

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Весніна Л.Е.

УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ТИМАЛІНУ НА АНТИГЕННІ ДЕТЕРМІНАНТИ ЛІМФОЦИТІВ ЗА УМОВ ДІЇ ЕНДОГЕННИХ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ

Весніна Л.Е.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

В работе исследованы особенности влияния тималина на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов на фоне действия эндогенных иммуномодуляторов - ИЛ-2 и гидрокортизона для его сравнения с действием пептидного комплекса почек (ПКП). Полученные данные свидетельствуют, что на фоне действия ИЛ-2 под влиянием тималина сохраняется направление изменений в сторону увеличения экспрессии CD3, снижения - CD8, CD72, за исключением HLA-DR. Общая тенденция изменений характера перераспределения рецепторов - снижение количества сформированных кэпов и пэтчей, увеличение - количества кластеров, что не было характерным для действия ПКП. На фоне действия гидрокортизона тималин, как и ПКП, повышал экспрессию CD3 и CD8, снижал - HLA-DR, но повышал уровень экспрессии CD4. Перегруппировка рецепторов под влиянием тималина происходила однонаправленно с действием ПКП. Результаты работы дают основание считать, что пептидным веществам различного происхождения (центрального - тималин, периферического - ПКП), присуще сходное по механизмам развития иммуномодулирующее действие, которое является проявлением общего неспецифического влияния регуляторных пептидов на систему иммунитета.

Ключовые слова: тималин, пептидный комплекс почек, эндогенные иммуномодуляторы лимфоцит.

Враховуючі складну, багаторівневу ієрархію, механізми регуляції гомеостазу виконують єдину задачу, яка спрямована на координацію процесів біосинтезу та збереження генетичної сталості клітинного складу органів та тканин. Система біорегуляції в організмі діє опосередковано клітинними медіаторами, які є олігопептидами, функцією яких є селективне передавання інформації при взаємодії клітин імунної, нервової та інших систем, та які утворюються в реакціях обмеженого протеолізу із білків-попередників (цитокінів, ростових та тимусних факторів, імуноглобулінів) в безпосередній близькості до відповідних рецептивних систем [13].

Інтерлейкіни – одна з найчисельніших груп цитокінів, які можна поділити на прозапальні, ростові, диференцировочні фактори лімфоцитів, та окремі регуляторні цитокіни. Інтерлейкіни (ІЛ) забезпечують ендогенну регуляцію міжклітинних взаємодій різних ланок гемопоєзу, імунної системи, запалення та міжсистемних взаємовідносин як за фізіологічних умов, так і при дії різних патогенних факторів [3,12]. Біологічні ефекти цитокінів опосередковуються специфічними рецепторними комплексами, розташованими на цитоплазматичних мембранах, за участю каскадних реакцій, які призводять до індукції, посилення або пригнічення активності ряду генів, які вони регулюють [12].

Родину ІЛ-2 (ІЛ-2,4,7,9,13,15) відносять до I групи цитокінів, які утілізують рецептори з некіназною акти-

вністю [8]. Існують дані, що цитокіни родини ІЛ-2 контролюють фосфорилування серину Stat 5 через кіназу, яка відрізняється від серинові кінази Stat 3 [18]. Після активації відповідних генів у клітині продукуються білки, які регулюють клітинні процеси [3,8].

У той же час продукція ІЛ-2 пригнічується іншими компонентами системи біорегуляції – глюкокортикоїдами. Крім того, вони зменшують продукцію таких цитокінів, як ІЛ-4, ІЛ-10, інтерферон γ , ІЛ-1, ГМ-КСФ, фактор некрозу пухлини α , послаблюють експресію молекул головного комплексу гістосумісності на антигенпрезентуючих клітинах, пригнічують проліферативну відповідь Т-лімфоцитів на активацію та регулюють експресію генів на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях [15-17].

Цілком зрозуміло, що дослідження певних елементів системи біорегуляції, зокрема, регуляторних пептидів, неможливо проводити відокремлено від інших компонентів. Дослідження пептидної біорегуляції, особливо тонких механізмів взаємодії РП з клітинами імунної системи, потребує комплексного підходу, з обов'язковим урахуванням наявності в організмі ендогенних біорегуляторів різноспрямованої дії. Попередніми дослідженнями пептидного комплексу, отриманого із кіркової речовини нирок (ПКН) за оригінальним методом [14], нами було запропоновано мембраноопосередкований механізм дії ПКН. Модулюючи рівень експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів викори-

станням ІЛ-2 та гідрокортизону, ми зробили висновок відносно можливості впливати пептидним комплексом нирок на перебіг ранніх етапів активації імункомпетентних клітин шляхом модуляції активності ключових ферментів сигнальної трансдукції, та вірогідності прямого впливу пептидного комплексу на саму мембрану [1,2,10,11].

Мета даної роботи – визначити особливості впливу тималіну, пептидного комплексу центрального походження [5], на експресію антигенних детермінант лімфоцитів на фоні дії ендогенних імунomodуляторів - ІЛ-2, гідрокортизону та порівняти його з дією пептидного комплексу нирок.

Матеріали та методи

Для виконання експериментальних досліджень було використано спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів за допомогою пептидного комплексу, отриманого із кіркової речовини нирок, шляхом реєстрації зміни експресії мембранних рецепторів під впливом пептидів [9].

З венозної крові здорових донорів отримували суспензію лімфоцитів стандартним методом на градієнті густини фіколл-триомбразт ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) з наступним відмиванням у фосфатно-сольовому буфері при рН 7,2 [7]. Клітини ресуспензували у середовищі 199 ("Sigma") з додаванням 10% інактивованою телячої сироватки (Bio Mark, Львів), довели концентрацію клітин у суспензії до $1-1,5 \times 10^6/\text{л}$.

В роботі використано інтерлейкін-2 з надосадової рідини 3-денної культури спленоцитів, стимульованих конканаваліном-А [7]. В серії дослідів було визначено розведення ІЛ-2 (1:8), яке викликало найбільш значні зміни експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів [1,2]. Клітини інкубували протягом 60 хвилин з ІЛ-2 при 37°C (контрольні клітини). Після відмивання у фосфатно-сольовому буфері продовжували інкубацію протягом 60 хвилин з додаванням тималіну (загод

медпрепаратів, Санкт-Петербург, Росія) у кінцевій дозі 0,5 мкг/мл за тих же умов (дослідні клітини).

В другій серії експериментів інкубацію суспензії лімфоцитів із препаратом гідрокортизону сукцинат (ASTRAPIN, Germany) в концентрації 10^{-5} М проводили при 37°C протягом 30 хвилин [6] (контрольні клітини). Після відмивання до суспензії клітин додавали тималін (0,12 мкг/мл) та продовжували інкубацію за тих же умов протягом 60 хвилин (дослідні клітини).

Результати експерименту оцінювали методом непрямої імунofлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до основних субпопуляцій лімфоцитів – CD3, CD4, CD8, CD72 та HLA-DR, та вторинних антитіл – кон'югованих з флюоресцеїнізотіаціанатом анти-F(ab)₂ антитіл (ТОВ «Сорбент», Москва). За допомогою мікроскопа «Люмам Р-8» визначали клітини за наявністю флюоресценції (позитивна реакція) та відсутністю (негативна реакція) у відсотках. Власну флюоресценцію клітини вважали негативною реакцією. Також групували клітини з флюоресценцією за характером світіння: дифузна флюоресценція (рівномірне світіння всієї мембрани), групування рецепторів у вигляді кластерів (рецептори збираються на поверхні мембрани окремими групами), петчів (плямообразне світіння на поверхні мембрани) та кепів (рецептори збираються на одному з полюсів у вигляді "капелька") [4]. Морфологічний контроль досліджених клітин відбувався у фазовому контрасті.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерія для попарно-зв'язаних величин за допомогою стандартного пакету програм "Statistica".

Результати та їх обговорення

В першій серії досліджень на поверхні мембран контрольних клітин було зареєстровано під дією ІЛ-2 вірогідне підсилення експресії CD4 в 1,4 рази, CD8 - в 1,7 рази, CD72 - в 2,3 рази, експресія CD3 та HLA-DR практично не змінювалась (табл.1) [2].

Таблиця 1
Зміна експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів під дією тималіну при попередній інкубації з ІЛ-2 (M±σ)

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити (n=7)	Лімфоцити, інкубовані з ІЛ-2 (n=7)	Лімфоцити, інкубовані з ІЛ-2 та тималіном в дозі 0,5 мкг/мл, (n=7)
CD 3	63,29±4,75	65,14±6,52	72,86±5,05*
CD 4	36,57±4,31	52,71±5,35*	47,57±3,15
CD 8	35,43±3,15	58,86±5,90*	39,0±3,51*
CD 72	20,14±2,73	47,29±4,75*	30,43±3,05*
HLA-DR	24,86±5,55	29,0±4,0	35,29±3,50*

Примітка. Тут та в таблицях 2,3 - * - $p < 0,05$ – порівняння показників між інтактними лімфоцитами, та лімфоцитами, які інкубували з імунomodулятором;

** - $p < 0,05$ порівняння показників між лімфоцитами, які інкубували з імунomodулятором та тималіном.

Додавання тималіну до лімфоцитів, попередньо інкубованих з ІЛ-2 показало наступні зміни. Спостерігалось вірогідне збільшення рівня експресії CD3 на

11,85%, що супроводжувалось перерозподілом рецепторів переважно у бік збільшення кількості кластерів на 56,34% (табл. 2).

Таблиця 2
Зміна характеру перегрупувань поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів під дією тималіну на клітинах, попередньо інкубованих з ІЛ-2 ($M \pm \sigma$)

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=7)	Лімфоцити, інкубовані з ІЛ-2 (n=7)	Лімфоцити, інкубовані з ІЛ-2 та тималіном в дозі 0,5 мкг/мл, (n=7)
CD 3	36,71±4,75	34,86±6,52	27,14±5,05**
кепи	3,14±1,95	7,0±3,06	5,57±3,05
петчі	21,14±4,22	31,0±7,0*	24,86±4,74
кластери	39,0±7,44	27,14±4,53*	42,43±5,94**
CD 4	63,43±4,31	47,29±5,35*	52,43±3,15
кепи	8,0±2,08	10,0±2,65*	3,43±1,72**
петчі	25,57±4,65	37,14±4,88*	27,43±5,38**
кластери	3,0±1,63	5,57±3,26	16,71±2,69**
CD 8	64,57±3,15	41,14±5,90*	61,0±3,51**
кепи	13,0±4,76	7,43±3,15	3,71±2,06**
петчі	12,0±3,11	33,14±4,71*	11,43±3,46**
кластери	10,43±3,69	18,29±3,35*	23,86±4,88**
CD 72	79,86±2,73	52,71±4,75*	69,57±3,05**
кепи	7,14±2,27	10,0±2,65*	4,0±2,38*
петчі	12,0±1,91	30,0±3,06*	5,86±2,12**
кластери	1,0±0,82	7,29±2,87*	20,57±3,26**
HLA-DR	75,14±5,55	71,0±4,0	64,71±3,50**
дифузне світіння	1,29±0,95	2,0±1,15	2,57±1,81
кепи	7,14±2,91	4,0±1,83*	7,0±2,65**
петчі	12,14±3,18	16,0±3,96*	5,14±2,54**
кластери	4,29±1,80	7,0±2,71	20,57±3,74**

Примітка: 0 – клітини, у яких відсутня флюоресценція.

Для антигенних детермінант CD4 рівень експресії вірогідно не змінювався, але відбувався перерозподіл рецепторів у площині мембрани. Вірогідно знижувалась кількість кепів та петчів, відповідно – на 65,7% та 26,14%, підвищувалась кількість кластерів у 3,0 рази. Рівень експресії антигенних детермінант на поверхні CD8⁺-клітин, які інкубували з ІЛ-2 та тималіном, вірогідно знижувався на 33,74%, що супроводжувалось вірогідним зниженням кепів у 2,0 рази та петчів – у 2,9 рази, підвищенням кількості кластерів на 30,45%.

Для CD72⁺-клітин зниження експресії відбувалось на 35,65% ($p < 0,05$). Кількість кепів з молекул CD72 знижувалась у 2,5 рази, петчів – у 5,12 рази, кількість кластерів вірогідно збільшувалась у 2,85 рази. Для клітин, які експресують антигенну детермінанту HLA-DR вірогідно підвищувалась її експресія на 21,69%, що супроводжувалось підвищенням кількості кепів у 1,75 рази, кластерів у 2,94 рази та зниженням – петчів у 3,11 рази.

В опублікованих раніше дослідженнях на фоні дії ІЛ-2 пептидний комплекс нирок виявляв стимулюючий вплив на експресію рецепторів CD3, знижував експе-

сію CD4, CD8 та CD72 детермінант, практично не впливаючи на експресію HLA-DR [2]. Під впливом тималіну є характерним зберігання напрямку змін – збільшення експресії CD3, та зниження - CD8, CD72, підвищення HLA-DR (що не спостерігалось для ПКН). Якщо проаналізувати характер перерозподілу рецепторів під впливом тималіну, то є наявною загальна тенденція – зниження кількості сформованих кепів та петчів, збільшення – кількості кластерів, що спостерігалось для всіх досліджених антигенних детермінант. Такі особливості перегрупувань рецепторів не були характерні для дії ПКН.

В другій серії досліджень попередня інкубація контрольних лімфоцитів з препаратом гідрокортизону сукцинат в дозі 10^{-5} M сприяла зниженню рівня експресії CD3 у 2,7 рази, CD4 - у 1,3 рази, CD8 - у 1,2 рази, збільшенню експресії HLA-DR у 2,8 рази (табл.3) [2].

Використання тималіну призвело до вірогідного підвищення рівня експресії на мембранах дослідних клітин антигенних детермінант CD3 у 2,9 рази.

Таблиця 3
Зміна експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів під дією тималіну при попередній інкубації з гідрокортизоном ($M \pm \sigma$)

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити (n=6)	Лімфоцити, інкубовані з гідрокортизоном (n=6)	Лімфоцити, інкубовані з гідрокортизоном та тималіном в дозі 0,12 мкг/мл, (n=6)
CD 3	51,33±6,38	19,0±2,83*	55,17±5,78**
CD 4	35,50±2,67	27,33±2,34*	43,50±5,61**
CD 8	41,0±3,74	33,67±3,27*	39,17±4,31**
CD 72	15,17±2,64	13,83±3,92	17,50±3,51
HLA-DR	12,0±2,90	33,0±4,24*	21,67±4,18**

Література

Для антигенних детермінант CD4 спостерігалось підвищення експресії на 59,17% ($p < 0,05$), та вірогідне збільшення кількості кластерів у 2,2 рази. Рівень експресії CD8 підвищувався на 16,34%, що супроводжувалось появою дифузного світіння мембрани ($3,17 \pm 2,04\%$) та перегрупувань у вигляді кепів ($5,5 \pm 2,88\%$).

У лімфоцитів, на мембрані яких виявлялись рецептори CD72, вірогідно їх експресія не змінювалась, хоча й спостерігалась тенденція до збільшення. Вірогідно збільшувалась кількість кластерів (у 1,8 рази). Для клітин, які експресують антигенну детермінанту HLA-DR спостерігалось зниження рівня експресії на 34,33%, та зниження кількості кластерів – на 24,65% ($p < 0,05$).

Таким чином, під дією тималіну у клітин дослідної групи спостерігалось вірогідне підвищення рівня експресії CD3, CD4 та CD8, зниження - HLA-DR. Якщо порівняти результат з впливом ПКН, то отримано подібний результат по відношенню до антигенних детермінант CD3 та CD8 (підвищення експресії), HLA-DR (зниження експресії), але тималін вірогідно підвищував рівень експресії CD4 [2]. Характер перегрупувань рецепторів в серії дослідів з тималіном зберігав спрямованість змін, як і при інкубації клітин з ПКН.

Взагалі, результати роботи свідчать, що тималін практично по всім дослідженим рецепторам зберігає тенденцію змін, які викликав ПКН, що може свідчити про деяку подібність механізмів дії ПКН та тималіну. У той же час виключення становить антигенна детермінанта CD4, експресія якої в серії з ІЛ-2 під дією тималіну не зазнавала вірогідних змін, а під дією ПКН зменшувалась; в серії з гідрокортизоном спостерігалось підвищення експресії CD4 під дією тималіну, та зниження – під дією ПКН. В серії з ІЛ-2 також вірогідно підвищувалась експресія HLA-DR під дією тималіну.

Результати попередніх досліджень узгоджувались з концепцією мембраноопосередкованого механізму дії ПКН, та свідчили про можливість змінювати перебіг ранніх етапів активації імунокомпетентних клітин за допомогою ПКН шляхом модуляції активності ключових ферментів сигнальної трансдукції [1,2,10]. Також цілком вірогідним, на наш погляд, був і прямиий вплив пептидного комплексу на мембрану лімфоцитів. Отримані дані впливу тималіну на рівень експресії антигенних детермінант лімфоцитів дають підставу вважати, що незважаючи на різне походження пептидних речовин (центрального для тималіну, та периферичного – для ПКН), їм обом притаманна подібна за механізмами розвитку імуномодулююча дія, яка є проявом загального неспецифічного впливу регуляторних пептидів на систему імунітету.

1. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Экспрессия мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия иммуномодуляторов //Иммунология.- 1999.- № 6.- С. 36-39.
2. Веснина 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.
3. Ветра Я.Я., Иванова Л.В., Крейле И.Э. Цитокины //Гематол. и трансфузиол.- 2000.- Т. 45, № 4.- С. 45-49.
4. Иммунология: В 3-х т. Т.1 /Под ред. У. Пола.- М.: Мир, 1987-1988.- 476 с.
5. Иммунология гормонов тимуса /Под ред. Ю.А. Гриневича, В.Ф. Чеботарева.- К.: Здоров'я, 1989.- 152 с.
6. Клиническая иммунология и аллергология /Под ред. Л.Иегера, в 3-х т.- т.1.- М.: Мед., 1980.- 480 с.
7. Лимфоциты. Методы. /Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.- 392 с.
8. Ляшенко А.А., Уваров В.Ю. К вопросу о систематизации цитокинов //Успехи соврем. биологии.- 2001.- Т. 121, № 6.- С. 589-603.
9. Пат. 53122А України 7 А 61К35/23. Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів. – Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. – N 2002032132; Заявл. 18.03.2002; Опубл. 15.01.2003; Бюл. № 1.
10. Регуляція активності мембрани та процесів апоптозу лімфоїдних клітин тканинними пептидами /Боброва Н.О., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П., Квас О.В., Шликова О.А., Рябенко В.В. /Під ред. І.П.Кайдашева.- Полтава: Полімет, 2004.- 216 с.
11. Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы клинического применения) /Веснина Л.Э., Гаркович А.Л., Грицай Н.Н. и др.; Под общ. ред. Кайдашева И.П., Мищенко В.П., Рыбальченко В.К. – К.: Здоров'я, 2003.- 392 с.
12. Тодоріко Л.Д., Рихліцька К.В. Цитокині – нова система регуляції захисних реакцій організму, їх роль у формуванні запалення //Клінічна та експериментальна патологія.- 2004.- Т.3, № 1.- С. 91-97.
13. Тутельян В.А., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Физиологическая роль коротких пептидов в питании //Бюл. экпер. биол. и мед.- 2003.- Т.135, № 1.- С. 4-10.
14. А.С. 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.- № 3.- С. 3.1.76-3.1.77.
15. Ashwell J.D., Lu W.M.L., Vacchio M.C. Glucocorticoids in T cell development and function //Annu. Rev. Immunol.- 2000.- Vol. 18.- P. 309-345.
16. Bessler H., Kagazanov S., Punskey I., Sirota L. Effect of dexamethasone on IL-10 and IL-12p40 production in newborns and adults //Biol. Neonate.- 2001.- Vol. 80, № 4.- P. 262-266.
17. Irakam A., Miskolci V., Vancurova I., Davidson D. Dose-related inhibition of proinflammatory cytokine release from neutrophils of the newborn by dexamethasone, betamethasone, and hydrocortisone //Biol. Neonate.- 2002.- Vol. 82, № 2.- P. 89-95.
18. Nagy Z.S., Wang Y., Ervin-Cohen R.A., Aradi J., Monia B., Wangs L.H., Stepkowski S.M., Rui H., Kirken R. Interleukin-2 family cytokines stimulate phosphorylation of the Pro-Ser-Pro motif of Stat5 transcription factors in human T cells: resistance to suppression of multiple serine kinase pathways //J. Leukocyte Biol.- 2002.- Vol. 72.- P. 819-828.

Summary

PECULIARITIES OF THYMALINE INFLUENCE ON LYMPHOCYTE ANTIGEN DETERMINANTS UNDER THE ENDOGENOUSE IMMUNOMODULATORS ACTION CONDITIONS

Vesnina L.E.

Key words: thymaline kidney peptide complex endogenous immunomodulators lymphocytes.

The peculiarities of thymaline influence on lymphocytes antigen determinants at endogenous immunomodulators IL-2 and Hydrocortizone action for its comparison with kidney peptide complex (KPC) action were investigated. The obtained datas testify, that at IL-2 action under thymaline influence a direction of changes in the side of CD3 expression increasing, CD8, CD72 – decreasing, is remained excepted HLA-DR. The decreasing of generated caps and patches, the increasing of clusters – is the common tendency of receptors redistribution character changes. It was not the characteristic for KPC action. At Hydrocortizone action thymaline, as well as KPC, CD3 and CD8 expression increased, HLA-DR – decreased, but CD4 expression level increased. The receptors regrouping under thymaline influence occurred directionally to KPC action.

The results received give the basis to consider that peptide substances of a different origin (central – thymaline, peripheral – KPC), possess similar immunomodulation action, as for developmental mechanisms, which is the manifestation of common nonspecific influence of regulative peptides on immunity system.

**Ukrainian Ministry of the Health Public Service, Ukrainian Medical Stomatological Academia,
Shevchenko Str., 23, Poltava, 36024**

Матеріал надійшов до редакції 27.05.05.