

И. П. Кайдашев

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕПТИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ, И ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНОГО ЭКСТРАКТА ПОЧЕК

При анализе хроматографических спектров пептидных экстрактов, полученных из паренхиматозных органов (селезенка, почки, печень), эндокринных желез (тимус, поджелудочная железа) и пародонта, обнаружено значительное сходство спектров внутри выделенных групп. Предположительно, синтез исследуемых пептидов связан со специфически для каждого органа или ткани этапами протеолитического процессинга белковых структур.

Исследование аминокислотной последовательности пула фракций пептидного экстракта почек позволило определить структуру пептида-аналога: в 1-й позиции — недетерминированная аминокислота, во 2-й — глутаминовая или аспарагиновая кислота, в 3-й — лизин, в 4-й — аспарагиновая кислота или гистидин, в 5-й — недетерминированная аминокислота, в 6-й — аргинин.

Пептидный экстракт почек был хроматографически разделен на 115—120 фракций. Данные, полученные при изучении КонА-индуцированной пролиферации мышечных спленоцитов, свидетельствуют о том, что пептидные фракции обладают ингибирующими свойствами (до 55%). При изучении ИЛ-2-индуцированной пролиферации линии CTLL отмечено, что более гидрофильные фракции ингибировали, а более гидрофобные — стимулировали пролиферативный ответ, однако четкого дозозависимого эффекта обнаружено не было.

Полученные результаты позволяют предположить существование органной регуляции функций клеток с помощью пептидных молекул, регулирующих пролиферацию и дифференцировку и осуществляющих кооперацию между иммунocyтaми и специализированными паренхиматозными клетками.

Введение. В последнее десятилетие активно изучается группа биологически активных веществ полипептидной природы, выделенных из различных органов и впервые описанных Морозовым и Хавинсоном [1—3]. Эти вещества на основании их биологических эффектов были отнесены к отдельной группе регуляторных полипептидов, впоследствии названных цитомединами. Им присуще выраженное регенераторное, иммуномодулирующее действие, причем выявлена также определенная органоспецифичность [4—8].

На сегодняшний день такие вещества выделены из множества органов и тканей (почки, печень, тимус, эпифиз, пародонт, сердце, эритроциты и т. д.), и обнаружены их выраженные модулирующий, корригирующий эффекты на состояние систем регуляции в пораженном органе и целостном организме. Таким образом, полипептидные экстракты обладают следующей эффекторной направленностью: 1) действие на орган, из которого полипептидные вещества выделены; 2) действие на физиологически коррелирующий орган; 3) неспецифическое действие на организм в целом [9].

Приблизительно в то же время была сформулирована концепция тетиновой системы регуляции функционирования иммунокомпетентных клеток [10], основанная на влиянии продуктов ограниченного протеолиза иммуноглобулинов и других эндогенных иммуномодуляторов. Основные принципы действия этой системы можно сформулировать следующим образом: 1) пептиды и белки синтезируются в клетках сначала в виде неактивных предшественников (пре/прогормонов), из которых структуры действующего биологически активного соединения «выреза-

ются» или «отрезаются» протеолитическими ферментами; 2) поскольку подобные тканевые регуляторы расщепляются киназами в считанные десятки секунд, то их действие в тканях строго локализовано; 3) тетины, образуясь вблизи рецепторов, на которые они действуют, передают информацию непосредственно в клетку или через иммуно- и нейросинапс из одной клетки в другую.

Нами были внесены модификации в методику выделения таких пептидных экстрактов, заключающиеся в использовании более активной галогенсодержащей органической кислоты и введении в условия экстракции, кроме ионов цинка, ионов магния и кальция. Полученные таким способом пептидные экстракты из коркового вещества почек оказались более активными, и их наибольший эффект выявлялся при аутоиммунной патологии почек [11—13]. При этом отмечалось восстановление иммунологической толерантности организма лабораторных животных к смеси тканевых антигенов, что дало основание предположить участие выделенного пептидного экстракта в процессе взаимодействия Т-клеточного рецептора с его лигандами [11].

Сегодня гуморальная природа иммунных реакций организма достаточно хорошо изучена. Регуляция иммунной реакции эндогенными иммуномодуляторами осуществляется во всех ее звеньях: размножение и дифференцировка предшественников иммуноцитов, представление антигена, пролиферация антигенсенсibilизированных лимфоцитов, перераспределение В-лимфоцитов в плазматические клетки, а Т-лимфоцитов и макрофагов — в цитотоксические клетки [14, 15]. Значительный интерес представляет исследование природы и свойств гуморальных факторов, которые служат кооперации между классическими клетками иммунной системы и специализированными паренхиматозными клетками органов (гепатоциты, миокардиоциты, эпителий канальцев почек и т. д.). Именно эти факторы могут отвечать как за нормальное функционирование органов и тканей и течение физиологических репарационных процессов, так и за развитие патологических состояний, в частности аутоиммунной агрессии. Целью предлагаемой работы явилось изучение отличий полипептидных вытяжек из разных тканей для выявления возможных различий в путях протеолиза с последующим углубленным анализом состава и действия отдельных фракций полипептидного экстракта коркового вещества почек.

Материалы и методы. Полипептидные вещества экстрагировали из тканей свиней по следующей методике. Ткани свиней, очищенные от сосудов, фасций и жировой ткани, измельчали на холоду до размера $2 \times 2 \times 2$ мм, после чего их на 12 ч помещали в ацетон при 4°C . Затем ацетон удаляли и ткань высушивали при постоянном перемешивании и комнатной температуре. Высушенную ткань экстрагировали 0,5 %-м раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в присутствии 0,1 % хлорида цинка, 0,1 % хлорида магния и 0,1 % хлорида кальция (соотношение 1 : 8). Экстракцию выполняли в течение 72 ч при 4°C и непрерывном перемешивании. Далее удаляли дисперсный осадок центрифугированием и фильтрованием через мембраны «Millipore» (США) с величиной пор 0,45 мкм. Полученный преципитат отмывали охлажденной смесью эфир : ацетон (1 : 1), растворяли в подкисленной дистиллированной воде (рН 4,5) и центрифугировали через патрон «Centricon-10» Amicon (USA), позволяющий отсепарировать материал с молекулярной массой менее 10 000. Полученный раствор полипептидов лиофилизировали.

Полипептидные экстракты органов разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Использовали систему SMART tm SYSTEM, LKB («Pharmacia», Швеция). Колонка mRPC C2/C18, SC-2.1/100; градиентная подача элюента от 10 до 100 % раствора В в А (раствор А — 0,1 %-й раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ); раствор В — 0,085 %-я ТФУ в 80 %-м ацетонитриле) за 80 мин, детекция при 214 и 280 нм. Аминокислотную последовательность фракций определяли по методу Эдмана на автоматическом секвенаторе 120A «Applied Biosystems» (США). При этом цистеин не модифицировался и поэтому не был детектирован.

Реакцию пролиферации воспроизводили на спленocyтaх мышей BALB/c. В 96-луночный планшет с U-образным дном вносили суспензию спленocyтoв в концентрации $4 \cdot 10^5$ на лунку. Использовали среду RPMI 1640 («GibcoBRL», Шотландия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (С. С. Pro GBH, Германия). Пролиферацию индуцировали добавлением конканавалина А (КонА) до конечной концентра-

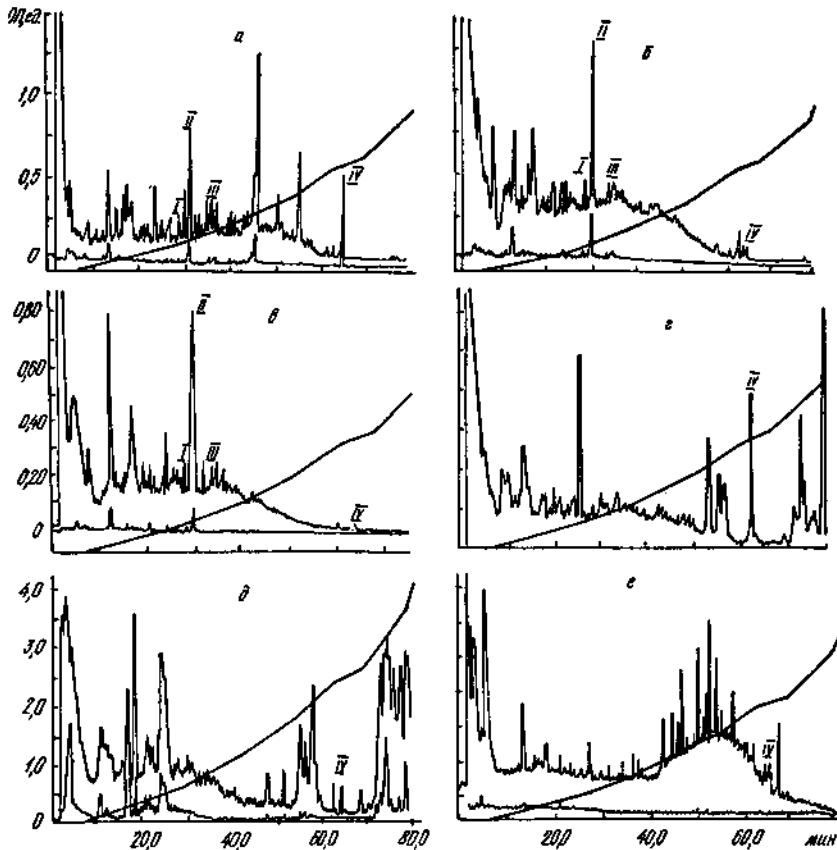


Рис. 1. Хроматографические спектры пептидных экстрактов: а — селезенки; б — почек; в — печени; г — тимуса; д — поджелудочной железы; е — пародонта (по оси абсциссе — время удерживания; по оси ординат — оптическая плотность). I—IV — общие хроматографические фракции

ции 10 мкг/мл. С началом инкубации в лунки вносили исследуемую пептидную фракцию, через 48 ч — 0,5 мКи ^3H -тимидина в объеме 50 мкл. Харвестер осуществляли через 72 ч после начала инкубации в автоматическом режиме на стекловолоконных фильтрах 1450-421 Printer Filtermat А с твердым сцинтиллятором 1450-441 MeltiLex tmA и подсчетом на В-счетчике MicroBeta tm («Wallac Oy», Финляндия).

Кроме того, исследовано влияние отдельных фракций пептидов на интерлейкин-2 (ИЛ-2)-индуцированную пролиферацию линии CTLL (European Collection of Animal Cell Cultures, UK). Для культивирования использовали среду RPMI с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и добавлением 10 % двухсуточного супернатанта КонА-индуцированной суспензии спленocyтoв. ^3H -тимидин и исследуемые фракции вносили по указанной выше схеме. Для изучения дозозависимого эффекта готовили 3-кратные разведения пептидных фракций.

Результаты и обсуждение. Нами были проанализированы хроматографические спектры полипептидных экстрактов, выделенных из следующих органов: паренхимы селезенки, коркового вещества почек, паренхимы печени, паренхимы тимуса, паренхимы поджелудочной железы, ткани пародонта (рис. 1).

Для сравнительного анализа полученные спектры были распределены по группам: паренхиматозные органы (селезенка, почки, печень), эндокринные железы (поджелудочная железа, тимус) и пародонт.

В группе паренхиматозных органов обращает на себя внимание сходство хроматографических спектров печени, почек и в меньшей степени — селезенки. Основная масса вещества сосредоточена в более гидрофильной части хроматограммы со временем выхода до 50 мин, что соответствует элюирующей силе до 30 % раствора В. Характерным является также существование на хроматограммах полипептидных экстрактов органов этой группы пика со временем удерживания около 50 мин и достаточно высокой оптической плотностью при 280 нм. Кроме того, существуют несколько общих пиков со временем удерживания 60—65 мин. Они также обнаруживаются и на хроматограмме полипептидного экстракта тимуса.

Далее была исследована аминокислотная последовательность общих хроматографических фракций для полипептидных экстрактов паренхиматозных органов, обозначенных I, II, III, IV. Методом анализа аминокислотной последовательности по Эдману определены следующие последовательности:

I — GNPVKANGKK; II — LSHGSDQVKANGQK;

III — MGNPVKANGKK; IV — MQIFVKTTLTGKTITLEVEPS,

которые принадлежат ипсилон-цепи гемоглобина свиньи (фрагмент 56—66); альфа-цепи гемоглобина свиньи (48—61), ипсилон-цепи гемоглобина свиньи (55—66) и убиквитину (1—20).

Причем данные фрагменты достаточно консервативны. Для примера можно привести 48—61-фрагмент альфа-цепей гемоглобина:

Мышь VSHGSAQVKGHGKK;

Свинья LSHGSDQVKANGQK;

Бык LSHGSAQVKGHGAQ;

Человек LSHGSAQVKGHGKK.

Интригующим фактом является находка фрагмента ипсилон-цепи гемоглобина, характерного для ранних эмбрионов, в составе пептидов, экстрагированных из тканей коркового вещества почек взрослых животных.

В группе полипептидных экстрактов, полученных из эндокринных желез, прослеживается иная закономерность: достаточно широко представлены более гидрофобные вещества со временем удерживания 50—80 мин, отсутствует выраженный пик фрагментов гемоглобина со временем удерживания 28—35 мин, однако присутствуют фрагменты убиквитина.

При аналитическом сравнении спектров в целом заметна определенная стереотипность. В группе полипептидных экстрактов паренхиматозных органов наблюдаются пики фрагментов гемоглобина, основная масса вещества сосредоточена в более гидрофильной части хроматограммы, которая завершается достаточно гидрофобным 20-аминокислотным N-концевым фрагментом убиквитина. В группе полипептидных экстрактов эндокринных желез отмечено наличие гидрофильной группы полипептидов со временем удерживания до 28 мин, отсутствие выраженных пиков гемоглобина в области 28—35 мин, присутствие пика убиквитина и двух полипептидных достаточно гидрофобных групп со временем удерживания 50—60 и 70—80 мин соответственно.

Интересно, что три фрагмента гемоглобина, обнаруженные в полученных препаратах, в качестве C-концевой аминокислоты имеют остаток лизина. Это может свидетельствовать в пользу того, что данные фрагменты могли быть образованы в результате ограниченного протеолиза молекул гемоглобина, поскольку известно, что расщепление моле-

кул предшественников происходит главным образом в районе локализации основных аминокислот — аргинина и лизина [16, 17].

Для сравнения были проанализированы хроматограммы полипептидного экстракта пародонта — ткани, чрезвычайно богатой соединительнотканскими элементами в отсутствие специализированных паренхиматозных структур. Как следует из представленной хроматограммы, основная масса полипептидных веществ сосредоточена в области со временем удерживания 40—65 мин (20—50 % раствора В). При этом отсутствуют выраженные пики фрагментов гемоглобина и убиквитина.

Таким образом, можно предположить, что каждая группа сходных по морфофункциональным признакам тканей имеет сходную хромото-

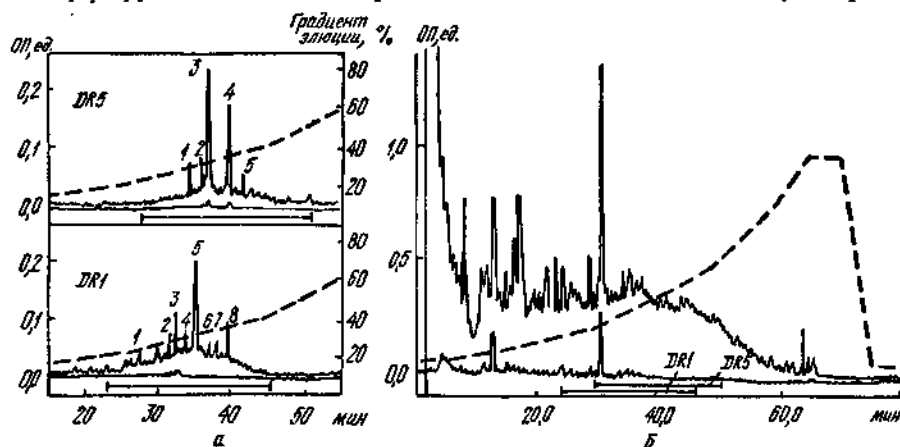


Рис. 2. Хроматографические спектры пептидов: а — элюированных из молекул МНС II класса HLA-DR5 и HLA-DR1; б — экстрагированных из коркового вещества почек (по оси абсцисс — время удерживания; по оси ординат — оптическая плотность)

графическую картину полипептидных экстрактов, полученных из этих органов с помощью описанного метода экстракции.

Скорее всего, это может быть связано со специфическим для каждого органа или ткани этапом протеолитического процессинга белковых структур, который имеет место либо при деградации, либо при посттрансляционной модификации вновь синтезированных белков. По-видимому, такие свойственные каждому органу или ткани полипептидные молекулы, возможно, являющиеся продуктами одного и того же предшественника, могут участвовать как в межклеточном сигнализировании на уровне клеток одной популяции, так и между физиологически коррелирующими органами.

Метод экстракции, использованный в данной работе и заключающийся в обработке ткани сильной галогенсодержащей органической кислотой, имеет много общего с методикой вытеснения эндогенных антигенных пептидов из молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). В 1991 г. Фолк с соавт. [18] описали метод элюции пептидов, связанных с молекулой МНС в кармане Бйоркмана, с помощью 0,1 %-го раствора ТФУ и последующего центрифугирования через патроны «Centricon-10». Такие экстракты затем изучали методом ВЭЖХ с обращенными фазами. Пример хроматограммы эндогенных пептидов, элюированных из молекул МНС II класса — HLA-DR5 и HLA-DR1, приведен на рис. 2 (по данным [18]). Хроматограмма пептидных веществ, полученных нами из коркового вещества почек, представлена для сравнения на том же рисунке. Тот факт, что исследования, выполненные авторами [18] и нами, проведены на одном и том же оборудовании с использованием одних и тех же режимов элюции, позволяет нам сопоставить эти две группы пептидов. Как видно из рисунка, эндогенные пептиды HLA-DR5 элюируются со временем выхода около 28—50 мин, HLA-DR1 — 23—45 мин, т. е. с общим временем 23—50 мин. На хроматограмме пептидов почек в области 23—50 мин также локализуется

значительное количество пептидного материала, причем как в случае пептидов МНС, так и пептидов почек отмечается кривая выхода хроматографического материала в форме «холма». Из этого следует, что пептиды, выделенные из молекул МНС II класса и коркового вещества почек, имеют сходные физико-химические характеристики.

Ранее для определения согласованной последовательности пула фракций в комплексной смеси пептидов, выделенных из молекул МНС I и II классов, был применен оригинальный метод определения аминокислотной последовательности по Эдману [18]. Кратко суть этого подхода заключается в том, что пептиды смеси фиксируются С-концом на твердой матрице и затем с помощью фенилизотиоцианата последовательно с N-конца отщепляются фенилтиогидантоиновые производные аминокислот. Этот метод позволяет не только установить, какие и сколько аминокислот находятся в каждой позиции, но также проследить за изменением концентрации аминокислоты с первой до последней позиции и изменением концентрации аминокислот в каждой позиции.

Данные исследования аминокислотной последовательности пула почечных пептидов представлены в таблице. Основные правила оценки таких данных приведены в работах [18, 19]: в случае отсутствия закономерностей в расположении аминокислоты в том или ином положении пептидов в смеси наблюдается убывание концентрации аминокислоты от первой до последней позиции (как, например, для аланина, фенилаланина, изолейцина и т. д.); в случае, если аминокислота преимущественно занимает одну из позиций, то отмечается нарушение убывания

Результаты изучения последовательности пула фракций пептидного экстракта, выделенного из коркового вещества почек

Позиция	Аминокислота, промоль						
	A	D	E	F	G	H	
1	797,70	413,33	728,03	661,46	858,89	133,72	
2	750,22	575,75	904,19	297,13	579,91	218,25	
3	563,35	482,71	675,89	146,41	651,77	245,89	
4	476,24	531,60	556,21	96,84	538,42	248,22	
5	401,72	478,15	446,13	55,19	410,81	234,24	
6	379,99	396,89	314,38	46,21	339,10	171,74	
7	286,81	286,01	237,49	37,13	271,81	131,76	
8	218,51	186,54	176,55	29,31	239,59	111,73	
9	175,27	128,88	131,60	23,43	185,48	94,32	
10	136,27	93,95	105,30	18,42	161,86	66,53	
	I	K	L	M	N	P	
1	872,23	838,89	130,25	161,00	118,78	96,79	
2	770,56	1010,19	114,34	99,01	196,25	400,46	
3	414,25	1233,63	106,88	89,96	195,06	1095,40	
4	210,02	1158,24	101,59	68,54	161,34	827,16	
5	176,45	986,67	97,67	43,14	120,41	534,46	
6	143,35	803,96	94,78	36,76	99,79	356,51	
7	110,97	680,04	83,52	25,09	80,64	286,95	
8	75,61	463,61	81,14	22,51	52,53	230,66	
9	59,28	372,11	73,90	15,86	37,67	181,84	
10	52,03	271,66	66,95	12,57	29,00	146,38	
	Q	R	S	T	V	W	Y
1	169,61	356,12	257,15	259,67	887,56	89,36	691,52
2	332,90	404,11	204,76	240,65	968,42	56,70	456,68
3	309,94	495,93	120,36	160,58	539,46	43,36	258,63
4	284,93	539,15	101,76	155,13	308,29	32,72	171,34
5	219,79	560,15	94,43	126,79	284,37	21,87	92,75
6	179,15	593,78	74,71	102,71	248,60	17,56	68,34
7	150,80	554,06	61,77	30,00	183,58	12,13	49,33
8	111,30	454,10	45,84	61,30	147,22	9,62	34,03
9	82,66	336,24	38,60	49,67	94,08	7,28	27,37
10	60,00	243,32	29,33	30,00	72,81	5,62	20,19

концентрации этой аминокислоты. Первая позиция сложна для заключения, так как отсутствует предыдущий цикл. Например, аспарагиновая кислота преимущественно встречается во 2-м и 4-м положениях аминокислотной последовательности пептидов, находящихся в смеси, глутаминовая кислота — во 2-позиции. В количественном отношении можно также оценить выделенные аминокислоты, как доминантные, сильные и слабые.

а

Позиция аминокислот в пептиде

	1	2	3	4	5	6	7	8
Доминантные остатки		V E D	K	D		R		
Сильные остатки			G	H				
Слабые остатки	V		P		R			T

б

Позиция аминокислоты в пептиде

	1	2	3	4	5	6	
Поисковая формула:	X	(V, E, D)	(K, G)	(D, H)	X	R	
	X — любая аминокислота						
Белок — источник пептида:							
Аконитаза	(136—142)		GEKDLRR				
Кофилин	(76— 82)		PDKDCRY				
Дестрин	(76— 82)		PEKDCRY				
Про-ТНФ-α	(201—207)		LEKDDRL				
Прогастрин	(98—104)		EEGDQRP				
Прорелаксин	(150—156)		LDKHSRK				
Сорбин	(107—113)		TEKHDRD				
Возможная модель строения пептида-аналога							
	1	2	3	4	5	6	7
	?	E	K	D	?	R	?
	—				—		—
		D		H			

На схеме (а) представлено строение пептидов, выделенных из коркового вещества почек свиней. Доминирующими остатками являются валин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты во 2-й позиции, лизин — в 3-й, аспарагиновая кислота — в 4-й и аргинин — в 6-й позициях. Кроме того, заслуживает обсуждения преимущественное расположение пролина во 2-м и 3-м положениях. Подобные результаты были получены также в работе [19] и расценены как следствие процессинга пептидов, не влияющее на связывание с молекулами МНС. Необходимо принять во внимание и то, что большинство аминокислотидаз (например, дипептидилпептидаза IV и аминокислотидазы N) останавливают расщепление на одном остатке перед пролином, приводя к образованию продукта $XPXXXXXX \dots$. Таким образом, можно предположить участие аминокислотидаз, включая аминокислотидазы с N-концевой специфичностью, в образовании пептидов, выделенных из коркового вещества почек. Можно предположить также, что подобное концевое расположение пролина защищает эпитоп от деградации под действием экзопептидаз.

На основании анализа аминокислотной последовательности пула пептидов была составлена поисковая формула (схема, б) для обнаружения предполагаемой последовательности в составе известных белков свиньи. Для поиска была использована компьютерная база данных последовательностей белков и ДНК Немецкого Центра исследования рака (Гейдельберг). Из 700 белков свиньи было обнаружено семь, содержащих поисковую формулу: аконитаза (фермент цикла Кребса), кофилин и дестрин (актинсвязывающие белки), предшественник опухоленекротического фактора альфа, предшественники гастрин и релаксина, а также сорбин (белок, усиливающий всасывание воды и натрия в кишечнике).

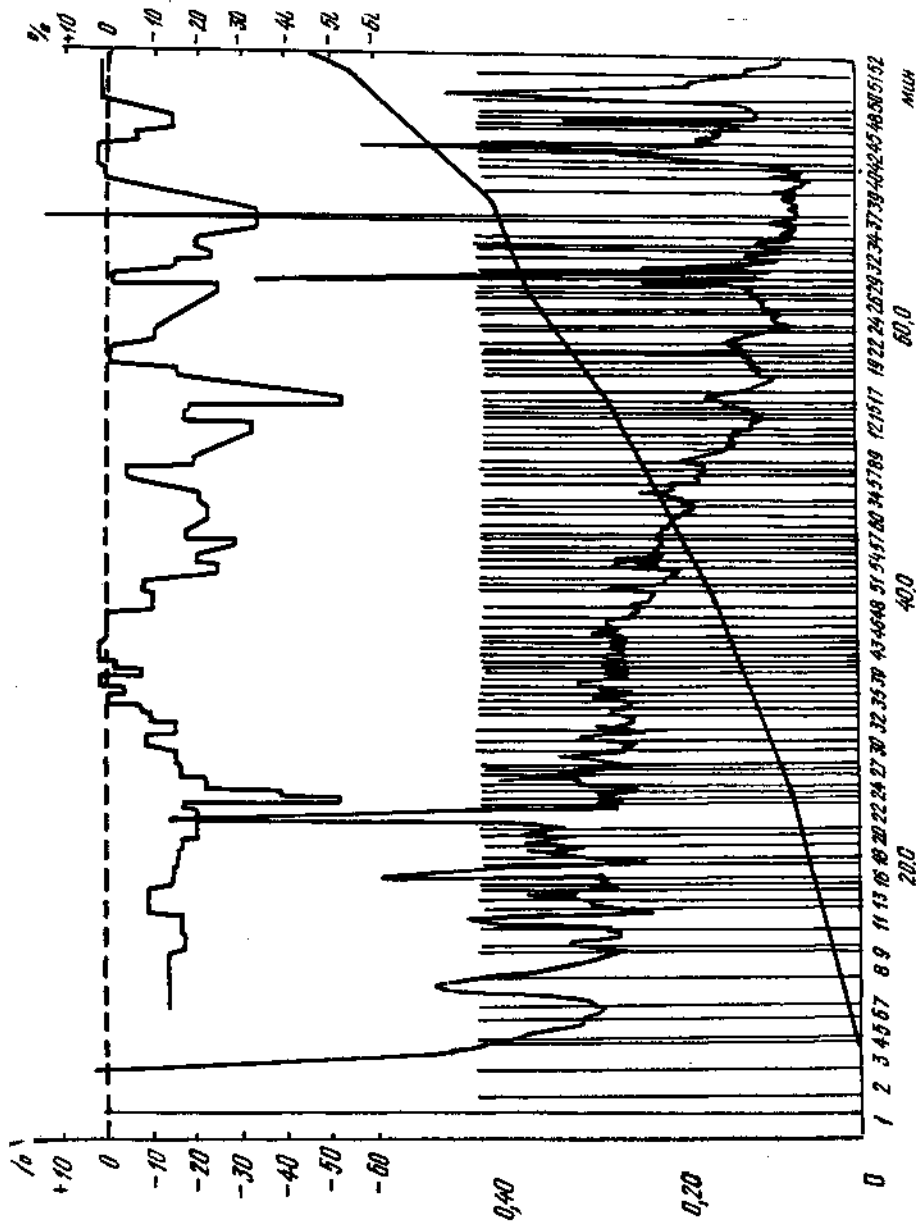


Рис. 3. Влияние пептидных фракций пептидного экстракта почек на КоА-индуцированную пролиферацию мышиных спленоцитов. В нижней части рисунка — хроматограмма экстракта, где вертикальные линии отмечают отдельные фракции; в верхней части — показатели торможения (—) или активации (+) пролиферации под действием фракций. Пунктирная линия обозначает уровень КоА-стимулированной пролиферации без добавления фракций

Базируясь на строении реальных белков, нами предложена модель пептида-аналога пула пептидов, выделенных из тканей почек: в 1-й позиции находится любая аминокислота (возможно, пролин для защиты эпитопа), во 2-й позиции — глутаминовая или аспарагиновая кислота, в 3-й — лизин, в 4-й — аспарагиновая кислота или гистидин, в 5-й — любая аминокислота, в 6-й — аргинин, в 7-й — любая аминокислота. В качестве любой аминокислоты чаще используют неполярные незаряженные аминокислоты.

Учитывая, что исследуемый пептидный экстракт оказывает выраженное толерогенное действие у лабораторных животных при иммунной патологии почек, в частности, при нефрите Хеймана у крыс, можно предположить, что пептиды «вмешиваются» во взаимодействие Т-клеточного рецептора с лигандом (комплекс МНС/эндогенный пептид). Недавно показано, что пептиды, моделирующие эпитоп Т-клеточного распознавания, способны предотвращать развитие аутоиммунных заболеваний [20]. Затем синтетический пептид, соответствующий иммунодоминантному эпитопу вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), был использован для примирования и восстановления иммунологической толерантности *in vivo* у трансгенных мышей, предотвращая повреждение бета-клеток и развитие диабета у таких мышей [21].

Таким образом, кажется возможным, используя предложенную модель пептида, синтезировать реальную субстанцию, обладающую иммунопротективными свойствами при иммунопатологии почек.

Как видно из хроматограммы, представленной на рис. 3, полученная кислотная экстракция смесь при анализе разделилась приблизительно на 115—120 компонентов. При хроматографическом анализе отбирали отдельно каждую фракцию, после чего проводили биуретовую реакцию. Фракции, состоящие из веществ пептидной природы и имеющие не менее 30 мкг белка, были отобраны для дальнейших исследований.

При индукции пролиферации КонА (рис. 3) наблюдалось выраженное включение радиоактивной метки ^3H -тимидина в делящиеся спленоциты, индекс стимуляции при этом достигал 20—25. Внесение исследуемых фракций пептидов коркового вещества почек в основном приводило к снижению пролиферативной активности мышинных спленоцитов. В отдельных случаях (фракции со временем удерживания 22,5 и 52 мин) ингибирование достигало 55 %, в то же время общая ингибирующая активность пептидного препарата не превышала 20—24 %.

Определенный интерес представляло изучение действия пептидных фракций на пролиферацию лимфоцитов, приближенную к физиологическим условиям. Для этого была использована линия мышинных Т-лимфоцитов СТЛЛ, размножающаяся в присутствии интерлейкина-2. В этом случае внесение в культуру Т-лимфоцитов пептидных фракций вызывало более выраженные сдвиги в пролиферативной активности, чем наблюдаемые при активации спленоцитов КонА. При этом более гидрофильные пептидные фракции со временем удерживания менее 50 мин (рис. 4) ингибировали ответ лимфоцитов на ИЛ-2, а более гидрофобные — усиливали его.

Были выбраны 10 наиболее активных пептидных фракций, чтобы установить, имеет ли обнаруженная активность дозозависимый характер. При этом исходные фракции были последовательно трехкратно разведены, и исследование влияния пептидов на пролиферацию СТЛЛ было повторено. Полученные результаты представлены на рис. 5. Фракции 1—4, 6 максимальный ингибирующий эффект проявляли в разведении 1 : 9, после чего эффект снижался и достигал минимума при разведении 1 : 24 — 1 : 2187. Фракции 5, 7—10 несколько снижали свое действие в разведениях 1 : 27 — 1 : 243, но затем их эффект с разведением нарастал до 1 : 729 — 1 : 2187. Однако, как видно из графиков, четкого дозозависимого эффекта в использованной модели выявить не удалось.

По-видимому, это может быть связано с неспецифическим действием описанных пептидных фракций на пролиферативную активность

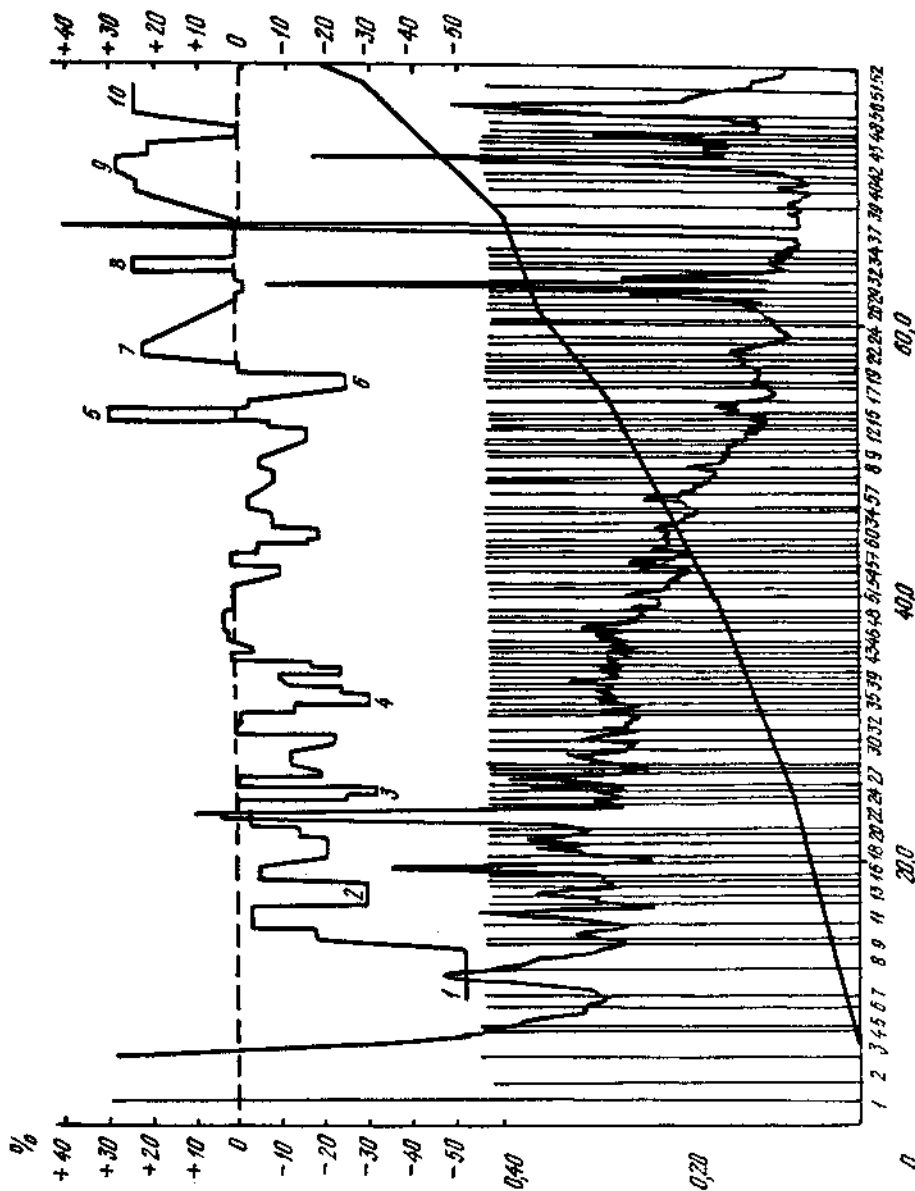


Рис. 4. Влияние пептидных фракций пептидного экстракта почек на ИЛ-2-индуцированную пролиферацию линии СТЛ. Обозначения те же, что и на рис. 3. Цифрами обозначены фракция, взятые для дальнейшего исследования

лимфоцитов или с присутствием в хроматографически однородной фракции нескольких индивидуальных пептидов.

В совокупности с полученными нами ранее результатами, демонстрирующими отчетливый специфический эффект пептидного экстракта коркового вещества почек на пролиферацию лимфоцитов при иммунных поражениях почек [11, 12], можно сделать вывод о том, что в паренхиме почек содержатся пептидные вещества, способные в физиологических условиях неспецифически регулировать активность лимфоцитов, а при патологии выступать уже в качестве специфических мессенджеров.

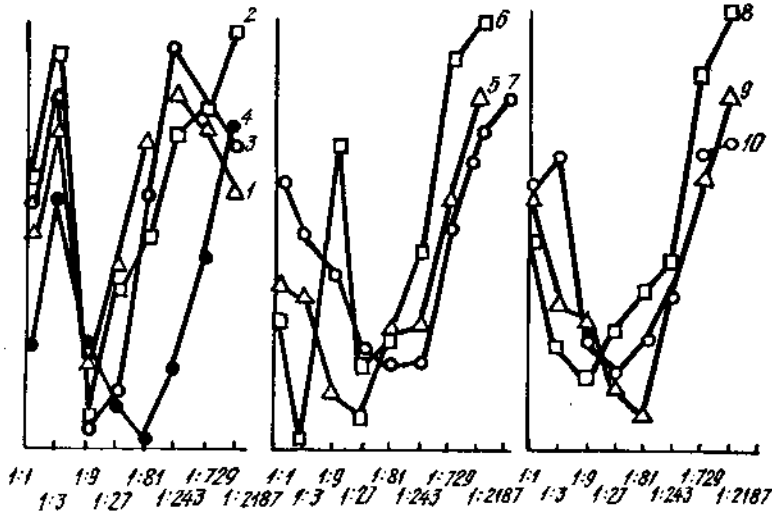


Рис. 5. Исследование дозозависимого влияния фракций пептидного экстракта почек (номера фракций соответствуют рис. 4) на пролиферацию линии CTLL (по оси абсцисс — разведение фракций; по оси ординат — индекс стимуляции пролиферации клеток в условных единицах)

Возможность существования такого процесса подкрепляется также и данными об изменении соотношения отдельных фракций в пептидном экстракте при развитии аутоиммунной патологии почек [13].

Обращает на себя внимание различие в действии одних и тех же пептидных фракций на лимфоциты, активированные митогенным лектином КонА и эндогенным клеточным ростовым фактором ИЛ-2. Очевидно, различие заключается в воздействии пептидов на какие-то характерные активационные этапы Т-лимфоцитов. Известно, что в активации пролиферации КонА основную роль играют такие процессы, как изменение потока одновалентных катионов, раннее трансметилирование липидов, активация фосфолипазы А₂ и на центральном месте — поток кальция в клетку со следовым изменением концентрации цАМФ и цГМФ [14]. В то же время ИЛ-2 действует через рецепторный комплекс, состоящий по крайней мере из двух мембранных белков P55 и P70. Первый белок (Тас-антиген) не имеет значения для процесса дальнейшей передачи информации, после же связывания ИЛ-2 с P70 происходит изменение внутриклеточного pH, усиление синтеза клеточных протоонкогенов и экспрессия гена p55 [22].

Вероятно, точку приложения полученных пептидов следует искать именно в каскаде реакций, следующих за воздействием ИЛ-2 на лимфоцит, таких как лиганд-рецепторное взаимодействие с рецепторами ростовых факторов, синтез клеточных протоонкогенов и реципрокное индуцирование синтеза субъединиц рецептора ИЛ-2.

Таким образом, отдельные пептидные фракции коркового вещества почки способны неспецифически действовать на пролиферацию непримированных лимфоцитов, индуцированную КонА и ИЛ-2. Наиболее отчетливое действие наблюдается при активации ИЛ-2. Возможно, полученные пептиды воздействуют на системы, регулирующие рост и про-

лиферацию клеток, связанные с действием ростовых факторов и клеточных протоонкогенов, осуществляя в физиологических условиях кооперацию между иммунocyтaми и клетками нефрона, и реализуют процессы репарации и компенсации.

Таким образом, мы попытались ответить на три главных вопроса: существуют ли различия в составе пептидных экстрактов, полученных из различных органов, и в чем они заключаются; какова структура пептидного экстракта, выделенного из тканей коркового вещества почек; и, наконец, как влияют отдельные пептидные фракции почек на пролиферацию некоторых клеток?

При этом выявлено, что пептиды, экстрагированные из различных групп органов, имеют определенное сходство внутри группы и достаточно различаются вне групп. Основываясь на этих данных и данных о С-концевом расположении остатка лизина, можно предположить, что синтез исследуемых пептидных веществ связан со специфическими для каждого органа или ткани этапами протеолитического пресессинга белковых структур. Интригующим и до конца неясным фактом является обнаружение фрагментов эмбриональной ипсилон-цепи гемоглобина в составе пептидов, выделенных из тканей коркового вещества почек взрослых (!) животных. Пока мы бы хотели воздержаться от предположений, касающихся этой находки.

Определенный интерес представляет найденное сходство между исследуемыми пептидными субстанциями и эндогенными пептидами, выделенными из молекул МНС. Это позволило нам установить согласованную последовательность пула фракций пептидных веществ почки, что вместе с анализом реальных аминокислотных последовательностей, несущих выявленную согласованную последовательность, позволило предложить модель пептида-аналога. В 1-й позиции такого аналога находится любая аминокислота (возможно, пролин для защиты эпитопа от протеолиза), во 2-й — глутаминовая или аспарагиновая кислота, в 3-й — лизин, в 4-й — аспарагиновая кислота или гистидин, в 5-й — любая аминокислота, в 6-й — аргинин, в 7-й — любая аминокислота.

Кажется интересным связать свойства и структуру исследуемых пептидов с таковыми эндогенных пептидов МНС. В каждый момент времени клетка экспрессирует на своей поверхности пептиды, ассоциированные с молекулами МНС, которые (пептиды) являются фрагментами абсолютно всех белков, синтезирующихся в клетке в данный момент времени. Было бы непростительной расточительностью для клетки и для природы вообще использовать такую информацию только для отличия «свое—чужое». Логичнее, что такая информация о функциональном состоянии клетки, заключенная в пептидных символах, способна передаваться во внешнюю среду клеток и восприниматься остальными клетками популяции. При этом роль возможных пептидных акцепторов могли бы играть или те же молекулы МНС, или другие молекулы, способные к связыванию пептидов (например, белки теплового шока, находящиеся на внешних мембранах, и т. д.). Подтверждением этого могут служить обнаруженные многими исследователями различия в составе пептидных экстрактов, которые были выделены из здоровых и патологически измененных тканей.

Не оставляет сомнений гетерогенность полученных пептидных органических экстрактов. Пептидную субстанцию коркового вещества почек удалось разделить на 115—120 отдельных фракций. Результаты изучения КонА-индуцированной пролиферации мышинных спленоцитов показывают, что пептидные фракции обладают ингибирующими свойствами (в определенных случаях до 55 %). При использовании в качестве модели ИЛ-2-индуцированную пролиферацию клеток мышцы линии СТLL отмечено, что более гидрофильные фракции ингибировали, а более гидрофобные — стимулировали пролиферативный ответ. Обнаруженные отличия могут быть связаны с разным действием пептидов на этапы активации клеток КонА и ИЛ-2. По-видимому, точка приложения исследуемых пептидов — каскад ИЛ-2-индуцированных реакций — лиганд-

рецепторное взаимодействие с рецепторами ростовых факторов, синтез клеточных протоонкогенов, реципрное индуцирование синтеза рецептора ИЛ-2.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании органной регуляции функции клеток с помощью пептидных молекул, регулирующих рост и пролиферацию клеток, а также осуществляющих кооперацию между иммунocyтaми и специализированными паренхиматозными клетками (в частности, клетки нефрона).

В заключение хочется выразить благодарность Администрации города Остфилдерна (Германия) за организацию и финансовую поддержку наших исследований в Немецком Центре исследования рака (Гейдельберг), а также профессору Н.-Г. Rammensee (руководитель лаборатории иммунологии опухолевых вирусов) и его сотрудникам — за помощь и плодотворное обсуждение полученных результатов.

І. П. Кайдашев

ТКАНИННА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПЕПТИДНИХ ЕКСТРАКТІВ, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ОРГАНІВ, ТА ІМУНОРЕГУЛЯТОРНА ДІЯ ПЕПТИДНОГО ЕКСТРАКТУ НИРОК

Резюме

Аналіз хроматографічних спектрів пептидних екстрактів, виділених з паренхіматозних органів (селезінка, нирки, печінка), ендокринних залоз (тимус, підшлункова залоза) та пародонта, виявив значну схожість спектрів досліджуваних груп. Імовірно, що синтез пептидів пов'язаний із специфічними для кожного органу або тканини етапами протеолітичного процесингу білкових структур.

В результаті вивчення амінокислотної послідовності пулу фракцій пептидного екстракту нирок визначено структуру пептида-аналога: у 1-й позиції — недетермінована амінокислота, у 2-й — глутамінова або аспарагінова кислота, у 3-й — лізин, у 4-й — аспарагінова кислота або гістидин, у 5-й — недетермінована амінокислота, у 6-й — аргінін.

Пептидний екстракт нирок було хроматографічно розділено на 115—120 фракцій. Дані, одержані при аналізі КонА-індукованої проліферації мишиних спленоцитів, свідчать про те, що пептидним фракціям притаманні інгібуючі властивості (до 55 %). При вивченні ІЛ-2-індукованої проліферації лінії СТІЛЛ відмічено, що гідрофільніші фракції пригнічували, гідрофобніші — стимулювали проліферативний відгук, однак чіткого дозозалежного ефекту знайдено не було.

Отримані результати дозволяють припустити наявність органної регуляції функцій клітин за допомогою пептидних молекул, котрі регулюють проліферацію та диференціювання, здійснюють кооперацию між імунocyтaми та спеціалізованими паренхіматозними клітинами.

І. П. Кайдашев

TISSUE SPECIFICITY OF PEPTIDE EXTRACTS WHICH WERE OBTAINED FROM DIFFERENT ORGANS AND IMMUNOREGULATIVE, INFLUENCE OF PEPTIDE KIDNEY EXTRACT

Summary

Extracts from parenchymal organs (spleen, kidney, liver), endocrin glands (thymus, pancreas) and periodont were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC). Analysis of these chromatograms has found out important similarity of the chromatographic spectra into determined groups. It can be possible that the synthesis of studied peptides is connected with specific for each organ or tissue stages of protein structures proteolytic processing.

Pool sequence analysis of kidney peptide extract has determined the structure of peptide-analog: in 1 position — undetermined amino acid, in 2 — glutamic or aspartic acids, in 3 — lysine, in 4 — aspartic acid, in 5 — undetermined amino acid, in 6 — arginine.

Kidney peptide extract was separated on 115—120 fractions by HPLC. The peptide fractions has inhibiting properties on ConA-induced mice spleenocytes proliferation (up to 55 %). More hydrophylic fractions are inhibited and more hydrophobic ones are stimulated proliferative response. Unfortunately, unclear dosis-dependent actions were discovered.

This results testify the existence of the cell function organ regulation by peptide molecules which executes proliferation, differentiation and cooperation between immunocytes and special parenchym cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Кожемякин А. Л., Кожемякин Л. А. Влияние полипептидного фактора тимуса на систему циклических нуклеотидов иммунокомпетентных клеток // *Вопр. мед. химии.*—1982.— № 4.— С. 114—118.
2. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины // *Успехи соврем. биологии.*—1983.— 96, № 6.— С. 339—352.
3. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Кузник Б. И. и др. Влияние полипептидов, выделенных из костного мозга, на иммунитет и гемостаз // *Гематология и трансфузиология.*—1984.— № 4.— С. 35—37.
4. Калашиников С. Г. Роль вилочковой железы в регуляции активности периферических полипептидов, влияющих на иммуногенез и гемостаз: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1988.— 16 с.
5. Калашиников С. Г., Кузник Б. И., Цыбиков Н. Н. Участие тимуса в контроле активности цитомединов // *Патофизиология.*—1989.— № 1.— С. 57—59.
6. Литвиненко Н. В. Перекисное окисление липидов, физиологическая антиоксидантная система и гемостаз в тканях головного мозга в норме, при экспериментальной патологии и их регуляция кортексином: Дис. ... канд. мед. наук.— Полтава, 1992.— 187 с.
7. Мищенко В. П., Кайдашев И. П., Силенко Ю. И., Хавинсон В. Х. Влияние почечных пептидов-цитомединов на гемокоагуляцию и перекисное окисление липидов при экспериментальном нефрите Хейманна // *Патофизиология.*—1991.— № 6.— С. 35—36.
8. Силенко Ю. И. Роль свободнорадикальных, гемокоагулирующих и иммунных механизмов в патогенезе пародонтита и разработка его патогенетической терапии полипептидами: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Полтава.— 1992.— 34 с.
9. Полежаев Л. В. Очерки о биологически активных веществах // *Успехи соврем. биологии.*—1992.— 112, № 1.— С. 74—87.
10. *Структурные основы действия пептидных и белковых иммунорегуляторов* / Под ред. Г. И. Чипенка.— Рига: Зинатне, 1980.— 260 с.
11. Кайдашев И. П. Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите // *Физиол. журн.*—1993.— 39, № 5—6.— Р. 52—56.
12. Кайдашев И. П. Некоторые особенности пептидной регуляции в организме посредством полипептидных регуляторов цитомединов // *Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза.*—Полтава, 1993.— С. 73—86.
13. Кайдашев И. П. Восстановление пептидергической регуляции в почках экзогенными полипептидными веществами ренального происхождения // *Физиол. журн.*—1992.— 38, № 6.— С. 106—109.
14. *Иммунология* / Под ред. У. Пола.— М.: Мир, 1987—1988.— Т. 1.— С. 420—455.
15. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С., Воробьев А. А. Эндогенные иммуномодуляторы.— Санкт-Петербург: Гиппократ, 1992.— 256 с.
16. Сологуб Л. І., Пащковська І. С., Сухорська Е. І., Антопяк Г. Л. Роль протеолізу в посттрансляційних модифікаціях біологічно активних пептидів та поліпептидів // *Укр. біохім. журн.*—1991.— 63, № 5.— С. 3—14.
17. Orci L., Ravasolla M., Storch M.-J. et al. Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event, which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles // *Cell.*—1987.— 49, N 6.— P. 685—668.
18. Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S. et al. Allel-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules // *Nature.*—1991.— N 351.— P. 290—296.
19. Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S. et al. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules // *Immunogenetics.*—1994.— N 39.— P. 230—242.
20. De Magistris M. T., Alexander J., Coggeshall et al. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of T cell receptor // *Cell.*—1992.— 68.— P. 625—634.
21. Aichele P., Kyburz D., Ohashi P. S. et al. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.— 91.— P. 444—448.
22. Bieh-Thuy L. T., Ducosich M., Peffer N. J. Direct activation of resting human T-cell by IL-2: the role of an IL-2 receptor distinct from the Tac-protein // *J. Immunol.*—1987.— 139, N 5.— P. 1550—1556.