

УДК 615.276.4: 616-092: 612.017.1]. 015.44.076.9

Л.Е. ВЕСНІНА

Українська медична стоматологічна академія, Полтава

Визначення рівня впливу пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів

Використання сучасних методів дослідження дає змогу поглибити та деталізувати знання про фізіологічну роль та механізм дії особливої групи біологічно активних речовин – регуляторних пептидів (РП). Вони виконують сигнальну функцію та є регуляторами різноманітних функцій організму – від окремих функцій спеціалізованих клітин до складних поведінкових актів, відіграють основну роль у механізмах клітинних взаємодій, координуючи процеси біосинтезу через вплив на експресію генів [8,13]. Багато аспектів дії РП залишаються до кінця нез'ясованими, зокрема, як саме взаємодіють пептидні молекули та імунокомпетентні клітини, на якому рівні.

Результати досліджень пептидного комплексу, отриманого з кіркової речовини нирок (ПКН), свідчать про його вплив на рецепторний апарат лімфоцитів, опосередкований зміною рівня експресії поверхневих антигенних детермінант [3]. Виконання експериментальних робіт з використанням ендогенних імуномодуляторів дало змогу обґрунтувати мембраноопосередкований механізм дії ПКН [2,4]. В експериментах з модуляцією окремих ланок основних сигнальних шляхів ми отримали дані, на підставі яких можна зробити висновок, що зміна, зокрема стимуляція, експресії антигенних детермінант лімфоцитів відбувається переважно за рахунок початкових, швидких етапів сигнальної трансдукції [11, 12].

Водночас інші дані стосовно того, що ПКН відновлює експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів на фоні пригнічення метаболічних процесів, є основою припущення, що ПКН діє не тільки на поверхні мембрани, а й на етапі мобілізації внутрішньоклітинного пулу вже синтезованих рецепторів [5]. Таким чином, цілком імовірно є дія ПКН як на початкових, так і на більш довготривалих етапах синтетичних процесів, коли пул рецепторів починає відновлюватись.

Метою цієї роботи стало визначення етапу, на якому ПКН реалізує свій вплив на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів.

Матеріал і методи досліджень. Лімфоцити периферичної крові донорів отримували стандартним методом [9], у кінцевій концентрації $1...1,5 \cdot 10^6$ /мл клітини культивували в середовищі RPMI-1640 („Gibco BRL“, Шотландія) з додаванням 10% інактивованої телячої сироватки при 37°C. У першій серії досліджень клітини інкубували з ПКН у дозах 0,05; 0,12 та 0,5 мкг/мл протягом 30 та 60 хв при 37°C; у другій серії – протягом 24 год.

Ми використовували пептидний комплекс, що отримували з кіркової речовини нирок у результаті екстракції їхніх тканин органічною галогенвмісною кислотою при наявності іонів цинку [1]. Після одержання пептиди осаджували органічним розчинником з додатковим очищенням за допомогою гель-фільтрації для виділення пептидів молекулярною масою менш як 10 кДа.

Рівень експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів визначали методом непрямого ІФА з моноклональними антитілами проти *CD3*, *CD4*, *CD8*, *CD22*, *CD72*, *HLA-DR* та кон'югованими з ФІТЦ анти-*F(ab)₂*-антитілами (ТОО „Сорбент“, Москва). Поверхневі імуноглобулінові рецептори визначали методом прямого ІФА з антитілами, які помічені ФІТЦ, проти *Ig A*, *M*, *G*. Визначали рівень флуоресценції у відсотках та її характер за типом перегруповань [10].

Статистичне опрацювання результатів провадили за допомогою стандартного пакета програм STATISTICA.

Результати досліджень та їх обговорення. Досліди ми згрупували за тривалістю інкубації в дві серії: короточасні інкубації – по 30 та 60 хв та довготривалі – 24 год та використали спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів за допомогою ПКН, шляхом реєстрації зміни експресії мембранних рецепторів під впливом пептидів [10].

Ще раз проаналізуємо результати 30- та 60-хвилинної інкубації лімфоцитів з ПКН [3, 12]. Результати першої, 30-хвилинної інкубації засвідчили, що рівень експресії поверхневих імуноглобулінів при використанні ПКН у максимальній дозі (0,5 мкг/мл) вірогідно знижувався, що супроводжувалось зменшенням кількості сформованих у площині мембрани кластерів.

Для *CD3⁺*-клітин було характерним підвищення рівня експресії при використанні ПКН у максимальній дозі та зниження – при дозах 0,12 та 0,05 мкг/мл (на 19,07% та 40,47% відповідно). Характер флуоресценції змінювався переважно через формування кепів та кластерів. При використанні всіх досліджуваних доз ПКН спостерігали зниження рівня кластеризації рецепторів.

Т а б л и ц я 1

Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією пептидного комплексу нирок протягом 30 хв, $M \pm \sigma$

Експресія антигенних детермінант, % позитивних клітин	Інтактні лімфоцити, $n=5$	Лімфоцити, інкубовані з ПКН у дозі, мкг/мл; $n=5$		
		0,5	0,12	0,05
<i>Ig A, M, G</i>	21,14±2,61	13,14±2,19*	24,57±5,68	19,0±4,0
<i>CD 3</i>	67,43±5,47	78,0±6,83*	54,57±4,79*	40,14±4,30*
<i>CD 4</i>	31,57±2,94	40,29±3,45*	52,14±7,29*	46,43±4,16*
<i>CD 8</i>	29,0±2,94	42,14±3,98*	38,43±2,37*	34,86±2,34*
<i>CD 72</i>	9,14±1,35	15,0±2,31*	6,29±4,31	2,14±1,35*
<i>HLA-DR</i>	14,0±1,63	27,57±2,76*	21,14±1,95*	27,0±2,45*

П р и м і т к а. Тут та в табл. 2, 3: * $p < 0,05$ – порівняння показників між інтактними лімфоцитами та лімфоцитами, які інкубували з різними дозами пептидного комплексу нирок.

Маркування лімфоцитів моноклональними антитілами проти *CD4*-, *CD8*- та *HLA-DR*- детермінанти дало змогу виявити односпрямовані зміни – підвищення

ної стимуляції антигенних детермінант *CD3*, *CD4*, *CD8* та *HLA-DR*, зниження експресії *CD22* та перерозподілу рецепторів у площині мембрани.

Таким чином, 30-хвилинна інкубація інтактних лімфоцитів з ПКН спричиняла підвищення рівня експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів *CD4*, *CD8* та *HLA-DR* при усіх дозах ПКН, підвищення рівня експресії *CD3* та *CD72* лише при максимальній дозі ПКН [12]. Під час 60-хвилинної інкубації лімфоцитів з ПКН спостерігалась переважна стимуляція *CD3*, *CD4*, *CD8* та *HLA-DR*, зниження рівня експресії *CD22* [3]. Результати першої серії досліджень свідчать про можливість модуляції ПКН швидкої відповіді клітини на початкових етапах сигнальної трансдукції на рівні клітинної мембрани.

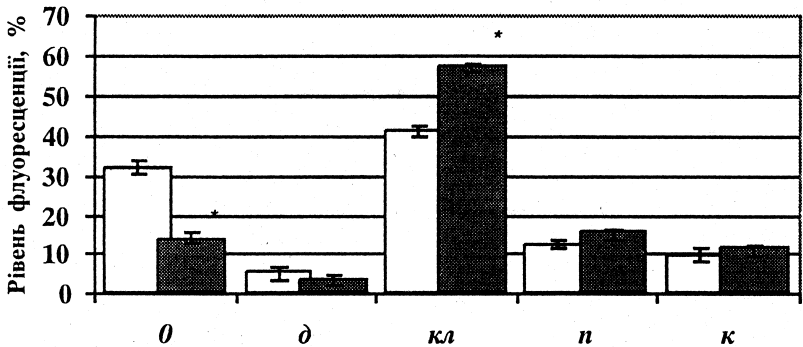


Рис. 1. Мембранна флуоресценція *CD3*⁺-лімфоцитів в інтактній групі (□) та при додаванні пептидного комплексу нирок у дозі 0,5 мкг/мл (інкубація протягом 24 год) (■): тут та на рис. 2: по осі ординат – відсоток клітин з флуоресценцією; по осі абсцис – види перегрупувань рецепторів: *o* – клітини, у яких відсутня флуоресценція; *д* – клітини з рівномірним, дифузним світінням мембрани, *кл* – кластери, *п* – петчі; *к* – кепи; * вірогідність розбіжностей між досліджуваними групами ($p < 0,05$)

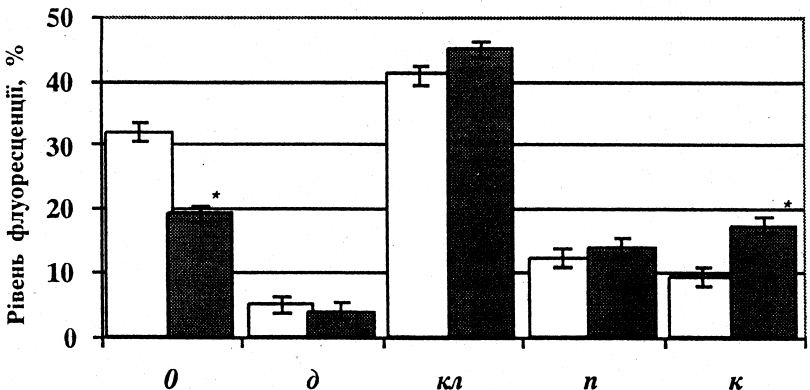


Рис. 2. Мембранна флуоресценція *CD3*⁺-лімфоцитів в інтактній групі (□) та при додаванні пептидного комплексу нирок у дозі 0,12 мкг/мл (інкубація протягом 24 год) (■)

Друга серія досліджень – інкубація лімфоцитів з ПКН протягом 24 год. Під час підрахунку клітин, які є носіями диференційного маркера

CD3, ми виявили вірогідне підвищення експресії рецепторів при максимальній та середній дозах ПКН (табл. 3) від $68,0 \pm 7,75$ до $86,17 \pm 7,47\%$ та $80,67 \pm 6,44\%$ відповідно. Дослідження характеру перегрупувань рецепторів дало змогу виявити переважне формування кластерів з молекул *CD3* (максимальна доза ПКН; рис. 1) та кепів (середня доза ПКН; рис. 2).

Т а б л и ц я 3

Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією пептидного комплексу нирок протягом 24 год, $M \pm \sigma$

Експресія антигенних детермінант, % позитивних клітин	Інтактні лімфоцити, $n=6$	Лімфоцити, інкубовані з ПКН у дозі, мкг/мл; $n=6$		
		0,5	0,12	0,05
<i>CD 3</i>	$68,0 \pm 7,75$	$86,17 \pm 7,47^*$	$80,67 \pm 6,44^*$	$72,83 \pm 7,88$
<i>CD 4</i>	$32,67 \pm 4,97$	$45,17 \pm 7,44^*$	$35,5 \pm 8,24$	$52,67 \pm 10,48^*$
<i>CD 8</i>	$27,33 \pm 3,98$	$30,5 \pm 16,37$	$29,5 \pm 7,92$	$35,83 \pm 5,34^*$
<i>CD 72</i>	$14,0 \pm 4,2$	$11,5 \pm 3,21$	$13,17 \pm 3,87$	$7,33 \pm 3,2^*$
<i>HLA-DR</i>	$25,83 \pm 5,71$	$44,5 \pm 4,23^*$	$18,33 \pm 3,61$	$35,33 \pm 2,58^*$

Експресія антигенної детермінанти *CD4* вірогідно підвищувалась від $32,67 \pm 4,97$ до $45,17 \pm 7,44\%$ (максимальна доза ПКН) та $52,67 \pm 10,48\%$ (мінімальна доза ПКН). Використання мінімальної дози ПКН супроводжувалось вірогідним збільшенням формування кластерів мембранних рецепторів *CD4* від $14,0 \pm 3,52$ до $35,5 \pm 8,36\%$. Додавання середньої дози ПКН характеризувалось вірогідним збільшенням кількості кепів від $7,0 \pm 3,22$ до $15,0 \pm 4,38\%$.

Показники експресії *CD8* мали тенденцію до зростання в усіх дозах, вірогідний результат був отриманий при додаванні мінімальної дози ПКН – від $27,33 \pm 3,98$ до $35,83 \pm 5,34\%$.

Інкубація ПКН з лімфоцитами, на яких досліджували антигенну детермінанту *CD72*, навпаки, призвела до зниження рівня експресії, вірогідні дані отримані при використанні мінімальної дози ПКН – від $14,0 \pm 4,2$ до $7,33 \pm 3,2\%$. Додавання середньої дози ПКН супроводжувалося вірогідним зменшенням кількості сформованих кепів від $4,0 \pm 2,83$ до $1,0 \pm 1,26\%$.

Експресія детермінанти *HLA-DR* вірогідно підвищувалась при додаванні максимальної та мінімальної доз ПКН – від $25,83 \pm 5,71$ до $44,5 \pm 4,23\%$ та $35,33 \pm 2,58\%$ відповідно. При використанні максимальної дози ПКН вірогідно збільшувалася кількість утворених кластерів від $5,17 \pm 3,54$ до $13,5 \pm 2,74\%$.

Згідно з результатами, інкубація лімфоцитів із ПКН протягом доби спричинила вірогідне підвищення рівня експресії *CD3* (максимальна та середня дози), *CD4* (максимальна та мінімальна дози), *CD8* (мінімальна доза) та *HLA-DR* (максимальна та мінімальна дози). Експресія *CD72* при мінімальній дозі ПКН зменшувалась.

Простежимо за зміною показників у динаміці – у першій та другій серіях. Загальна тенденція в першій серії дослідів – підвищення експресії

CD3 при максимальній та мінімальній дозах; *CD4* та *CD8* – при середній та мінімальній дозах; зниження експресії *CD72* практично за всіх досліджених доз та посилення експресії *HLA-DR* при максимальній та середній дозах ПКН.

Якщо порівняти таку тенденцію змін з показниками 24-годинної інкубації, то стає зрозумілим, що загальний напрям впливу не тільки зберігається, а й стає більш виразним. Стимуляція експресії рецепторів сягає максимального значення при використанні для молекул *CD3* ПКН у максимальній та середній дозах, для *CD4* – у максимальній та мінімальній дозах, для *CD8* – у мінімальній дозі, для антигенних детермінант *HLA-DR* – у максимальній та мінімальній дозах. Для молекул *CD72* зберігається напрям у бік зниження рівня експресії, який більш помітний при додаванні ПКН у мінімальній дозі.

Сприйняття клітиною активуючих сигналів призводить до процесів, які розпочинаються в перші секунди та хвилини, зокрема це зміна потоку одновалентних катіонів Na^+ та K^+ , раніше трансметилювання ліпідів, активація фосфоліпази A_2 , посилення потоку Ca^{2+} в клітину, зміна концентрації циклічних нуклеотидів [7]. Процеси, що відбуваються під час інкубації лімфоцитів з пептидними речовинами протягом 30 та 60 хв, можна вважати швидкими сигнальними явищами, коли ще не задіяний геном клітини, та підвищення експресії антигенних детермінант можна пояснити як вихід на поверхню мембрани раніше занурених у її товщу рецепторів або доставку готових рецепторних структур на поверхню (суто мембранний рівень впливу).

Через 2–3 год після стимуляції поступово збільшується швидкість синтезу білка, яка стає максимальною за 48...72 год, що збігається з періодом найбільш швидкого клітинного ділення [7]. Причиною пришвидшення синтезу білка в перші 3 год вважають підвищену активність факторів ініціації, що може пояснити швидке включення передіснуючих матричних РНК (мРНК) в полірибосоми [7]. У процесі імунної відповіді протягом 30...180 хв після зв'язування МНС-білків *T*-клітин транскрипційний фактор *Stat3* транслокується до ядра та зв'язує ДНК [16] й активується ядерний фактор *NFκB* [17]. Пришвидшується синтез РНК, поліамінів, відбуваються зміни в метаболізмі вуглеводів та бласттрансформація лімфоцитів. Взагалі, найменша зміна функціонального стану клітини супроводжується зміною білкового синтезу.

Цілком вірогідно, що ПКН впливає не тільки на утворення та транспорт на поверхню мембрани рецепторних структур, а й на синтез молекул рецепторів, діючи на рівні геному клітини, зокрема, впливаючи на експресію окремих генів, що вже визначено для пептидів вілону та епіталону [6, 14, 15]. Ми вважаємо, що специфічна імунорегуляторна дія ПКН, яка виявляється в зміні експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів та, відповідно, їх функціональної активності, реалізується як на ранніх етапах сприйняття клітиною активуючого сигналу завдяки мобілізації вже наявних рецепторних структур, так і на більш віддалених етапах, які включають механізми синтезу та транспортування на поверхню мембрани молекул рецепторів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. А.с. 10180А Україна, МКІ 5 А 61 К 37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію / І.П. Кайдашев, О.В. Катрушов // Пром. власність. – 1996. – № 3. – С. 3.1.76–3.1.77.
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. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лимфоцитов // Иммунология. – 1998. – № 4. – С. 13–16.
4. 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.
5. Восстановление поверхностных рецепторов лимфоцитов под действием пептидных комплексов почек и тимуса (тималина) после обработки метотрексатом / Л.Э. Веснина, Н.Л. Куценко, И.П. Кайдашев, И.Н. Звягольская // Пробл. екології та медицини. – 2001. – Т. 5, № 1–2. – С. 33–37.
6. Изучение действия пептидов вилона и эпیتالона на экспрессию генов в сердце мышцы с помощью технологии на основе микрочипов / С.В. Анисимов, К.Р. Бохелер, В.Х. Хавинсон, В.Н. Анисимов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 3. – С. 340–347.
7. Иммунология: В 3 т. / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987–1988. – Т.1. – 1987. – 476 с.
8. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. – СПб.: Наука, 1998. – 310 с.
9. Лимфоциты: Методы / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 392 с.
10. Пат. 53122А Україна, 7 А 61 К 35/23. Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів / Л.Э. Веснина, І.П. Кайдашев. – № 2002032132; Заявл. 18.03.02; Опубл. 15.01.03, Бюл. № 1.
11. Роль протеинкиназы С в механизме действия регуляторных пептидов / Л.Э.Веснина, И.П. Кайдашев, О.А. Ножинова и др. // Пробл. екології та медицини. – 1999. – Т. 3, № 5. – С. 50–54.
12. Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы клинического применения) / Л.Э. Веснина, А.Л. Гаркович, Н.Н. Грицай и др.; Под общ. ред. И.П. Кайдашева, В.П. Мищенко, В.К. Рыбальченко. – К.: Здоровья, 2003. – 392 с.
13. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Аймарин И.П. Пептидергическая регуляция гомеостаза // Успехи соврем. биологии. – 2002. – Т. 122, № 2. – С. 190–203.
14. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Чернова А.А. Влияние регуляторных пептидов на транскрипцию генов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 9. – С. 328–330.
15. Экспрессия аргирофильных белков областей ядрышковых организаторов в тимocyтах и эпителиальных клетках тимуса человека в условиях совместного культивирования при действии пептидов вилона и эпیتالона / Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Е.А. Смирнова и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 6. – С. 667–670.
16. Skov S., Klausen P., Claesson M.H. Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity // J. Cell Biol. – 1997. – V. 139. – P. 1523–1531.
17. Turco M.C., Romano M.F., Lamberti A. et al. Induction of nuclear factor kappa B/Rel nuclear activity in human peripheral blood T lymphocytes by anti-HLA class I monoclonal antibodies // Tissue Antigens. – 1997. – V. 50. – P. 1–7.

Стаття надійшла до редколегії 04.01.05

Определение уровня влияния пептидного комплекса почек на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов

Л.Э. Веснина

Для определения уровня влияния пептидного комплекса почек (ПКН) на экспрессию рецепторов лимфоцитов проведена инкубация в течение 30 и 60 мин и 24 ч. При 30-минутной инкубации лимфоцитов с ПКН

отмечено усиление экспрессии *CD4*, *CD8* и *HLA-DR* при использовании всех доз ПКН, усиление экспрессии *CD3* и *CD72* при максимальной дозе ПКН. При 60-минутной инкубации лимфоцитов с ПКН наблюдались преимущественная стимуляция *CD3*, *CD4*, *CD8* и *HLA-DR*, снижение уровня экспрессии *CD22*. Во время 24-часовой инкубации сохранялось и становилось более выраженным общее направление изменений – стимуляция экспрессии *CD3* (максимальная и средняя дозы ПКН), *CD4* (максимальная и минимальная дозы), *CD8* (минимальная доза), *HLA-DR* (максимальная и минимальная дозы), уменьшение уровня экспрессии *CD72*.

На основании результатов предположено, что иммунорегуляторное воздействие ПКН, которое выражается изменением экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, реализуется на начальных этапах активации клетки путем мобилизации уже существующих молекул рецепторов, а также на отдаленных этапах, включая механизмы синтеза и транспортировки на мембрану рецепторов.

Determination of kidney peptide complex influence level on surface of lymphocyte receptors expression

L. Vesnina

To determine the level of kidney peptide complex influence on the surface of lymphocyte receptors expression incubation, which lasted 30 min, 60 min and 24 hours was performed. Lymphocyte incubation in the course of 30 minutes with kidney peptide complex increased *CD4*, *CD8* and *HLA-DR* expression – when the whole dose was used, *CD3* and *CD72* – when maximal dose was used.

At lymphocyte incubation in course of 60 min with kidney peptide complex mainly *CD3*, *CD4*, *CD8* and *HLA-DR* stimulation was observed, and *CD22*, as well as expression decreasing. Under incubation in the course of 24 hours general changes direction remained same, as well as became more significant, namely *CD3* expression stimulation (maximal and average doses), *CD4* and *HLA-DR* (maximal and minimal doses), *CD8* (minimal dose) and *CD72* expression level decreased.

On the basis of the results received the following hypothesis was presented: the immunoregulative kidney peptide complex influence is expressed by changes of surface lymphocyte receptors expression. Such immunoregulative action is realized both on initial cell activation stages by means of already existing receptors molecules mobilization and on prolonged stages including mechanisms of new receptors synthesis and transport to membrane.