

7. Flodin P., Killander J. Fractionation of human serum proteins by gel filtration // BBA.—1962.—63.—P. 403—407.
8. Palmblad J., Uden A.-M., Venizelos N. The quantification of neutrophil orientation and migration under agarose—a new method for detecting directed and random movements // J. Immunol. Method.—1981.—44.—P. 37—53.
9. Paronetto F. Cell-mediated immunity in liver disease // Hum. Pathol.—1986.—17, N 2.—P. 168—178.
10. Ricevuti J., Mazzone A. The neutrophil revisited // Inflamm.—1989.—13, N 4.—P. 475—482.
11. Thopnton A. J., Strieter R. M., Lindley I. et al. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/LL-8 in human hepatocytes // J. Immunol.—1990.—144, N 7.—P. 2609—2613.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця
АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 05.05.93

УДК [612.017.3:616—008.6]:616.8

И. П. Кайдашев

Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите

На моделі експериментального нефриту у щурів лінії Вістар показано, що розвиток вказаної патології викликає різкі морфофункціональні зміни у паренхімі нирок. Одночасно вивчали стан Т-ланки (реакцію бластотрансформації лімфоцитів на фітогемаглютинін) і В-ланки (титр сироваткових протиниркових антитіл) імунітету. Показано, що розвиток експериментального нефриту супроводжується підсиленням відповіді лімфоцитів на фітогемаглютинін та ниркові тканинні антигени, а також збільшенням титру протиниркових антитіл. З метою корекції цих порушень був застосований поліпептидний комплекс, виділений із паренхіми нирок. Показана нормалізуюча дія цього комплексу на активність лімфоцитів. Зроблений висновок про можливу толерогенну дію речовин цього комплексу.

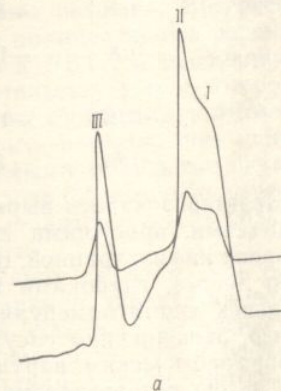
Введение

Изучение этиологии и патогенеза почечных заболеваний — одна из важнейших проблем современной медицины. Понимание сущности нефропатий в значительной мере зависит от выяснения индивидуальных особенностей иммунного статуса организма и связанного с ним иммунного ответа. В последние годы широко используются полипептидные препараты, полученные из периферических органов, обладающие мощным регуляторным действием на состояние систем гемостаза, иммуногенеза, свободно-радикального окисления и регенерации не только в самом органе, но и на уровне целостного организма [3, 4, 7]. Данные, представленные в одной из наших работ [6], показывают наличие регуляторного влияния полипептидного препарата, выделенного из почек, на состояние перечисленных систем при экспериментальном нефрите. Однако по-прежнему не вполне ясны механизмы действия этого вещества на лимфоидные клетки. Учитывая, что наиболее чувствительным звеном иммуногенеза является лимфоидный росток, и лимфоциты играют важную трофическую роль в развитии репаративных процессов в почках [9], нами предпринята попытка проанализировать функциональное состояние лимфоцитов при экспериментальном нефрите Хейманна, а также влияние на эти процессы комплекса полипептидов, выделенных из почек.

© И. П. КАЙДАШЕВ, 1993

Методика

Работа выполнена на 48 кр 200 г. Экспериментальный нефрит описанной в работе Kment и др. [1] моделировали на основании морфологических срезов окрашивали гистологическими методами. Животные: 1 — интактные крысы; 2 — крысы с нефритом (0,1 мг/кг в течение



Гельхроматограмма (а) и обращенная хроматограмма (б) веществ, выделенных из ткани почек.

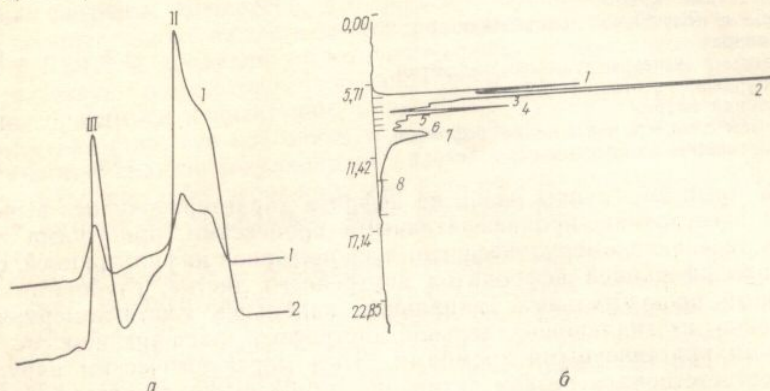
инъекции изотонического раствора, получавшие препарат

Биологически активные вещества из тканей почек свиней получали методом обращенной хроматографии на поливинилпирролидон (Yosoda, Япония), проведенной (фирма «Hitachi», Япония) на три основные фракции (рис. 1). Материалом для хроматографии на высокоэффективной жидкостной хроматографии (Япония) в режиме элюции 0,1 моль/л фосфорной кислоты при длине волны 210 нм на колонке 4,6 × 25 мм, в выделенном препарате (рисунки б, в).

Для постановки реакции использовали лимфоциты из селезенки. Методика основана на включении меченой радиоактивной субстанции. Радиоактивность — 26 Кюри. Индекс сдвига рассчитывали индекс сдвига фитогемаглютинина (ФГА) с помощью полипептидного препарата, который рировали с помощью сцинтилляционного производства. Титр протинирковых антител оценивали с помощью реакции агглютинации эритроцитами барана [10] и спектрофотометрически с помощью спектрофотометра [11]. Титр протинирковых антител и соавт. [13]. Результа

Методика

Работа выполнена на 48 крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. Экспериментальный нефрит Хейманна вызывали по методике, описанной в работе Kment и соавт. [12]. О возникновении нефрита судили на основании морфологических изменений тканей почки (гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином, согласно общепринятым методам). Животные были разделены на четыре группы: 1-я — интактные крысы; 2 — крысы, которым вводили внутримышечно препарат (0,1 мг/кг в течение 7 сут); 3 крысы с нефритом, получавшие



Гельхроматограмма (а) и обращенно-фазовая хроматограмма (б) полипептидных веществ, выделенных из ткани почек. Объяснение в тексте.

инъекции изотонического раствора хлорида натрия; 4 — крысы с нефритом, получавшие препарат в указанной дозировке.

Биологически активные вещества (полипептидный препарат) из ткани почек свиней получали методом Морозова и Хавинсона [7]. Это щелочные полипептиды молекулярной массой от 2 до 4 кДа. При гельхроматографии на поливиниловом геле «Toyopearl HW-50» (фирма «Toyo Soda», Япония), проведенной на жидкостном хроматографе «KLA-5» (фирма «Hitachi», Япония) по общепринятой методике, они делятся на три основные фракции (рисунок, а). Методом обращенно-фазовой хроматографии на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Irica» (Япония) в режиме элюции — метанол: вода (2:1), содержащей 0,1 моль/л фосфорной кислоты, скорость подачи — 0,4 мл/мин, детекция при длине волны 210 нм на колонке «Lichrosorb RP-18T» — 5 мкм, 4,0 × 25 мм, в выделенном препарате идентифицированы восемь фракций (рисунок, б).

Для постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) использовали лимфоциты цельной крови по методике [5], которая основана на включении меченого тимидина (^3H -тимидин, «Изотоп», удельная радиоактивность — 26 Ки/ммоль). После 5-суточного культивирования рассчитывали индекс стимуляции. В качестве митогенов использовали фитогемагглютинин (ФГА, НПК «Лектинотест») и вышеуказанный полипептидный препарат в равных дозах. Радиоактивность регистрировали с помощью сцинтилляционного счетчика «Бета» отечественного производства. Титр противпочечных антител в сыворотке крови крыс оценивали с помощью реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с эритроцитами барана [10], с фиксированным на их поверхности экстрактом тканевых почечных антигенов, приготовленным по методу Miller и соавт. [13]. Результаты исследований обработаны статистически.

Результаты и их обсуждение

У животных 2-й группы мы не регистрировали видимых изменений морфологических структур ткани почек. В то же время наблюдалось достоверное снижение индекса стимуляции лимфоцитов под действием ФГА и полипептидного препарата (таблица). По результату реакции пассивной гемагглютинации с эритроцитами барана титр противопочечных антител сыворотки крови у крыс разных экспериментальных групп существенно не изменялся:

Интактные крысы		
Крысы, получавшие полипептидный препарат	—1:16	—1:32
Крысы с экспериментальным нефритом, получавшие изотонический раствор хлорида натрия	—1:8	—1:32
Крысы с экспериментальным нефритом, получавшие полипептидный препарат	—1:128	—1:512
	—1:64	—1:128

У крыс 3-й группы развитие нефрита характеризовалось выраженными экссудативно-пролиферативными процессами, присущими подострому течению гломерулонефрита: лейкоцитарной инфильтрацией, очаговой пролиферацией нефроцитов внутреннего листка, глубокими поражениями проксимальных канальцев, канальцев юктагломерулярных нефронов, их гиалиново-капельной дистрофией, расширением сосудов с частыми пристеночными тромбами. Этим морфологическим нарушениям соответствовала резкая активация лимфоцитов: возрастала их способность к РБТЛ на ФГА. В еще большей мере увеличивался индекс стимуляции полипептидными веществами, полученными из ткани почек (см. таблицу). Титр нефротоксических антител возрастал от 1:16 — 1:32 до 1:128—1:512. Таким образом, показано, что у животных с нефритом повышена реактивность лимфоцитов, по результатам ФГА-индуцированной РБТЛ — в основном Т-клеточная и по результатам РПГА — В-клеточная, сопровождающаяся деструктивными изменениями тканей почек. Эти результаты согласуются с данными литературы [11, 14].

Введение животным с нефритом полипептидов почки вызывало интенсивную нормализацию морфологических структур: в основном ткань почек мало отличалась от нормальной, однако встречались участки гиалиново-капельной дистрофии проксимальных канальцев. Нормализация структуры почечной паренхимы соответствовала снижению способности лимфоцитов к ответу на ФГА (до значений, которые несколько ниже таковых в норме) и на комплекс полипептидных веществ, полученных из ткани почек (до значений, соответствующих таковым у интактных животных). Одновременно концентрация антител к паренхиматозным структурам почек приближалась к нормальной (их титр составлял 1:64 — 1:128).

Таблица. Индекс стимуляции лимфоцитов, вызванной фитогемагглютинином (ФГА) или полипептидным препаратом (ПП), полученным из ткани почек свиней, у крыс разных экспериментальных групп

Группа животных	Индуктор реакции бласттрансформации лимфоцитов	
	ФГА	ПП
Интактные крысы	1,76±0,01	1,58±0,02
Крысы, которым вводили полипептидный препарат	1,46±0,01*	1,20±0,04*
Крысы с экспериментальным нефритом, получавшие изотонический раствор NaCl	2,30±0,04*	2,60±0,15*
Крысы с экспериментальным нефритом, получавшие полипептидный препарат	1,45±0,04*	1,60±0,10

* $P < 0,01$

Полученные результаты ментального нефрита у крыс с вом локальной иммунологической локальной иммунной системы. Это под ергически отвечают не только и на комплекс полипептидных чек. Указанная активация л гуморального звена иммунитета к паренхиме почек. Это ве механизмов толерантности тального нефрита. Интересно, лекса полипептидных веществ цитов к РБТЛ и продукцию свидетелствует о некотором системы организма к антиген. лее того, известно, что состоя творимыми и низкомолекуляр но в дозе 0,1 ммоль/кг через в данные литературы в большо римента.

Таким образом, есть осно механизмов терапевтического ществ есть восстановление ес толерантности. Такой эффект болеваний, среди которых место.

I. P. Kaidashev

AN EFFECT OF RENAL POLYPEPT OF LYMPHOCYTES AT EXPERIMENT

A model of experimental nephritis in logy mentioned induces sharp morph kidneys. At the same time the stat response to phytohemagglutinin) and the immunity were studied. It is accompanied by intensification of and renal tissue antigens with a studies. To correct these damages a kidney parenchyma was applied. The of this complex on lymphocyte action of substances of this complex.

Poltava Medical Stomatological Institute Ministry of Public Health of Ukraine

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виленко М. В. Биологические на, 1978. — 190 с.
2. Иммунологические методы: Пер. С. 294—302.
3. Кайдашев И. П., Мищенко В. цитомединов на гемостаз, перек неспецифической резистентности Физиол. о-ва (Харьков, 17—21 с).
4. Кузник Б. И., Васильев Н. В., физическая резистентность орган
5. Культура животных клеток. Ме Мир, 1989. — С. 291—293.
6. Мищенко В. П., Кайдашев И. П. ных пептидов-цитомединов на г при экспериментальном нефрите С. 35—36.

Полученные результаты указывают на то, что развитие экспериментального нефрита у крыс сопровождается значительным расстройством локальной иммунологической регуляции и регуляции на уровне целостного организма. Это подтверждается тем, что лимфоциты гиперэргически отвечают не только на неспецифический стимулятор ФГА, но и на комплекс полипептидных веществ, выделенных из паренхимы почек. Указанная активация лимфоцитов сопровождается напряжением гуморального звена иммунитета, проявляющегося в гиперпродукции антител к паренхиме почек. Это свидетельствует, очевидно, о расстройстве механизмов толерантности при развитии у животных экспериментального нефрита. Интересно, что введение больным животным комплекса полипептидных веществ достоверно снижало способность лимфоцитов к РБТЛ и продукцию противопочечных антител, что, возможно, свидетельствует о некотором восстановлении толерантности иммунной системы организма к антигенам, полученным из паренхимы почек. Более того, известно, что состояние толерантности легче вызывается растворимыми и низкомолекулярными антигенами, которые вводят обычно в дозе 0,1 ммоль/кг через короткие промежутки времени [9, 10]. Эти данные литературы в большой мере соответствуют условиям эксперимента.

Таким образом, есть основания полагать, что одним из вероятных механизмов терапевтического действия комплекса полипептидных веществ есть восстановление естественного состояния иммунологической толерантности. Такой эффект очень важен в терапии аутоиммунных заболеваний, среди которых поражения почек занимают значительное место.

I. P. Kaidashev

AN EFFECT OF RENAL POLYPEPTIDES ON ACTIVITY OF LYMPHOCYTES AT EXPERIMENTAL NEPHRITIS

A model of experimental nephritis in Wistar rats has been used to show that the pathology mentioned induces sharp morphofunctional changes in the parenchyma of the kidneys. At the same time the state of the T-link (lymphocyte blast transformation response to phytohemagglutinin) and B-link (a titre of serum antirenal antibodies) of the immunity were studied. It is shown that development of experimental nephritis is accompanied by intensification of the lymphocytic response to phytohemagglutinin and renal tissue antigens with a simultaneous increase of a titre of antirenal antibodies. To correct these damages a complex of polypeptide substances isolated from the kidney parenchyma was applied. The results obtained demonstrate a normalizing effect of this complex on lymphocyte activity. A conclusion is made on possible tolerogenic action of substances of this complex.

Poltava Medical Stomatological Institute,
Ministry of Public Health of Ukraine

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виленко М. В. Биологические аспекты аллотрансплантации почки.— М.: Медицина, 1978.— 190 с.
2. Иммунологические методы: Пер. с нем. / Под ред. Г. Фримеля.— М.: Мир, 1987.— С. 294—302.
3. Кайдашев И. П., Мищенко В. П., Ксенз И. В. Влияние почечных полипептидов-цитомединов на гемостаз, перекисное окисление липидов и некоторые показатели неспецифической резистентности организма // Сб. материалов XII съезда Укр. физиол. о-ва (Харьков, 17—21 сент. 1990).— Киев.— 1990.— С. 131—132.
4. Кузник Б. И., Васильев Н. В., Цыбиков Н. Н. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма.— М.: Медицина.— 1989.— С. 304—306.
5. Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Р. Фрешни.— М.: Мир, 1989.— С. 291—293.
6. 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 // Патол. физиология.— 1991.— № 5.— С. 35—36.