

© Веснина Л.Э., Куценко Н.Л., Кайдашев И.П., Звягольская И.Н.
УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОЧЕК И ТИМУСА (ТИМАЛИНА) ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ МЕТОТРЕКСАТОМ

Веснина Л.Э., Куценко Н.Л., Кайдашев И.П., Звягольская И.Н.

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

В роботі вивчено можливий вплив пептидних комплексів тимусу і нирок на процеси ремоделювання нових рецепторних молекул на фоні блокади метаболізму імунокомпетентних клітин за допомогою метотрексата. Інкубація лімфоцитів з метотрексатом призводила до зменшення експресії вивчаємих антигенних детермінант лімфоцитів, їх щільності на мембрані та перегрупувань з утворенням кепів, кластерів та петчів. Додавання в середовище інкубації пептидних комплексів тимусу і коркової речовини нирок супроводжувалось відновленням експресії поверхневих рецепторів, в деяких випадках її підвищенням. Тималін викликав вірогідне збільшення експресії імуноглобулінів і детермінант CD3, пептидний комплекс нирок - молекул CD3 і CD8. Відмічено збільшення щільності рецепторів в площині мембрани та формування перегрупувань. Припущено, що пептидні комплекси тимусу і нирок можуть приймати участь не тільки в регуляції експресії рецепторів безпосередньо на поверхні мембран лімфоцитів, їх дія може бути пов'язана з ремоделюванням мембранних рецепторів шляхом мобілізації внутришньоклітинного пула вже синтезованих рецепторів.

Вступление:

В связи с развитием фундаментальной и прикладной иммунологии в клинической практике появился новый класс лекарственных средств - иммуностропные препараты. Особое внимание среди них привлекают регуляторные пептиды - в большинстве своем представленные низкомолекулярными пептидами и пептидными фрагментами эндогенных и экзогенных белков, которые обладают способностью воздействовать на различные этапы иммунного ответа [12,13].

На основе пептидных экстрактов тимуса, ответственных за созревание и функциональную активность Т-лимфоцитов разработаны и широко используются препараты для коррекции нарушенных функций Т-лимфоцитов [5]. Способность оказывать влияние на Т-клетки присуща продукту диализного лейкоцитарного экстракта препарата имрег [1]. У лимфотилина, низкомолекулярного пептида лимфоидной ткани обнаружены антипролиферативные, иммуномодулирующие, иммуностимулирующие влияния [13]. Иммунорегуляторные пептиды, вырабатываемые клетками костного мозга - миелопептиды, усиливают антителообразование в продуктивную фазу иммунного ответа [8]. Пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек, воздействует на пролиферацию лимфоцитов и тимоцитов, активирует Т-клетки, облегчает активацию лимфоцитов фитогемагглютинином [6], препятствует дексаметазон-индуцированному апоптозу тимоцитов [9].

По-прежнему актуальным остается проблема выяснения механизмов иммуностропного действия регуляторных пептидов, в частности, полу-

ченных из паренхиматозных органов, не имеющих прямого отношения к иммунной системе. Одним из таких пептидов является пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек, для которого предположен мембраноопосредованный механизм действия на иммунокомпетентные клетки, проявляющийся в модуляции поверхностных антигенных детерминант лимфоцитов [2,3]. Показано, что пептидный комплекс почек вызывает ремоделирование поверхностных антигенных детерминант лимфоцитов, предварительно обработанных трипсином, восстанавливает их способность к перегруппировке в плоскости мембраны [4]. Сходное действие выявлено у тимогена, тимопозтина, тималина, α_1 -тимозина, которые значительно ускоряют появление рецепторов на клетках тимуса, предварительно обработанных трипсином [5,10].

В настоящем исследовании мы предприняли попытку выяснить, влияет ли пептидный комплекс почек на процессы ремоделирования новых рецепторных молекул на фоне блокады метаболизма иммунокомпетентных клеток с помощью метотрексата.

Материалы и методы:

Исследование *in vitro* проводили, используя периферическую кровь здоровых доноров, стабилизированную гепарином (25 ЕД/мл). Мононуклеары выделяли по методу Веуот [7] путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-триомбрас (d=1,077 г/см³) с последующим отмыванием в фосфатно-солевом буфере при pH 7,2. Лимфоциты в конечной концентрации (1-1,5)10⁶/мл культивировали в среде 199

("Sigma") с 10% инактивированной телячьей сывороткой ("Bio Mark Inc", Львов, Украина). Уровень жизнеспособности клеток в тесте с трипановым синим составил в среднем 95%-97%.

Инкубацию клеток с метотрексатом ("LACHEMA", Чехия) в дозе 1 мг/мл [11] проводили в течение 6 часов при 37° С. В опытных пробах после отмывания лимфоцитов путем центрифугирования в фосфатно-солевом буфере дополнительно вводили пептидные комплексы тимуса и почек и продолжали инкубацию в тех же условиях в течение 1 часа. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буфер.

В работе использовали пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек по оригинальной методике [14]. Экстракцию тканей почек проводили органической галогенсодержащей кислотой в присутствии катионов двухвалентных металлов с последующим осаждением пептидов органическим растворителем с добавочной очисткой путем гель-фильтрации для выделения пептидов с молекулярной массой меньше 10 кД. Доза пептидных комплексов, вносимых в инкубационную среду составила 0,5 мкг/мл. В качестве контрольного препарата использовали коммерческий препарат тималина.

Экспрессию мембранных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов определяли в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием антител против иммуноглобулинов А, М, G ("Sanofi", France). В реакции непрямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами LT3 (CD3), LT4 (CD4), LT8 (CD8), 3F3 (CD72) выявляли экспрессию соответствующих антигенных детерминант лимфоцитов с помощью анти-F(ab)2 - антител, конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (ТОО "Сорбент", Москва, Россия).

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

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение:

Добавление в суспензию лимфоцитов метотрексата в дозе 1 мг/мл приводило к снижению исходного уровня экспрессии исследованных мембранных маркеров. Выраженное ингибирующее действие препарат оказывал на экспрессию детерминант CD3, достоверно снижалась экспрессия CD8, CD72, поверхностных иммуноглобулинов (рис. 1).

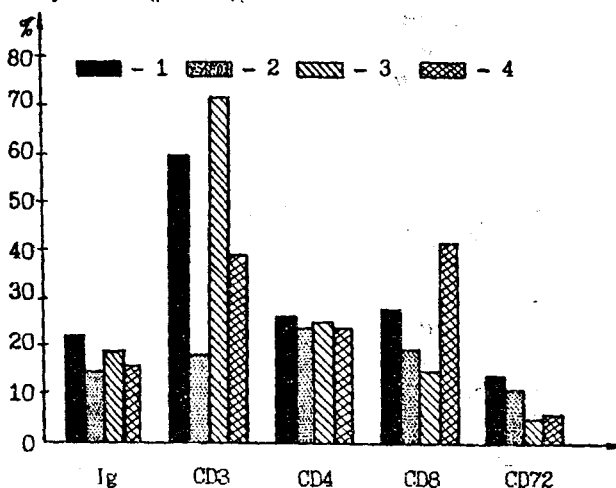
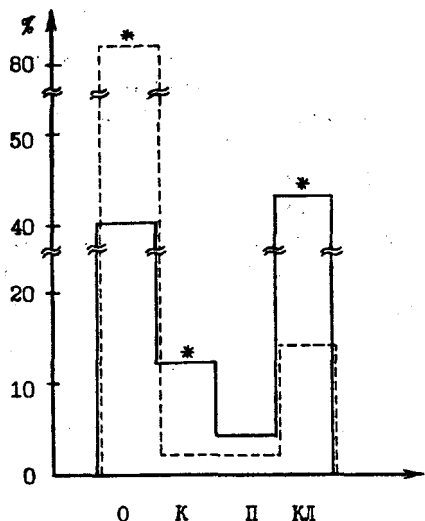


Рис. 1. Влияние тималина и пептидного комплекса почек на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов, предобработанных метотрексатом. По оси ординат - процент клеток с флюоресценцией; по оси абсцисс - распределение по группам: 1 - исходный уровень флюоресценции; 2 - уровень флюоресценции при добавлении в суспензию лимфоцитов метотрексата; 3 - уровень флюоресценции при добавлении в суспензию предобработанных метотрексатом лимфоцитов тималина; 4 - уровень флюоресценции при добавлении в суспензию предобработанных метотрексатом лимфоцитов пептидного комплекса почек.

Помимо снижения общего уровня флюоресценции мы наблюдали для всех маркеров уменьшение интенсивности свечения в виде практически полного исчезновения клеток с сильной степенью флюоресценции, что свидетельствует о снижении плотности соответствующих рецепторов на мембране. Наряду с уменьшением количества клеток, несущих дифференцировочные маркеры, наблюдалось изменение перегруппировки рецепторов в плоскости мембраны. Так, в два раза снизилось количество клеток, образующих на мембране кэпы иммуноглобулиновых рецепторов ($p < 0,05$). Для CD3+ клеток характерным было достоверное снижение в 6 раз количества образовавшихся кэпов, в 3 раза - кластеров и в 2 раза пэтчей (гист. 1).

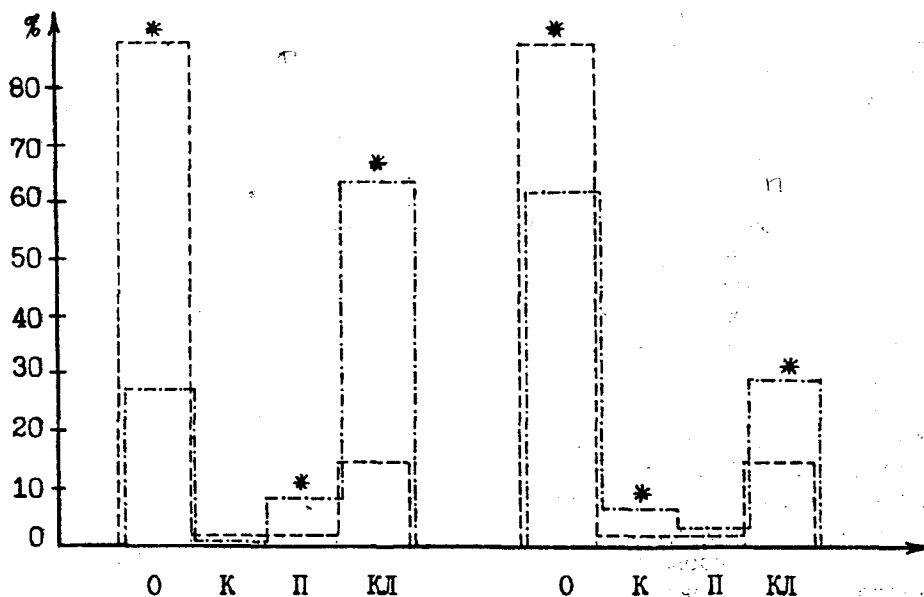


Гистограмма 1. Мембранная флуоресценция CD3+ лимфоцитов периферической крови в интактной группе (сплошная линия) и при добавлении метотрексата (пунктирная линия). Здесь и далее по оси ординат - процент клеток с флуоресценцией; по оси абсцисс - виды перегруппировок рецепторов; о - клетки, у которых отсутствует флуоресценция, д - диффузное свечение мембраны, к - кэпы, п - пэтки, кл - кластеры. * - достоверность изменений по отношению к интактной группе ($p < 0,05$).

Для CD4+ клеток отмечалось уменьшение образования кластеров в 2,5 раза ($p < 0,05$), для CD8+ клеток - в 3,8 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, под действием метотрексата отмечалось уменьшение экспрессии поверхностных антигенных детерминант лимфоцитов, их плотности на мембране и перегруппировки с образованием кэпов, кластеров и пэтчей.

В опытной серии исследований мы добавляли к лимфоцитам, прединкубированным с метотрексатом, пептидные комплексы, выделенные из тимуса и коркового вещества почек. Так, введение тималина в дозе 0,5 мкг/мл в инкубационную среду способствовало увеличению экспрессии поверхностных иммуноглобулинов и молекул CD3 (Рис.1). Помимо этого нами зарегистрировано изменение характера перераспределения рецепторов в плоскости мембраны - отмечено достоверное увеличение образования кластеров в 2,5 раза для CD4+ клеток, в 3,9 раза - для CD3+ клеток, тенденция к увеличению кластеризации поверхностных иммуноглобулинов. Также, у CD3+ клеток наблюдалось увеличение образования пэтчей в плоскости мембраны (Гист. 2,а).

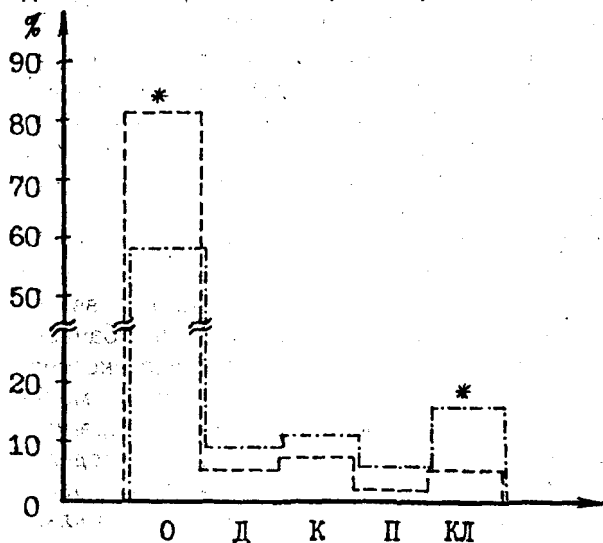


Гистограмма 2. Мембранная флуоресценция CD3+ лимфоцитов периферической крови, обработанных метотрексатом (пунктирная линия) и при добавлении пептидного комплекса почек (точка-пунктир) (а); обработанных метотрексатом (пунктирная линия) и при добавлении тималина (точка-пунктир) (б). * - достоверность изменений по отношению к группе с добавлением метотрексата ($p < 0,05$).

Добавление пептидного комплекса почек в среду инкубации способствовало восстановлению экспрессии CD3 и CD8 детерминант ($p < 0,05$) (Рис.1). Одновременно отмечалось повышение интенсивности флуоресценции, что свидетельствует об увеличении плотности рецепторов в плоскости мембраны. Были также отмечены и изменения характера флуоресценции -

снижение количества клеток с перегруппировкой рецепторов в виде кэпов, пэтчей на фоне увеличения образования кластеров мембранных рецепторов. Под влиянием пептидного комплекса почек наблюдалось увеличение количества CD3+ клеток, образующих на мембране кэпы (в 3 раза), кластеры (в 2 раза) ($p < 0,05$) (Гист. 2,б). Также усиливалась перегруппировка рецепторов

на поверхности CD8+ клеток под влиянием пептидного комплекса почек (Гист. 3).



Гистограмма 3. Мембранная флуоресценция CD8+ лимфоцитов периферической крови при добавлении метотрексата (пунктирная линия) и при добавлении метотрексата и пептидного комплекса почек (точка-пунктир). * - достоверность изменений по отношению к группе с добавлением метотрексата ($p < 0,05$).

Согласно результатам наших исследований, под влиянием метотрексата наблюдалось снижение экспрессии практически всех изученных антигенных детерминант, но наиболее чувствительными оказались клетки, у которых выявляли антигенную детерминанту CD3.

В малых дозах (10 - 30 мг/кг) метотрексат проникает в клетки посредством активного транспорта, где частично остается в свободном состоянии, частично связывается с дегидрофолатредуктазой. При использовании в больших дозах (50 - 200 мг/кг) проникает в клетки и путем пассивной диффузии [11].

Метотрексат относится к препаратам цикло-неспецифического действия, вызывающих гибель клетки преимущественно в фазу S клеточного цикла [11]. Как структурный аналог фолиевой кислоты, ингибирует дегидрофолатредуктазу, тем самым подавляя образование кофермента тетрагидрофолата, и, следовательно, превращение фолиевой кислоты в тетрагидрофолиевую. Подавляет тимидилсинтазу, что ведет к нарушению образования пуринов и тимидина. В результате нарушается рост клеток, метаболизм РНК и ДНК. Вероятно, наблюдаемая нами тенденция к снижению экспрессии рецепторов является результатом угнетения метаболических процессов под действием метотрексата, что проявляется в замедлении доставки на поверхность мембраны ранее синтезированных рецепторов и изменении функциональной активности клеток.

Добавление в среду инкубации пептидных комплексов тимуса и коркового вещества почек сопровождалось восстановлением экспрессии поверхностных рецепторов, а в некоторых случаях даже ее повышением. Так, тималин вызывал достоверное увеличение экспрессии иммуноглобулинов и детерминант CD3, пептидный комплекс почек - молекул CD3 и CD8. Обращает на себя внимание сходное действие обоих пептидных комплексов на экспрессию антигенной детерминанты CD3. Мультимолекулярный комплекс CD3 принимает участие в формировании Т-клеточного рецептора (TCR). Возможно, что усиление экспрессии CD3 сопровождается таким же изменением состояния TCR [15]. По-видимому, действие пептидных комплексов может быть связано с ремоделированием мембранных рецепторов путем мобилизации внутриклеточного пула уже синтезированных рецепторов.

Таким образом, пептидные комплексы тимуса и почек могут принимать участие не только в регуляции экспрессии рецепторов непосредственно на поверхности мембран лимфоцитов, но и по-видимому, влиять на процессы транспортировки новых рецепторных молекул на мембрану.

Литература:

- Беседнова Н.Н. Регуляция иммунных процессов пептидами природного происхождения // Антибиотики и химиотерапия.- 1999.- Т.44, №1. - С. 31-35.
- Веснина Л.Е. 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.
- Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лейкоцитов // Иммунология.- 1998.- № 4.- С. 13-16.
- Веснина Л.Е. Дія пептидного комплексу нирок на ремоделювання поверхневих мембраних глікопротеїдів лімфоцитів // Проблемы экологии та медицини. - 1999.- Т.3, № 5.- С. 7.
- Иммунология гормонов тимуса / Под ред. Ю.А. Гриневича, В.Ф. Чеботарева. - К.: Здоров'я, 1989.- 152 с.
- Кайдашев И.П. Влияние полипептидного комплекса тканей почек на активность лимфоцитов донорской крови // Иммунология.- 1995.- № 4.- С. 31-33.
- Лимфоциты. Методы. / Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.- 392 с.
- Михайлова А.А. Миелопептиды - новая группа регуляторных пептидов // Иммунология. - 1999.- №4.- С. 14-17.
- Рябенко В.В., Кайдашев И.П., Ножинова О.А., Губенко И.Я. Вплив регуляторних пептидів тималіну та пептидного комплексу нирок на процеси апоптозу тимоцитів // Імунологія та алергологія.- 1999.- № 3.- С.46-50.
- 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. Пуццино, 1990.- С. 163.

11. Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии /Чекман И.С., Пелешук О.А. и др. Под ред. Чекмана И.С., Пелешука А.П.; Пятака О.А. - К.: Здоров'я, 1986. - 736 с.
12. Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Фокина Л.А. и др. Миелопид (бивафлор), обладающий противоопухолевой активностью //Бюл. экпер. биол. мед. - 1995.- Т.119, N 5.- С. 530-533.
13. Тяготин Ю.В., Рыбакова Л.П., Тутова И.Ю. и др. Низкомолекулярный пептид лимфоидной ткани лимфотилин как модулятор иммунологических реакций //Иммунология.- 1999.- N 3.- С.36-38.
14. 10180А. Україна. МКІ 5 А61 К37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію. /Кайдашев І.П., Катрушов О.В. //Промислова власність.- 1996.- N 3.- С.3.1.76-3.1.77.
15. Damjanovich S., Szollosi J., Tron L. Transmembrane signalling in T cells //Immunol. Today.- 1992.- V.13, N 8.- P. A12-A15.

Summary

RESTORATION OF LYMPHOCYTE SURFACE RECEPTORS UNDER INFLUENCE OF KIDNEY AND THYMUS PEPTIDE COMPLEXES (THYMALINUM) AFTER THE TREATMENT BY METHOTREXAT

L.E.Vesnina, N.L.Kutsenko, I.P.Kaidashev, I.N. Zviagolskya

In this work has investigated the influence of thymus and kidney peptide complexes to the processes of receptor molecules remodelazing on the background of blockade immunocompetent cells methabolism by the methotrexat. According to received data the lymphocyte incubation with methotrexat resultated in decreasing of antigen lymphocyte determinants, their density on the cell membrane and recombination with the forming - capps, patches, clusters. Thymus and kidney peptide complexes added to substance of incubation led to the restoration of superficial receptors expression and, in some cases, increasing of this expression. Thymalinum caused relable immunoglobulin and determinant CD3 expression increasing; kidney peptide complex caused the increasing of CD3 and CD8 molecules expression. Also was noted the increasing of receptor density on cell membranes and forming of recombinations. It was supposed that thymus and kidney peptide complexes take part not only in regulation of receptors expression directly on the surface of the lymphocyte cells membrane, but their action can be connected with remodelizing membrane receptors by the mobilizing inner cell pool of receptors, which has been already synthesized.

Ukrainian Ministry of Health Public Service, Ukrainian Medical Stomatological Academy,
Shevchenko Str. 23 36024 Poltava Ukraine

Матеріал надійшов до редакції 28.05.01

© Губенко І.Я.

УДК: УДК 612-017:616-092

ВІДТВОРЕННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ НА АЛО- ТА ГЕТЕРОАНТИГЕНИ ВВЕДЕННЯМ ЕКЗОГЕННИХ ПЕПТИДНИХ КОМПЛЕКСІВ ЗДОРОВИХ ТКАНИН ПРИ ВТОРИННИХ ІМУНОДЕФІЦИТАХ, ВИКЛИКАНИХ ДІЄЮ АНТИЦИТОХРОМОКСИДАЗНОЇ СИРОВАТКИ

Губенко І.Я.

Українська медична стоматологічна академія

Исследовано влияние регуляторных пептидных комплексов на развитие иммунного ответа при вторичном иммунодефиците, вызванном введением анти ЦХО – сыворотки. Выявлены значительные изменения в составе регуляторных пептидных комплексов тимуса, селезенки и лимфатических узлов. Пептидные комплексы тимуса, селезенки и лимфоузлов приводили к восстановлению ответа иммунной системы крыс на алоантигены, но только пептиды тимуса (тималин) имели статистически достоверное действие. Действие пептидов селезенки было преимущественно направлено на активацию процессов первичного иммунного ответа на гетероантиген, пептидов лимфоузлов – на процессы вторичного иммунного ответа. Введение пептидов лимфоузлов вызывало усиление первичного и вторичного иммунного ответа на гетероантиген.

Розробка методів регуляції функціональної активності імунної системи має велике значення для клінічної іммунології, алергології та трансплантології [1,2]. Розв'язання цієї проблеми базується на фундаментальних дослідженнях природних регуляторних процесів, які відбуваються в імунній системі за участю клітинних та гуморальних факторів [3].

Традиційно основна увага дослідників приділялася вивченню дії антитіл проти компонентів зовнішніх клітинних мембран, і лише поодинокі роботи були присвячені дослідженню ефектів,

викликаних антитілами проти внутрішньоклітинних антигенів [4]. Пізніші дослідження показали, що всі антигени у вигляді пептидних фрагментів презентуються на поверхні імунокомпетентних клітин у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу [5], де вони стають доступними для подальшого розпізнавання. Це не тільки забезпечує здійснення функцій імунного нагляду, але, як показано сучасними дослідженнями, є основою цілісної пептидергічної системи регуляції імунного статусу [6,7].