

ционирующим белком данного семейства [9], позволяют предположить, что он должен характеризоваться сохранностью консервативных а.о. в функционально важных участках.

Мы провели сравнительный анализ аминокислотных последовательностей афамина и АФП, для которого экспериментально установлены специфические функционально важные участки. В составе афамина человека, мыши и крысы обнаружены участки, обладающие высокой степенью сходства с эстроген-связывающими участками АФП (табл.3).

Эти данные, наряду с тем, что в составе сывороточного альбумина подобные участки не обнаружены, могут указывать на то, что афамин, возможно, способен связывать и транспортировать эстрогены.

Заключение. Полученные нами результаты демонстрируют неравномерность убывания сходства в парах белков АФП-ВДСБ и афамин-ВДСБ у человека и у грызунов по сравнению с другими парами белков, производных альбуминоидных генов, которую мы не можем объяснить в рамках гипотезы «молекулярных часов». Эти данные могут свидетельствовать о неравномерности дивергенции белков семейства альбуминоидных генов у млекопитающих. Парное сравнение методом выравнивания первичных структур белков с известной функцией с белками, функции которых неизвестны, позволяет с большей степенью вероятности предсказывать возможные функционально-активные участки в первичных структурах изучаемых белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morinaga T., Sakai M., Wegmann T.G., Namaoki T. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4604-4608.
2. Ruoslahti E., Terry W.D. (1976) Nature, 260, 804-805.
3. He X.-M., Carter D. (1992) Nature, 358, 209-21.
4. Harper M.E., Dugaiczky A. (1983) Amer. J. Hum. Gen., 35, 565-572.
5. Ingram R.S., Scott R.W., Tilghman. S. M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4694-4698.
6. Gorin M.B., Cooper D.L., Eiferman F., Van de Rijn P., Tilghman S.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1954-1959.
7. Brown J.R. (1976) Fed. Proc. 35, 2141-2144.
8. Minghetti P.P., Law S. W., Dugaiczky. A. (1985) Mol. Biol. Evol. 2(4), 347-358.
9. Gibbs P. E.M., Witke W. F., Dugaiczky A. J. (1998) Mol. Evol. 46, 552-561.
10. Zuckerkandl E., Pauling L. (1965) In V. Bryson and H. J. Vogel, eds. Evolving genes and proteins, 97-166. Academic Press, New York.
11. Dickerson R. E. (1971) J. Mol. Evol. 1, 26-45.
12. Heiser M., Hutter-Paier B., Jercovic L., Pfranger R., Windisch M., Becker- Angre M., Dieplinger H. J. (2002) Neural Transm. Suppl. 62, 337-345.

УСИЛЕНИЕ АПОПТОЗА CD95⁺-ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ИЗ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА (АФП₁₄₋₂₀)

Терентьев А.А., Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Александрова И.А., Тагирова А.К., Молдогазиева Н.Т., Казимирский А.Н.
*Российский Государственный
Медицинский Университет,
Москва*

Современные наукоемкие технологии в биологии и медицине базируются на фундаментальных исследованиях способных дать новые представления о ключевых процессах в организме. Фундаментальные исследования фетоплацентарных белков человека ведут к лучшему пониманию процессов роста и развития. На основе молекулярных структур, происходящих из этих белков, могут быть созданы новые лекарственные препараты и разработаны диагностикумы.

Один из белков фетоплацентарного комплекса – альфа-фетопротейн человека включен во многие процессы, связанные с ростом и клеточной дифференцировкой. Ранее мы выдвинули предположение о том, что продукты спонтанной протеолитической деградации альфа-фетопротейна и, возможно, некоторых других белков фето-плацентарного комплекса оказывают регулирующее влияние на иммунную систему человека. В частности за счет пептидов из альфа-фетопротейна вполне может осуществляться контроль за иммунологической толерантностью. Ранее нами (Терентьев А.А., 1997; Терентьев и соавт., 1999, 2000, 2002, 2004) был выявлен биологически активный сайт в структуре альфа-фетопротейна (АФП), соответствующий последовательности с 14 по 20 аминокислотных остатков первичной структуры АФП. Предварительные исследования (Терентьев А.А. и соавт., 1999, 2001, 2003, 2005) продемонстрировали иммуномодуляторную активность синтетического пептида, соответствующего этой последовательности с возможным участием механизмов апоптоза в реализации его иммуномодуляторной активности.

Состояние иммунологической толерантности во многом определяется вхождением в апоптоз (программированную клеточную гибель) активированных лимфоцитов. Наиболее естественный путь удаления из организма активированных лимфоцитов способных к синтезу и секреции провоспалительных цитокинов это путь их активационного апоптоза. Активационный апоптоз лимфоцитов развивается как естественное завершение активационного (дифференцировочного) процесса в ходе, которого на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются рецепторы CD25, CD71, HLA-DR и CD95. CD95 – маркер готовности лимфоцитов к запуску активационного апоптоза. Система взаимодействующих рецепторов Fas(CD95) и FasL(CD178) - важнейший механизм активационной элиминации лимфоцитов, благодаря включению которого удаляется большинство лимфоцитов после выполнения ими возложенный на них функций.

Fas-FasL взаимодействие, запускающее активационный апоптоз, играет роль в торможении иммунного ответа, путем удаления активированных аутореактив-

ных лимфоцитов и, тем самым, служит защитой от аутоиммунных реакций, поддерживая толерантность организма.

Существо ответной иммунной реакции организма заключается в пролиферативных и дифференцировочных процессах в лимфоцитах. Эта реакция поддерживает гомеостаз организма и, вместе с тем, может приводить к иммунопатологическим заболеваниям, при нарушении механизмов толерантности. За настройку иммунного ответа и одновременно его торможение отвечает активационный процесс в лимфоцитах, который направлен на образование зрелых клеточных форм. После выполнения возложенных на них функций зрелые лимфоциты удаляются из организма с подключением механизмов активационного апоптоза. Ведущий процесс элиминации лимфоцитов заключается в их активационно-индуцированной программированной клеточной гибели.

Изучение механизмов, при помощи которых поверхностные рецепторы Fas и FasL регулируют гибель клеток, а также факторов, регулирующих их экспрессию, в сочетании с прямой регистрацией апоптоза лимфоцитов, может дать важную информацию для понимания гомеостаза, в иммунной системе для разработки новых подходов в лечении различных заболеваний.

Цель исследования состояла в определении влияния синтетического фрагмента АФП₁₄₋₂₀ на экспрессию активационных рецепторов лимфоцитов, также определения апоптоза лимфоцитов у больных atopической бронхиальной астмой.

Методы исследования. Все исследования выполнены на лимфоцитах периферической крови больных atopической бронхиальной астмой – 7 пациентов, а также 20 лимфоцитах здоровых доноров. Лимфоциты больных в период обострения заболевания представляют модель клеточного пролиферативного процесса с ограниченным входом в активационный или, CD95-индуцированный апоптоз. Лимфоциты выделяли в одноступенчатом градиенте плотности, а затем, используя метод непрямой иммунофлюоресценции, определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов, а также экспрессию активационных антигенов лимфоцитов CD25, CD71, HLA-DR, CD95 (ИКО, Россия), CD95L (Caltag Laboratories, США).

Культивирование лимфоцитов проводили в стерильных условиях в минимальной среде 199 в атмосфере 5% CO₂ в течение 16 ч при температуре 37°. Концентрация клеток в среде инкубации составляла 2,5 млн/мл. К культивируемым лимфоцитам добавляли синтетический пептид АФП₁₄₋₂₀ (в конечной концентрации 10⁻⁸М) После окончания культивирования лимфоциты отмывали от пептида и подвергали процедуре иммунофенотипирования.

Определение апоптоза лимфоцитов включает в себя традиционную подготовку препарата лимфоцитов, фиксированных на стекле с помощью полилизина, обработку лимфоцитов FITC-мечеными моноклональными антителами и финальное окрашивание хроматина клеток пропидий иодидом. Для повышения проницаемости клеточных мембран для пропидий иодида при-

меняли дигитонин, обеспечивающий необходимую проницаемость плазматической и ядерной мембран. Клетки, фиксированные на стекле, и обработанные моноклональными антителами для выявления поверхностных рецепторов, помещали в среду следующего состава: 0,1% цитрат калия, 0,75М NaCl, пропидий иодид 2 мкг/мл, дигитонин 20 нг/мл, pH 4,0. За 30 мин инкубации при 4°C развивается красно-оранжевое окрашивание нативных ядер клеток и темно-красное окрашивание ядер подверженных апоптозу. Темно-красное окрашивание апоптозирующихся ядер клеток объясняется небольшим количеством фосфоэфирных связей в рестриктированной ДНК клеток, находящихся в процессе программируемой клеточной гибели. В ходе этого процесса светло-зеленое окрашивание мембраны клетки, вызванное окрашиванием поверхностных рецепторов, сохраняется, что позволяет отнести каждый лимфоцит к определенному клеточному типу, а с другой стороны, выявить, находится ли данная клетка в состоянии апоптоза.

Результаты исследования. Исследование синтетического пептида LDSYQCT, соответствующего фрагменту АФП₁₄₋₂₀ проведено на лимфоцитах периферической крови 7 пациентов с диагнозом atopическая бронхиальная астма в период обострения заболевания. Диагноз подтвержден данными клинико-лабораторных исследований. Синтетический пептид LDSYQC(Asm)T получен методом твердофазного синтеза в лаборатории синтеза пептидов Кардиологического научного центра РФ сотрудниками Ж.Д. Беспаловой и Е.В. Кудрявцевой, где Asm – ацетоамидометильная защитная группа, прикрывающая SH-группу цистеина, защищая ее от окисления и димеризации по сере.

Результаты исследования влияния синтетического пептида LDSYQCT структурного фрагмента альфа-фетопротейна человека на экспрессию активационных антигенов лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой в сопоставлении с этими же параметрами здоровых доноров приведены в таблице.

Сопоставление иммунологических показателей здоровых доноров и больных, лимфоциты которых подвергали процедуре инкубации без добавления пептида (контроль) в целом подтверждает характерные изменения в экспрессии маркеров активации, выявленные ранее у этих больных. Так, при обострении заболевания, увеличено количество клеток экспрессирующих функциональные активационные антигены CD54(ICAM1) и CD23 в 2,5 – 3 раза, что свидетельствует о воспалении сопровождающемся интенсивным антителогенезом. Увеличение экспрессии CD54(ICAM1) интерпретируется как повышение готовности к миграции лимфоцитов и их участие в антигенной презентации. Увеличение экспрессии CD23, низкоаффинного рецептора для IgE, – свидетельство В-клеточной активации.

Количество лимфоцитов, экспрессирующих дифференцировочные активационные антигены CD25, HLA-DR, CD95, а также CD95L у больных увеличено примерно на 50% по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует о средней тяжести заболевания.

Таблица 1. Активированные формы лимфоцитов при культивировании в присутствии синтетического пептида АФП₁₄₋₂₀

Активационные антигены лимфоцитов	Здоровые доноры	Больные бронхиальной астмой	
		аминокислотный контроль	АФП ₁₄₋₂₀ опыт
CD54(ICAM1)	5,49±0,98%	14,17±1,04%	8,65±0,57%***
CD23	5,26±0,60%	13,11±0,82%	12,45±1,11%
CD25	6,09±0,50%	9,75±0,39%	10,10±0,46%
HLA-DR	11,93±0,55%	17,86±1,51%	10,69±1,24%**
CD95	4,64±0,34%	6,44±0,64%	13,19±0,99%***
CD95L	9,22±1,04%	13,85±1,09%	17,13±1,59

Примечание: *-p<0,05; **-p<0,01; ***-p<0,001; достоверность различий указана для опытной группы по сравнению с контрольной.

Под влиянием АФП₁₄₋₂₀ функциональные активационные антигены CD54(ICAM1) и CD23 испытывают разнонаправленные изменения. Так, количество лимфоцитов экспрессирующих CD54(ICAM1), молекулы межклеточной адгезии, достоверно снижается, что свидетельствует о торможении процессов миграции и антигенной презентации и указывает на противовоспалительный характер действия пептида. Однако, при этом, АФП₁₄₋₂₀ не влияет на количество лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD23 и, следовательно, не влияет на В-клеточную активацию лимфоцитов.

Под влиянием АФП₁₄₋₂₀ количество лимфоцитов, экспрессирующих дифференцировочные активационные антигены CD25, HLA-DR, CD95, а также CD95L изменяется в неодинаковой степени. Так пептид АФП₁₄₋₂₀ не влияет на количество лимфоцитов, экспрессирующих ранний активационный антиген CD25 – рецептор к интерлейкину 2, что свидетельствует о его неспособности к торможению иммунной активации. Вместе с тем количество лимфоцитов, несущих поздний активационный антиген – рецептор HLA-DR под влиянием пептида существенно понижается практически до уровня здоровых доноров. А количество лимфоцитов несущих рецептор запуска активационного апоптоза – CD95 увеличивается более чем вдвое. При этом содержание лимфоцитов, экспрессирующих лиганд для рецептора CD95 – CD95L, имеет тенденцию к увеличению.

Влияние пептида АФП₁₄₋₂₀ на лимфоциты, активированные воспалительным процессом у больных atopической бронхиальной астмой, наиболее выражено для двух поверхностных рецепторов – HLA-DR и CD95. Отношение HLA-DR/CD95 показывает насколько зрелые клеточные формы лимфоцитов преобладают над лимфоцитами, готовыми к вступлению на путь активационного апоптоза. Величина этого показателя, определённая у больных составляет 3,07±0,44,

под влиянием пептида достоверно понижается до 0,86±0,12 p<0,001. Полученные результаты свидетельствуют о том, что готовность лимфоцитов, активированных воспалительным процессом к апоптозу под влиянием пептида АФП₁₄₋₂₀, в целом, увеличивается, однако из этих данных неясно, насколько эта готовность реализуется. Ответ на этот вопрос был получен в следующих экспериментах.

Изучение апоптоза, развивающегося в CD95⁺-лимфоцитах, показало, что уровень апоптоза в CD95⁺-лимфоцитах больных составляет 31,51±3,16%. Под влиянием пептида количество лимфоцитов, несущих рецептор CD95 (CD95⁺-клетки) и находящихся в состоянии апоптоза, увеличивается до 64,30±5,66%, p<0,001. При этом количество CD95 позитивных лимфоцитов находящихся в состоянии апоптоза у здоровых доноров не менее 80%.

Заключение. Таким образом, исследуемый пептид АФП₁₄₋₂₀ влияет на активационный процесс в лимфоцитах путем увеличения экспрессии рецептора запуска активационного апоптоза CD95, повышает апоптоз среди CD95⁺-лимфоцитах, что ведет к снижению количества зрелых HLA-DR⁺-клеток. В то же время, указанный пептид не предотвращает раннюю активацию лимфоцитов и не влияет на В-клеточную активацию и экспрессию рецептора, являющегося лигандом для CD95, т.е. CD95L. Молекулярный механизм действия усиления апоптоза лимфоцитов под влиянием пептида АФП₁₄₋₂₀ может быть объяснен либо активацией внутриклеточных тирозинкиназ, вызывающих синтез рецептора CD95, либо действием пептида на уровне плазматической мембраны, вызывающим тримеризацию уже синтезированных субъединиц рецептора CD95.