

Л. Е. Весніна, І. П. Кайдашев

Роль кальційзалежних механізмів у реалізації імунотропних ефектів пептидного комплексу нирок

В роботі изучена роль внеклеточного и внутриклеточного кальция в реализации иммуотропных эффектов природного пептидного комплекса почек. Отмечено снижение экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов под влиянием блокаторов кальциевых каналов (верапамила, фенигидина), связывании внеклеточного и внутриклеточного Ca^{2+} (ЭДТА и ВАРТА соответственно). Пептидный комплекс почек восстанавливал сниженную под действием верапамила, фенигидина, ЭДТА и ВАРТА экспрессию поверхностных иммуноглобулинов, усиливал перегруппировку рецепторов в виде капов, патчей и кластеров. Пептидный комплекс почек проявлял синергизм с кальциевым ионофором А 23187 в усилении экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов. Учитывая, что ионофор А 23187 является каналобразующим веществом, можно предположить, что пептидный комплекс почек облегчает формирование транспортных каналов для кальция и его поступление в клетку. Действие пептидного комплекса почек на экспрессию мембранных рецепторов лимфоцитов не зависит от наличия ионов кальция как внутри клетки, так и в околоклеточном пространстве.

Вступ

Нині важливе значення мають гуморальні фактори, які зумовлюють зв'язок між клітинами імунної системи та спеціалізованими клітинами паренхіматозних органів. Такими чинниками можуть бути пептиди, виділені із різноманітних органів [7].

Дослідження пептидного комплексу, виділеного із кіркової речовини нирок, дозволило виявити при аутоімунному нефриті поряд з коригуючою органотропною дією відновлення імунологічної толерантності організму лабораторних тварин до суміші тканинних антигенів. Це стало підставою для припущення про можливий вплив пептидних молекул на взаємодію Т-клітинного рецептора з його лігандами [5]. В експериментах *in vitro* виявлено посилення експресії поверхневих рецепторів переважно Т-клітин (CD3, CD4, CD8) і HLA-Dr під впливом комплексу пептидів нирок [2].

Дія, яка стимулювала експресію мембранных маркерів лімфоцитів, зберігалася при попередній обробці клітин ендogenousними імунотропними — інтерлейкіном-2, α -інтерфероном, кортизолом [1], що дало змогу припустити можливу участь мембранных механізмів у реалізації фізіологічних ефектів пептидного комплексу нирок.

Під час впливу на імунотропну клітину стимуляторів різного походження — антигенів, мітогенів, медіаторів — змінюються конформації мембранных рецепторів, потік одновалентних іонів, трансметилування

ліпідів, активація фосфоліпази А₂, посилення перетворення фосфоінозитулу та арахідонової кислоти [4].

На цих ранніх етапах активація, проліферація та виконання ефекторної функції імунокомпетентними клітинами забезпечуються кальцієвою сигнальною системою. Зокрема, Ca²⁺ забезпечують відповідь на стимуляцію TCR-CD3 рецепторного комплексу [12], реалізацію ефектів гормонів тимуса [13].

Підвищення внутрішньоцитозольної концентрації кальцію ([Ca²⁺]_i) є наслідком каскаду біохімічних реакцій, які включають гідроліз фосфоінозитидів плазматичної мембрани, утворення вторинного посередника інозитол-1,4,5-трифосфату, активацію кальційтранспортних каналів плазматичної мембрани і мембран внутрішніх кальцієвих депо [8].

Враховуючи важливість кальційзалежних механізмів в активації імунокомпетентних клітин, ми дослідили роль вмісту позаклітинного та внутрішньоклітинного кальцію в реалізації імуотропних ефектів природного пептидного комплексу нирок.

Методика

Досліджували кров 10 донорів, стабілізовану гепарином (25 од/мл). Суспензію лімфоцитів периферичної крові виділяли за стандартною методикою в градієнті густини фікол-триомбразт [6], кількість клітин у суспензії доводили до $(1-1,5) \cdot 10^6$ у 1 мл.

В роботі були використані: пептидний комплекс нирок, отриманий за нашою методикою [11], у дозах 0,05, 0,12, 0,5 мкг/мл; ізоптину гідрохлорид (верапаміл) (фірми «Knoll», ФРН) у дозах 0,025, 0,05, 0,01 мг/мл; фенігідин (Україна) в дозах 0,002, 0,004, 0,024 мг/мл. Також використовували динатрієву сіль етилендіамінотетраоцтової кислоти — ЕДТА (фірми «Serva», США) у дозах 4,6, 9,2, 92 мг/мл; 1,2 — біс(О — амінофенокси) — етан — N,N,N,N — тетраоцтову кислоту (ВАРТА) фірми «ICN Biomedicals» (США) у дозі 20 ммоль/л [16]; кальцієвий іонофор А 23187 (фірми «Sigma», США) у дозі 100 нмоль/л [16].

Досліджувані препарати інкубували із суспензією мононуклеарів протягом 60 хв при 37 °С. У дослідних серіях після інкубації з модуляторами вмісту кальцію добавляли пептидний комплекс нирок і інкубували 60 хв при 37 °С. Контролем був забуферений фізіологічний розчин.

Експресію мембранних імуноглобулінових рецепторів оцінювали в реакції прямої імуофлюоресценції з використанням поліклональних антитіл свині, кон'югованих із флюоресцеїнізотіаціанатом (ФІТЦ) (Чеська Республіка) і антитіл проти мембранних імуноглобулінів, кон'югованих з ФІТЦ (фірми «Sanofi», Франція). Флюоресценцію оцінювали за допомогою мікроскопа «Люмам-Р8», підраховували відносну кількість клітин з флюоресценцією (у відсотках). Клітини, які світилися, розподіляли за інтенсивністю флюоресценції: слабка, середня, сильна і за її характером — групування рецепторів у вигляді кепів, кластерів, петчів [6].

Морфологічний контроль клітин проводили у фазовому контрасті. Життєздатність клітин оцінювали в тесті з трипановим синім, у середньому вона становила 95—97 %.

Результати та їх обговорення

У літературі описана велика кількість рецепторів, активація яких призводить до збільшення вмісту $[Ca^{2+}]_i$ [8]. Так, відомо, що антитілами до CD3 у Т-клітинах і антиімуноглобуліновими антитілами в В-лімфоцитах індукується підвищення вмісту $[Ca^{2+}]_i$ [4].

Внаслідок стимуляції низки рецепторів утворюється інозитол-1,4,5-трифосфат, який опосередковує початкове короткочасне (протягом кількох секунд) підвищення вмісту вільного $[Ca^{2+}]_i$ виділенням із внутрішньоклітинних джерел і більш тривале — внаслідок надходження ззовні, за допомогою посилення проникності трансмембранних кальцієвих каналів [14].

Враховуючи, що основне значення в активації імуноцитів відіграє інтенсивність кальцієвого обміну між клітиною та середовищем [15], у I серії досліджень ми вивчили вплив пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів при блокаді плазматичних мембран кальцієвих каналів верапамілом і фенігидином.

Прямий антагоніст кальцію — верапаміл, який взаємодіє з повільними каналами клітинної мембрани і участками зв'язування Ca^{2+} на мембрані [3], пригнічував експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів, особливо в дозах 0,01 і 0,05 мг/мл ($P < 0,05$) (рис. 1, а). Також ми спостерігали зміну характеру перегрупувань рецепторів у площині мембрани. Зменшилася кількість кепів, петчів і кластерів (рис. 5, а).

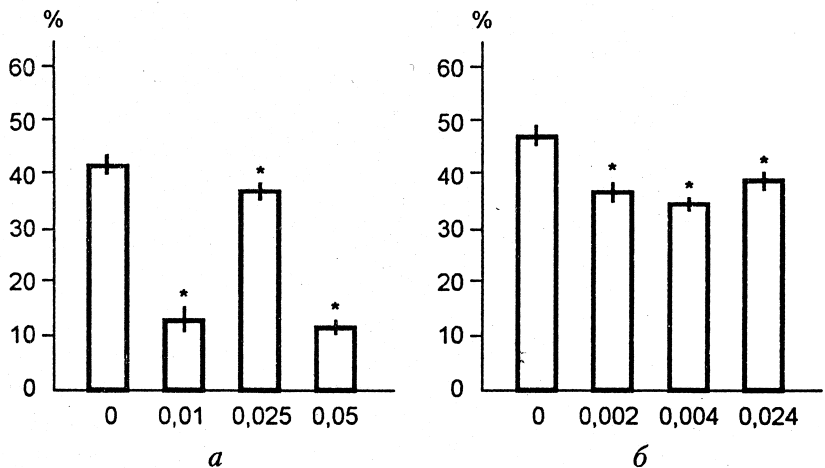
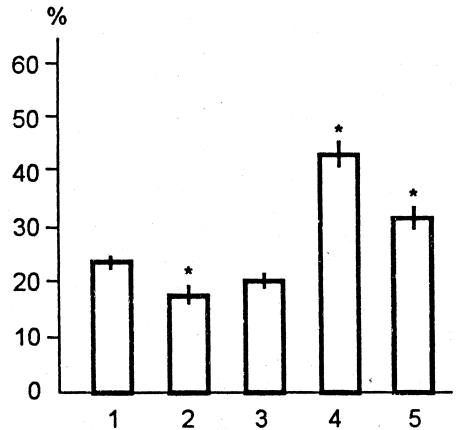


Рис. 1. Експресія мембранних імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів периферичної крові під впливом верапамілу (а) та фенігидину (б). По осі ординат — відсоток клітин з флюоресценцією; по осі абсцис — доза препарату (мкг/кг); * $P < 0,05$ (тут і на рис. 2, 3, 4).

Фенігидин, який відноситься до змішаних антагоністів кальцію, котрі взаємодіють із повільними каналами плазматичної мембрани і впливають на процеси накопичення та звільнення Ca^{2+} всередині клітини (посилення депонування в мікросомах, взаємодія з кальційзалежним регуляторним білком кальмодуліном) [3], також вірогідно пригнічував рівень експресії рецепторів. Однак зменшення експресії мембранних імуноглобулінів спостерігалось меншою мірою (рис. 1, б). Нами було відмічено зменшення кількості клітин з активаційним перегрупуванням рецепторів (див. рис. 5, б).

Рис. 2. Зміна експресії при зв'язуванні позаклітинного кальцію. По осі абсцис — досліджені групи: 1 — інтактна, 2 — інкубація з ЕДТА в дозі 9,2 мг/мл, 3, 4, 5 — інкубація з пептидним комплексом нирок в дозах 0,05; 0,12; 0,5 мкг/мл відповідно на фоні ЕДТА.



Таким чином, пригнічення обміну Ca^{2+} між клітиною та зовнішнім середовищем переважно в результаті блокади повільних каналів і участків зв'язування Ca^{2+} на мембрані призводило до зниження рівня експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, що відображало зменшення функціональної активності лімфоцитів. Саме пригніченням надходження іонів Ca до клітини пояснюється можливий механізм імуносупресивної дії цих препаратів [10].

Надалі, враховуючи той факт, що після швидкого транзитного підйому вмісту $[\text{Ca}^{2+}]_i$ внаслідок звільнення із внутрішньоклітинних джерел розпочинається тривале (більше ніж 30 хв) підвищення за рахунок надходження Ca^{2+} ззовні [14], дослідження були проведені у безкальцієвому середовищі і при зв'язуванні внутрішньоклітинного кальцію.

Інкубація мононуклеарів з різними дозами ЕДТА, які хелатують зовнішньоклітинні іони Ca , спричинила зниження рівня експресії імуноглобулінів, особливо помітне при використанні препарату в дозі 9,2 мг/мл (рис. 2). Зниження інтенсивності флюоресценції супроводжувалося зменшенням утворення кепів і петчів різних ступенів флюоресценції (див. рис. 5, в).

Додавання пептидного комплексу кіркової речовини нирок у середовище інкубації дозволило виявити вірогідне збільшення експресії досліджених рецепторів при використанні пептидного комплексу в дозах 0,12 і 0,5 мкг/мл ($P < 0,05$) і посилення рухливості рецепторів у площині мембрани з утворенням кепів і петчів.

Отримані результати свідчать, що дія пептидного комплексу призводить до посилення експресії поверхневих молекул лімфоцитів, який заблокований ЕДТА, що дозволяє оцінити реалізацію ефектів пептидного комплексу нирок на рівень експресії.

Внаслідок блокади виходу Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо за допомогою високоафінного хелатора ВАРТА (20 ммоль/л), ми також отримали вірогідне пригнічення експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів (рис. 3). Зміна характеру флюоресценції виявилась у зниженні перегрупувань рецепторів у вигляді кепів, петчів і кластерів (див. рис. 5, г). І в цьому випадку додавання в середовище інкубації пептидного комплексу кіркової речовини нирок у найбільш ефективній дозі (0,5 мкг/мл) призвело до збільшення рівня флюоресценції в два рази порівняно з початковим ($P < 0,05$) і посилення перегрупувань рецепторів у площині мембрани у вигляді кепів і петчів (рис. 3 та 5, г).

Результати дослідження дозволяють припустити, що здійснення активаційного сигналу при зв'язуванні внутрішньоклітинного кальцію

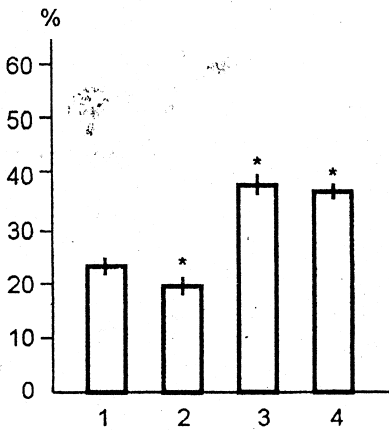


Рис. 3. Зміна експресії при зв'язуванні внутрішньоклітинного кальцію. По осі абсцис — досліджені групи: 1 — інтактна, 2 — інкубація з ВАРТА в дозі 20 ммоль/л, 3 — інкубація з пептидним комплексом нирок (0,5 мкг/мл) при попередній обробці клітин ВАРТА, 4 — інкубація з пептидним комплексом нирок (0,5 мкг/мл) при попередній обробці клітин ВАРТА і ЕДТА (9,2 мг/мл).

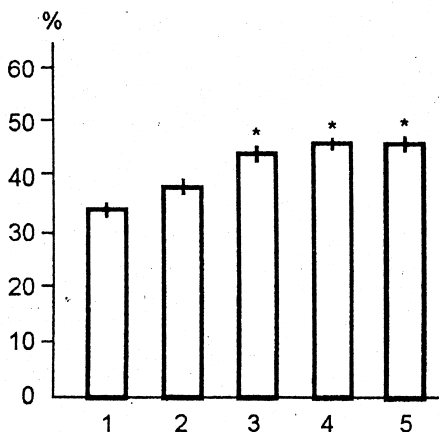
можливе внаслідок посилення його надходження з позаклітинного середовища. З іншого боку, використання внутрішньоклітинного хелатора у високій дозі (20 ммоль/л) не виключає, що ВАРТА до проникнення че-

рез лімфоцитарну мембрану в середину клітини здатна зв'язати і зовнішньоклітинний кальцій. Для з'ясування цього було проведено серію досліджень, в якій одночасно блокували іони Са у цитоплазмі та навколо клітин.

Дійсно, додаткове введення в інкубаційне середовище ЕДТА довело, що при повній блокаді як внутрішньо-, так і зовнішньоклітинного кальцію пептидний комплекс індукував високий рівень експресії поверхневих імуноглобулінів ($P < 0,05$) (див. рис. 4). Спостерігалось посилення перегрупування рецепторів у площині мембрани в вигляді петчів, кластерів, кепів.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що пептидний комплекс нирок впливає на функціональний стан клітин незалежно як від концентрації внутрішньоцитозольного кальцію, так і від його надходження з навколклітинного простору.

Однак ми не можемо повністю виключити участь пептидного комплексу нирок у механізмах, пов'язаних зі зміною концентрації $[Ca^{2+}]_i$. Слід відзначити (рис. 4) підсилення експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів, преінкубованих із кальцієвим іонофором А 23187 при дослідженні лімфоцитів. Крім збільшення щільності рецепторів на поверхні мембрани відмічалось їх активаційне перегрупування у вигляді кепів. Додавання в середовище інкубації пептидного комплексу нирок супроводжувалося дозозалежним вірогідним підсиленням експресії імуноглобулінових рецепторів і перегрупуванням у вигляді кепів і петчів (рис. 5, д). У цьому випадку можливим є збільшення проникності мембрани для іонів кальцію



під дією не тільки іонофора, але й пептидного комплексу. Про можливість такого припущення свідчать дані про вплив деяких нейропептидів, зокрема окситоцину на плазматичну мембрану з

Рис. 4. Зміна експресії при дії іонофора А 23187. По осі абсцис — досліджені групи: 1 — інтактна, 2 — інкубація з іонофором А 23187 в дозі 100 нмоль/л, 3, 4, 5 — інкубація з пептидним комплексом нирок у дозах 0,05; 0,12 і 0,5 мкг/мл відповідно при попередній обробці клітин іонофором А 23187.

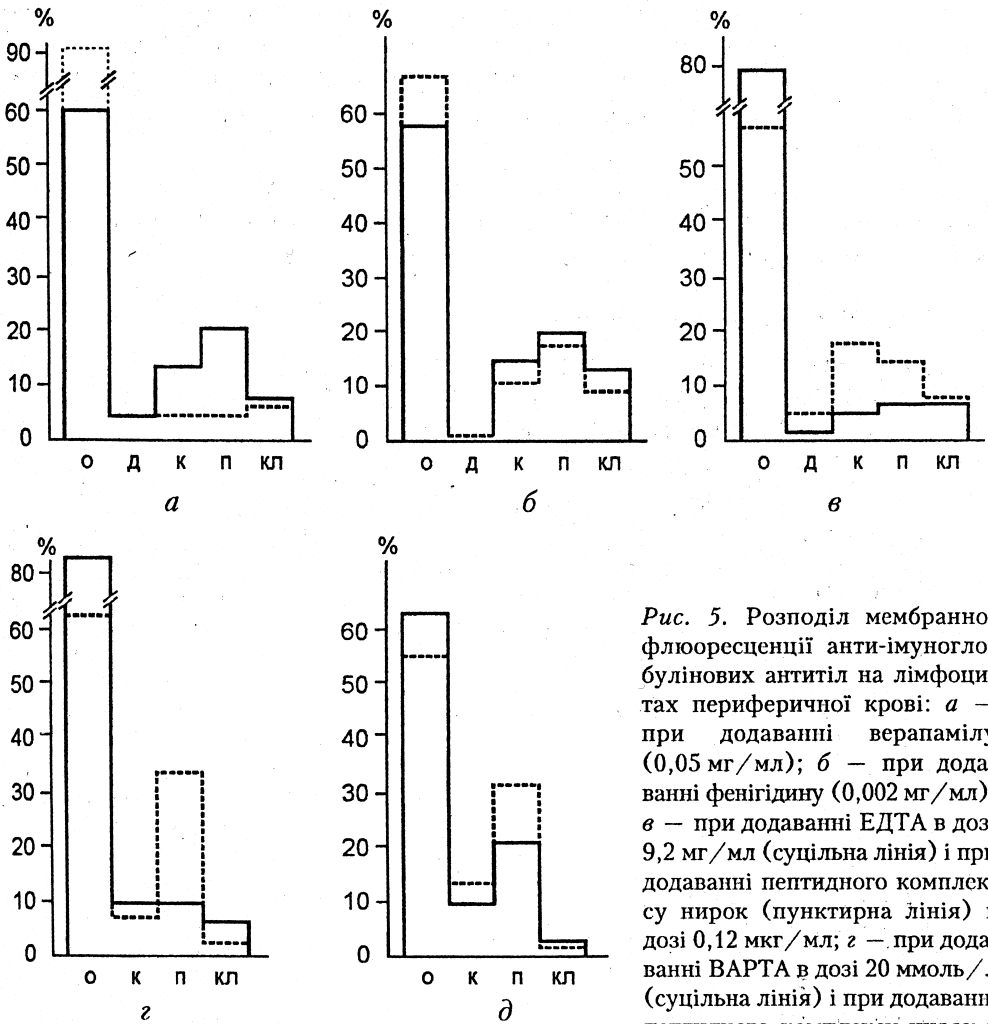


Рис. 5. Розподіл мембранної флюоресценції анти-імуноглобулінових антитіл на лімфоцитах периферичної крові: а — при додаванні верапамілу (0,05 мг/мл); б — при додаванні фенігідину (0,002 мг/мл); в — при додаванні ЕДТА в дозі 9,2 мг/мл (суцільна лінія) і при додаванні пептидного комплексу нирок (пунктирна лінія) в дозі 0,12 мкг/мл; г — при додаванні ВАРТА в дозі 20 ммоль/л (суцільна лінія) і при додаванні пептидного комплексу нирок в

дозі 0,5 мкг/мл (пунктирна лінія); д — при додаванні іонофору А 23187 в дозі 100 нмоль/л (суцільна лінія) і пептидного комплексу нирок в дозі 0,12 мкг/мл (пунктирна лінія). По осі ординат — відсоток клітин з флюоресценцією; по осі абсцис — види перегрупувань рецепторів: о — клітини, у яких відсутня флюоресценція, д — дифузний тип, к — кепи, п — петчі, кл — кластери.

утворенням за допомогою молекули пептиду іонних каналів при її надходженні в ліпідний матрикс [9].

Відповідно до результатів дослідження, вплив на проникність кальцієвих каналів верапамілу та фенігідину знижує експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів. Вибіркове зв'язування переважно позаклітинного або внутрішньоклітинного Ca^{2+} зменшує рівень експресії поверхневих імуноглобулінів, а також рухливість рецепторів у площині мембрани.

Використання пептидного комплексу нирок при блокаді зовнішньоклітинного і/або внутрішньоклітинного Ca^{2+} підсилювало експресію поверхневих імуноглобулінів на лімфоцитах. Пептидний комплекс нирок виявляв

синергізм із кальцієвим іонофором А 23187 у підсиленні експресії поверхневих імуноглобулінових лімфоцитів. Враховуючи, що іонофор А 23187 функціонує як каналотворююча речовина, можна припустити, що пептидний комплекс нирок полегшує формування транспортних каналів для кальцію та його надходження до клітини.

Таким чином, дія пептидного комплексу нирок на експресію мембранних рецепторів лімфоцитів не залежить від наявності іонів кальцію як всередині клітини, так і в навколочлітинному просторі .

L. E. Vesnina, I. P. Kaidashev

ROLE OF CALCIUM-DEPENDENT MECHANISM IN THE REALIZATION OF IMMUNE EFFECTS OF KIDNEY PEPTIDE COMPLEX

The role of intracellular and extracellular calcium in the realization of immune effects of the kidney peptide complex were studied. Expression of surface immunoglobulin receptors on lymphocytes depressed under the influence of calcium channels blockers (verapamil, phenigidin), binding of intracellular and extracellular calcium (EDTA, BAPTA). The kidney peptide complex restored expression of surface immunoglobulins depressed by verapamil, phenigidin, EDTA, BAPTA. Also in this conditions the peptide complex increased the re-assembly of receptors, as caps, patches and clusters. Kidney peptide complex has a synergy with the calcium ionophore A 23187 to increase the expression of surface immunoglobulin receptor on lymphocytes. We could not exclude the direct influence of peptide complex on the conformation changes of the ion traffic systems for calcium. It was suggested that peptide complex promote the entrance of calcium ions into the cells. The influence of kidney peptide complex on expression of lymphocytes membrane receptors are independent from the calcium existence neither into cells nor outside the cells.

*Ukrainian Medical Stomatological Academy
Ministry of Health Public Service of Ukraine, Poltava*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Веснина Л. Э.* Изменение экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия L-интерферона // *Проблеми екології та медицини.* — 1997. — 1, № 1-2. — С.32-34.
2. *Веснина Л. Е., Кайдашев И. П.* Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лейкоцитов // *Иммунология.* — 1998. — № 4. — С. 3-16.
3. *Джишамбаев Э. Д.* Применение антагонистов кальция при нарушениях ритма сердца // *Кардиология.* — 1987. — XXVII, № 5. — С. 109-116.
4. *Иммунология* / Под ред. У. Пола. — Т.1. — М.: Мир, 1987—1988. — 476 с.
5. *Кайдашев И. П.* Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите // *Физиол. журн.* — 1993. — 39, № 5-6. — С. 52-56.
6. *Лимфоциты.* Методы /Под ред. Дж. Клауса. — М.: Мир, 1990. — 392 с.
7. *Морозов В. Г., Хавинсон В. Х.* Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины // *Усп. совр. биологии.* — 1983. — 96, № 6. — С. 339-352.
8. *Рецепторы и внутриклеточный кальций* /Под. ред. Авдонина П. В., Ткачук В. А. — М.: Наука, 1994. — 288 с.
9. *Рыбальченко В. К.* Окситоциновые каналы в биомолекулярной мембране. — В кн.: *Тез. докл. Всесоюз. симпоз. «Физиология пептидов».* — Л., 1988. — С. 654-656.

10. Ямпольский В. С., Ратников В. И. Изучение характера иммуотропной активности некоторых антагонистов кальция // Фармакология и токсикология. — 1987. — №5. — С. 43-45.
11. А.с. 10180 А Україна МКІ 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. 3176-3177.
12. Gelfand Erwin W., Cheung Roy K., Mills Gordon B., Grinstein Sergio. Uptake of extracellular Ca and not recruitment from internal stores in essential for T lymphocyte //Eur. J. Immunol. — 1988. — 18, N 6. — С. 917-922.
13. Jy W., Fregien N., Bourguignon G. J., Bourguignon Lilly Y. W. Role of Ca²⁺ in the regulation of hormone receptor exposure during lymphocyte activation //Biochim. et biophys. acta. Biomembranes. — 1989. — 983, N 2. — С. 153-160.
14. Kuno M., Gardner Ph. Ion cannels activated by inositol 1,4,5-triphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes //Nature. 1987. — 326, N 6110. — P. 301-304.
15. Pasini F. L., Capocchi P. L., Orrico A. et al. Adenosine inhibits polymorphonuclear leucocyte in vitro activation: a possible role as an endogenous calcium entry blocker //J. Immunopharmacol. — 1985. — 7, N 2. — P. 203-215.
16. Yukihito Nishimoto, Yoshiaki Onishi, Yutaka Sato, Harutoshi Kizaki. Protein synthesis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cells //Bull. Tokyo dent. Coll. — 1997, May. — 38, N 2. — P. 133-138.

Укр. мед. стомат. академія
М-ва охорони здоров'я України, Полтава

Матеріал надійшов
до редакції 10.12.98