

Л.Е. Весніна, І.П. Кайдашев

Вплив пептидного препарату з нирок на рівень експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів за умов пригнічення активності Na^+, K^+ -АТФази

Изучено влияние пептидного комплекса почек на уровень экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов в условиях ингибирования активности Na^+, K^+ -АТФазы. Показано, что предварительная обработка лимфоцитов убаином привела к изменению функциональной активности лимфоцитов – снижению уровня экспрессии поверхностных иммуноглобулинов, антигенных детерминант CD4, CD8, усилению экспрессии CD3. Пептидный комплекс почек оказывал модулирующее действие на поверхностные рецепторы, восстанавливая сниженную экспрессию CD4, CD8, поверхностных иммуноглобулинов и разнонаправленно влияя на экспрессию CD3 и CD72. Пептидный комплекс влиял на перегруппировку рецепторов в плоскости мембраны. Предположено, что пептидный комплекс почек способствует процессам, связанным с реактивацией Na^+, K^+ -АТФазы.

ВСТУП

Нині велика увага приділяється природним біорегуляторам – пептидним комплексам, що утворюються клітинами паренхіматозних органів, функціонують в організмі як передавачі інформації та впливають на велику кількість біохімічних процесів [1, 21].

Багато досліджень, присвячених вивченню біологічної дії низькомолекулярного пептидного комплексу, отриманого з кіркової речовини нирок показали, що за фізіологічних умов він впливає на функціональний стан нирок, зокрема на процеси реабсорції та секреції [13]. Пептидний комплекс нирок (ПКН) виявляв регуляторний вплив на нирки за умов блокади альдостерону: сприяв зниженню реабсорбції натрію та підвищенню екскретуючої фракції калію, стимулював клубочкову фільтрацію [12]. Терапевтичний ефект пептидного комплексу спостерігався при імунних ураженнях нирок у шурів із нефритом Хеймана [10, 21]. Використання методичного підходу в дос-

лідженнях, коли за допомогою індукторів або інгібіторів окремих ланок сигнальних шляхів вивчався механізм дії ПКН, дало змогу отримати дані про те, що ПКН модулює процеси апоптозу лімфоцитів периферичної крові [18] та тимоцитів [19], змінює функціональний стан інтактних Т-клітин [4] і клітин, попередньо оброблених цитокінами [3, 5–7]. Це дало можливість припустити, що ПКН властивий мембраноопосередкований механізм дії. Відомо, що в мембраноопосередкованих ефектах різних гуморальних чинників важливу роль відіграють транспортні іонні ферментні системи. Вже на самих ранніх етапах внаслідок взаємодії імунокомпетентної клітини зі стимулювальним агентом, наприклад антигеном або мітогеном, відбувається швидка зміна потоку одновалентних катіонів Na^+ і K^+ [9]. Необхідні клітині електрохімічний та осмотичний градієнти одновалентних іонів підтримуються завдяки АТФ-залежному трансмембранному переносу Na^+ та K^+ за допомогою α/β -гетеродимерного інтег-

рального білка плазматичних мембран – Na^+ , K^+ -АТФази [2, 14]. Про важливість нормального функціонування останньої свідчить також і той факт, що інгібітор Na^+ , K^+ -АТФази, кардіотонічний глікозид убаїн, є потенційним інгібітором синтезу білка, РНК і ДНК в Т- і В-лімфоцитах. Пригнічення синтезу білка розпочинається протягом однієї години після внесення в суспензію лімфоцитів, а інгібування синтезу РНК і ДНК – за 2 год або пізніше [9]. Додавання убаїну навіть на пізніх стадіях припиняє активацію імунокомпетентних клітин [9]. Цілком можливо, що безперервне функціонування Na^+ , K^+ -АТФази необхідне для підтримки внутрішньоклітинної концентрації Na^+ , K^+ , які потрібні для метаболічних процесів.

Метою нашої роботи було дослідження впливу ПКН на рівень експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів за умов пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові здорових донорів ($n=6$), які виділяли у градієнті густини фіколтриомбразт ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) з наступним відмиванням лімфоцитів у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) при рН 7,2 [16]. Кінцева концентрація клітин у суспензії становила $1-1,5 \cdot 10^6$ в 1 мл.

Використовували пептидний комплекс, отриманий із кіркової речовини нирок за оригінальним методом [23], згідно з яким екстракцію тканин нирок проводили органічною галогенвмісною кислотою при наявності іонів In . Надалі пептиди осаджували органічним розчинником з додатковим очищенням за допомогою гель-фільтрації для виділення пептидів з молекулярною масою меншою ніж 10 кДа. ПКН було використано в дозах 0,5, 0,12 та 0,05 мкг/мл суспензії. Для пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази лімфоцитів використовували

убаїн (“Sigma”, США) в кінцевій концентрації 2 ммоль/л [8].

Інкубацію лімфоцитів із убаїном проводили в середовищі 199 (РАМН, Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів) з додаванням 10%-ї інактивованої телячої сироватки (“Bio Mark”, Львів) протягом 30 хв при 37 °С. Потім у дослідні проби додавали ПКН і продовжували інкубацію за цих умов протягом 1 год. У контрольні проби додавали ФСБ.

Для оцінки рівня експресії поверхневих імуноглобулінів проводили реакцію прямої імунофлюоресценції з використанням антитіл проти мембранних імуноглобулінів А, G, М, кон’югованих з ФІТЦ («Sanofi», Франція). Рівень експресії антигенних детермінант CD3, CD4, CD8, CD72 оцінювали в реакції непрямой імунофлюоресценції за допомогою моноклональних антитіл LT3, LT4, LT8 та 3F3 («Сорбент», Москва) та кон’югованих з ФІТЦ анти-F(ab)2-антитіл.

За допомогою мікроскопа «Люмам Р-8» підраховували кількість клітин, у яких спостерігали наявність флюоресценції та виражали їх у відсотках. За ступенем флюоресценції виділяли негативну (власна флюоресценція клітин) і позитивну реакції, (слабкого, середнього та сильного ступеня світіння) [20]. За характером флюоресценції відмічали дифузний тип світіння, коли рівномірно світилась уся клітина та перегрупування рецепторів у вигляді окремих кепів, кластерів і петчів. Морфологічний контроль клітин проводили за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була в середньому 95–98 %.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми STATISTICA.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Висновок про стан функціональної активності лімфоцитів робили за зміною рівня експресії поверхневих антигенних детермі-

нант клітин. У першій серії експериментів інкубація лімфоцитів з убаїном призвела до вірогідного зниження початкової експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів – на 31,51%, детермінант CD4 – на 42,56 %, CD8 – на 58,19 %, навпаки, відмічено підвищення експресії CD3 на 52,07 %, експресія CD72 практично не змінювалась (рис. 1).

Зміна функціональної активності лімфоцитів виявляється завдяки переміщенням цих рецепторів у площині мембрани. У процесі імунологічного розпізнання та пов'язаної з ним сигналізації є обов'язковим формування імуного синапсу – структурованої зони контакту між клітинами [22]. Необхідним підготовчим етапом для формування імунологічного синапсу є поляризація клітини, яка відбувається за участю актиновмісних компонентів цитоскелета. Перерозподіл мембранних молекул – один із проявів поляризації клітини [22]. Тому, окрім реєстрації рівня експресії поверхневих рецепторів, ми розподіляли клітини за типом їх групувань – кластерів, петчів, кепів. Якщо мембранні білки зшиті за допомогою антитіл, вони збираються в кластери, утворюючи потім на поверхні мембрани дискретні зони неправильної форми – петчі. За декілька хвилин після утворення петчів, вони з'єднуються з актином та міозином на внутрішньому боці мембрани, а згодом мігрують до одного з полюсів клітини, утворюючи кеп кепінг – активний процес, для якого потрібна енергія АТФ і неушкоджені актинові філаменти [9]. При утворенні кеп під ним концентруються скоротливі білки актин і міозин [25, 27].

За даними Пола [9], кепінг, який відбувається за декілька хвилин, дає можливість зробити висновок, що зшиття рецепторів на поверхні мембрани призводить до утворення сигналу, який надходить до клітини. Це дає можливість аналізувати найбільш ранні етапи активації клітини, враховуючи, що порівняно з кепінгом уся програма активації може тривати кілька діб. Спостерігаючи формування на поверхні мембрани різних груп рецепторів, ми, таким чином, можемо робити висновки про такі зміни функціональної активності клітини, як зв'язування з рецептором на поверхні мембрани лімфоцитів відповідного ліганда або зшиття цих рецепторів, чи активації актинових компонентів цитоскелета та послідовне формування окремих кластерів, злиття їх у петчі та перегрупування на один із полюсів клітини у вигляді кепів [9, 22].

У нашому дослідженні було отримано результати щодо впливу убаїну – вірогідне зниження кількості клітин, які формують на мембрані кепи з поверхневих імуноглобулінових молекул з $8,0 \pm 2,37$ до $3,0 \pm 1,41$, кількості CD4⁺-клітин, які утворюють петчі з $14,67 \pm 1,97$ до $2,67 \pm 1,51$ (рис. 2). На

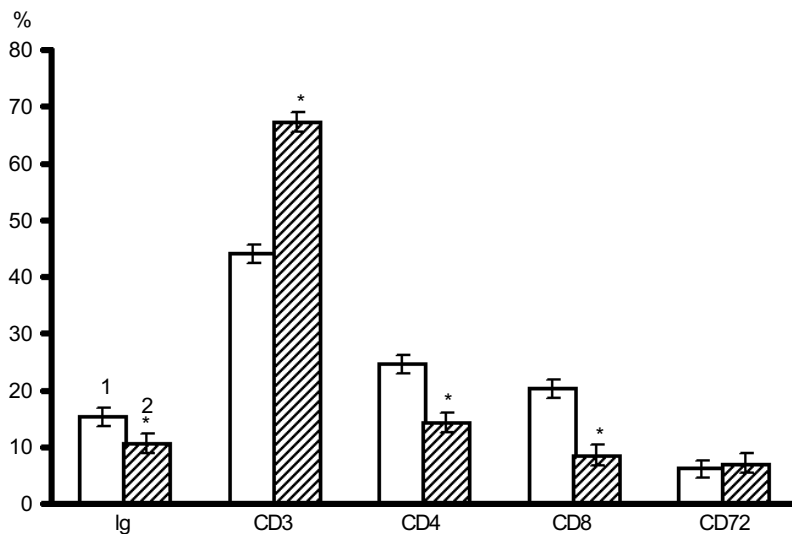


Рис. 1. Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під впливом убаїну: 1 – початковий рівень флюоресценції; 2 – рівень флюоресценції при додаванні в суспензію лімфоцитів убаїну (2 ммоль/л)

мембрані CD8⁺-клітин повністю зникали перегрупування у вигляді кластерів. Різнострамовані зміни спостерігали у CD3⁺-клітин, на мембрані яких вірогідно знижувалася кількість кепів з $9,0 \pm 3,29$ до $7,17 \pm 2,14$ та збільшувалася кількість петчів і кластерів. Незважаючи на те, що кількість експресованих на мембрані молекул CD72 під впливом убаїну вірогідно не змінилася, відбувався їх перерозподіл на мембрані – збільшення клітин з дифузним світінням на поверхні мембрани та зниження – з кепами.

Таким чином, додавання до середовища інкубації лімфоцитів убаїну призводило до зниження рівня функціональної активності клітин, що проявлялось у зниженні експресії поверхневих імуноглобулінів, антигенних детермінант CD4 і CD8, збільшенням експресії CD3 без істотної зміни експресії молекули CD72.

В інших серіях дослідів ПКН додавали до лімфоцитів, які попередньо інкубували з убаїном, у трьох дозах 0,05, 0,12 та 0,5 мкг/мл. Як показали результати досліджень, вірогідне підвищення рівня експресії

поверхневих молекул імуноглобулінів спостерігалось при використанні пептидного комплексу в дозі 0,12 мкг/кг (з $10,5 \pm 3,45$ до $21,17\% \pm 3,76\%$). Експресія антигенної детермінанти CD4 вірогідно збільшилася при використанні пептидного комплексу в дозі 0,5 мкг/мл з $14,17 \pm 3,06$ до $29,5\% \pm 4,28\%$ та в дозі 0,05 мкг/мл – до $24,5\% \pm 3,02\%$. Для клітин, у яких визначали детермінанту CD8 вірогідне збільшення рівня експресії спостерігалось у всіх трьох зазначених дозах пептидного комплексу. Експресія CD72 вірогідно підвищувалася при використанні мінімальної дози ПКН з $7,0 \pm 2,37$ до $11,5\% \pm 3,27\%$. Для CD3⁺-клітин зміни експресії були різнострамовані: додавання до лімфоцитів ПКН у дозі 0,5 мкг/мл викликало вірогідне підвищення експресії з $67,17 \pm 4,31$ до $77,17\% \pm 6,43\%$, додавання мінімальної його дози – зниження до $42,17 \pm 7,05\%$.

У лімфоцитах під дією ПКН змінювалося розташування поверхневих рецепторів у площині мембрани. Вірогідно збільшилася кількість клітин, які утворювали на мембрані петчі з $2,17 \pm 1,60$ до $9,83\% \pm 2,23\%$, та кепи з $3,0 \pm 1,41$ до $8,0\% \pm 2,97\%$ із поверхневих імуноглобулінів (доза ПКН – 0,12 мкг/мл) (рис. 3). Для CD4⁺-клітин було характерним збільшення зниженої кількості петчів з $2,67 \pm 1,51$ до $16,67\% \pm 2,16\%$ (доза ПКН 0,5 мкг/мл) та до $14,17\% \pm 2,48\%$ (доза ПКН 0,05 мкг/мл). Для молекул було характерним відновлення формування кластерів і зниження дифузного світіння мембрани лімфоцитів.

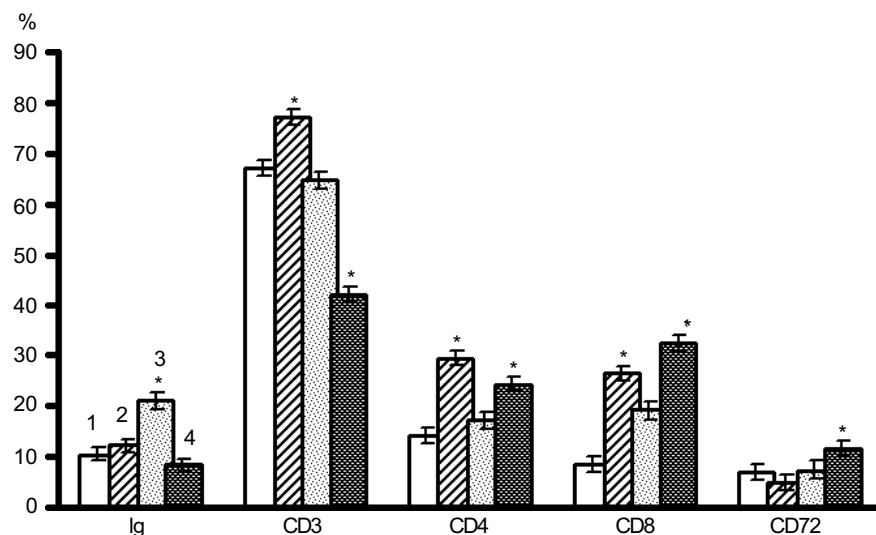


Рис. 2. Вплив пептидного комплексу нирок на експресію поверхневих рецепторів лімфоцитів на фоні дії убаїну: 1 – додавання до суспензії лімфоцитів убаїну; 2, 3, 4 – додавання до суспензії передінкубованих з убаїном лімфоцитів пептидного комплексу в дозах 0,5, 0,12, 0,05 мкг/мл відповідно.

* $P < 0,05$ вірогідність розбіжностей між групою з додаванням убаїну та дослідними групами

У разі застосування ПКН у дозі 0,05 мкг/мл у CD72⁺-клітин відмічено збільшення утворення кепів з $2,0 \pm 1,41$ до $4,0\% \pm 1,67\%$. Зниження флюоресценції CD3⁺-клітин після додавання ПКН в дозі 0,05 мкг/мл супроводжувалося зниженням утворення кластерів з $48,83 \pm 3,05$ до $33,33\% \pm 4,27\%$. При додаванні дози ПКН 0,5 мкг/мл вірогідно знижувалась кількість петчів з $9,17 \pm 1,94$ до $5,17\% \pm 1,6\%$, та збільшувалася – кластерів до $61,33\% \pm 3,72\%$.

Таким чином, ПКН виявив стимулювальний вплив на пригнічений уабаїном функціональний стан клітин, що відобразилося збільшенням рівня експресії молекул CD4, CD8, поверхневих імуноглобулінів і CD72, та різноспрямованій дії на експресію антигенної детермінанти CD3.

Відомо, що Na⁺, K⁺-АТФаза є мішенню дії серцевих глікозидів і містить уабаїнзв'язувальний центр з високою спорідненістю до нього та до інших кардіотонічних стероїдів [2, 11]. Вплив серцевих глікозидів (уабаїну, дигоксину, дигітоксину, цимарену) призводить до стабілізації ферменту в функційно неактивній конформації [2, 14]. Зокрема, уабаїн сприяє зміні просторової структури Na⁺, K⁺-АТФази [17], конформації її цитоплазматичних доменів [24].

Дослідження чутливості Na⁺, K⁺-АТФази до кардіоактивних стероїдів дало змогу сформулювати робочу модель механізму зв'язування нею кардіоактивних стероїдів [26]. Авторами було доведено, що молекула уабаїну зворотно взаємодіє своєю стероїдною частиною з петлею H3–R4 зі швидкістю, яка є однаковою як для чутливих, так і для резистентних до інгібітора форм Na⁺, K⁺-АТФази.

З іншого боку, згідно з даними літератури, одним із аспектів біологічної дії регуляторних пептидів є можливість їхнього впливу на активність Na⁺, K⁺-АТФази, Ca²⁺-АТФази, на зміну фосфоліпідного складу мембран клітин [15]. Також введення ПКН за умов реактивації карбоангідрази після її блокади діакрбом призвело до значного підвищення рівня компенсаторної реакції підвищення реабсорбції натрію. При цьому швидко відновлювався вміст калію в сироватці крові. ПКН виявляв активуючий вплив на карбоангідразу за цих умов [12].

У попередніх дослідженнях на інтактних лімфоцитах інкубація з ПКН виявляла стимуляцію експресії поверхневих рецеп-

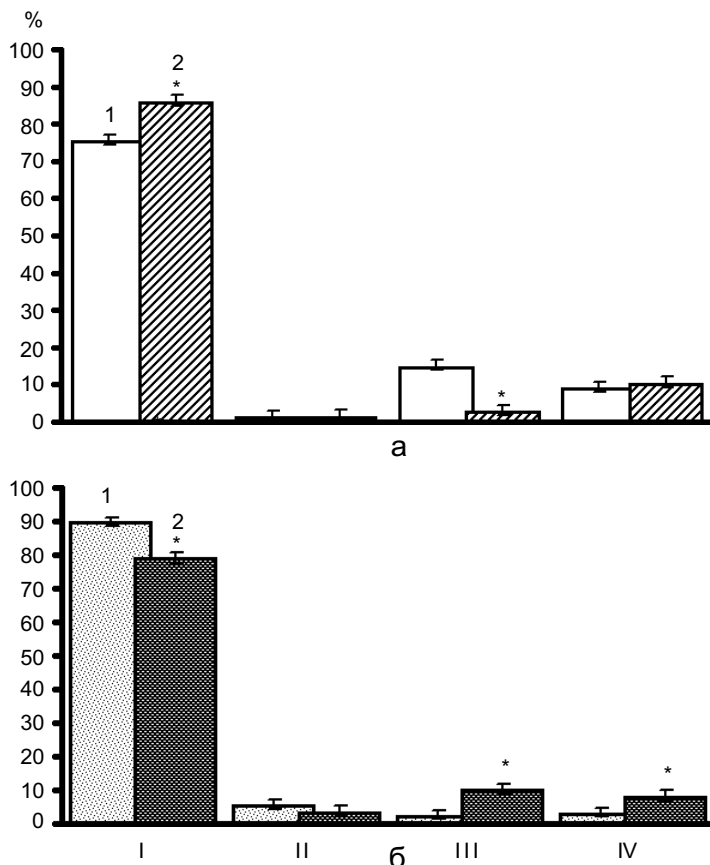


Рис. 3. Мембранна флюоресценція CD4⁺-лімфоцитів (а) та поверхневих імуноглобулінових рецепторів (б) у контролі (1) та при додаванні уабаїну (2): I – клітини, у яких відсутня флюоресценція, II – кепи, III – петчі, IV – кластери.

* P<0,05

торів переважно Т-клітин (CD3, CD4, CD8) та HLA-DR [4]. Ця дія супроводжувалася дозозалежним підсиленням їх експресії та зміною функціонального стану лімфоцитів. Цілком вірогідно, що ПКН може впливати на процеси, пов'язані з реактивацією Na^+ , K^+ -АТФази, сприяючи їм.

За умов пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази ПКН підвищував рівень експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів CD4, CD8, поверхневих імуноглобулінів і CD72 та підсилював утворення рецепторами угруповань у вигляді кепів, кластерів і петчів. Таким чином, фізіологічно активні пептиди, отримані з тканин паренхіматозних органів (зокрема нирок), беруть участь у регуляції функціональної активності клітин імунної системи.

L.E. Vesnina, I.P. Kaidashev

INFLUENCE OF KIDNEY PEPTIDE COMPLEX ON THE EXPRESSION OF SURFACE LYMPHOCYTE RECEPTORS UNDER Na^+ , K^+ -ATPASE INHIBITION

In the work the action of membrane-mediated kidney peptide complex on human peripheral blood lymphocytes was studied under Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition. It was shown that ouabain pretreatment changed the functional activity of lymphocytes: the surface immunoglobulin expression level was decreased, antigene determinants CD4, CD8 expression were reduced, CD3 expression was increased either. The kidney peptide complex had the modulated influence on the surface receptors, improving the decreased CD4, CD8 and surface immunoglobulins expression and differently influencing the CD3 and CD72 expression. It has been proposed that kidney peptide complex facilitates processes of Na^+ , K^+ -ATPase reactivation.

*Ukrainian Medical Stomatological Academy,
Poltava*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беседнова Н.Н. Регуляция иммунных процессов пептидами природного происхождения // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – 44, № 1. – С. 31–35.
2. Болдырев А.А., Мельгунов В.И. Транспортные АТФазаы. Итоги науки и техники. Биофизика. – М.: ВИНТИ, 1985. – 17. – 241 с.
3. Веснина Л.Э. Изменение экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного

- комплекса почек на фоне действия б-интерферона // Проблемы экологии та медицини. – 1997. – 1, № 1–2. – С. 32–34.
4. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лимфоцитов // Иммунология. – 1998. – № 4. – С. 13–16.
 5. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Экспрессия мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия иммуномодуляторов // Там же. – 1999. – № 6. – С. 36–39.
 6. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Особенности воздействия пептидного комплекса почек на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов, обработанных интерлейкином-2 и гидрокортизоном // Там же. – 2000. – № 2. – С. 17–21.
 7. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П., Ножинова О.А. и др. Роль протеинкиназы С в механизме действия регуляторных пептидов // Проблемы экологии та медицини. – 1999. – 3, № 5. – С. 50–54.
 8. Герасев А.Д., Святаш Г.А., Луканина С.Н. и др. Влияние природных цеолитов на функции почек и водно-солевой обмен у крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2003. – 89, № 7. – С. 879–887.
 9. Иммунология: В 3-х т. Т.1 / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987–1988. – 476 с.
 10. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек // Биополимеры и клетка. – 1995. – 11, № 5. – С. 61–73.
 11. Капля А.А., Кравцов А.В. Молекулярные механизмы рецепции сердечных гликозидов Na^+ , K^+ -АТФазой // Успехи соврем. биологии. – 1999. – 119, № 1. – С. 84–94.
 12. Квак О.В. Вплив пептидного комплексу нирок на процеси секреції та реабсорбції в цьому органі: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2001. – 16 с.
 13. Квак О.В., Кайдашев І.П., Бобович О.В. Вплив пептидного комплексу нирок на деякі показники секреції та реабсорбції за умов індукованого діурезу // Фізіол. журн. – 2000. – 46, № 4. – С. 41–44.
 14. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. – К.: Наук. думка, 1990. – 176 с.
 15. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины. 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. – СПб: Наука, 1998. – 310 с.
 16. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 392 с.
 17. Модянов Н.Н., Аристархова Е.А., Кочергинская С.А. // Биол. мембраны. – 1988. – 5, № 4. – С. 341.
 18. Ножинова О.А. Вплив пептидного комплексу тимуса – тималіну та природного пептидного комплексу нирок на процеси апоптозу лімфоцитів периферійної крові за фізіологічних умов та модуляції активності їх внутрішньоклітинних регуляторних систем:

- Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2003. – 18 с.
19. Рябенко В.В., Кайдашев І.П., Ножинова О.А., Губенко І.Я. Вплив регуляторних пептидів тималіну та пептидного комплексу нирок на процеси апоптозу тимоцитів //Імунологія та алергологія. – 1999. – № 3. – С. 46–50.
20. Современные проблемы ревматологии /Под ред. В.А.Насоновой. – М., 1974. – 294 с.
21. Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы клинического применения) / Под общ. ред. Кайдашева И.П., Мищенко В.П., Рыбальченко В.К. – К.: Здоров'я, 2003. – 392 с.
22. Ярилин А.А. Иммунный синапс как структурная основа презентации антигена //Имунология. – 2003. – № 6. – С. 347–350.
23. А.С. 10180А. Україна. МКІ 5 А61 К37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію /Кайдашев І.П., Катрушов О.В. //Промислова власність. – 1996. – № 3. – С. 3.1.76–3.1.77.
24. Kirley T. L., Peng M. Identification of cysteine residues in lamb kidney (Na, K)-ATPase essential for ouabain binding //J. Biol. Chem. – 1991. – 266, №30. – P. 19953.
25. Loor F. Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte functions //Adv. Immunol. – 1980. – 30. – P. 1–120.
26. Price E.M., Lingrel J.B. //Biochemistry. – 1988. – 27, № 22. – P. 8400.
27. Schreier G.F., Unanue E.R. Membrane and cytoplasmic changes in B lymphocytes induced by ligand surface Ig interaction //Adv. Immunol. – 1976. – 24. – P.37–165.

Укр. мед. стомат. академія, Полтава

Матеріал надійшов до редакції 26.02.2004