалізації свого мембраноопосередкованого впливу двома етапами, впливаючи на початкові етапи сигнальної трансдукції, зокрема, на роботу ферментів з тирозинкіназною активністю, та на етапи сигнальної трансдукції, які реалізуються на рівні ферментативних каскадів, що взаємодіють з ядерними факторами транскрипції. Субстратом фосфорилювання можуть бути білки, які пов'язані з молекулами ГКГС I класу.

Таким чином, мембраноопосередкована взаємодія з імунокомпетентною клітиною, на наш погляд, визначає подальшу долю реалізації пептидною молекулою своєї фізіологічної ролі. ПКН та тималін модулюють функціональний стан мембран лімфоцитів периферійної крові за фізіологічних умов, в комплексі з ендogenous імуномодуляторами, за умов модуляції активності компонентів найважливіших шляхів сигнальної трансдукції, за умов видалення поверхневого рецепторного пулу та пригнічення метаболічних процесів. Такий достатньо значний обсяг впливів неможливо пояснити одним певним механізмом. Участь регуляторних пептидів в численних фізіологічних процесах пояснюється залученням різних сигнальних (трансдукторних) механізмів, як це визначено, наприклад, для ендотеліну-1, котрий є модулятором тону судин, клітинного росту, проліферації, мітогенезу, звільнення гормонів з надниркових залоз та ін. [Гомазков О.А., 1999]. Значним моментом в механізмах дії ПКН та тималіну є здатність залучати процеси фосфорилювання за тирозином для їх реалізації, опосередковуючи свій вплив або через власні рецептори, або діючи безпосередньо на мембрану, про що свідчить властивість ПКН та тималіну модулювати перегрупування рецепторів у площині мембрани та змінювати співвідношення в системі "кластери-петчі-кепи", які є підґрунтям для

формування структурної основи сигнальних каскадів - рафтів, початкового етапу формування контактного сайту TCR з антиген-презентуючою клітиною.

Необхідний рівень обміну речовин, гомеостазу та життєдіяльності для пристосування до умов зовнішнього середовища, що постійно змінюються, потребує активного керування функціями організму та його поведінкою, що забезпечується складною системою механізмів фізіологічної регуляції. Результати дослідження свідчать, що за фізіологічних умов нирки продукують пептидні речовини, які, окрім прямого впливу на функціональний стан самої нирки, здатні впливати на фізіологічну регуляцію функціонального стану мембран лімфоцитів. Порівняння дії ПКН та тималіну, який походить з центрального органу імуногенезу – тимусу, показує, що пептидні речовини володіють спільними механізмами дії, реалізація яких забезпечує підтримку компонентів імунної системи в функціонально активному стані. В складних багаторівневих системах біологічної регуляції регуляторним пептидам тканинного походження відводиться важлива та відповідальна роль інформаційних посередників, які забезпечують зв'язок між органами та системами, а також реалізацію численних впливів за фізіологічних умов і за умов дії на організм різноманітних чинників. Результати дослідження підтверджують концепцію пептидергічної регуляції багатоклітинного організму пептидними речовинами, які синтезуються в периферійних органах та тканинах та забезпечують їх функціонування в чіткому співвідношенні з життєдіяльністю організму в цілому.

## ВИСНОВКИ

У дисертації представлено теоретичне узагальнення та нове рішення наукової проблеми визначення механізмів регуляції функціонального стану мембран лімфоцитів периферійної крові фізіологічно активними речовинами, які продукуються нирками та реалізують свій вплив за фізіологічних умов, за умов дії ендогенних імуномодуляторів, за умов модуляції активності окремих ланок основних шляхів сигнальної трансдукції та пригнічення метаболічних процесів.

1. За допомогою розробленого способу моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів визначено, що пептидний комплекс нирок здатний стимулювати функціональну активність інтактних лімфоцитів за рахунок модуляції рівня експресії поверхневих рецепторів. Під час 30-ти та 60-хвилинної інкубації ПКН переважно збільшував рівень експресії антигенних детермінант CD3, CD4, CD8 та HLA-DR, знижував експресію CD22. Інкубація лімфоцитів з ПКН протягом 24 годин виявила стимулювання експресії CD3, CD4, CD8 та HLA-DR, пригнічення – CD72. Тималін під час 30-ти та 60-хвилинної інкубації також збільшував рівень експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, CD3, CD4, CD8 та HLA-DR переважно

в середній та максимальній концентраціях, знижував експресію CD72 у максимальній концентрації. При інкубації з тималіном протягом 24 годин зростав рівень експресії CD3, CD4, CD8 та HLA-DR.

2. Порівняння впливу ПКН та тималіну за умов дії ендогенних імунomodulatorів визначило односпрямовану модулюючу дію. За умов дії ІЛ-2 ПКН викликав достовірне збільшення експресії CD3 у 1,3 рази, зниження експресії CD4 у 1,2 рази, CD8 та CD72 – у 1,3 рази. Тималін за подібних умов підвищував експресію CD3 на 11,85%, HLA-DR на 21,69%, знижував - CD8 на 33,74%, CD72 на 35,65% ( $p < 0,05$ ). ПКН відновлював знижену під дією гідрокортизону експресію CD3 і CD8, зменшував – CD4 та HLA-DR. Тималін підвищував рівень експресії CD3, CD4 та CD8, знижував - HLA-DR. За умов дії  $\alpha$ -ІФН ПКН відновлював знижений рівень експресії антигенних детермінант Т-клітин (CD3, CD4, CD8), HLA-DR та продовжував збільшення експресії CD72. Тималін також відновлював знижений під дією  $\alpha$ -ІФН рівень експресії антигенних детермінант.

3. ПКН та тималін стимулювали експресію мембранних рецепторів лімфоцитів незалежно від рівня іонів кальцію всередині клітини і в позаклітинному просторі. Така дія була опосередкована властивістю досліджених пептидних речовин відновлювати необхідний рівень внутрішньоклітинного кальцію або збільшувати його, діючи подібно до кальцієвого іонофору A23187.

4. Для ПКН визначено функціональну антагоністичну дію по відношенню до протеїнкіназної сигнальної системи. ПКН знижував індуковану ФМА експресію CD4 на 22,91%, CD8 на 13,26%, CD72 на 24,32%, поверхневих імунoglobulinових рецепторів на 39,20%, викликав подальше зниження експресії HLA-DR на 33,33% ( $p < 0,05$ ). Тималін також знижував експресію CD3 на 11,22%, CD4 на 35,24%, поверхневих імунoglobulinів на 13,57% ( $p < 0,05$ ).

5. За умов пригнічення активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази за допомогою убаїну ПКН та тималін володіли здатністю стимулювати функціональну активність клітин шляхом збільшення рівня експресії антигенних детермінант CD4, CD8, поверхневих імунoglobulinів та CD72. На експресію CD3 пептидні речовини діяли різноспрямовано.

6. При попередньому видаленні рецепторів з поверхні мембрани трипсином ПКН та тималін здатні відновлювати експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів. За умов пригнічення метаболічних процесів у клітині за допомогою метотрексату дія пептидних речовин мала відмінності в збільшенні експресії деяких рецепторів. Так, ПКН стимулював експресію CD3 та CD8, тималін - поверхневих імунoglobulinових рецепторів і детермінант CD3. Комплексна обробка клітин трипсином та метотрексатом визначила, що ПКН притаманна властивість відновлювати рівень експресії ефективніше, ніж тималіну.

7. На поверхні мембран лімфоцитів за умов відсутності перехресного зв'язування виявлено низькоафінні рецептори до ПКН та тималіну. Визначено, що

ПКН взаємодіє з 38,0 % клітин, які переважно несуть маркери HLA-DR, CD3, CD16, CD4, та в меншій мірі CD8 та CD95, практично не зв'язувався з клітинами з фенотипом CD22<sup>+</sup>. Тималін взаємодіє з 17,7% лімфоцитів.

8. У реалізації мембраноопосередкованого впливу ПКН беруть участь процеси фосфорилювання мембранних білків лімфоцитів за залишками тирозину, які відбуваються на початкових та більш віддалених за часом етапах сигнальної трансдукції.

9. Модуляція функціональної активності лімфоцитів відбувається шляхом зміни перегрупування поверхневих рецепторів лімфоцитів у площині мембрани у вигляді кластерів, петчів та кепів, визначаючи здатність ПКН та тималіну впливати на початковий етап формування контактного сайту T-клітинного рецептора з антиген-презентуючою клітиною – поляризацію клітин та функціональну активність B-клітинного рецептора.

10. Реалізація модулюючого впливу пептидних комплексів центрального та периферичного походження - ПКН та тималіну на функціональний стан мембран лімфоцитів периферійної крові відбувається подібними механізмами дії. Визначено односпрямований мембраноопосередкований стимулюючий вплив ПКН та тималіну за фізіологічних умов, за умов дії ендогенних імуномодуляторів, зміни рівня внутрішньоклітинного кальцію. За умов модуляції активності протейніназної сигнальної системи, транспортних систем для іонів та пригніченні метаболічних процесів дія пептидних речовин на експресію окремих рецепторів відрізнялась. Отримані результати свідчать про універсальність дії пептидного комплексу нирок та тималіну.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Розроблений спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів може бути використаний для оцінки функціонального стану мембран лімфоїдних клітин за фізіологічних умов, за умов дії різних чинників та для визначення імуномодулюючої мембранотропної активності фізіологічно активних речовин.

Результати дослідження механізмів дії ПКН (лікарська речовина “Нефролат”) є фрагментом його доклінічних випробувань. Отримані дані визначають перспективність подальшого дослідження імуномодулюючих властивостей пептидного комплексу нирок для обґрунтування його використання в клініці як імуноотропного препарату. Результати роботи розширюють та доповнюють знання стосовно механізмів імуномодулюючої дії тималіну та визначають необхідність їх врахування в клінічній практиці при призначенні тималіну в комплексній терапії з модуляторами рівня кальцію, імуномодуляторами, цитостатичними препаратами.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Регуляція активності мембрани та процесів апоптозу лімфоїдних клітин тканинними пептидами /Н.О. Боброва, Л.Е. Весніна, І.П. Кайдашев, О.В. Квак, О.А. Шликова, В.В. Рябенко /Під ред. І.П. Кайдашева. - Полтава: Полімет, 2004.- 216 с. *(пошукувачем особисто написаний розділ 3.2, здійснено підбір літературних джерел, підготовку до друку).*

2. Весніна Л.Э. Изменение экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия  $\alpha$ -интерферона //Проблеми екології та медицини.- 1997. - Т.1, № 1-2. - С. 32-34.

3. Весніна Л.Э. Эффект ремодуляции поверхностных рецепторов лимфоцитов пептидным комплексом почек //Архив клинич. и эксперим. медицины.- 2000.- Т. 9, № 3.- С. 353-355.

4. Весніна Л.Е. Особливості впливу пептидного комплексу нирок та тималіну на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів при модуляції вмісту внутрішньоклітинного кальцію // Эксперим. та клініч. фізіологія і біохімія.- 2004.- № 4(28).- С. 42-50.

5. Весніна Л.Е. Визначення рівня впливу пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів //Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія.- 2005.- № 1(29).- С. 59-66.

6. Весніна Л.Е. Особливості впливу тималіну на антигенні детермінанти лімфоцитів за умов дії ендогенних імуномодуляторів //Проблеми екології та медицини.- 2005.- Т. 9, № 1-2.- С. 18-22.

7. Весніна Л.Э., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лейкоцитов //Иммунология.- 1998.- № 4.- С. 13-16. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження, підбір літературних джерел).*

8. Весніна Л.Э., Кайдашев И.П. Экспрессия мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия иммуномодуляторов //Иммунология.- 1999.- № 6.- С. 36-39. *(пошукувачем особисто проведено планування і виконання експерименту, імунофлюоресцентне дослідження, аналіз отриманого матеріалу).*

9. Весніна Л.Э., Кайдашев И.П. Особенности воздействия пептидного комплекса почек на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов, обработанных интерлейкином-2 и гидрокортизоном //Иммунология.- 2000.- № 2. - С. 17-21. *(пошукувачем особисто проведено експеримент, імунофлюоресцентне дослідження, формулювання висновків, підбір літературних джерел).*

10. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Роль кальційзалежних механізмів у реалізації імуотропних ефектів пептидного комплексу нирок //Фізіол. журн.- 2000.- Т.46, № 6.- С. 28-35. *(пошукувачем особисто проведено моделювання вмісту кальцію,*

*імунофлюоресцентне дослідження, аналіз отриманих даних, підбір літературних джерел).*

11. Роль протеинкиназы С в механизме действия регуляторных пептидов //Л.Э. Веснина, И.П. Кайдашев, О.А. Ножинова, О.А. Гейко, Н.А. Боброва //Проблеми екології та медицини.- 1999.- Т.3, N 5.- С. 50-54. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження, формулювання висновків).*

12. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П., Соколенко В.Н. Влияние пептидного комплекса почек на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов в условиях связывания внеклеточного кальция //Проблеми екології та медицини.- 1998.- Т.2, № 1-2.- С. 34-37. *(пошукувачем особисто проведено планування експерименту, імунофлюоресцентне дослідження, формулювання висновків).*

13. Восстановление поверхностных рецепторов лимфоцитов под действием пептидных комплексов почек и тимуса (тималина) после обработки метотрексатом / Л.Э. Веснина, Н.Л. Куценко, И.П. Кайдашев, И.Н. Звягольская //Проблеми екології та медицини.- 2001.- Т. 5, № 1-2. - С. 33-37. *(пошукувачем особисто проведено імунофлюоресцентне дослідження, аналіз отриманих даних).*

14. Кайдашев И.П., Веснина Л.Э. К механизму иммуотропного действия естественного пептидного комплекса почек //Имунологія та алергологія.- 1999. - № 1-2. - С. 119-122. *(пошукувачем особисто проведено імунофлюоресцентне дослідження, підбір літературних джерел).*

15. Влияние природного пептидного комплекса почек и его синтетических аналогов на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов доноров / О.А. Гейко, И.П. Кайдашев, И.Н. Звягольская, О.А. Баштовенко, Л.Э. Веснина, Л.В. Беркало //Проблеми екології та медицини.- 1999.- Т. 3, № 3-4. – С. 94-95. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження).*

16. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Вплив пептидного препарату з нирок на рівень експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів за умов пригнічення активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази //Фізіол. журн.- 2004.- Т. 50, № 6.- С. 76-82. *(пошукувачем особисто проведено моделювання активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази, імунофлюоресцентний метод, підбір літературних джерел, аналіз отриманих даних).*

17. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Динамика изменения экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов под действием тималина //Имунологія та алергологія.- 2005.- № 2.- С. 7-11. *(пошукувачем особисто проведено планування та виконання експерименту, імунофлюоресцентне дослідження, формулювання висновків).*

18. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Визначення та порівняння впливу пептидного комплексу нирок та тималіну на експресію рецепторів лімфоцитів //Имунологія та алергологія.- 2005.- № 3.- С. 51-54. *(пошукувачем особисто проведено планування та експериментальне дослідження, імунофлюоресцентне дослідження, аналіз та інтерпретацію отриманих даних).*

19. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Тималін відновлює експресію поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином //Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед.стомат. акад.- 2005.- Т. 5, вип. 2(10).- С. 9-12. *(пошукувачем особисто проведено моделювання впливу трипсину, імунофлюоресцентне дослідження, формулювання висновків).*

20. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Порівняльний вплив тималіну та пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів за умов модуляції транспортних систем для іонів //Вісник проблем біології і медицини.- 2005.- Вип. 3.- С. 65-71. *(пошукувачем особисто проведено планування та експеримент, імунофлюоресцентне дослідження, підбір літературних джерел, аналіз даних).*

21. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Участь пептидного комплексу нирок в процесах фосфорилування внутрішньоклітинних білків за залишками тирозину //Проблеми екології та медицини.- 2005.- Т.9, № 3-4.- С. 3-7. *(пошукувачем особисто проведено моделювання впливу пептидного комплексу нирок та ФМА, лізис та маркування клітин, підбір літературних джерел, формулювання висновків).*

22. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Порівняння дії тималіну та пептидного комплексу нирок на експресію мембранних рецепторів лімфоцитів на фоні  $\alpha$ -інтерферону //Клінічна фармація.- 2006.- № 1.- С. 26-29. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження, інтерпретацію даних).*

23. Пат. 53122А України 7 А 61К35/23. Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів. – Весніна Л.Є., Кайдашев І.П. – N 2002032132; Заявл. 18.03.2002; Опубл. 15.01.2003; Бюл. № 1. - С. 4.51. *(пошукувачем особисто проведено розробку способу моделювання, імунофлюоресцентне дослідження, підбір літературних джерел).*

24. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Участь пептидного комплексу нирок в регуляції експресії деяких рецепторів імунітету //Фізіологія та патологія імунітету, гемостазу та перекисного окислення ліпідів: Зб. наук. пр. /Під ред. М.С. Скрипнікова.- Полтава, 1997. - С. 54-60. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження, проведено підбір літературних джерел).*

25. Весніна Л.Э. Некоторые особенности мембрано-опосредованного действия регуляторных пептидов /Матер. конф. молодих вчених “Фізіологія і патологія перекисного окислення, гемостазу та імуногенезу”.- Полтава, 1998 //Проблеми екології та медицини.- 1999.- Т. 3, № 1-2.- С. 32.

26. Весніна Л.Е. Дія пептидного комплексу нирок на ремоделювання поверхневих мембранних глікопротеїдів лімфоцитів /Матер. конф. молодих вчених “Фізіологія і патологія перекисного окислення, гемостазу та імуногенезу”.- Полтава, 1999 //Проблеми екології та медицини.- 1999.- Т. 3, № 5.- С.7.

27. Весніна Л.Е., Міщенко В.П. Вплив пептидного комплексу нирок на експресію мембранних рецепторів лімфоцитів на фоні дії імуномодуляторів //Фізіол.



журнал.- 1998.- Т. 44, № 3.- С. 184-185. *(пошукувачем особисто проведено експеримент, імунофлюоресцентне дослідження, аналіз отриманого матеріалу).*

28. Весніна Л., Куценко Н. Особливості мембрано-опосередкованої дії пептидного комплексу нирок на фоні цитостатичних препаратів //Тези допов. 3-го міжнар. мед. конгр. студентів і молодих учених.- Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.- С. 16. *(пошукувачем особисто проведено моделювання впливу пептидного комплексу нирок та цитостатичних препаратів, формулювання висновків).*

29. Весніна Л.Е. Вплив пептидного комплексу нирок на експресію мембранних рецепторів лімфоцитів на фоні дії цитостатичних препаратів //36. тез I нац. конгр. України з імунології, алергології та імунореабілітації.- Алушта, 1998.- С. 88-89.

30. Пептиды, представляемые молекулами главного комплекса гистосовместимости, как перспективные препараты иммуотропной терапии /И.П. Кайдашев, Л.Э. Веснина, О.А. Гейко, Н.А. Боброва, О.В. Квак, В.В. Рябенко, О.А. Ножинова, И.Я. Губенко, В.Н. Соколенко, Н.И. Чекалина, Т.Н. Запорожец /Матер. IV Укр. наук.-практ. конф. з актуальних питань алергології та клінічної імунології.- Київ, 1999 //Імунологія та алергологія.- 1999.- № 3.- С.- 66. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження).*

31. Роль тканевых пептидов, экстрагированных из молекул главного комплекса гистосовместимости, в регуляции экспрессии поверхностных рецепторов и процессов апоптоза тимоцитов и лимфоцитов периферической крови /И.П. Кайдашев, Н.А. Боброва, Л.Э. Веснина, О.А. Гейко, О.А. Ножинова, В.В. Рябенко /Матер. III съезда иммунологов и алергологов СНГ.- Сочи, 2000 //Аллергология и иммунология.- 2000.- Т. 1, № 2.- С. 119. *(пошукувачем особисто проведено моделювання впливу пептидного комплексу нирок, виконано імунофлюоресцентне дослідження).*

32. Возможность использования тканевых пептидов в терапии иммунопатологий, вызванных нарушением апоптоза иммунных клеток /И.П. Кайдашев, О.А. Баштовенко, О.А. Гейко, В.В. Рябенко, О.А. Ножинова, Н.А. Боброва, Л.В. Беркало, И.Н. Звягольская, Л.Э. Веснина, И.В. Новоселецкая /Матер. IV съезда иммунологов и алергологов СНГ.- Москва, 2001 //Аллергология и иммунология.- 2001.- Т. 2, № 2.- С. 16. *(пошукувачем особисто проведено аналіз та інтерпретацію даних).*

33. Kaidashev I., Noginova O., Ryabenko V., Vesnina L. The role of peptides and genetic differences in the regulation of lymphoid cells apoptosis /Abstr. of the VII Congress of Polish society of allergology //Alergya Astma Immunologia.- 2000.- Vol. 5, suppl. 2.- P. 312. *(пошукувачем особисто виконано імунофлюоресцентне дослідження, формулювання висновків).*

34. Kaidashev I., Noginova O., Ryabenko V., Vesnina L. The role of MHC peptides in the regulation of lymphocyte apoptosis /Abstr. XIXth Congress of the European

academy of allergology and clinical immunology //Allergy.- 2000,- Vol. 55, suppl. 63.- P. 72. *(пошукувачем особисто проведено моделювання впливу пептидного комплексу нирок, аналіз даних).*

35. Peptides bound to MHC class I molecules induce signal transduction by these molecules /I.P. Kaidashev, V.V. Ryabenko, E.I. Kaidasheva, O.A. Noginova, L.E. Vesnina /Abstr. of the XXI Congress of the European academy of allergology and clinical immunology //Allergy.- 2002.- Vol. 57, suppl. 73.- P. 161. *(пошукувачем особисто виконано аналіз отриманих даних).*

## АНОТАЦІЯ

Весніна Л.Е. Фізіологічна регуляція функціонального стану мембран лімфоцитів периферійної крові пептидним комплексом нирок. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.03 - нормальна фізіологія. - Інститут геронтології АМН України, Київ, 2006.

Дисертація присвячена теоретичному узагальненню та новому вирішенню наукової проблеми визначення механізмів регуляції функціонального стану плазматичної мембрани лімфоцитів периферійної крові фізіологічно активними речовинами, які продукуються нирками, та реалізують свій вплив за фізіологічних умов, за умов дії ендогенних імунomodуляторів, за умов модуляції активності окремих ланок основних шляхів сигнальної трансдукції та пригнічення метаболічних процесів.

Результати досліджень свідчать про можливість фізіологічної регуляції функціонального стану мембран лімфоцитів периферійної крові пептидним комплексом, отриманим з тканин органу нелімфоїдного походження - кіркової речовини нирок, яка реалізується зміною рівня та характеру експресії поверхневих мембранних рецепторів лімфоцитів. Визначено, що до трансдукції сигналу пептидного комплексу нирок у клітину залучені процеси фосфорилювання за тирозином, які відбуваються на початкових та більш віддалених за часом етапах реалізації біологічної дії. На поверхні мембрани периферійних лімфоцитів визначені специфічні рецептори з низькою афінністю до пептидного комплексу нирок.

Обґрунтована ідентичність механізмів реалізації біологічної дії пептидних комплексів, отриманих з кіркової речовини нирок та тимусу.

Ключові слова: пептидний комплекс нирок, тималін, лімфоцити, рецептори, експресія, фізіологічна регуляція.

## АННОТАЦИЯ

Веснина Л.Э. Физиологическая регуляция функционального состояния мембран лимфоцитов периферической крови пептидным комплексом почек. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.03 – нормальная физиология. – Институт геронтологии АМН Украины, Киев, 2006.

Диссертация посвящена теоретическому обобщению и новому решению научной проблемы определения механизмов регуляции функционального состояния мембран лимфоцитов периферической крови в физиологических условиях, в условиях действия эндогенных иммуномодуляторов, в условиях модуляции активности отдельных звеньев основных путей сигнальной трансдукции и ингибирования метаболических процессов.

Результаты исследования свидетельствуют о возможности физиологической регуляции функционального состояния лимфоцитов периферической крови пептидным комплексом, полученным из тканей органа нелимфоидного происхождения – коркового вещества почек.

Для решения научной проблемы физиологической регуляции использован методический подход, согласно которому функциональное состояние мембран лимфоцитов моделировали веществами с исследованными механизмами действия - иммуномодуляторами эндогенного происхождения, индукторами и ингибиторами отдельных звеньев основных путей сигнальной трансдукции, ингибиторами клеточного метаболизма. Использовано сравнение механизма действия пептидного комплекса почек с действием пептидного комплекса центрального происхождения - тималином.

Установлено, что в физиологических условиях регулирующее влияние пептидного комплекса почек реализуется за счет изменения уровня и характера экспрессии поверхностных мембранных рецепторов лимфоцитов. Пептидный комплекс почек и тималин влияют на функциональную активность лимфоцитов опосредованно путем изменения перегруппировки рецепторов в плоскости мембраны.

В работе определено, что в условиях действия эндогенных иммуномодуляторов пептидный комплекс почек и тималин оказывают модулирующее действие на функциональную активность лимфоцитов на уровне мембраны. Установлено, что стимулирующее влияние пептидного комплекса почек и тималина на экспрессию мембранных рецепторов лимфоцитов не зависит от изменения уровня ионов кальция как внутри клетки, так и в околоклеточном пространстве, и обусловлено способностью пептидных веществ восстанавливать необходимый уровень кальция внутри клетки, действуя подобно кальциевому

ионофору A23187. Доказано, что в условиях активации протеинкиназной сигнальной системы пептидный комплекс почек и тималин проявляют по отношению к ней функциональное антагонистическое действие. На фоне ингибирования убаином уровня экспрессии поверхностных рецепторов пептидный комплекс почек и тималин оказывают преимущественно стимулирующее экспрессию действие.

Установлено, что в условиях предварительного удаления рецепторов с поверхности мембраны пептидный комплекс почек восстанавливает экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов. В условиях ингибирования метаболических процессов в клетке пептидный комплекс почек и тималин оказывают преимущественно стимулирующее воздействие на функциональную активность лимфоцитов. Максимальное стимулирующее функциональную активность лимфоцитов влияние исследованных пептидных веществ реализуется в условиях комплексного действия – предварительного удаления рецепторов и ингибирования клеточного метаболизма.

Показано, что реализация мембраноопосредованного действия пептидного комплекса почек осуществляется с участием процессов фосфорилирования мембранных белков лимфоцитов по тирозиновым остаткам, которое происходит на начальных этапах сигнальной трансдукции, с затрагиванием работы ферментов с тирозинкиназной активностью, и на более поздних этапах сигнальной трансдукции. Определено наличие на поверхности мембраны лимфоцитов периферической крови специфических рецепторов к пептидному комплексу почек с низкой аффинностью.

Доказана идентичность механизмов реализации биологического действия пептидного комплекса, полученного из коркового вещества почек и пептидного комплекса центрального происхождения – тималина.

Ключевые слова: пептидный комплекс почек, тималин, лимфоциты, рецепторы, экспрессия, физиологическая регуляция.

## SUMMARY

Vesnina L.E. Physiological regulation of peripheral blood lymphocytes membrane functional state by kidney peptide complex. – A manuscript.

Dissertation for the doctor of medical sciences degree in speciality 14.03.03 – Normal Physiology. – Institute of Gerontology of the AMS of Ukraine, Kyiv - 2006.

Dissertation is dedicated to theoretical uniting and new decision of scientific problem – the regulative mechanisms determining peripheral blood lymphocytes plasmatic membrane functional state. Such regulation is performed by physiologically-active substances producing by kidneys and realizing their influence under physiological conditions, under endogenous immunomodulators action conditions, at signal transduction main ways separate links activity modulation as well as metabolic processes inhibiting.

The investigation results testify to peripheral blood lymphocytes functional state regulation by peptide complex received from non-lymphoid tissues – kidney cortex substance. Such regulation is performed due to lymphocytes surface membrane receptors character and level changing.

It was established that phosphorylation processes on tyrosine residues are involved into kidney peptide complex signal transduction in the cells. These processes take place on initial and later biologic action realization stages. Low-affinity specific receptors to peptide kidney complex were predicted on peripheral blood lymphocytes membrane surface.

Kidney and thymus peptide complexes had similar mechanisms for the realization of its biological activities targeted on lymphocytes from peripheral blood.

Key words: kidney peptide complex, thymaline, lymphocytes, receptors, expression, physiological regulation.