

© Веснина Л.Э. и соавт.

УДК 567.367:612.017.1

РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ C В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ*Веснина Л.Э., Кайдашев И.П., Ножинова О.А., Гейко О.А., Боброва Н.А.*

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

Вивчено вплив пептидних комплексів нирок і тимусу (тималіну) на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів на фоні активації ендогенної протеїнкінази C (ПК-C) за допомогою форболового ефіру 4-форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА). Активація протеїнкінази C супроводилась посиленням експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів, підвищенням їх рухової активності в площині мембрани і здатності до перегрупування. Аналогічний ефект посилення експресії антигенних детермінант і підвищення їх рухової активності в площині мембрани здійснювали пептидні комплекси тимусу і нирок, діючи окремо на інтактні клітини. Дослідження дії пептидних комплексів тимусу і нирок при попередній активації протеїнкінази C виявило антогонізм в дії регуляторних пептидів по відношенню до ФМА, що супроводжувалося відмінною посилення експресії рецепторів. Існує припущення про два можливих шляхи реалізації антогонізмів: по-перше, пептидні комплекси можуть діяти подібно ФМА, викликаючи подальшу активацію протеїнкінази C, приводячи її до гіперактивації і подальшому виснаженню; по-друге, пептидні комплекси можуть викликати активацію другої регуляторної системи, яка представлена в якості антогоніста систем, що залежать від Ca^{2+} та протеїнкінази C (можлива роль цАМФ-залежних механізмів сигнальної трансдукції).

Исследование биологического действия регуляторных пептидов показало, что выделенные из центральных органов иммунитета (тимуса, красного костного мозга, бурсы Фабрициуса), пептиды способны оказывать влияние на осуществление реакций клеточного и гуморального иммунитета, изменять состояние неспецифической резистентности организма [8]. В частности, тималин способствует увеличению Е_α-РОК и снижению Е_м-РОК в суспензии лимфоцитов здоровых доноров; у больных с некоторыми формами иммунодефицитов пептиды тимуса способствуют увеличению сниженного количества Т-хелперов/индукторов (ОКТ4+) и Т-супрессоров/киллеров (ОКТ8+), а при исходном увеличении числа этих клеток – уменьшают их [4]. Тимоген, низкомолекулярная (менее 500 Да) фракция пептидов тимуса в опытах *in vitro* и *in vivo* стимулировал образование Т-лимфоцитов, значительно ускорил появление рецепторов на клетках тимуса, предварительно обработанных трипсином [10].

Периферические пептиды, выделенные из различных органов и тканей, также могут выполнять роль модуляторов клеточного и гуморального иммунитета. Изучение биологического действия пептидного комплекса, выделенного из коркового вещества почек, показало его эффективность при аутоиммунной патологии почек [6]. Было отмечено восстановление иммунологической толерантности организма лабораторных животных к смеси тканевых антигенов, что дало возможность предположить участие выделенного пептидного экстракта в процессе взаимодействия Т-клеточного рецептора с его лигандами [6]. В проведенных ранее исследованиях показано, что *in vitro* пептидный комплекс почек оказывал дозозависимое стимулирующее действие на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов преимущественно Т-ряда – CD3, CD4,

CD8 и HLA-DR [2]. Способность пептидного комплекса влиять на функциональную активность лимфоцитов на фоне различных иммуномодуляторов – интерлейкина-2, гидрокортизона, α-интерферона позволила предположить возможный мембрано-опосредованный механизм действия [1,3].

В данной работе для выяснения роли сигнальных систем, связанных с мобилизацией внутриклеточного кальция в процессах взаимодействия пептидного комплекса почек с иммунокомпетентными клетками, мы изучили влияние пептидного комплекса на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов на фоне активации эндогенной протеинкиназы C (ПК-C) с помощью форболового эфира 4-форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА).

Материалы и методы

В работе использовали активатор протеинкиназы C 4-форбол-12-миристат-13-ацетат («Sigma»), тималин (завод медпрепаратов, Санкт-Петербург, Россия) и пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек по оригинальной методике [11]. Согласно методу, экстракцию тканей проводили органической галогенсодержащей кислотой в присутствии катионов двухвалентных металлов с последующим осаждением пептидов органическим растворителем с добавочной очисткой путем ультрафильтрации для выделения пептидов с молекулярной массой меньше 10 кДа.

Мононуклеары периферической крови здоровых доноров выделяли в градиенте плотности фикольтриомбрас (ρ=1,077 г/см³) по стандартной методике с последующим отмыванием в фосфатно-солевом буфере при pH 7,2 [7].

Суспензию лимфоцитов инкубировали в контрольных сериях с ФМА в дозе 5 нг/мл [14], в течение 2 часов при температуре 37°C. В опытных сериях в пробы параллельно добавляли тималин и

пептидный комплекс почек в дозах 0,12 мкг/мл и продолжали инкубировать при тех же условиях в течение 1 часа.

В качестве контроля использовали забуференный физиологический раствор. Для определения влияния тималина на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов проводили инкубацию интактных клеток с тималином в дозах 0,05 мкг/мл; 0,12 и 0,5 мкг/мл в течение 1 часа.

Экспрессию мембранных иммуноглобулиновых рецепторов оценивали в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием антител, против мембранных иммуноглобулинов А, G, М, конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) («Sanofi», France). Для определения экспрессии антигенных детерминант CD3, CD4, CD8, CD72 и HLA-DR в реакции непрямой иммунофлюоресценции использовали моноклональные антитела LT3, LT4, LT8, 3F3, HLA-DR (ТОО «Сорбент», Москва). В качестве вторых антител использовали конъюгированные с ФИТЦ анти-F(ab)₂- антитела.

Флюоресценцию регистрировали с помощью микроскопа «Люмам Р-8». Результаты оценивали по степени интенсивности флюоресценции – исследуемые клетки делили на 4 группы: с отрицательной реакцией (0 баллов), со слабopоложительной реакцией (1 балл), положительной (2 балла) и резко положительной (3 балла) реакцией. Рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) – дифференцировали 100 исследуемых клеток по указанной выше системе. Полученный процент клеток в каждой группе умножали на соответствующее данной группе число баллов. Сумма этих величин, разделенная на 100 – СЦК для одной клетки [13]. По характеру флюоресценции выделяли: диффузную флюоресценцию мембраны, когда равномерно светилась вся клетка, группировку рецепторов в виде отдельных кластеров, экзпов и пэтчей. Флюоресцентная микроскопия мембранных маркеров сопровождалась морфологическим контролем клеток в фазовом контрасте. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим, в среднем она составила 95-98%.

Результаты и обсуждение

В предыдущих исследованиях было изучено влияние пептидного комплекса почек на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов в опытах *in vitro*. Было показано, что пептидный комплекс оказывает дозозависимое стимулирующее действие на экспрессию антигенных детерминант CD3, CD4, CD8 и HLA-DR, повышает их подвижность в плоскости мембраны с образованием перегруппировок в виде экзпов, кластеров и пэтчей [2].

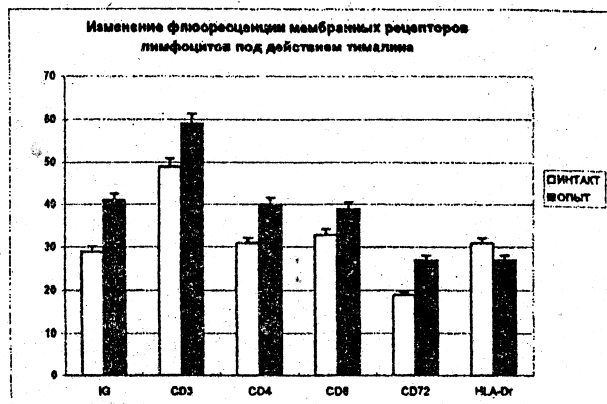
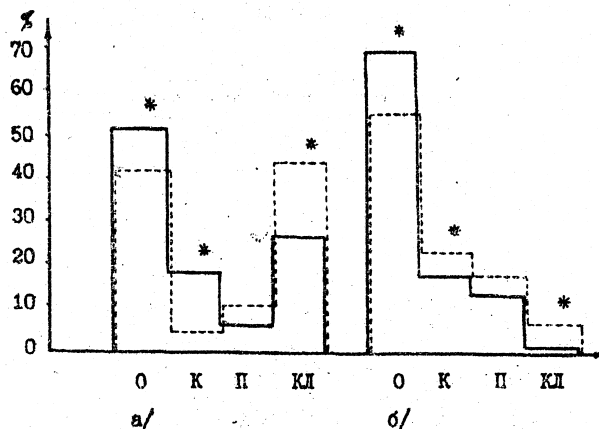


Рис. 1. Влияние тималина на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов. Здесь и в рис.2 по оси ординат – процент клеток с флюоресценцией; по оси абсцисс – распределение по группам: интакт – исходный уровень флюоресценции; контроль – уровень флюоресценции при добавлении в суспензию лимфоцитов тималина в дозе 0,12 мкг/мл.

В данной работе мы также изучили влияние тималина, который относят к центральным регуляторным пептидам [8], на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов. Как показали результаты исследования, тималин в дозах 0,05; 0,12 и 0,5 мкг/мл способствовал усилению экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, CD3, CD4, CD8, CD72 и незначительному снижению экспрессии HLA-DR (рис.1).



Гистограмма 1. Мембранная флюоресценция CD3+ (а) и CD4+ (б) лимфоцитов периферической крови в интактной группе (сплошная линия) и при добавлении ФМА (пунктирная линия). Здесь и далее – по оси ординат процент клеток с флюоресценцией; по оси абсцисс – виды перегруппировок рецепторов: о – клетки, у которых отсутствует флюоресценция, к – экзпы, п – пэтчи, кл – кластеры. * – достоверность изменений по отношению к интактной группе ($p < 0,05$).

Также, инкубация лимфоцитов с тималином приводила к повышению количества клеток, образующих в плоскости мембраны различные виды перегруппировок рецепторов. Так, для клеток, несущих антигенные детерминанты CD4, было характерным

образование пэтчей и кластеров, для CD8⁺ и CD72⁺ клеток – пэтчей, для CD3⁺ клеток – кластеров.

Для оценки роли протеинкиназы С в механизме действия регуляторных пептидов мы предварительно исследовали изменение уровня экспрессии антигенных детерминант лимфоцитов в условиях ее активации с помощью форболового эфира. Согласно полученным нами результатам, инкубация лимфоцитов с ФМА в дозе 5 нг/мл способствовала усилению экспрессии поверхностных рецепторов у CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺ и CD72⁺ – клеток, а также поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, которую оценивали по уровню флюоресценции соответствующих мембранных маркеров. Препарат вызывал угнетение экспрессии HLA-DR (рис.2). На фоне повышения экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов мы наблюдали изменение их подвижности с последующей перегруппировкой в плоскости мембраны. На гистограмме 1 показано изменение соотношения различных рецепторных групп (кэпы, пэтчи, кластеры) для CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов.

Средний цитохимический коэффициент, являющийся интегральным показателем свечения клетки, под влиянием ФМА возрастал практически для всех изученных маркеров, за исключением HLA-DR. Так, для клеток, у которых выявляли поверхностные иммуноглобулины, СЦК увеличивался с 0,57 до 0,69; для CD4⁺ клеток – с 0,6 до 0,81; для CD72⁺ клеток – с 0,36 до 0,45.

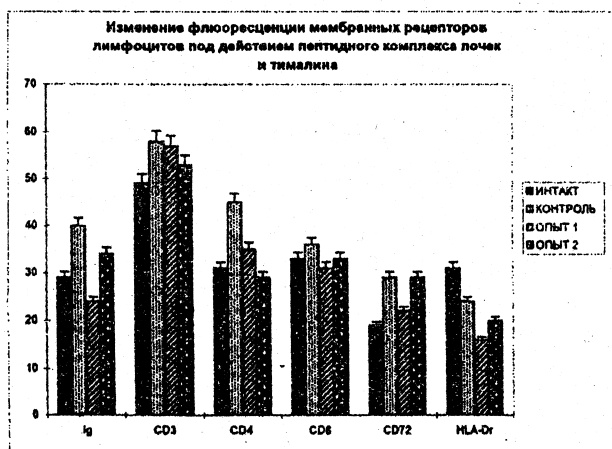
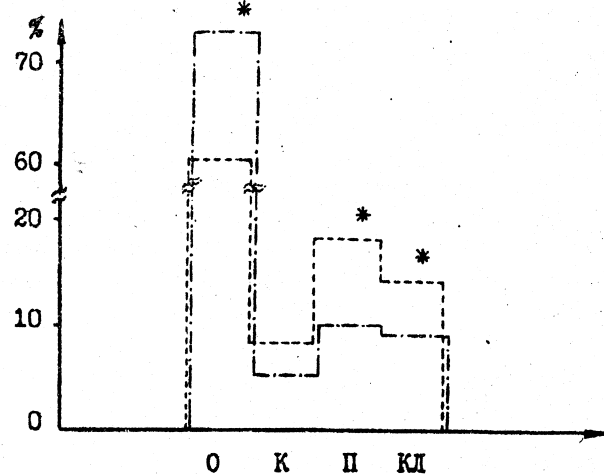


Рис. 2. Влияние пептидного комплекса почек и тималина на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов на фоне действия ФМА. Распределение по группам: интакт – исходный уровень флюоресценции; контроль – уровень флюоресценции при добавлении в суспензию лимфоцитов ФМА; опыт I – уровень флюоресценции при добавлении в суспензию лимфоцитов ФМА и пептидного комплекса почек; опыт II – уровень флюоресценции при добавлении в суспензию лимфоцитов ФМА и тималина.

Нами была выбрана наиболее эффективная доза пептидного комплекса почек и тималина, которая составила 0,12 мкг/мл. Инкубация лимфоцитов,

обработанных ФМА, с пептидным комплексом почек приводила к снижению уровня экспрессии CD4, CD8, CD72, поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, дальнейшему снижению экспрессии HLA-DR, практически не оказывая влияния на выраженность антигенных детерминант CD3 (рис. 2). Учитывая, что усиление подвижности рецепторов в плоскости мембраны, способность клетки образовывать различные группы рецепторов, например, кэпы на своей поверхности могут служить признаком приема клеткой активационного сигнала [5], наблюдаемое под действием пептидного комплекса почек уменьшение перегруппировки рецепторов в плоскости мембраны может свидетельствовать о негативном влиянии пептидного комплекса на определенные этапы сигнальной трансдукции (гист.2).

Тималин проявлял сходное действие на выраженность изучаемых рецепторов лимфоцитов. Нами было отмечено снижение экспрессии CD3, CD4, CD8, дальнейшее уменьшение выраженности HLA-DR (рис.2). Препарат вызывал незначительное снижение экспрессии поверхностных иммуноглобулинов и не влиял на CD72⁺ клетки. Под влиянием тималина наблюдалось также изменение характера перегруппировки рецепторов в плоскости мембраны. В частности, для клеток, у которых выявлялся маркер CD3, было характерным изменение соотношения групп рецепторов в сторону увеличения пэтчей и кластеров.



Гистограмма 2. Мембранная флюоресценция поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов периферической крови при добавлении ФМА (пунктирная линия) и при добавлении ФМА и пептидного комплекса почек (прерывистый пунктир). * – достоверность изменений по отношению к группе с добавлением ФМА (p<0,05).

Анализ интегрального показателя свечения показал, что пептидный комплекс почек вызывал увеличение СЦК для CD8⁺ клеток (с 0,70 до 0,74), для тималина было характерно увеличение СЦК у лимфоцитов, несущих поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы (с 0,69 до 0,74) и CD72⁺ лимфоцитов (с 0,45 до 0,55).

Следовательно, пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек, подавлял вызванную ФМА экспрессию CD4, CD8, CD72 и поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, вызывая дальнейшее снижение выраженности HLA-DR и практически не оказывал влияния на CD3⁺ клетки. Тималин вызывал снижение экспрессии CD3, CD4, CD8, поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов, дальнейшее снижение экспрессии HLA-DR и не изменял выраженность рецепторов на CD72⁺ клетках.

В иммунокомпетентных клетках трансдукция сигнала с активированного рецептора на генетический аппарат осуществляется с помощью внутриклеточных регуляторных систем, среди которых можно выделить цАМФ-зависимую, Ca²⁺-зависимую и регуляторную систему, включающую функционирование протеинкиназы С [9].

В физиологических условиях ПК-С активируется при повышении в цитоплазме концентрации ионов кальция в присутствии диацилглицерина. Систему ПК-С можно также активировать митогенами, интерлейкином-2, форболовыми эфирами [5]. Форболовые эфиры, являясь опухолевыми промоторами, «имитируют» эффект диацилглицерина в активации протеинкиназы С и поэтому могут использоваться для изучения роли фермента в клеточных функциях. Экспериментальное использование ФМА в качестве активатора ПК-С в исследовании влияния ФМА на экспрессию мембранных гликопротеинов (в том числе CD3, CD4, CD8, HLA-DR) на поверхности мононуклеаров показало, что ФМА может вызывать изменение экспрессии некоторых рецепторов посредством механизмов, которые не включают прямое фосфорилирование этих молекул [12].

Согласно нашим данным, активация протеинкиназы С с помощью форболового эфира сопровождалась усилением экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, повышением их подвижности в плоскости мембраны и способности к перегруппировке. В то же время аналогичный эффект в виде усиления экспрессии исследуемых антигенных детерминант и повышения их подвижности в плоскости мембраны оказывали пептидные комплексы тимуса и почек, действуя в отдельности на интактные клетки.

Исследование действия пептидных комплексов тимуса и почек на фоне предварительной активации протеинкиназы С позволило выявить антагонизм в действии регуляторных пептидов по отношению к ФМА, что выразилось в отмене усиления экспрессии рецепторов на поверхности лимфоци-

тов. Этот антагонизм может быть связан по крайней мере с двумя возможными путями реализации: во-первых, пептидные комплексы могут действовать подобно ФМА, вызывая дальнейшую активацию протеинкиназы С, что приводит к ее гиперактивации и к последующему истощению; во-вторых, пептидные комплексы могут вызывать активацию другой регуляторной системы, которая выступает в качестве антагониста систем, опосредованных Ca²⁺ и протеинкиназой С. На эту роль вполне могут претендовать цАМФ-зависимые механизмы сигнальной трансдукции.

В целом, результаты работы показывают, что регуляторные пептиды центрального и периферического происхождения взаимодействуют с иммунокомпетентными клетками, оказывая свое иммуномодулирующее действие путем влияния на определенные этапы передачи активационного сигнала внутрь клетки.

Литература:

1. Веснина Л.Э. Изменение экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия α-интерферона // Проблемы экологии та медицини. – 1997. – Т.1, №1-2. – С.32-34.
2. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лейкоцитов // Иммунология. – 1998. – №4. – С.13-16.
3. Веснина Л.Э., Мищенко В.П. Вплив пептидного комплексу нирок на експресію мембранных рецепторів лімфоцитів на фоні дії імуномодуляторів // Фізіол. журнал. – 1996. – Т. 44, №3. – С.184-185.
4. Иммунобиология гормонов тимуса // Гриневич Ю.А., Чеботарев В.Ф., Никольский И.С. и др.; Под ред. Ю.А. Гриневича, В.Ф. Чеботарева. – К.: Здоровья, 1989. – 152 с.
5. Иммунология: В 3-х т. Т. 1 / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987-1988. – 476 с.
6. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т.11, №5. – С.61-74.
7. Лимфоциты. Методы. / Под ред. Дж.Клауса. – М.: Мир, 1990. – 392 с.
8. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем – цитомедины // Успехи соврем. биологии. – 1983. – 96, №6. – С.339-352.
9. Новикова В.М. Координация систем регуляции в антигенстимулированных Т-клетках // Иммунология. – 1995. – №1. – С.7-10.
10. Серый С.В., Пасхина Т.Г., Дейгин В.И. и др. Влияние иммуноактивных пептидов тимуса на регенерацию рецепторов тимоцитов // Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов. – Пущине, 1990. – С.163.
11. Способ одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію / А. с. №94052069.
12. Aiberolalla J., Lozano F., Places L., Vitella R., Vives J. Correlacion entre fosforilacion y modulacion de antigenos de superficie linfocitaria inducida por esterios de forbol // Immunologia. – 1989. – 8, №3. – С. 95-101.
13. Astaldi G., Verga L. The Glycogen Content of the Cells of Lymphatic Leukaemia // Acta haematol. – 1957. – Vol. 17, №3. – P.129-136.
14. Yukihito Nishimoto, Yoshiaki Onishi, Yutaka Sato, Harutoshi Kizaki. Protein synthesis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cells // Bull. Tokyo dent. Coll. – 1997. – Vol.38, №2. – P.133-138.

Summary

THE ROLE OF PROTEINKINASE C IN REGULATORY PEPTIDES MECHANISMS OF ACTION

Vesnina I.E., Kaydashev I.P., Nozhihova O.A., Geyko O.A., Bobrova N.A.

It was studied the influence of peptide complexes of kidney and thymus (thymalin) on superficial receptors expression in lymphocytes on the background of endogenic proteinkinase C (PK-C) activation by 4-forbol-12-miristat-13-acetate forbolio acether (FMA).

PK-C activation was accompanied by the increase of superficial receptors' expression in lymphocytes, the rise of their mobility in the plane of the membrane and the ability for regrouping. Influence on the increase of antigenic determinants' expression and the rise of their mobility in the plane of the membrane. Peptide complexes of thymus and kidney exerted the same influence, if they had effect on intact cells individually.

The investigation of thymic and kidney peptide complexes after preliminary PK-C activation had shown the antagonism between regulatory peptides and FMA, which accompanied by abolition of receptor's expression increase. It was supposed, at least, two possible ways for antagonism's realisation: the first, peptide complexes may effect similarly to FMA and cause further PK - C activation, its hiperactivation and next exhaustion; the second, peptide complexes may cause the activation of other regulatory system, which is the antagonist of systems mediated by Ca²⁺ and PK-C (it is possible the role of cAMP-connected mechanisms of signal transduction).

Ukrainian Ministry of the Health Public Service
Ukrainian Medical Stomatological Academy
Shevchenko Str., 23, 314024, Poltava

Матеріал надійшов до редакції 27.08.99.