

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Боброва Н.О.

УДК 616.112:615.36

### ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРНИХ ПЕПТИДНИХ КОМПЛЕКСІВ НА ЕКСПРЕСІЮ ПОВЕРХНЕВИХ ГЛІКОПРОТЕЇДІВ ЛЕЙКОЦИТІВ

Боброва Н.О.

НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ “Українська медична стоматологічна академія”, м. Полтава

*Исследовано влияние регуляторных пептидных комплексов на экспрессию поверхностных гликопротеидов лейкоцитов с углеводным остатком D-маннозой в экспериментах in vitro. Используются пептидные комплексы вермилата и почек в дозах 2,4 мг/л; 12 мг/л; 24 мг/л, а так же пептидные фрагменты гемоглобина в дозах 10 мг/л; 25 мг/л; 50 мг/л. Определение маннозосодержащих мембранных структур (МСМС) лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов проводили с помощью непрямого лектин-пероксидазного метода. Показано достоверное снижение экспрессии МСМС лимфоцитов под влиянием регуляторных пептидных комплексов вермилата и почек в дозе 2,4 мг/л, пептидные фрагменты гемоглобина понижали экспрессию их МСМС в дозах 10 мг/л и 25 мг/л. При изучении влияния регуляторных пептидных комплексов вермилата и почек на полиморфноядерные лейкоциты выявлено снижение экспрессии МСМС в дозах 2,4 мг/л; 12 мг/л, а пептидных фрагментов гемоглобина – в дозах 10 и 25 мг/л. Установлено, что регуляторные пептидные комплексы вермилата и почек, а так же пептидные фрагменты гемоглобина изменяют уровень экспрессии поверхностных гликопротеидов лейкоцитов, что свидетельствует об их регуляторном влиянии на функциональную активность лейкоцитов.*

Ключевые слова: маннозосодержащие структуры, лимфоциты, полиморфноядерные нейтрофилы, регуляторные пептидные комплексы, экспрессия.

#### Вступ

Визначення ролі регуляторних пептидних комплексів у модулюванні функціонального стану клітин імунної системи є одним з актуальних питань фізіології та імунології [2,24]. Дослідження в цій галузі довели, що даним речовинам притаманна здатність впливати на стан імунітету і неспецифічної резистентності організму, вони мають регенеративну дію, багато з них органоспецифічні [7,17,25]. Так, пептидний комплекс, отриманий із кіркової речовини нирок, впливає на проліферацію Т-лімфоцитів [9], посилює експресію та щільність рецепторів на мембранах [11], відновлює стан імунологічної толерантності [5], впливає на активність імуноцитів [8]. Окремі речовини впливають на розвиток гуморальної імунної відповіді, функціональну активність макрофагів та нейтрофілів [12]. Такі регуляторні пептидні комплекси належать до медіаторної ланки системи біорегуляції, беруть участь у регуляції міжгенних взаємодій на рівні популяцій спеціалізованих клітин, впливають на процеси метаболізму тканин [10,18]. Однак механізми впливу регуляторних пептидних комплексів на активність лейкоцитів і пов'язані з ними імунні процеси висвітлені недостатньо і потребують подальшого вивчення.

Відповідно до літературних даних, в реалізації функціональної активності лейкоцитів важливе значення мають поверхневі глікопротеїди лейкоцитів з вуглеводним залишком D-манозою [22]. Вони беруть участь в

активації комплементу, опсонізації мікроорганізмів, у посиленні процесів фагоцитозу [3], функціонують як рецептор до антигену [19,20]. Відомо, що у важких ланцюгах імуноглобулінів з боку С-кінця є залишки манози [16].

Мета: Враховуючи важливість манозомістних мембранных структур (ММС) лейкоцитів у реалізації їх функціональної активності, напрямком наших досліджень стало вивчення впливу регуляторних пептидних комплексів на експресію поверхневих глікопротеїдів лейкоцитів в дослідях in vitro.

#### Матеріали та методи дослідження

Для дослідження впливу пептидергічної системи на експресію поверхневих глікопротеїдів лейкоцитів нами були використані регуляторні пептидні комплекси, які отримані за оригінальним методом [14] у трьох дозах (у діапазоні від мінімальної до максимальної). Було використано пептидний комплекс вермилату, виділений з черв'яків *Eisenia foetida*, та пептидний комплекс нирок (ПKN) [14] у дозах 2,4 мг/л; 12 мг/л; 24 мг/л, а також пептидні фрагменти гемоглобіну (ПФГ), які було отримано після пепсинового дайджесту з наступною очисткою [4] у дозах 10 мг/л; 25 мг/л; 50 мг/л.

Для виявлення ММС лімфоцитів та поліморфноядерних лейкоцитів (ПМЯЛ) ми застосовували непрямий лектин-пероксидазний метод у власній модифікації [15]. Дослідження in vitro проводили з використанням крові донорів різних груп, стабілізованої гепа-

рином ("Reanal"), яку інкубували з досліджуваними речовинами протягом двох годин на предметних скельцях у вологій камері. Прикріплені до скла лейкоцити відмивали від еритроцитів у 0,01 М фосфатному буферному розчині (рН 7,4). На фіксовані препарати з прикріпленими клітинами наносили лектин конканавалін-А (30 мкг/мл), який має вуглеводну специфічність до Д-манози [13, 21, 23] і продовжували інкубацію ще 30 хвилин. В якості маркера конканаваліну-А використовували пероксидазу хрому ("Reanal"). Після інкубації активність пероксидази та відповідно локалізацію пов'язаного з глікокон'югатами конканаваліну-А виявляли у розчині, якій містить 0,05 % 3,3-діамінобензидину тетрагідрохлориду та 0,015% пероксиду водню у 0,01 М фосфатному розчині (рН 7,4). Для диференціації лейкоцитів ядра дофарбовували в 1% розчині сафраніну ("Сметарол", Чехія) протягом 30 секунд. Оцінювали ступінь експресії МММС лімфоцитів та ПМЯЛ за допомогою мікроскопу "Біолам" за наявності коричневих відкладень продуктів окисної полімеризації діамінобензидину у вигляді гранул, розраховуючи середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК). Проводили обчислення середньої арифметичної, її помилки та вірогідність отриманих результатів за критерієм Ст'юдента (t).

СЦК, у.о.

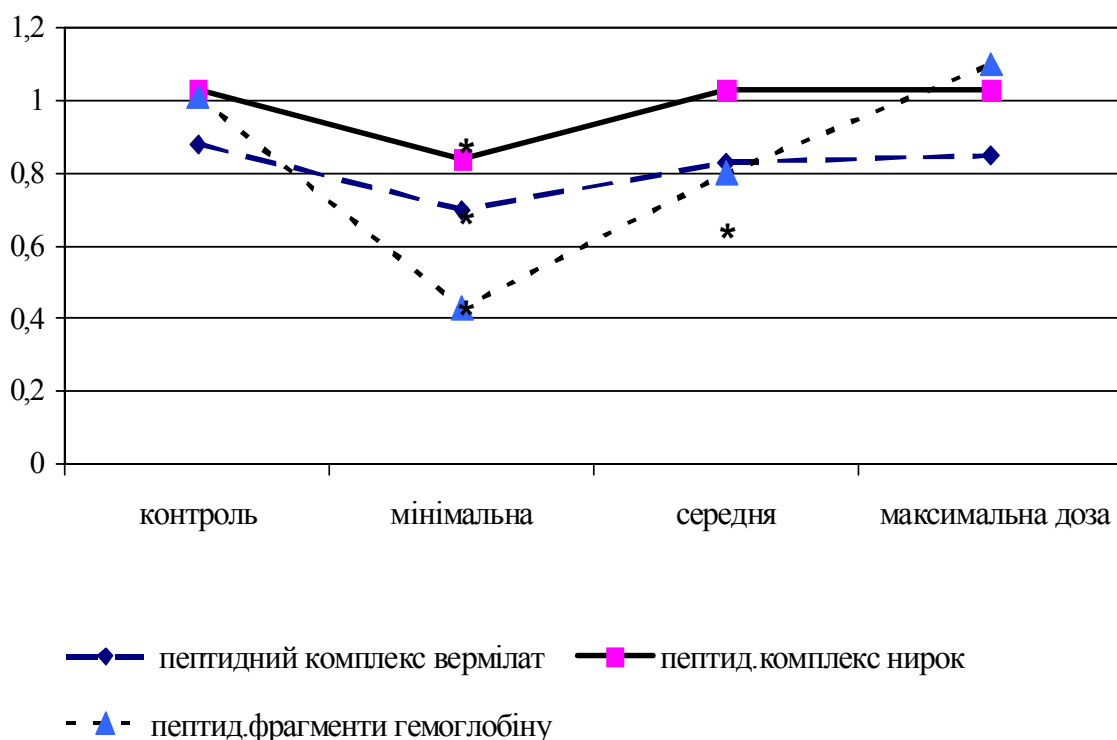


Рис. 1. Вплив пептидного комплексу вермілату, пептидного комплексу нирок та фрагментів гемоглобіну на експресію манозомістних мембранних структур лімфоцитів

Примітка. \* - тут і далі вірогідність відмін показників у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ).

Під час вивчення впливу регуляторних пептидних комплексів на функціональну активність ПМЯЛ нами виявлено, що найбільш ефективними у зниженні експресії МММС були досліджувані речовини в мінімальній та середній дозах.

Так, пептидний комплекс вермілату у дозах 2,4 та 12 мг/л призводив до зниження рівня експресії МММС

### Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження впливу регуляторних пептидних комплексів вермілату, нирок та ПФГ на функціональну активність лімфоцитів показали, що найбільш ефективну дію досліджувані речовини виявили у мінімальній дозі, що призводило до зниження експресії МММС.

Так, пептидний комплекс вермілату у дозі 2,4 мг/л викликав вірогідне зниження ступеня експресії МММС лімфоцитів на 11 % (рис. 1). Середня та максимальна доза практично не впливала на рівень експресії МММС.

Дія ПКН на експресію МММС лімфоцитів не відрізнялась від дії пептидного комплексу вермілату. У мінімальній дозі (2,4 мг/л) ПКН викликав вірогідне зниження рівня експресії МММС лімфоцитів на 18%, а в середній та максимальній дозах (12 та 24 мг/л) експресія МММС залишилась на рівні контролю.

Внесення ПФГ у кров донорів призвело до вірогідного зниження рівня експресії МММС лімфоцитів не тільки у мінімальній, а і у середній дозах (10 та 25 мг/л) відповідно на 57 % та 21%. Максимальна доза (50 мг/л) не вплинула на рівень експресії їх МММС.

на 10 %. Максимальна доза (24 мг/л) не спричинила змін експресії МММС.

Дія ПКН на експресію МММС поліморфноядерних лейкоцитів також не відрізнялась від дії пептидного комплексу вермілату. У дозах 2,4 та 12 мг/л ми спостерігали вірогідне зниження рівня експресії їх МММС відповідно на 13 % та 17%, а в максимальній дозі експресія МММС залишалась без змін.

Дослідження відповіді ПМЯЛ на ПФГ виявило в цілому ідентичну картину. У мінімальній та середній дозах (10 мг/л та 25 мг/л) ПФГ призводили до зниження рівня експресії МММС відповідно на 25 % та 11%. Максимальна доза препарату (50 мг/л) рівень експресії ПМЯЛ не змінила (рис. 2)

Таким чином, дослідження показали, що регуляторні пептидні комплекси вермілату та нирок проявили помірну активність, спрямовану на рівень МММС лімфоцитів. Максимальну пригнічуючу дію на

рівень експресії МММС лімфоцитів виявили ПФГ. Більш виражена дія усіх досліджених регулярних пептидних комплексів була спрямована на рецептори поверхневих глікопротеїдів ПМЯЛ, що супроводжувалось вірогідним зниженням експресії МММС в мінімальній та середній дозах. Зокрема, роботами Запорожець Т.М. [4] було показано подібний пригнічуючий вплив ПФГ в дозах 10 та 25 мг/л на адгезивну активність ПМЯЛ.

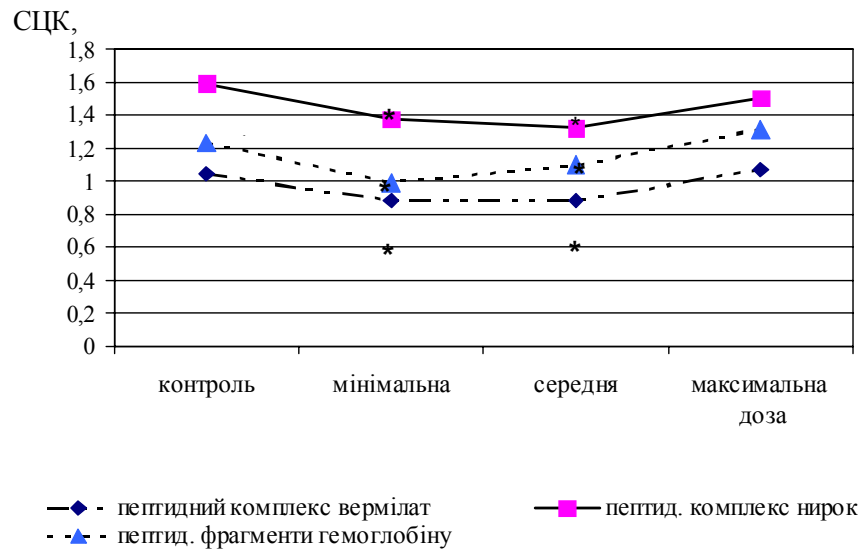


Рис. 2. Вплив пептидного комплексу вермілату, пептидного комплексу нирок та фрагментів гемоглобіну на експресію манозомістних мембранних структур поліморфноядерних лейкоцитів.

Звертає на себе увагу факт, що досліджені РП в максимальних дозах не впливали на експресію МММС лейкоцитів. Це дозволяє припустити, що пептидні комплекси більш специфічно і активно діють у низьких концентраціях. У попередньо проведених дослідженнях були відмічені деякі особливості дозування РП: малі дози дають позитивний ефект у порівнянні з великими [2]. Вплив низьких доз відомі і для розчинних низькомолекулярних антигенів – використання дози 0,1 ммоль/кг через короткі проміжки часу викликає стан толерантності [6].

Результати роботи свідчать, що використані нами РП володіють мембранотропною дією, впливаючи на експресію поверхневих рецепторних структур. На наш погляд можливі декілька механізмів такого впливу за фізіологічних умов. РП здатні взаємодіяти із специфічними рецепторами за посередництвом відповідних месенджерних систем, що призводить до модифікації метаболічних процесів і зміни функціональної активності лімфоцитів та ПМЯЛ. Це, в свою чергу, викликає зміни функційної активності клітинних мембран, що призводить до змін рівня експресії численних рецепторів. Такі зміни реєструються нами у вигляді збільшення або зменшення СЦК під час дослідження МММС лейкоцитів. Не виключений також прямий вплив РП на зміну конформації іонних транспортних систем для кальцію і регуляцію його входу в клітини імуноної системи [1].

Інший сценарій може реалізуватися за умов прямої мембранотропної дії пептидів, коли сам пептид вбудовується в плазматичну мембрану, змінює їх функці-

ональну активність і може функціонувати в якості мембранного каналу [2].

Таким чином, нами встановлено, що вермілат®, пептидний комплекс нирок та пептидні фрагменти гемоглобіну за фізіологічних умов змінюють експресію МММС лейкоцитів, тим самим опосередковуючи свій регуляторний вплив на функціональний стан імунокомпетентних клітин.

### Висновки

1. Регуляторні пептиди вермілат®, пептидний комплекс нирок та пептидні фрагменти гемоглобіну змінюють рівень експресії манозомістних мембранних структур лімфоцитів та ПМЯЛ, що свідчить про їх регуляторний вплив на функціональну активність лейкоцитів.

2. Регуляторні пептиди вермілат®, пептидний комплекс нирок та пептидні фрагменти гемоглобіну у нормі знижують експресію манозомістних мембранних структур лімфоцитів та ПМЯЛ.

### Література

1. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П., Соколенко В.Н. Влияние пептидного комплекса почек на экспрессию поверхностных рецепторов лимфоцитов в условиях связывания внеклеточного кальция // Проблемы екології і медицини. - 1998. – N.1-2. - С.34-37.
2. Веснина Л.Э., Гаркович А.Л., Грицай Н.Н., Запорожець Т.Н. и др. Тканевые регуляторные пептиды: под. ред. И.П. Кайдашева. - Київ: „Здоров’я”, 2003 – 389 с.
3. Драннік Г.Н. Клінічна імунологія та алергологія: Навчальний посібник. – Одеса.: “АстроПринт”, 1999. – 604 с.

4. Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на деякі показники крові та гемостазу *in vitro* // Медицина сьогодні і завтра. – 2002. – № 1. – С.32-34.
5. Кайдашев І.П. Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите // Физиологический журнал, 1993. – Т.39, № 5-6.
6. Кайдашев І.П. Некоторые особенности пептидной регуляции в организме посредством полипептидных регуляторов цитомединов // "Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. - Полтава: Совет молодых ученых и специалистов. - 1993. – С. 73-86 .
7. Кайдашев І.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек // Биополимеры и клетка.-1995.- Т.11, № 5.- С.61-74.
8. Кайдашев І.П. Влияние полипептидного комплекса тканей почек на активность лимфоцитов донорской крови // Иммунология. – 1995. - № 82. – С.31-32.
9. Кайдашев І.П. Влияние отдельных пептидных фракций, выделенных из коркового вещества почек, на пролиферативную активность лейкоцитов // Иммунология. – 1996. - № 3. – С. 30-33.
10. Кайдашев І.П. Нова група біологічних регуляторів багатоклітинних систем – пептиди головного комплексу гістосумісності (огляд літератури і власних досліджень) // Журн. АМН України. – 2000. – Т.6, № 1. – С.26-38.
11. Кайдашев І.П., Весніна Л.Е. Вплив пептидного препарату з нирок на рівень експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів за умов пригнічення активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази // Физиологический журнал.-2004.- Т.50, №6.- С.76-82.
12. Лазарев А.И., Солин А.В., Ляшев Ю.Д. Влияние нейропептида нейротензина на развитие гуморального иммунного ответа, функциональную активность макрофагов и нейтрофилов // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2005. – №2. – С. 39-43.
13. Мирошниченко О.С. Взаимодействие некоторых РНК-аз и манноспецифических лектинов // Укр. биохим. журн. – 2000. – Т. 72, № 1. – С. 51-55.
14. Патент України № 10180 А. Спосіб одержання біологічно-активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію. - Кайдашев І.П., Катрушов О.В.- № 94052069; заяв.30.05.94, опубл.15.05.2001,бюл.№4.
15. Патент 45149 А України. Спосіб оцінки функціонального стану лейкоцитів. - Боброва Н.О., Кайдашев І.П. – № 2001063710; Заявл. 01.06.2001; Опубл.15.03.2002, Бюл.№3.
16. Сыкулев Ю.К., Еролина Т.В. Углеводные компоненты иммуноглобулинов: структура и биологическое значение // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110, № 2. – С. 204-218.
17. Шабанов П.Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры // Психофармакология и биологическая наркология/ – 2008. – Т. 8, Вып. 3-4.- С. 2399-2425.
18. Busch-Dienstfertig M., Stein C. Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain-basic and therapeutic aspects // Brain Behav. Immun. – 2009. - Vol. 24, №5. – P. 683-694.
19. Cella M., Lanzavecchia A. Antigen Targeting to DCs Via the Mannose-receptor // Immunology. - 1995. - P. 97.
20. Cella M., Lanzavecchia A. Role of mannose receptor in antigen presentation by DC // Immunology. – 1996. – P. 84.
21. Dodd B., Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity // Glycobiol. – 2001. - Vol. 11, № 5. - P. 71R-79R.
22. Fernández N, Alonso S, Valera L. Mannose-Containing Molecular Patterns Are Strong Inducers of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E<sub>2</sub> Production in Human Macrophages // The Journal of Immunology. – 2005. – Vol. 174. – P. 8154-8162.
23. Gabius H.-J. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins// Anat.Histol. Embryol. – 2001. - Vol. 30, № 1. - P. 3-31.
24. Helle K.B. Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II: putative modulators of cells and tissues involved in inflammatory conditions // Regul Pept. - 2010 - Vol. 165, №1. – С. 45-51.
25. Peng L.-H., Qin X.Q., Tan Y.R. Influence of intrapulmonary regulatory peptides on the expressions of HLA-DR, CD80 and CD86 in human bronchial epithelial cells// Sheng li xue bao Acta physiologica Sinica. – 2008. – Vol. 60, Issue 6. – P. 723-729.

### Summary

#### INFLUENCE OF REGULATORY PEPTIDE COMPLEXES ON THE EXPRESSION OF SURFACE GLYCOPROTEINS OF LEUKOCYTES

Bobrova N.A.

Key words: mannose-containing structures, lymphocytes, polymorphonuclear neutrophils, regulatory peptide complexes, expression.

The influence of regulatory peptide complexes on the expression of the surface glycoproteins of leukocytes with carbohydrate residue of D-mannose in experiments *in vitro* has been investigated. The vermilate and kidney peptide complexes at doses 2.4 mg / l; 12 mg / l; 24 mg / l, as well as peptide fragments of hemoglobin at doses 10 mg / l; 25 mg / l; 50 mg / l, have been used. The detection of mannose-containing membrane structures (MCMS) of lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes was performed using the indirect lectin-peroxidase method. The significant reduction in expression of MCMS lymphocytes under the influence of regulatory vermilate and kidney peptide complexes at doses of 2.4 mg / l, has been observed; the peptide fragments of hemoglobin reduced the expression of MCMS at doses of 10 mg / l and 25 mg / l. When investigating the effect of regulatory vermilate and kidney peptide complexes on polymorphonuclear leukocytes, the decreased expression of MCMS at doses of 2.4 mg / l; 12 mg / l, and peptide fragments of hemoglobin – at doses of 10 and 25 mg / l, has been detected. It has been determined that the regulatory vermilate and kidney peptide complexes, as well as peptide fragments of hemoglobin, change the expression level of surface glycoproteins of leukocytes which indicates their regulatory effects on the functional activity of leukocytes.

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

*Матеріал надійшов до редакції 29.11.2011 р.*