

ПОРІВНЯННЯ ДІЇ ТИМАЛІНУ ТА ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ НИРОК НА ЕКСПРЕСІЮ МЕМБРАННИХ РЕЦЕПТОРІВ ЛІМФОЦИТІВ НА ФОНІ α -ІНТЕРФЕРОНУ

Л.Е.Весніна, І.П.Кайдашев

Українська медична стоматологічна академія

Ключові слова: тималін; пептидний комплекс нирок; α -інтерферон; лімфоцити; рецептори

Досліджено вплив тималіну на експресію мембранних рецепторів лімфоцитів периферійної крові на фоні дії α -ІФН для порівняння з дією пептидного комплексу, отриманого з кіркової речовини нирок (ПКН). Тималін сприяв збільшенню експресії CD3, CD4 та HLA-DR, рівень яких на фоні попередньої обробки α -ІФН був знижений, модулював перегрупування рецепторів. На відміну від тималіну ПКН вірогідно підвищував рівень експресії CD8 та CD72, більш інтенсивно стимулював експресію CD4, менш інтенсивно — CD3. Для ПКН характерно підвищення кількості кепів та петчів, тималін переважно стимулював утворення кластерів. У цілому в серії дослідів з тималіном зберігається загальна тенденція до змін, яка спрямована на відновлення зниженого під дією α -ІФН рівня експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів. Результати, отримані в даному дослідженні, підтримують загальну спрямованість дії тканинних регуляторних пептидів незалежно від їх походження (тималін — пептидний комплекс центрального походження, ПКН — периферичного), які поряд з класичними імунomodуляторами забезпечують взаємозв'язок клітин імунної системи та спеціалізованих клітин паренхіматозних органів. Результати досліджень механізмів дії ПКН дають підставу вважати, що цей препарат є перспективним для подальшого дослідження та використання в якості імунomodулятора.

Одна з найважливіших та актуальних проблем сучасної біології та медицини полягає в дослідженні ролі основних регуляторних пептидів у механізмах регуляції гомеостазу в нормі та патології. Дослідження останніх років свідчать, що головні системи, відповідальні за підтримку сталості внутрішнього середовища — нервова, ендокринна, імунна, мають єдиний механізм хімічної регуляції, ключові ланки якого — синтез та секреція клітинних медіаторів: пептидних гормонів і цитокінів [15].

Цитокіни, які продукуються переважно активованими клітинами імунної системи та частково іншими клітинами, виконують функції медіаторів міжклітинних взаємодій в імунних реакціях, процесах гемопоєзу, розвитку запалення та міжсистемних взаємодіях, визначають певні клітинні проце-

си: виживаємість клітин, їх диференціювання, функціональну активність. До цитокінів відносяться інтерферони — противірусні цитокіни, які взаємодіють з високоафінними рецепторами на поверхні клітини [12]. Через внутрішньоклітинні елементи сигнал передається до ядра, де активуються відповідні гени, під впливом яких в клітинах продукуються білки, що регулюють клітинні процеси [16, 17]. Так, інтерферони пригнічують експресію проонкогенів у пухлинних клітинах, відмінюють дію ростових факторів на пухлинні клітини, пригнічують геномну трансляцію при вірусній реплікації [7]. Цитокіни формують функціональну мережу, де діючи як синергісти або антагоністи, вони індуюють секрецію один одного та модулюють склад поверхневих клітинних рецепторів [7].

В організмі імункомпетентна клітина одночасно стає об'єктом впливу з боку специфічних ендогенних імунomodуляторів (цитокінів) та неспецифічних тканинних регуляторних пептидів, до яких належить пептидний комплекс нирок [10]. Показано, що пептидний комплекс нирок (ПКН), отриманий за оригінальним методом [1], впливає на активність периферичних лімфоцитів крові, модулює відповідь лімфоцитів та спленоцитів на мітогени та ІЛ-2 [10], змінює експресію мембранних рецепторів лімфоцитів [4]. Раніше в дослідженнях імунomodуючої дії ПКН та сполучення його ефектів з ефектами основних ендогенних імунomodуляторів були отримані дані, що ПКН притаманні властивості модулювати рівень експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів, попередньо оброблених ІЛ-2 та гідрокортизоном [5, 6], відновлювати знижену під впливом α -інтерферону (α -ІФН) екс-

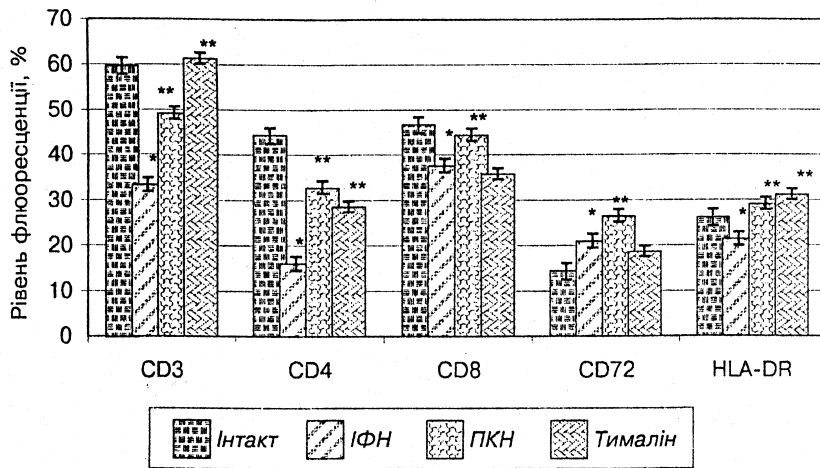


Рис. 1. Вплив тималіну та пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів на фоні дії α -ІФН. Розподіл по групах: інтакт — початковий рівень флюоресценції; ІФН — рівень флюоресценції при додаванні в суспензію лімфоцитів α -ІФН; ПКН — рівень флюоресценції при додаванні в суспензію лімфоцитів пептидного комплексу нирок (0,05 мкг/мл) на фоні дії α -ІФН; тималін — рівень флюоресценції при додаванні в суспензію лімфоцитів тималіну (0,05 мкг/мл).

пресію поверхневих антигенних детермінант [3].

Мета даної роботи — дослідити вплив пептидного комплексу, отриманого з тканин тимусу — тималіну [9], на експресію мембранних рецепторів різних субпопуляцій лімфоцитів периферійної крові на фоні дії (α -ІФН) для порівняння з дією ПКН.

Матеріали та методи

Роботу проведено з використанням розробленого нами способу моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів за допомогою ПКН шляхом реєстрації зміни експресії мембранних рецепторів під впливом пептидів [13]. Пептидний комплекс нирок отримували із кіркової речовини нирок шляхом екстракції тканин нирок органічною галогенвмісною кислотою у присутності іонів цинку. В подальшому пептиди осаджували органічним розчинником з додатковим очищенням шляхом гель-фільтрації для виділення пептидів з молекулярною масою менше 10 кДа [1].

Тималін ("Завод медпрепаратів", Санкт-Петербург) та ПКН додавали до клітин в дозі 0,05 мкг/мл (найбільш ефективна в даній серії) [3]. Ліофілізований лейкоцитарний α -інтерферон для інтраназального використання (актив-

ність 1000 МО/мл, "Біофарма", Київ) додавали в концентрації 100 МО/мл [2].

Суспензію мононуклеарів отримували з периферійної крові здорових донорів, стабілізованої гепарином (25 ОД/мл) центрифугуванням у градієнті густини, фікол-тріомбразт ($\rho=1,077$ г/см³) з наступним відмиванням у фосфатно-сольовому буфері (рН 7,2) [11]. Лімфоцити в кінцевій концентрації $(1-1,5) \cdot 10^6$ /мл культивували у середовищі 199 ("Sigma") з додаванням 10% інактивованої телячої сироватки ("Bio Mark Inc", Львів). Рівень життєздатності клітин у тесті з трипановим синім у середньому становив 95%.

Інкубацію клітин з препаратом α -ІФН проводили протягом 1 год при 37°C. У дослідних пробах потім вводили тималін та ПКН і продовжували інкубацію за тих же умов протягом 1 год. Контроль — фосфатно-сольовий буфер.

Експресію антигенних детермінант лімфоцитів визначали в реакції непрямой імуофлюоресценції за допомогою моноклональних антитіл LT3 (CD3), LT4 (CD4), LT8 (CD8), 3F3 (CD72), LT-DR (HLA-DR) та кон'югованих з ФІТЦ анти-F(ab)₂ — антитіл ("Сорбент", Москва).

Результати оцінювали на люмінесцентному мікроскопі "Лю-

мам Р-8", визначаючи у відсотках кількість клітин з флюоресценцією. Окрім рівня флюоресценції визначали типи перегрупувань рецепторів у площині мембрани у вигляді кластерів (окремі невеликі групи рецепторів), петчів (більш упорядкована форма кластерів) та кепів (перегрупування у вигляді капелюшка) [8]. Морфологічний контроль клітин проводили у фазовому контрасті. Результати оброблені статистично з використанням t-критерію для парно зв'язаних величин (Statistica for Windows 5.0).

Результати та їх обговорення

У попередніх дослідженнях отримані дані стосовно пригнічення рівня експресії антигенних детермінант, переважно Т-клітин при додаванні α -ІФН (рис. 1). Знижувалась не лише загальна кількість клітин, які експресували відповідні рецептори, зменшився також ступінь інтенсивності флюоресценції та розподіл клітин за інтенсивністю світіння, що, на наш погляд, є слідством зниження щільності рецепторів та їх спроможності до руху у площині мембрани [3]. Для В-клітин α -ІФН діяв прямо протилежним чином — кількість CD72⁺-клітин з флюоресценцією збільшувалась, інтенсивніше відбувалось перегрупування рецепторів.

Додавання тималіну до клітин, преінкубованих з α -ІФН, показало наступні результати: кількість клітин, які експресують CD3, вірогідно збільшилась у 1,84 рази (рис. 1), що супроводжувалось збільшенням формування кепів у 2,0 рази, петчів у 2,31 рази, кластерів у 1,55 рази ($p < 0,05$; рис. 2). Експресія антигенних детермінант CD4 під впливом тималіну збільшувалась в 1,79 рази ($p < 0,05$). Перерозподіл рецепторів характеризувався вірогідним збільшенням формування кластерів з $2,0 \pm 2,0$ до $14,4 \pm 3,97$.

Тималін не викликав вірогідних змін експресії антигенних детермінант CD8 та CD72, але спостерігалось вірогідне перегрупування рецепторів — зниження кількості петчів з молекул С8 в 2,7

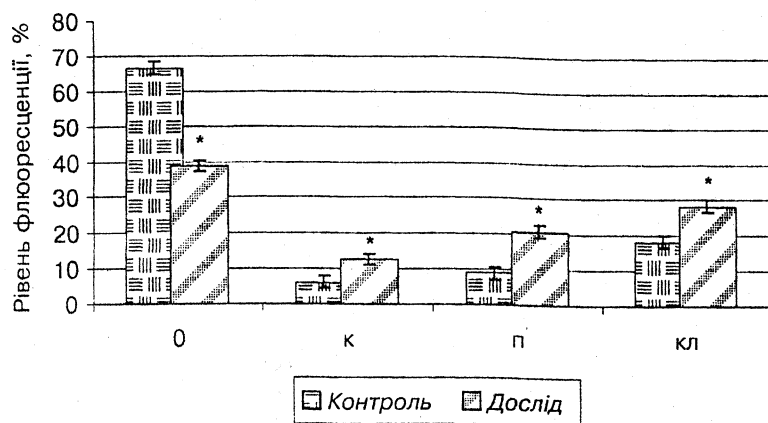


Рис. 2. Мембранна флюоресценція CD3⁺-лімфоцитів при додаванні α -інтерферону і при додаванні тималіну на фоні дії α -інтерферону. Тут та на рис. 3 — досліджені групи: контроль — інкубація з α -інтерфероном (100 МО/мл); дослід — інкубація з тималіном на фоні дії α -інтерферону; 0 — клітини, у яких відсутня флюоресценція; к — кепи; п — петчі; кл — кластери.

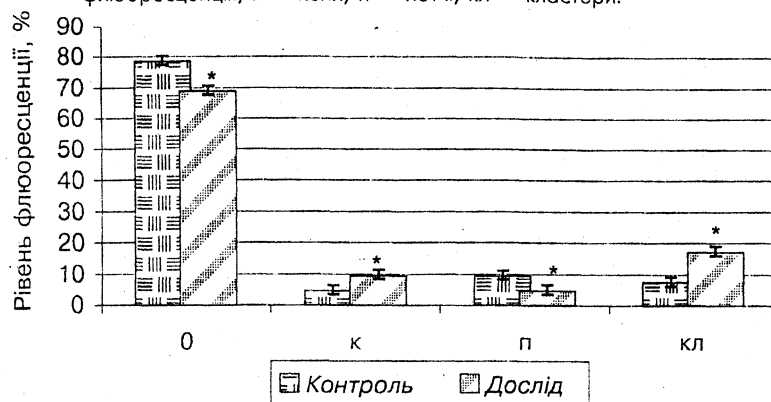


Рис. 3. Мембранна флюоресценція HLA-DR⁺-лімфоцитів при додаванні α -інтерферону і тималіну на фоні дії α -інтерферону

рази, зниження кепів CD72 в 1,55 рази та поява кластерів.

Антигенні детермінанти HLA-DR під впливом тималіну підвищували експресію в 1,46 рази, вірогідно збільшувалась кількість кепів у 2,04 рази та кластерів у 2,32 рази (рис. 3).

Якщо порівняти з дією ПКН вплив на експресію поверхневих антигенних детермінант тималіну, стає помітним, що ПКН, на відміну від тималіну, вірогідно підвищував рівень експресії CD8 в 1,18 рази та CD22 — в 1,26 рази, більш інтенсивно стимулював експресію CD4 та менш інтенсивно — CD3 [3]. Найвні також відмінності в перегрупованні рецепторів — якщо для дії ПКН було характерне підвищення кількості перш за все кепів та петчів, то тималін переважно стимулював утворення кластерів. Слід зауважити, що в серії дослідів з

тималіном зберігається загальна тенденція до змін, спрямована на відновлення зниженого під дією α -ІФН рівня поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів.

Нами було зроблено припущення, що зниження під впливом α -ІФН експресії антигенних маркерів CD3, CD4, CD8, які відносяться до суперродини імуноглобулінів, що надходять на поверхню мембрани із ендосомального компартменту клітини як і молекули ГКГС I класу, пояснюється можливим впливом α -ІФН на етапи біосинтезу та транспортування на мембрану цих рецепторів [3]. Тималін та ПКН сприяли збільшенню загальної кількості клітин, які експресують на мембрані досліджені антигенні детермінанти, впливали на щільність рецепторів окремих клітин, стимулювали рухливість рецепторів у площині мембрани, полегшуючи формування кепів, петчів, кластерів.

Результати попередніх досліджень тонких механізмів дії ПКН дозволили запропонувати мембраноопосередкований механізм дії, який реалізується за рахунок як рецепторних, так, можливо, і нерепеторних механізмів [3]. Ми вважаємо, що і ПКН, і тималін можуть стимулювати появу рецепторів, які до цього були заглиблені в мембрану або можуть впливати на процеси синтезу та транспортування на мембрану нових рецепторних молекул. Мембраноопосередкований механізм імуномодулюючої дії пептидних речовин узгоджується з можливістю змінювати перебіг ранніх етапів активації імунокомпетентних клітин за рахунок вірогідної модуляції активності ключових ферментів сигнальної трансдукції [3]. Не виключений також і прямий вплив пептидних речовин на саму мембрану, коли занурені в ліпідний матрикс молекули регуляторних пептидів отримують можливість взаємодії з експонованими в товщині мембрани сайтами різних білків [14].

Здатність впливати на рецепторний апарат клітини та, відповідно, змінювати функціональний стан клітин є важливим аспектом імуномодулюючої дії пептидних речовин. Результати, отримані у цьому дослідженні, підтримують загальну спрямованість дії тканинних регуляторних пептидів незалежно від їх походження, так, зокрема, це стосується тималіну — пептидного комплексу центрального походження та ПКН — пептидного комплексу периферичного походження.

У цілому пептидні речовини ендogenousного походження поряд із класичними імуномодуляторами забезпечують взаємозв'язок клітин імунної системи та спеціалізованих клітин паренхіматозних органів. Слід зауважити, що тималін вже з успіхом використовується у клінічній практиці як імуномодулюючий препарат, а результати досліджень механізмів дії пептидного комплексу нирок дають підставу вважати, що цей препарат є перспективним для подальшого дослідження та використання в якості імуномодулятора.

ЛІТЕРАТУРА

1. А.с. 10180А Україна. А 61 К 37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію / І.П.Кайдашев, О.В.Катрушов // Промислова власність. — 1996. — №3. — С. 3.1.76-3.1.77.
2. Авдеева Ж.И., Медуницын Н.В., Крылов О.Р. и др. // Иммунол. — 1987. — №4. — С. 82-85.
3. Боброва Н.О., Веснина Л.Е., Кайдашев І.П. та ін. Регуляція активності мембрани та процесів апоптозу лімфоїдних клітин тканинними пептидами / Під ред. І.П.Кайдашева. — Полтава: Полімет, 2004. — 216 с.
4. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. // Иммунол. — 1998. — №4. — С. 13-16.
5. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. // Иммунол. — 1999. — №6. — С. 36-39.
6. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. // Иммунол. — 2000. — №2. — С. 17-21.
7. Ветра Я.Я., Иванова Л.В., Крейле И.Э. // Гематол. и трансфузиол. — 2000. — Т. 45, №4. — С. 45-49.
8. Иммунология: В 3-х т. — Т. 1 / Под ред. У.Пола. — М.: Мир, 1987-1988. — 476 с.
9. Иммунология гормонов тимуса / Под ред. Ю.А.Гриневича, В.Ф.Чеботарева. — К.: Здоров'я, 1989. — 152 с.
10. Кайдашев И.П. // Биополимеры и клетка. — 1995. — Т. 11, №5. — С. 61-74.
11. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж.Клауса. — М.: Мир, 1990. — 392 с.
12. Ляшенко А.А., Уваров В.Ю. // Успехи соврем. биол. — 2001. — Т. 121, №6. — С. 589-603.
13. Пат. 53122А Україна 7 А 61 К 35/23. Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів / Л.Е.Веснина, І.П.Кайдашев №2002032132; Заявл.: 18.03.2002. Опубл.: 15.01.2003. — Бюл. №1.
14. Рыбальченко В.К. // Пробл. физиол. гипоталамуса. — 1987. — Вып. 21. — С. 76-79.
15. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ашмарин И.П. // Успехи соврем. биол. — 2002. — Т. 122, №2. — С. 190-203.
16. Li Y., Batra S., Sassano A. et al. // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280, Is. 11. — P. 10001-10010.
17. Tanabe Y., Nishibori T., Su L. et al. // The J. of Immunol. — 2005. — Vol. 174. — P. 609-613.

Адреса для листування: 36024, м. Полтава,
вул. Шевченка, 23. Тел. (0532) 57-19-78.
Українська медична стоматологічна академія

Надійшла до редакції 29.08.2005 р.