

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧЕК НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ α -ИНТЕРФЕРОНА

Веснина Л.Э.

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

Исследования последних лет показали, что отдельному классу биологических регуляторов - регуляторным пептидам присуща способность изменять состояние иммунитета и неспецифической резистентности организма [6]. Иммуномодулирующее действие свойственно не только регуляторным пептидам (РП), выделенным из иммунокомпетентных органов - тимуса, бursы Фабрициуса, селезенки, лимфоцитов [6], но и периферическим пептидам - в частности, полученным из коркового вещества почек [3]. На основании проведенных исследований было сделано предположение о возможном участии пептидного экстракта в процессе взаимодействия Т-клеточного рецептора с его лигандами. Также отмечено структурное сходство между исследуемыми пептидными субстанциями и эндогенными пептидами, выделенными из молекул главного комплекса гистосовместимости [3].

Остается нерешенным вопрос о тонких механизмах взаимодействия регуляторных пептидов с иммунокомпетентными клетками и влияния различных эндогенных иммуномодуляторов, например, лимфокинов, на это взаимодействие.

Интерфероны, относящиеся к семейству лимфокинов, играют важную роль в обеспечении физиологических процессов иммуномодуляции. Помимо широкого спектра неспецифической противовирусной активности, опосредованной через метаболические процессы, включая синтез РНК и белка [14], все препараты интерферонов (α -, β -, и γ -интерфероны) оказывают сильное иммуномодулирующее действие на гуморальные и клеточные реакции иммунитета. Так, интерфероны (ИФН) оказывают ингибирующее влияние на формирование антител *in vitro*, сенсибилизацию к эритроцитам барана и экспрессию реакции гиперчувствительности замедленного типа; усиливают активность естественных киллеров *in vivo* и *in vitro* [4,7].

Кроме того, по мнению Blalock J. B. и Smith E.M. (1980), протеолитическое расщепление интерферона *in vivo* ведет к появлению пептидных гормонов, устанавливая, таким образом, прямую связь между иммунной и эндокринной системами.

В данной работе мы изучили влияние пептидного экстракта, выделенного из коркового вещества почек на

экспрессию мембранных рецепторов лимфоцитов на фоне действия α -интерферона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

В первой серии исследований использовали коммерческий препарат лейкоцитарного α -интерферона для интраназального применения (предприятие "Бакпрепараты", Киев) с активностью 1000 МЕ/мл. Инкубацию проб проводили с последовательными разведениями ИФН (1:1; 1:2; 1:4; 1:10) в течение 60 минут при температуре 37° С. Во второй серии в среду инкубации добавляли пептидный комплекс, полученный из коркового вещества почек по оригинальной методике [8]. Использовали дозы пептидного комплекса 0,05 мкг/мл, 0,12 мкг/мл и 0,5 мкг/мл. В качестве контроля использовали физиологический раствор в соответствующем объеме.

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

Регистрацию зеленой флюоресценции ФИТЦ проводили с помощью микроскопа "Люам Р-8" (ЛОМО, Россия). Результаты оценивали по яркости флюоресценции: собственную флюоресценцию клеток считали отрицательной реакцией (-); выраженную флюоресценцию - положительной реакцией и выражали в баллах (+, ++, +++) [1], рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК). По характеру флюоресценции выделяли: диффузный тип, когда равномерно светилась вся клетка; диффузную флюоресценцию мембраны; группировку рецепторов в виде отдельных кла-

стеров, кэпов и пэтчей; полулунное расположение. Флюоресцентная микроскопия мембранных маркеров сопровождалась морфологическим контролем клеток в фазовом контрасте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что наличие на поверхности большого количества иммуноглобулинов характерно для В-клеток, также допускается, что рецепторы Т-клеток могут нести аллотипические детерминанты, которые, подобно аллотипам иммуноглобулинов, экспрессируются на структурно-различных константных областях, выполняющих различные функции [2]. Вследствие использования поликлональной сыворотки к поверхностным маркерам в виде молекул иммуноглобулинов, по всей видимости, выявляется смешанный пул Т- и В-клеток. Количество клеток с флюоресценцией в контрольной группе составило 43%, наблюдалось незначительное количество клеток с выраженной перегруппировкой рецепторов в виде кэпов, кластеров, пэтчей.

Изменение функциональной активности лимфоцитов определяли по способности экспрессировать на мембране поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы под влиянием индуктора с изменением уровня и характера флюоресценции.

При добавлении в среду инкубации ИФН происходило уменьшение количества клеток с флюоресценцией на 20%, снижение СЦК в два раза (с 0,88 в контроле до 0,42 в пробе с ИФН). Изменялся также характер и интенсивность флюоресценции. Так, практически в три раза уменьшился процент клеток, формирующих на мембране группы рецепторов в виде пэтчей сильной степени флюоресценции, а также клеток, образующих на мембране кластеры (++)).

Изучение разведений ИФН 1:2, 1:4 и 1:10 дало возможность выявить подобную направленность изменений, хотя и менее выраженную. Для всех трех разведений было характерно снижение общего количества клеток с флюоресценцией, СЦК до 0,63; 0,57 и 0,56 соответственно. При добавлении к суспензии лимфоцитов ИФН в разведении 1:10 не было отмечено связывание антител с рецепторами, сопровождающееся сильной степенью флюоресценции. Следует отметить, что практически во всех разведениях значительно снижался процент клеток, образующих пэтчи и формирующих на мембране группы рецепторов в виде отдельных кластеров сильной степени флюоресценции, что, по всей видимости, свидетельствует о подавлении функциональной активности клеток.

Во второй серии исследований совместная инкубация лимфоцитов с пептидным комплексом почек на фоне ИФН приводила к усилению экспрессии иммуноглобулиновых рецепторов. Наиболее высокий подъем уровня свечения был отмечен при использовании пептидного комплекса почек в дозе 0,05 мкг/мл. Общее количество клеток с флюоресценцией возросло на 27% (СЦК соответственно с 0,41 до 0,89). Изменялся и характер флюоресценции - если в результате воздействия ИФН группировка рецепторов в виде кластеров средней степени флюоресценции (++) была минимальной, а

сильной степени флюоресценции (+++) - практически отсутствовала, то добавление пептида в дозе 0,05 мкг/мл увеличивало на 5% и 6% количество клеток с данным видом свечения.

О функциональной активации клеток свидетельствует увеличение более чем в два раза процента клеток, образующих на мембране кэпы и пэтчи (++) под влиянием пептида в дозе 0,05 мкг/мл. Исследование влияния пептидного комплекса почек в дозировках 0,12 и 0,5 мкг/мл также выявило усиление экспрессии иммуноглобулиновых рецепторов на фоне действия интерферона. Общее количество клеток с флюоресценцией возросло соответственно на 12% и 13% (СЦК 0,69 и 0,73). Изменение характера флюоресценции сопровождалось преимущественным увеличением процента клеток, формирующих пэтчи сильной степени флюоресценции.

Результаты исследований показывают, что α -интерферон ингибировал уровень и характер экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов. В целом, механизмы влияния ИФН на иммунную систему сложны и не до конца изучены. Многие из иммуномодулирующих эффектов ИФН обусловлены изменением структуры мембраны и рецепторов клеток, играющих важную роль во взаимодействии клеток при распознавании молекулярных структур, презентации антигенов, при активации и дифференцировке. Под воздействием ИФН происходят изменения поверхностного заряда, цитоскелета, увеличивается концентрация внутримембранных частиц [13], изменяется экспрессия рецепторов для лектинов [13], текучесть мембраны [12]. Под воздействием α и β -ИФН усиливается экспрессия антигенов ГКГС I класса, этот процесс реализуется на посттранскрипционных стадиях синтеза белка и связан с антипролиферативным эффектом [4].

Добавление в среду инкубации пептидного комплекса почек способствовало восстановлению уровня флюоресценции и экспрессии поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов. В предыдущей работе [1] показано, что действие пептидного комплекса направлено преимущественно на рецепторные структуры Т-клеток (CD 3, CD 4, CD 8, HLA-Dr). Так как CD 3 принимает участие в формировании Т-клеточного рецептора (TCR), было предположено, что усиление экспрессии CD 3 сопровождается сходными изменениями состояния TCR [10]. Такие изменения приводят к усилению экспрессии молекул ГКГС на мембране лимфоцитов, что характерно для активированных Т-клеток. Такие изменения были более характерны для CD 4, чем CD 8, что по-видимому, объясняется различным характером взаимодействия пептидов с этими клетками (пептиды представляются Т-хелперам в контексте ГКГС II класса, а Т-супрессорам - ГКГС I класса).

Можно предположить, что в данном случае активационные события касались также преимущественно CD 4-клеток, что сопровождалось усилением уровня экспрессии мембранных рецепторов и степени флюоресценции. Следовательно, пептидный экстракт, выделенный из коркового вещества почек, регулирует функциональное состояние клеток иммунной системы на фоне действия иммуномодулятора интерферона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. Участь пептидного комплексу нирок в регуляції експресії деяких рецепторів імуноцитів /"Фізіологія та патологія імунітету, гемостазу та перекисного окислення ліпідів": Зб. наук. праць.- Полтава, 1997.- С. 54-60.
2. Иммунология: В 3-х т. Т.1 /Под ред. У. Пола.- М.:Мир, 1987-1988.- 476 с.
3. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек //Биополимеры и клетка.- 1995.- Т. 11, N 5.- С. 61-73.
4. Кузнецов В.П. Интерфероны как средство иммуномодуляции //Иммунология.- 1987.- N 4.- С.30-34
5. Лимфоциты. Методы. /Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.392 с.
6. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем - цитокины //Успехи соврем. биологии.- 1983.- 96, N 6.- С. 339-352.
7. Спивак Н.Я., Лисовенко В.Г. Иммуномодулирующие свойства интерферона //ЖМЭИ.- 1982.- N 7.- С. 21-27.
8. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію /А. с. N 94052069, Україна.
9. Blalock J.B., Smith E.M. //Proc. nat. Acad. Sci. (USA).1980.- V. 77.- P. 5972 - 5974.
10. Damjanovich S., Szollosi J., Tron L. Transmembrane signalling in T cells //Immunol. Today.- 1992.- V. 13, N 8.- P. A12-A15.
11. Evavold B.D., Sloan-Lancaster J., Allen P.M. Ticking the TCR: selective T-cell functions stimulated by altered peptide ligands //Immunol. Today.- 1993.- V. 14, N 12.- P. 602-612.
12. Kuhry J.C., Poindron P., Laustriat G.//Ibid.- 1983.- Vol. 110.- P. 88-95.
13. Pfeffer L.M., Wang E., Tamm J.//J. exp. Med.- 1980.- Vol. 152.- P. 469-474.
14. Stewart W.E., Blalock J.E., Burke D.C. et al. //Ibid. - 1980.- Vol. 41.- P. 1017-1018.

Alteration of expression of membrane receptors of lymphocytes under the influence of kidneys peptide complex on the background of α -interferon action

L.E.Vesnina

There was studied the influence of peptide extract of cortical substance of kidneys on expression of superficial immunoglobulin receptors of the lymphocytes on the background of action of endogenous immunomodulator of α -interferon in reaction of the straight immunofluorescin. It was noted that decrease of expression of immunoglobulin lymphocytes receptors took place. This was accompanied by decreasing of the general number of cells with fluorescin 20% when interferon was added. The percentage of cells was decreasing, cells, that form clusters and patches of the strong degree of fluorescin on the membrane. Peptide complex on the background of α -interferon action resulted in the strengthening of the lightening, which was maximally expressed when dose of peptide 0,05 mkg/ml was used. The number of cells with regrouping of receptors in the form caps and patches of the middle degree of fluorescin was two times more.

The strengthening of expression of immunoglobulin receptors under the influence of kidneys peptide complex on the background of interferon action touched probably CD4-cells. The results testify the participation of peptide molecules in the interaction of between specialized parenchymatous cells and immunocytes in participation of immunomodulator.

Ministry Public Health of Ukraine
Ukrainian Medical Stomatological Academy
314024, Shevchenko str. 23, Poltava, Ukraine

Матеріал надійшов до редакції 19/ХІ/1997