

136. *Ruscetti F. W., Mikovits J. A., Kalyanaraman V. S. et al.* // *Ibid.* — Vol. 136, N 10. — P. 3619–3624.
137. *Salonen R., Ilonen J., Reunanen M., Salmi A.* // *J. neurol. Sci.* — 1982. — Vol. 55, N 2. — P. 197–206.
138. *Santoli D., Trinchieri G., Zmiewski C. M., Koprowski H.* // *J. Immunol.* — 1976. — Vol. 117, N 3. — P. 765–770.
139. *Santoni A., Gismondi A., Paolini R. et al.* // *Cytotechnology.* — 1991. — Vol. 5. — Suppl. 1. — P. 117–121.
140. *Saxena R. K., Spees E. K., Adler W. H.* // *Indian J. exp. Biol.* — 1981. — Vol. 19. — P. 595–597.
141. *Seaman W. E., Gindhart T. D., Blackman M. A. et al.* // *J. clin. Invest.* — 1982. — Vol. 69, N 4. — P. 876–888.
142. *Seebach J. D., Comrack C., Germana S. et al.* // *Natur. Immun.* — 1996–1997. — Vol. 15, N 4. — P. 176.
143. *Serrano R., Alonso C., Solana R. et al.* // *Immunol. Lett.* — 1989. — Vol. 20, N 4. — P. 311–316.
144. *Shah P. D.* // *Cell. Immunol.* — 1987. — Vol. 104, N 2. — P. 440–445.
145. *Shah P. D., Keij J., Gilbertson S. M., Rowley D. A.* // *J. exp. Med.* — 1986. — Vol. 163, N 4. — P. 1012–1017.
146. *Shirakawa F., Tanaka Y., Eto S. et al.* // *J. Immunol.* — 1986. — Vol. 137, N 2. — P. 551–556.
147. *Silvennoinen O.* // *Immunology.* — 1988. — Vol. 64. — P. 495–500.
148. *Skov M. P., Hokland P., Hokland M.* // *Acta pathol. microbiol. immunol. scand.* — 1986. — Vol. C94, N 5. — P. 193–200.
149. *Somersalo K.* // *Natur. Immun.* — 1996–1997. — Vol. 15, N 2–3. — P. 117–133.
150. *Thygesen P., Hougen H. P., Christensen H. B. et al.* // *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* — 1992. — Vol. 14, N 1–2. — P. 219–232.
151. *Timonen T., Jääskeläinen J., Heiskala M. et al.* // *European Immunological Meeting, 11-th: Abstracts.* — Espoo, 1991. — NS-3.
152. *Toossi Z., Paris M. R., Purvis S. F., Ellner J. J.* // *Cell. Immunol.* — 1989. — Vol. 118, N 2. — P. 413–424.
153. *Tsuji J. M., Pollack S. B.* // *Natur. Immun.* — 1995. — Vol. 14, N 1. — P. 44–56.
154. *Umehara H., Domae N., Bloom E. T.* // *J. Leukocyte Biol.* — 1994. — Suppl. — P. 34.
155. *Wallace P. K., Howell A. L., Fanger M. W.* // *Ibid.* — Vol. 55, N 6. — P. 816–826.
156. *Watanabe Y., Sakata T.* // *Eur. J. Immunol.* — 1988. — Vol. 18, N 10. — P. 1627–1630.
157. *Welsh R. M., Kärre K., Hansson M. et al.* // *J. Immunol.* — 1981. — Vol. 126, N 1. — P. 219–225.
158. *Wilson A. B., Harris J. M., Coombs R. R. A.* // *Cell. Immunol.* — 1988. — Vol. 113, N 1. — P. 130–142.
159. *Wyatt R. M., Dawson J. R.* // *J. Immunol.* — 1991. — Vol. 147, N 10. — P. 3381–3388.
160. *Yeoman H., Robins R. A.* // *Immunology.* — 1988. — Vol. 63, N 2. — P. 291–297.
161. *Yogeeswaran G., Welsh R. M., Grönberg A. et al.* // *NK Cells and Other Natural Effector Cells / Ed. R. B. Herberman.* — New York, 1982. — P. 765–770.
162. *Young J. D.-E., Liu C.-C.* // *Immunol. Today.* — 1988. — Vol. 9, N 5. — P. 140–144.
163. *Zielinski C. C., Gisinger C., Binder C. et al.* // *Cell. Immunol.* — 1984. — Vol. 87, N 1. — P. 65–72.
164. *Zöller M., Matzku S.* // *Immunobiology.* — 1982. — Vol. 163, N 5. — P. 497–510.

Поступила 26.03.99

## КЛЕТочная ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 615.276.41.015.46:612.46.014.2:577.112

Л. Э. Веснина, И. П. Кайдашев

### ЭКСПРЕССИЯ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧЕК НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

Украинская медицинская стоматологическая академия, Полтава

Благодаря развитию молекулярной иммунологии и совершенствованию методов иммунологических исследований стало возможным открытие ряда биологически активных веществ, модифицирующих иммунный ответ. Оказалось, что растворимым эндогенным факторам принадлежит одно из центральных мест в регуляции иммунологических процессов и межклеточных взаимодействий в иммунном ответе [1, 4]. Эндогенные иммуномодуляторы являются регуляторами иммунных реакций, инициирующими воспаление, острофазовый ответ организма, модифицирующими функциональное состояние нервной и эндокринной систем и т. д. [4, 6].

Способность изменять состояние иммунитета и неспецифической резистентности организма свойственна особому классу биологических регуляторов полипептидной природы [10]. С одной стороны, пептиды, выделенные из иммунокомпетентных органов — тимуса, бурсы Фабрициуса, селезенки, лимфоцитов, восстанавливают состояние природной иммунологической толерантности, изменяют активность иммунокомпетентных клеток

[10], а с другой — пептиды, выделенные из нелимфоидных органов, по-видимому, способны оказывать модулирующее влияние на состояние иммунокомпетентных клеток. Так, пептидный экстракт, выделенный из коркового вещества почек, давал терапевтический эффект при их иммунных поражениях [5]. На этом фоне было отмечено восстановление толерантности организма лабораторных животных к смеси тканевых антигенов, что послужило основанием для предположения о возможном участии пептидного экстракта в процессе взаимодействия Т-клеточного рецептора с его лигандами. Кроме того, отмечено сходство между исследованными пептидными субстанциями и эндогенными пептидами, выделенными из молекул главного комплекса гистосовместимости [5].

В предыдущей работе [2] нами показано, что комплекс пептидов коркового вещества почек *in vitro* может вызывать изменение функционального состояния Т-клеток, что сопровождается усилением экспрессии комплекса TCR—CD3. Многие вещества *in vitro* могут изменять экспрессию мембранных рецепторов клеток, в то же время имму-

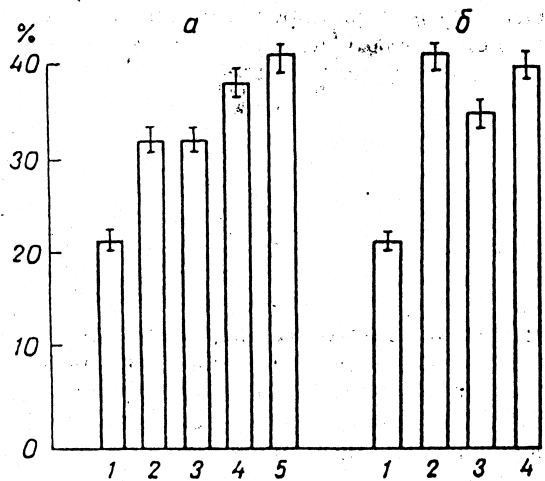


Рис. 1. Изменение экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов под действием ИЛ-2 (а) и пептидного комплекса почек (б).

По оси абсцисс — распределение по группам; по оси ординат (здесь и на рис. 2—4) — процент клеток с флуоресценцией.  
 а: 1 — исходный уровень флуоресценции, 2—5 — уровень флуоресценции при добавлении ИЛ-2 в разведениях соответственно 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8; б: 1 — исходный уровень флуоресценции, 2 — уровень флуоресценции при добавлении ИЛ-2 в разведении 1:8, 3 — уровень флуоресценции при добавлении пептидного комплекса почек в дозе 0,5 мкг/мл, 4 — уровень флуоресценции при добавлении ИЛ-2 в разведении 1:8 и пептидного комплекса почек в дозе 0,5 мкг/мл.

номодулирующие эффекты зависят от ряда условий, в том числе от исходного состояния клеток [11]. Представляется необходимым выяснить, как будет изменяться экспрессия мембранных рецепторов иммунокомпетентных клеток на фоне действия различных иммуномодуляторов.

В связи с этим в настоящей работе мы изучили влияние пептидного экстракта коркового вещества почек на экспрессию мембранных рецепторов иммунокомпетентных клеток на фоне действия эндогенных иммуномодуляторов — интерлейкина-2 (ИЛ-2) и кортизола.

**Методика исследований.** В исследованиях использовали кровь здоровых доноров, стабилизированную гепарином (25 ЕД/мл). Суспензию лимфоцитов периферической крови выделяли по стандартной методике в градиенте плотности фикола—триомбраста с последующим отмыванием в фосфатно-солевом буфере ("Дельбекко А") при рН 7,2 [9]. Количество клеток в суспензии при подсчете в камере Горяева в среднем составило  $(1-1,5) \cdot 10^6$  в 1 мл.

Использовали ИЛ-2, полученный из надосадочной жидкости 3-дневной культуры спленоцитов крысы, стимулированных Кона [9]. В I серии исследований проводили инкубацию лимфоцитов с последовательными разведениями ИЛ-2 (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) в течение 60 мин при температуре 37°C. В опытной серии в среду инкубации добавляли пептидный комплекс, полученный из коркового вещества почек по оригинальной методике. Коротко суть метода заключается в экстракции тканей органической галогеносодержащей кислотой в присутствии катионов двухвалентных металлов с последующим осаждением пептидов органическим растворителем с дополнительной очисткой путем гель-фильтрации для выделения пептидов с мол. массой менее 10 кД. Использовали дозы пептидного комплекса 0,05, 0,12 и 0,5 мкг/мл. В качестве контроля использовали физиологический раствор.

Во II серии исследований вначале проводили инкубацию суспензии лимфоцитов с гидрокортизона сукцинатом ("Astragin") в концентрациях  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-2}$  М в течение 30 мин при температуре 37°C [7]. В опытной серии затем в среду инкубации добавляли пептидный комплекс почек в аналогичной дозировке и продолжали инкубировать в течение 60 мин при 37°C.

В реакции прямой иммунофлуоресценции были использованы поликлональные антитела свиньи к поверхностным мембранным иммуноглобулинам человека, конъюгированные с ФИТЦ производства Института сывороток и вакцин (Прага). Неспецифическое связывание устраняли с помощью сыворотки на порошке крысиной печени.

Регистрацию зеленой флуоресценции ФИТЦ проводили на микроскопе "Люмам Р-8". Результаты оценивали по степени интенсивности флуоресценции и делили исследуемые клетки на 4 группы: с отрицательной (0 баллов), со слабоположительной (1 балл), с положительной (2 балла) и с резко положительной (3 балла) реакцией. Рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК): дифференцировали 100 исследованных клеток по указанной выше системе; полученный процент клеток в каждой группе умножали на соответствующее данной группе число баллов. Сумма этих величин, разделенная на 100, представляет собой СЦК для одной клетки [12]. По характеру флуоресценции выделяли диффузную флуоресценцию мембраны, когда равномерно светилась вся клетка, группировку рецепторов в виде отдельных кластеров, кэпов и пэтчей. Флуоресцентная микроскопия мембранных маркеров сопровождалась морфологическим контролем клеток в фазовом контрасте.

**Результаты и обсуждение.** В работе мы оценивали изменение функциональной активности лимфоцитов по способности экспрессировать на мембранной поверхности рецепторы под влиянием внешнего сигнала с изменением флуоресценции.

Согласно результатам наших исследований, при добавлении ИЛ-2 в суспензию лимфоцитов периферической крови отмечалось дозозависимое усиление экспрессии рецепторов (рис. 1, а). Максимальная стимуляция экспрессии (практически в 2 раза по сравнению с исходным уровнем) наблюдалась при наибольшем разведении (1:8). СЦК, характеризующий интенсивность свечений и соответственно плотность рецепторов на мембране, также возрос и составил соответственно 1,21, 1,16, 1,51 и 1,55 по сравнению с исходным, равным 0,70.

Обращает на себя внимание усиление подвижности рецепторов в плоскости мембраны под действием ИЛ-2, что сопровождалось перегруппировкой рецепторов в виде отдельных кэпов, кластеров и пэтчей и отражало функциональную активацию клеток. На рис. 2 показано изменение перегруппировки рецепторов под влиянием ИЛ-2 в разведении 1:8.

Предварительно мы выбрали наиболее эффективную дозировку пептидного комплекса почек,

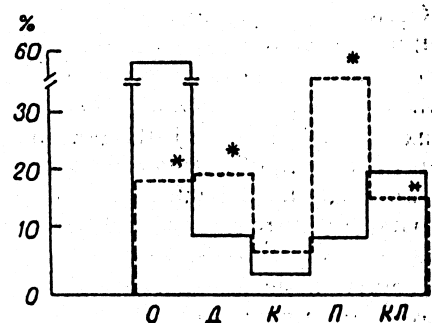


Рис 2. Мембранная флуоресценция поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов интактных лимфоцитов (сплошная линия) и при добавлении ИЛ-2 в разведении 1:8 (штриховая линия).

По оси абсцисс — виды перегруппировок рецепторов: О — клетки, у которых отсутствует флуоресценция; Д — диффузная флуоресценция мембраны; К — кэпы, П — пэтчи, КЛ — кластеры; по оси ординат — процент клеток с флуоресценцией. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными лимфоцитами.

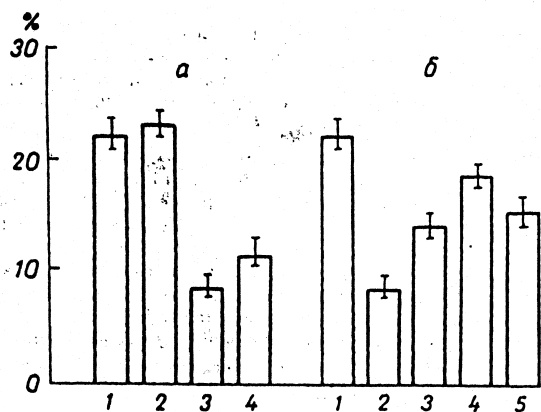


Рис. 3. Изменение экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов под действием гидрокортизона (а) и пептидного комплекса почек (б).

а: 1 — исходный уровень флуоресценции, 2—4 — уровень флуоресценции при добавлении гидрокортизона в дозах соответственно  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-2}$  М; б: 1 — исходный уровень флуоресценции, 2 — уровень флуоресценции при добавлении гидрокортизона в дозе  $10^{-2}$  М, 3—5 — уровень флуоресценции при добавлении гидрокортизона в дозе  $10^{-2}$  М и пептидного комплекса почек в дозах соответственно 0,05, 0,12 и 0,5 мкг/мл.

которая составила 0,5 мкг/мл. Добавление в интактную суспензию пептидного комплекса привело к значительному приросту процента клеток с флуоресценцией (рис. 1, б). Совместная инкубация клеток с ИЛ-2 и пептидом способствовала однонаправленному увеличению процента связывания клеток с антителами, что свидетельствует о синергизме действия иммуномодулятора и пептида.

Важно было выяснить характер изменения экспрессии рецепторов при изучении взаимодействия полипептида в дозе 0,5 мкг/мл и ИЛ-2 в разведении 1:8. Так, если добавление ИЛ-2 в среду инкубации способствовало увеличению кэппинга рецепторов в 3,8 раза, то дополнительное внесение полипептида приводило к снижению кэппинга практически до уровня контрольной группы. В то же время содержание клеток, формирующих на своей мембране отдельные кластеры из рецепторов, при добавлении ИЛ-2 снижалось в 1,7 раза по сравнению с контролем, а инкубация с полипептидом приводила к увеличению уровня кластеризации в 2,2 раза. В целом СЦК изменялся незначительно — от 1,57 до 1,61 (при добавлении пептидного комплекса).

Во II серии исследований использовали коммерческий препарат гидрокортизона сукцинат в дозировках  $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-2}$  М. Широкий охват концентраций препарата объясняется их разными эффектами. Специфическое действие кортикостероидов (полураспад мРНК или специфических белков) в системе *in vivo* проявляется в концентрации  $10^{-8}$  М. Неспецифическое действие, в частности, на систему иммунитета предполагает другие дозировки. Четкий эффект изменения кинетики, инактивации и пролиферации лимфоцитов, воздействия на активность НК-клеток и клеток-супрессоров наблюдается только при концентрации  $10^{-5}$  М и выше [7].

Согласно полученным нами данным, при добавлении в инкубационную среду гидрокортизона в концентрации  $10^{-8}$  М практически не изменялся

процент клеток с флуоресценцией, но изменялся характер свечения. Следует отметить увеличение в 2 раза по сравнению с контролем количества клеток, формирующих на мембране пэтч с сильной степенью флуоресценции, увеличение СЦК с 0,94 до 1,13.

Выраженный ингибирующий экспрессию рецепторов лимфоцитов эффект был обнаружен при концентрации  $10^{-5}$  М (рис. 3, а). Помимо значительного снижения процента клеток с флуоресценцией, отмечено изменение перегруппировки рецепторов в плоскости мембраны (рис. 4, а): уменьшение кластеризации, образования кэпов и пэтчей, практически полное исчезновение перегруппировки рецепторов с сильной степенью флуоресценции, снижение СЦК до 0,26. Снижение процента клеток с флуоресценцией отмечено также и при использовании гидрокортизона в дозе  $10^{-2}$  М, что сопровождалось уменьшением количества клеток, формирующих пэтчи, кэпы и кластеры.

Для оценки влияния пептидного комплекса почек на экспрессию мембранных рецепторов была выбрана максимально ингибирующая доза гидрокортизона —  $10^{-5}$  М. Добавление в среду инкубации комплекса пептидов в дозах 0,05, 0,12 и 0,5 мкг/мл на фоне действия гидрокортизона привело к однонаправленному повышению процента клеток с флуоресценцией (рис. 3, б). Наиболее выраженное действие отмечено при использовании средней дозировки 0,12 мкг/мл, когда, помимо роста уровня флуоресценции, отмечается изменение подвижности рецепторов в плоскости мембраны и способности к перегруппировкам (рис. 4, б). При использовании пептидного комплекса в дозе 0,5 мкг/мл также наблюдалось увеличение в 2 раза процента клеток, образующих пэтчи и кластеры средней степени свечения.

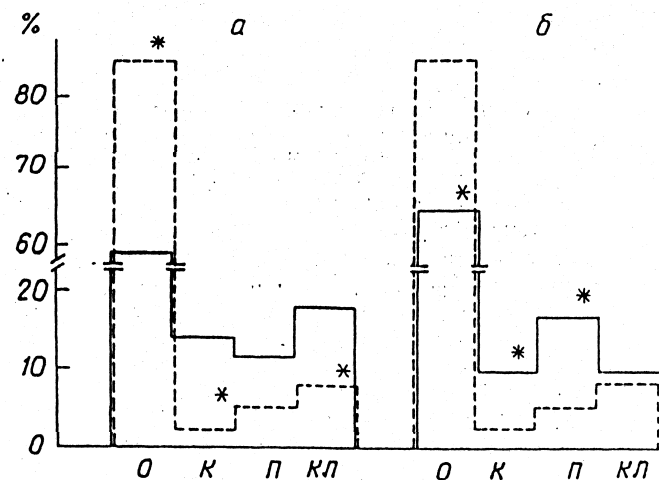


Рис. 4. Мембранная флуоресценция поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов.

а — при добавлении гидрокортизона в дозе  $10^{-5}$  М, сплошная линия — интактные лимфоциты, штриховая — внесение гидрокортизона. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными лимфоцитами; б — при сочетанном добавлении гидрокортизона в дозе  $10^{-5}$  М и пептидного комплекса почек в дозе 0,12 мкг/мл, сплошная линия — внесение гидрокортизона, сплошная линия — сочетанное действие гидрокортизона и пептидного комплекса. Звездочка —  $p < 0,05$  по сравнению с лимфоцитами, прединкубированными с гидрокортизоном. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

Известно, что рецепторы к ИЛ-2 экспрессируют клетки различных популяций и субпопуляций, в том числе В-клетки [1]. После связывания ИЛ-2 с клеточным рецептором происходит каскад событий, обеспечивающих передачу ростового сигнала. ИЛ-2 индуцирует фосфорилирование рецептора и всей популяции Т-клеточных мембранных белков [14]. Эти внутриклеточные превращения в конечном счете ведут к метаболическим изменениям [1].

Изолированное внесение ИЛ-2 в суспензию лимфоцитов приводило к кэппингу, а внесение в совокупности с пептидным комплексом — к кластеризации. Хотя кэппинг и нельзя считать "активационным процессом" [4], поскольку отсутствуют синтез ДНК и секреция иммуноглобулинов, не исключено, что сигнал к кэппингу представляет собой своеобразное "регулирующее устройство". Продолжаясь всего несколько минут, он служит быстрым индикатором того, что в результате сшивки рецепторов на поверхности мембраны возник сигнал, поступивший в клетку [4].

Возможно, при сочетанном внесении ИЛ-2 и пептидного комплекса мы регистрировали уже распавшийся на отдельные кластеры рецепторных иммуноглобулинов кэп как следствие приема активационного сигнала клеткой.

В данном случае мы наблюдали стимуляцию под влиянием ИЛ-2 экспрессии иммуноглобулиновых рецепторов В-клеток, увеличение их плотности и перегруппировки в плоскости мембраны, что свидетельствует об активации клеток. Возможно, используя сходные механизмы активации, пептидный комплекс опосредует передачу ростового сигнала внутрь клетки и облегчает дальнейший путь — синтез клеточных протоонкогенов, реципрокное индуцирование синтеза рецептора для ИЛ-2 [6].

Несомненно важное значение имеет существенное подавление экспрессии иммуноглобулиновых рецепторов при использовании гидрокортизона в дозе  $10^{-5}$  М. Известно, что в целом на уровне лимфоидной ткани действие кортикостероидных гормонов проявляется общей депрессией функциональной активности лимфоцитов. Установлено, что ингибирующий эффект кортикостероидов тесно связан с их способностью ингибировать продукцию АТФ в лимфоцитах через глюкозу [8]. Важной особенностью гормонов является их влияние на изменение концентрации внутрицитозольного кальция [3]. Активаторы протеинкиназы С, факторы, способствующие накоплению в клетке цАМФ, и аналоги циклических нуклеотидов ослабляют, но не отменяют полностью действие кортикостероидов на выживаемость тимоцитов [13].

В наших исследованиях совместная инкубация суспензии лимфоцитов с гидрокортизоном и пептидным экстрактом коркового вещества почек приводила к более чем 2-кратному приросту числа клеток с флюоресценцией (при дозе пептида 0,12 мкг/мл).

Маловероятно, что пептидный комплекс является прямым антагонистом гидрокортизона. Скорее всего передача активационного сигнала пеп-

тидным комплексом почек осуществляется альтернативным путем, минуя путь, заблокированный гидрокортизоном. Не исключено, что на определенном этапе (возможно, это процесс увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ ) эти пути перекрещиваются.

## Выводы

1. Пептидный комплекс, выделенный из коркового вещества почек, проявляет синергизм в усилении экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов с эндогенным иммуномодулятором ИЛ-2.

2. Пептидный комплекс выступает в качестве функционального антагониста гидрокортизона, восстанавливая снижение экспрессии изученных рецепторов.

3. Полученные данные свидетельствуют об участии тканевых пептидных молекул во взаимодействии между специализированными паренхиматозными клетками и иммунocyтами, регулируемом иммуномодуляторами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н. М., Горецкий Б. А. Интерлейкин-2 и злокачественные новообразования. — Киев, 1992.
2. Веснина Л. Э., Кайдашев И. П. // Иммунология. — 1998. — № 4. — С. 3—16.
3. Духанин А. С. // Фармакол. и токсикол. — 1988. — № 4. — С. 71—72.
4. Иммунология / Под ред. У. Пола. — М., 1987. — Т. 1.
5. Кайдашев И. П. // Биополимеры и клетка. — 1995. — Т. 11, № 5. — С. 61—73.
6. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С., Воробьев А. А. Эндогенные иммуномодуляторы. — СПб., 1992.
7. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Л. Йегера. — М., 1986. — Т. 1.
8. Корнеева Е. А., Шхинек Э. К. Гормоны и иммунная система. — М., 1988.
9. Лимфоциты: Методы / Под ред. Дж. Клауса. — М., 1990.
10. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Успехи соврем. биол. — 1983. — Т. 96, № 6. — С. 339—352.
11. Новиков Д. К., Мельникова Л. А., Гресь А. А. // Иммунология. — 1993. — № 1. — С. 28—30.
12. Astaldi G., Verga L. // Acta haematol. (Basel). — 1957. — Vol. 17, N 3. — P. 129—136.
13. Iseki Rieko, Mukai Mutsumi, Iwata Makoto // J. Immunol. — 1991. — Vol. 147, N 12. — P. 4286—4292.
14. Leonard W. J., Depper J. M., Kronke M. et al. // J. biol. Chem. — 1985. — Vol. 260, N 2. — P. 1872—1880.

Поступила 24.05.99

## INFLUENCE OF THE KIDNEY PEPTIDE EXTRACT AND IMMUNOMODULATORS ON THE EXPRESSION OF LYMPHOCYTES MEMBRANE RECEPTORS — L. E. Vesnina, I. P. Kaidashev

**Summary.** We studied the effect of a peptide extract from renal cortex on expression of lymphocyte surface immunoglobulin receptors under the action of endogenic immunomodulators IL-2 and hydrocortisone in direct immunofluorescence reaction. We found out maximal fluorescence (as single clusters and patches) in incubation of lymphocytes with IL-2 (1:8). IL-2 incubation with the peptide extract increased binding of the cells with the antibodies. Hydrocortisone induced a decrease in fluorescence and disappearance of receptor rearrangement. In this case the peptide complex increased amount of fluorescent cells two-fold. The findings suggest that peptide molecules may be involved into interaction between immunocytes and special parenchymal cells which is controlled by immunomodulators.