

Таблиця 4. Вплив опромінення на активність ФАС тканин у нащадків 1-го покоління щурів

Показники, що вивчалися	Орган	Статист. показн.	Групи тварин	
			Контрольні	Дослідні
Каталаза (КП) (нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв)	Пародонт	M±m, p	1,34±0,09	1,46±0,1 <0,5
	Слинні залози	M±m, p	4,01±0,33	3,88±0,2 <0,5
	Печінка	M±m, p	20,52±0,48	18,18±0,72 <0,05
	Кишечник	M±m, p	0,39±0,09	0,55±0,03 <0,5
	Шлунок	M±m, p	0,6±0,07	0,72±0,11 <0,5
	Серце	M±m, p	3,83±0,44	2,38±0,42 <0,25
	Нирки	M±m, p	9,07±0,85	17,60±1,8 <0,05
	Селезінка	M±m, p	4,80±0,45	6,30±0,65 <0,01
СОД (У.Од.)	Пародонт	M±m, p	0,67±0,06	0,540,03 <0,001
	Слинні залози	M±m, p	2,19±0,14	1,96±0,18 <0,25
	Печінка	M±m, p	2,43±0,7	3,65±0,13 <0,005
	Кишечник	M±m, p	0,60±0,04	1,24±0,03 <0,05
	Шлунок	M±m, p	0,70±0,08	0,62±0,03 <0,05

## ЛІТЕРАТУРА

1. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині / Під ред. Кайдашева І.П., Соко-

ленко В.М., Катрушова О.В. - Полтава: Вид-во УМСА, 1996, С. 19-43.

2. Руднев М.І. Радіація та її біологічні наслідки // Медичний консультант - 1996, № 1- С. 46.

## Experimental model of investigation of the progeny of rats, who were exposed to radiation

T.A. Kruchko

The purpose of our investigation is developing the experimental model of situation of irradiation of rats before conception with investigation of progeny. The object of investigation - rats of Wistar-line, which were grouped in the following groups: 1 group - the progeny from healthy parents - control group; 2 group - the progeny from irradiated bucks (dose 1Gr) - experimental group; 3 group - crossing of the irradiated bucks (1Gr) and doses (2Gr), they had no progeny, the rats were born unviable. The progeny of rats in the age of 1,5-2 month were investigated for the effect of radiation on the peroxygen oxygenation of lipides, activity of physiological antioxygen system, hemostasis.

The results, wich we have, we will use for our next work, for formulation the tasks and methods of investigation, they may be used for comparison of the results by other investigators and for their future work.

Ministry Public Health of Ukraine

Ukrainian Medical Stomatological Academy

314024, Shevchenko str. 23, Poltava, Ukraine

Матеріал надійшов до редакції 2/III/1998

© Л.Э.Веснина, И.П.Кайдашев, В.Н.Соколенко

УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06

## ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧЕК НА ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ СВЯЗЫВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ

Л.Э.Веснина, И.П.Кайдашев, В.Н.Соколенко

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

В настоящее время большое количество исследований посвящено изучению нового класса биологических регуляторов - регуляторным пептидам (РП). Особый

интерес представляет иммуномодулирующее действие этих соединений. РП, выделенные из иммунокомпетентных клеток, влияют на пролиферацию и дифферен-

цировку Т- и В-клеток, усиливают экспрессию и плотность рецепторов [3], восстанавливают состояние иммунологической толерантности [12,14]. Способность восстанавливать иммунологическую толерантность к тканевым антигенам открыта и для природного пептидного комплекса из коркового вещества почек [2].

Обнаруженные эффекты пептидного комплекса почек вызвали необходимость объяснения механизмов его взаимодействия с иммунокомпетентными клетками. В эксперименте *in vitro* ранее нами было обнаружено усиление экспрессии лимфоцитарных рецепторов CD 3, CD 4, CD 8 и HLA-Dг под влиянием пептидного комплекса почек [1].

Известно, что воздействие на иммунокомпетентную клетку активационных стимулов любой природы - антигенов, митогенов, медиаторов и гормонов иммунной системы приводит к запуску трех внутриклеточных сигналов: увеличению концентрации внутрицитозольного кальция, стимуляции протеникиназы С и протеинтирозин-фосфатаз [8]. По мнению большинства исследователей кальцийзависимый механизм активации иммунокомпетентных клеток является ведущим, обеспечивая ответ на стимуляцию TCR-CD3-рецепторного комплекса [6,9,11], реализацию эффектов тимических гормонов [10] и т.д.

Таким образом, учитывая важность кальцийзависимых механизмов для активации лимфоцитов было необходимым изучить связь между реализацией эффектов природного пептидного комплекса почек и уровнем внеклеточного кальция.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования *in vitro* проводили, используя кровь здоровых доноров, стабилизированную гепарином (25 ЕД/мл). Мононуклеары периферической крови выделяли в градиенте плотности фиколл-триомбраз [7]. Готовили суспензию мононуклеаров с концентрацией клеток  $1-1,5 \cdot 10^6$  в 1 мл в забуференном физиологическом растворе.

В первой серии пробы крови инкубировали при 37°

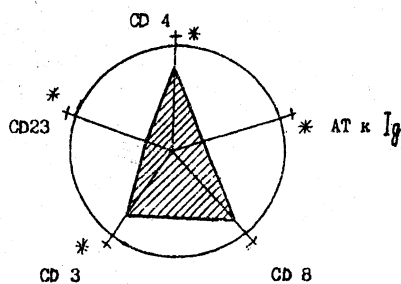


Диаграмма 1.

Изменение уровня экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов при добавлении ЭДТА:

- - при добавлении физиологического раствора /контроль/;
- ▨ - при добавлении ЭДТА в дозе 9,2 мг/мл;

\* - статистически достоверные различия между контрольной и опытной группами.

С в течение 60 минут с этилендиаминотетраацетатом (Serva) в экспериментально подобранных дозах 4,6 мг/мл, 9,2 мг/мл, 92 мг/мл. Во второй серии исследований последовательно инкубировали пробы с этилендиаминотетраацетатом (ЭДТА) в средней дозе 9,2 мг/мл как оплеском коркового вещества почек [5] в дозах 0,05 мкг/мл, 0,12 мкг/мл, 0,5 мкг/мл. В контрольные пробы вместо ЭДТА и пептидного комплекса добавляли физиологический раствор в соответствующем объеме (0,1 мл).

Экспрессию мембранных иммуноглобулинов лимфоцитов в реакции прямой иммунофлюоресценции оценивали с помощью поликлональных антител свиньи, конъюгированных с флюоресцеинизотиацианатом (ФИТЦ) (Производства института вакцин и сывороток, Прага, Чехословакия). Неспецифическое связывание устраняли с помощью адсорбции сыворотки на порошке крысиной печени.

Экспрессию CD3, CD4, CD8, CD23 определяли в реакции непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител LT3, LT4, LT8, LT23 (Производства ТОО "Сорбент", Москва, Россия). В качестве вторых антител использовали анти-F(ab)<sub>2</sub> - антитела, меченные ФИТЦ. Регистрацию зеленой флюоресценции ФИТЦ осуществляли на микроскопе "Люмам-Р-8".

По интенсивности флюоресценции выделяли собственную флюоресценцию клеток (отрицательная реакция) и выраженную флюоресценцию (положительная реакция) слабой, средней и сильной степени [4]. Рас-

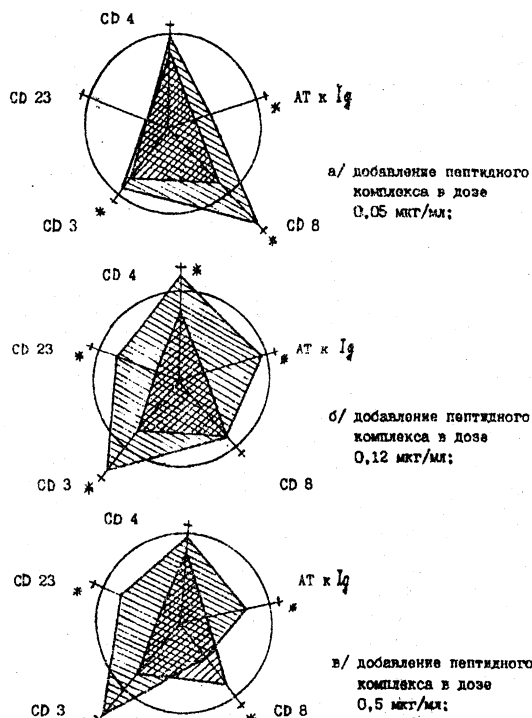


Диаграмма 2.

Изменение уровня экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов при добавлении ЭДТА и пептидного комплекса почек:

- - при добавлении физиологического раствора /контроль/;
- ▨ - при добавлении ЭДТА в дозе 9,2 мг/мл;
- ▩ - при добавлении пептидного комплекса почек.

считывали средний цитохимический коэффициент (СЦК). По характеру флюоресценции выделяли: диффузное свечение всей клетки, диффузную флюоресценцию мембраны, группировку рецепторов в виде экзпов, пэтчей, отдельных кластеров. Морфологический контроль клеток осуществляли в фазовом контрасте.

Результаты исследований обработаны с применением вариационной статистики.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первая серия исследований была проведена для определения величины эффективной дозы ЭДТА, ингибирующей экспрессию мембранных молекул лимфоцитов и изучения влияния сниженного уровня внеклеточного кальция на экспрессию мембранных рецепторов лимфоцитов. Как показали наши исследования, добавление ЭДТА в среду инкубации во всех выбранных дозах (4,6; 9,2 и 92 мг/мл) приводило к дозозависимому снижению уровня экспрессии всех исследованных мембранных маркеров (диагр. 1). Однако, степень снижения экспрессии лимфоцитарных рецепторов при внесении ЭДТА в дозе 92 мг/мл по сравнению с внесением дозы 9,2 мг/мл была менее выражена. Это дало нам основания дальнейшие исследования проводить при использовании ЭДТА в дозе 9,2 мг/мл. Наиболее чувствительной к снижению уровня внеклеточного кальция оказалась экспрессия CD23, иммуноглобулиновых молекул (преимущественно локализованных на В-клетках), экспрессия CD3 и CD4 снижалась достоверно, а CD8 практически не менялась.

Добавление пептидного комплекса почек способствовало увеличению количества клеток с перегруппировкой рецепторов в виде экзпов, пэтчей и кластеров в основном средней и сильной степени флюоресценции для маркеров CD3, CD4 и антител к иммуноглобулинам. Клетки, выявляемые антителами к CD23, усиливали перегруппировку рецепторов в виде экзпов средней степени интенсивности при добавлении пептида в дозе 0,12 и 0,5 мкг/мл. Пептидный комплекс уменьшал количество клеток, формирующих на мембране кластеры средней степени интенсивности.

Наряду с уменьшением числа клеток, несущих дифференцировочные маркеры, отмечалось изменение характера флюоресценции под влиянием снижения уровня внеклеточного кальция (внесение ЭДТА в среду).

Происходило смещение характера флюоресценции CD4 и иммуноглобулиновых молекул в сторону увеличения выраженной кластеризации, CD8 - наоборот. Молекулы CD23 не претерпевали перегруппировки. В то же время CD3 резко уменьшали степень кластеризации.

Во второй серии исследований изучали влияние природного пептидного комплекса почек на экспрессию мембранных молекул лимфоцитов в условиях блокады поступления в клетку внеклеточного кальция.

Инкубация лимфоцитов с природным пептидным комплексом почек приводила к увеличению экспрессии иммуноглобулиновых молекул, CD4, сниженные вследствие преинкубации лимфоцитов с ЭДТА (диагр. 2).

Восстановление экспрессии CD3 и CD23 носило четкий дозозависимый характер, причем экспрессия CD3 при воздействии пептидного комплекса в максимальной дозировке (0,5 мкг/мл) существенно превышала исходное нормальное значение. Обращало на себя внимание действие различных доз пептидного комплекса на экспрессию CD8: если доза 0,05 мкг/мл повышала ее, то внесение пептидного комплекса в дозе 0,5 мкг/мл - достоверно снижало. Усиление экспрессии CD4 и иммуноглобулиновых молекул не имело четко выраженной дозозависимости.

Характер флюоресценции изменялся разнонаправленно. Так, было отмечено снижение количества клеток с перегруппировкой рецепторов в виде экзпов и пэтчей различной степени флюоресценции CD3, CD4, CD8 и иммуноглобулиновых молекул, на фоне увеличения количества кластеров сильной и средней степени флюоресценции CD4 и CD8.

Известно, что повышение уровня свободного внутриклеточного кальция обеспечивается не путем подавления активного выноса кальция из клетки, а за счет его вхождения извне через потенциалнезависимые каналы или мобилизации связанного эндогенного кальция. Показано, что при стимуляции В-клеток антииммуноглобулиновыми антителами, связывание внеклеточного кальция и блокада поступления кальция из внутриклеточных депо полностью подавляли увеличение уровня свободного кальция [15]. Связывание внеклеточного кальция ЭДТА и его производными в низких дозах полностью ингибировало повышение экспрессии антигенов ГКГС II класса [13], подавляло экспрессию рецепторов к ИЛ-2 и инсулину, экспрессию гена с-шус и синтез ДНК [10].

Согласно результатам наших исследований, связывание внеклеточных ионов кальция с помощью ЭДТА приводило к снижению уровня экспрессии рецепторов лимфоцитов. Причем наиболее чувствительными к снижению внеклеточного кальция оказались В-клетки, несущие на своей поверхности молекулы иммуноглобулинов и CD23 (рецептор к Ig E). Наблюдаемое нами снижение интенсивности флюоресценции, вероятно, обеспечивалось перераспределением внутриклеточных запасов кальция с уменьшением группировок рецепторов в виде экзпов и пэтчей. Добавление пептидного комплекса коркового вещества почек в среду инкубации способствовало восстановлению исходного уровня экспрессии иммуноглобулиновых молекул, CD3, CD4 и даже ее увеличение (при использовании доз пептидного комплекса 0,12 и 0,5 мкг/мл).

Полученные данные дают возможность предположить, что природный пептидный комплекс почек воздействует на клетку, повышая уровень экспрессии мембранных маркеров.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что связывание внеклеточного кальция путем внесения в инкубационную среду ЭДТА приводит к снижению функциональной активности лимфоцитов, причем наиболее чувствительными являются В-клетки. Эти данные свидетельствуют о важности нормального

вхождення внесклеточних іонів кальція в клітку для активації лімфоцитів.

Действие природного пептидного комплекса почек приводит к усилению экспрессии поверхностных молекул лимфоцитов, блокированной предшествующим связыванием внесклеточного кальция ЭДТА. Следовательно, реализация эффектов пептидного комплекса на уровень экспрессии поверхностных мембранных молекул лимфоцитов не связана с процессами интернализации внесклеточных ионов кальция.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Участь пептидного комплексу нирок в регуляції експресії деяких рецепторів імунітетів / "Фізіологія та патологія імунітету, гемостазу та перекисного окислення ліпідів": Зб. наук. праць.- Полтава, 1997.- С. 54-60.
2. Кайдашев І.П. Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите // Физиол. журн. 1993.- 39, N 5-6.- С. 52-56.
3. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем - цитомины // Усп. совр. биологии.- 1983.- 96. N 6.- С. 339-352.
4. Современные проблемы ревматологии: Науч. обзор / Под ред. В.А.Насоновой.- М., 1974.
5. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію / А. с. N 94052069.
6. Bismuth Georges, Trautmann Alain, Debre Patrice. Calcium et activation lymphocytaire T // M/S: Med. sci.- 1990.- 6, N 8.- С. 762-769.

7. Boyum A. // Scan.J.Clin.Lab. Invest.- 1968.- 21. - Suppl.- 97.- p.77.
8. Cantrell D.A. Signal transduction // Res.Immunol. - 1990.- 141, N 8.- C.795-796.
9. 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.- C. 917-922.
10. Jy W., Fregien N., Bourguignon G.J., Bourguignon Lilly Y.W. Role of Ca in the regulation of hormone receptor exposure during lymphocyte activation // Biochim. et biophys. acta. Biomembranes.- 1989.- 983, N 2.- C. 153-160.
11. Kay John E. Mechanisms of T lymphocyte activation // Immunol. Lett.- 1991.- 29, N 1-2.- C.51-54.
12. Nadel J.A. Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation in airways // Allergologie.- 1989.- 12, Sondernum.- P. 136-138.
13. Mizuguchi Junichiro, Beaven Michael A., Ohara Junichi, Paul William E. BSF-1 action on resting B cells does not require elevation of inositol phospholipid metabolism or increased [Ca] // J.Immunol.- 1986.- 137, N 7.- C. 2215-2219.
14. Schild H., Rotzschke O., Kalbacher H., Rammensee H.-G. Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation // Science.- 1990.- 247, N 4950.- P. 1587-1589.
15. Wilson H.A., Greenblatt D., Taylor C.W., Putney J.W., Tsien R.Y., Finkelman F.D., Chused T.M. The B-lymphocyte calcium response to anti-Ig is diminished by membrane immunoglobulin cross-linkage to the Fc receptor // J. Immunol. - 1987.- 138, N 6.- P. 1712-1718.

## THE INFLUENCE OF KIDNEYS PEPTIDE COMPLEX ON THE EXPRESSION OF THE SURFACE RECEPTORS OF LYMPHOCYTES IN THE CONDITIONS OF THE BLOKADE OF EXTRACELLULAR CALCIUM

L.E.Vesnina, I.P.Kaidashev, V.N.Sokolenko

We have studied the connection between the natural peptide complex of the kidneys cortex realization effects on the expression of the membrane markers of the lymphocytes and the extracellular calcium level.

There was determined a dosis-dependent decrease in the level of the CD3, CD4, CD8, CD23 and surface immunoglobulins in the presence of extracellular calcium binding by ethylendiaminetetraacetate (EDTA), the regrouping decrease of the receptors in the form of caps and patches. The B-cells carrying the immunoglobulin molecules and CD23 (Ig E-receptor) there was a most sensitive for decrease of extracellular calcium. The addition of the kidneys cortex peptide complex to the incubation medium promoted the restoration of the initial immunoglobulin molecules, CD3, CD4 expression level and even assisted to the its increase (using the dosed peptide complex 0,12 and 0,5 mkg/ml).

The natural kidneys peptide complex intensified the lymphocyte surface molecules expression, blocked by the preceded calcium binding by the EDTA. Consequently, the realization of the effects of the kidneys peptide complex on the lymphocyte surface membrane molecules is not connected with the entrance of extracellular Ca.

Ukrainian Medical Stomatological Academy  
Ukrainian Ministry of Health Publis Service  
314024 Poltava, Shevchenko Str. 23

Матеріал надійшов до редакції 20/IV/1998