

Специфический фактор переноса к антигенам *Staphylococcus aureus* влияет на активацию сокращения гладкомышечных клеток толстого кишечника

Т. Л. Давидовская, Н. С. Мирошниченко, Н. П. Фадеенко,
Н. В. Давидовская, Л. С. Холодная, Т. А. Любченко, Е. Г. Голева

Киевский университет имени Тараса Шевченка
Ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина

*Изучали влияние бычьего фактора переноса (ФП) в концентрации 10^{-6} — 10^{-3} мг/мл на сокращения гладкомышечных полосок (ГМП) *taenia coli*, вызванные гиперкалиевым раствором, а также действием нейромедиаторов. Установлено, что ФП потенцирует потенциалзависимый вход Ca^{2+} в клетку, изменяет чувствительность системы транспорта катионов в саркоплазматическом ретикулуме. ФП (10^{-4} мг/мл) угнетает вызванные ацетилхолином сокращения по неконкурентному механизму.*

Введение. Фактор переноса (ФП) иммунной реактивности впервые был описан в 1949 г. Лоуренсом как субстанция, которая переносит устойчивость к туберкулину [1]. Это гетерогенная смесь, в состав которой входит около 200 разнообразных низкомолекулярных соединений с молекулярной массой меньше 10 кДа. Ее активным компонентом является олигорибонуклеопептид с молекулярной массой 1—3 кДа [2]. Молекулы ФП обладают консервативной структурой. Они способны переносить антигенспецифическую реактивность через видовые барьеры без потери своих свойств [3]. ФП используется в клинической и экспериментальной практике западных стран для лечения первичных иммунодефицитных состояний, грибковых и паразитных инфекций, вирусных заболеваний [4, 5]. Проводятся исследования относительно использования специфического антигепатитного ФП в качестве вакцины [3]. Новым эффективным направлением в медицинской практике является применение этого

вещества для лечения инфекций бактериальной этиологии [6]. Несмотря на столь активное внимание к ФП в клинической практике, остаются открытыми вопросы о клеточном и молекулярном механизмах его действия.

Особый интерес представляет изучение его модулирующего влияния на клеточные процессы гладкомышечных клеток (ГМК) кишечника, поскольку разветвленная лимфоидная система последнего участвует в продуцировании ФП, обеспечивая местный иммунитет и нормальное функционирование пищеварительной системы. В лечебных целях ФП наравне с другими способами введения применяется орально. При этом, как показано, ферменты пищеварительного тракта не влияют на его активность [7].

В данной работе впервые исследовано влияние ФП на регуляторные механизмы сокращения гладкомышечных клеток *taenia coli* морских свинок.

Материалы и методы. Опыты проводили на гладкомышечных полосках *t. coli* морских свинок. Их сократительную активность исследовали в изометрическом режиме при оптимальной длине с помощью пьезоэлектрического датчика. Препараты

© Т. Л. ДАВИДОВСКАЯ, Н. С. МИРОШНИЧЕНКО,
Н. П. ФАДЕЕНКО, Н. В. ДАВИДОВСКАЯ, Л. С. ХОЛОДНАЯ,
Т. А. ЛЮБЧЕНКО, Е. Г. ГОЛЕВА. 1999

растягивали до такой степени, при которой проявлялся максимальный эффект вещества, индуцирующего сокращение. Сигналы регистрировали с помощью электрического потенциометра КСП-4. В опытах использовали раствор Кребса следующего состава (мМ): NaCl — 20,4; KCl — 5,9; NaHCO₃ — 15,5; NaH₂PO₄ — 1,2; MgCl₂ — 1,2; CaCl₂ — 2,5; глюкоза — 11,5; pH раствора равен 7,4. Гиперкалиевый раствор с концентрацией K⁺ 90 мМ готовили, заменяя в исходном растворе Кребса необходимую часть ионов Na⁺ на эквимоллярное количество ионов K⁺. ФП заданной концентрации вносили в раствор Кребса для промывания препаратов за 30 мин до изучения механической активности, вызываемой физиологически активными веществами.

Бычий специфический фактор переноса к корпускулярному антигену получали из диализованного бесклеточного экстракта лейкоцитов животных, сенсибилизированных к корпускулярному антигену штамма *Staphylococcus aureus* Cowan-1 (стандартный продуцент белка А) на кафедре микробиологии и общей иммунологии биологического факультета Киевского университета (Л. С. Холодная, Т. А. Любченко, Е. Г. Голева) по методу, описанному ранее [8]. ФП использовали в концентрациях 10⁻⁶—10⁻³ мг/мл по белку. В исследованиях применяли ацетилхолин хлорид (АХ, 10⁻⁷—5·10⁻³ М); фентоламин гидрохлорид (ФА, 10⁻⁶ М) («Sigma», США); пропранолол гидрохлорид (ППЛ, 10⁻⁶ М) («Veb Arzneimittelwerk», ФРГ); кофеин (КФ, 2·10⁻² М); нифедипин (НФ, 10⁻⁵ М) («Sigma»), атропин сульфат (АТ, 10⁻⁶ М) (Воронежский химфармзавод, Россия).

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятой методике [9].

Результаты и обсуждение. Как показали результаты экспериментов, ФП (10⁻⁶—10⁻³ мг/мл) не вызывал изменений тонуса ГМП. Известно, что удобной моделью для изучения состояния потенциалуправляемых кальциевых каналов гладкомышечных клеток является регистрация их сокращений, вызванных устойчивой гиперкалиевой деполяризацией мембраны. В опытах в ответ на аппликацию гиперкалиевого раствора с концентрацией ионов K⁺ 90 мМ ГМП *t. coli* генерировали фазные сокращения. Достигнув максимального значения, напряжение ГМК начинало спадать. Кривая после пикового спада выходила на плато, которое несколько превышало исходный уровень механического напряжения (рис. 1, а).

Непотенциалобусловленное влияние на активность Ca²⁺-каналов L-типа мембран гладкомышечных клеток, как следует из литературных данных [10], оказывают нейромедиаторы, выделяющиеся

из интрамуральных нервных окончаний и опосредующие свое действие через G-белки и систему вторичных посредников. В опытах добавление ФА (10⁻⁶ М) и ППЛ (10⁻⁶ М), а также АТ (10⁻⁶ М) снимало вышеописанный эффект — кривая возвращалась к исходному уровню с последующим незначительным снижением (рис. 1, б). Все дальнейшие опыты этой серии выполняли в тех же условиях. Влияние ФП на гиперкалиевое сокращение исследовали путем его предварительной аппликации с последующей заменой этого раствора на раствор, содержащий избыток ионов K⁺ (90 мМ). Установлено, что ФП дозозависимым способом увеличивал амплитуду таких сокращений (рис. 1, в—д). Например, при концентрации ФП 5·10⁻⁵ мг/мл амплитуда фазного компонента увеличивалась на 20,4±2,9 %, при 10⁻⁴ мг/мл — на 58,6±3,4 %, при 5·10⁻⁴ мг/мл — на 75,6±3,9 % (n = 6) (рис. 2). Как видно из рис. 1, 2, значительные изменения претерпевала также величина тонического компонента, которая при концентрации ФП 5·10⁻⁴ мг/мл составляла 90,3±5,4 % (n = 6) по отношению к амплитуде фазной компоненты.

Из литературы [11] известно, что калиевая деполяризация ГМК приводит к открытию Ca²⁺-каналов L-типа и появлению входного кальциевого тока через эти каналы. Реполяризация мембраны вызывает выход кальциевых каналов из инактивированного состояния. В наших экспериментах кинетика тонического компонента претерпевала значительные изменения. Последующая аппликация блокатора электроуправляемых кальциевых каналов L-типа нифедипина (10⁻⁵ М) приводила к расслаблению ГМП практически до исходного уровня (рис. 3, А). Приведенные выше результаты указывают на то, что потенцирование гиперкалиевых сокращений под действием ФП обеспечивается преимущественно за счет дополнительного входа Ca²⁺ извне в ГМК.

Однако оно может быть обусловлено также изменением чувствительности системы транспорта кальция в саркоплазматическом ретикулуме (СР). Известно, что высокие концентрации кофеина способствуют освобождению большинства локализованного в «реанодиново депо» СР Ca²⁺, а величина сократительного ответа при этом отражает его количество в депо [12]. Проведенные эксперименты показали, что в номинально бескальциевом растворе в присутствии ФП (10⁻⁴ мг/мл) амплитуда кофеиновых ответов увеличивается по сравнению с контролем, тогда как повышение на порядок его количества приводит к уменьшению этого показателя (рис. 3, Б, а—в). Учитывая это, можно сделать вывод о том, что потенцирование гиперкалие-

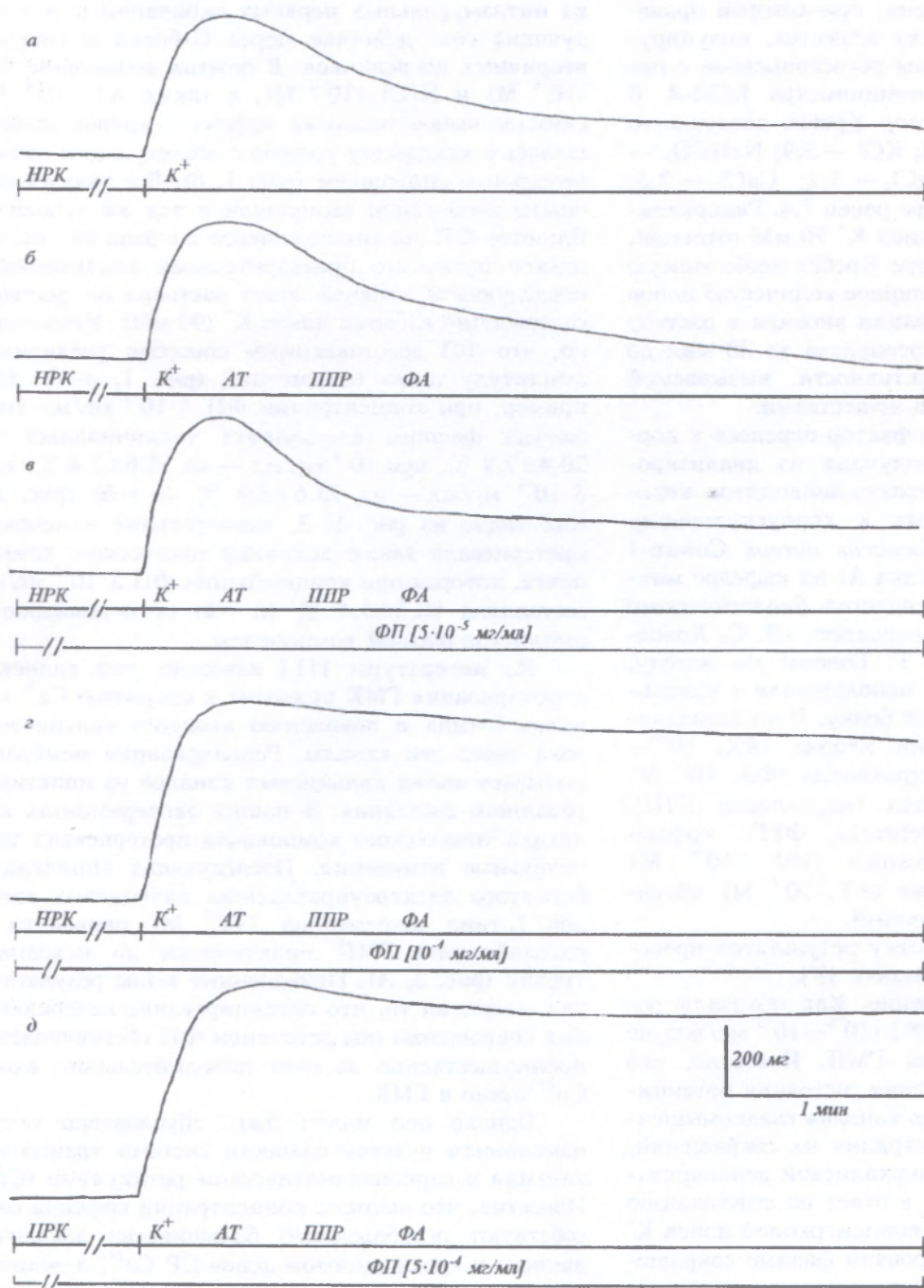


Рис. 1. Зависимость потенцирования контрактуры гладкомышечных клеток *t. coli* морских свинок, вызванной повышением концентрации ионов калия до 90 мМ (а — в отсутствие; б — в присутствии атропина — АТ, 10^{-6} М; фентоламина — ФА, 10^{-6} М; пропранолола — ППА, 10^{-6} М), от концентрации фактора переноса (в—д — $5 \cdot 10^{-5}$; 10^{-4} ; $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл в присутствии АТ, ФА, ППА в концентрациях, указанных выше)

вой контрактуры при концентрации ФП 10^{-3} мг/мл, по-видимому, обусловлено преимущественно повышением проницаемости мембраны ГМК для ионов Ca^{2+} , поступающих извне по потенциалуп-

равляемым Ca^{2+} -каналам, тогда как аналогичный эффект исследуемой субстанции в концентрации 10^{-4} мг/мл связан также с освобождением дополнительного количества этих катионов из СР.

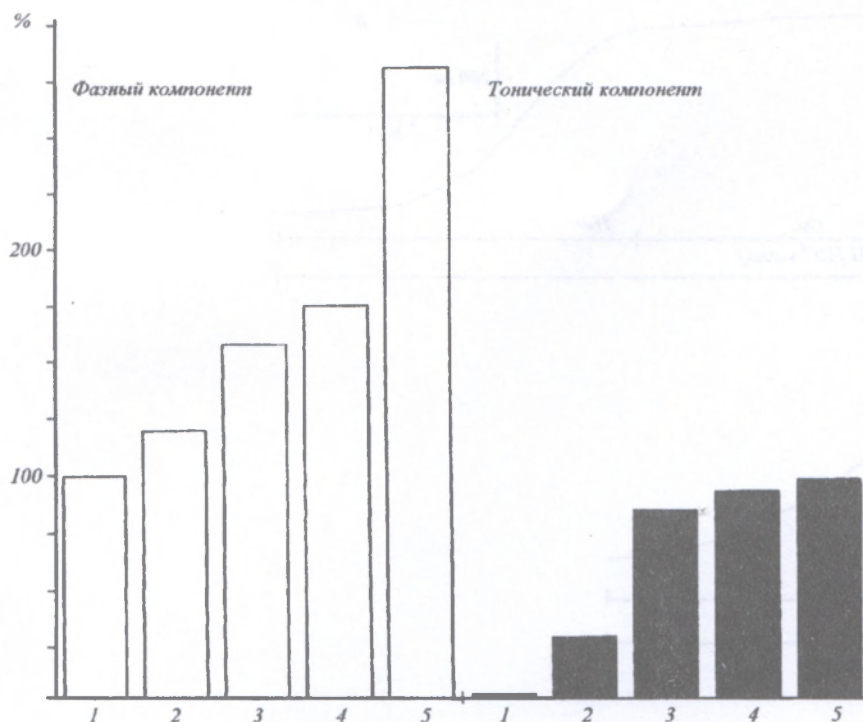


Рис. 2. Диаграмма статистически усредненных данных влияния фактора переноса (ФП, $5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-3} мг/мл) на 30-й мин его действия на сократительные реакции гладкомышечных полосок, вызванные аппликацией гиперкалиевого раствора (90 мМ) в присутствии атропина (АТ, 10^{-6} М), фентоламина (ФА, 10^{-6} М), пропранолола (ППР, 10^{-6} М). По оси ординат — значения величин фазного и тонического компонентов сокращения. За исходный уровень (100 %) фазного компонента принята амплитуда сокращения до начала действия ФП. Рост величины тонического компонента рассчитывали по отношению к значению фазного компонента, принятого за 100 %: 1 — контроль; 2 — ФП, $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл; 3 — ФП, 10^{-4} мг/мл; 4 — ФП, $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл; 5 — ФП, 10^{-3} мг/мл

Как показано в нашей предыдущей работе [13], мускариновые ацетилхолиновые рецепторные комплексы (лигандсвязывающий центр — молекулы сократительного аппарата) ГМК являются мишенями действия активных субстанций *St. aureus*: белка А (БА) и пептидогликана (ПГ). В этой связи представляло интерес изучить действие ФП к антигенам стафилококка на проведение рецепторного сигнала в этих клетках. Для этого исследовали его влияние на сокращения ГМК *t. coli*, вызванные АХ. Доказательством действия АХ на мускариновые рецепторы являлась конкурентная блокада эффекта агониста атропином.

Как показали результаты наших экспериментов (рис. 4, А, 1), E_0 (концентрация АХ, при которой достигается 50 % максимального сокращения) для зависимости $-\lg[AX]$ (амплитуда сокращения) составила $6,3 \cdot 10^{-6}$ М, что в 3,5 раза больше, чем для миометрия [13]. Анализ реакции ГМК на агонист в присутствии ФП в концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} мг/мл не выявил ее достоверных изменений. Увеличение на порядок количества этой субстанции приводит к сдвигу дозовой кривой в сторону больших концентраций. При этом E_0 становится

равной $7,9 \cdot 10^{-5}$ М. Для объяснения полученных результатов было сделано предположение о неконкурентном механизме ингибирования фактором переноса АХ-вызванных сокращений. Действие АХ на холинорецепторы описывается известным уравнением Хилла:

$$F = F_0 \cdot \frac{[AX]^k}{K_M + [AX]^k},$$

где $[AX]$ — концентрация лиганда; F — сила, развиваемая ГМП в ответ на действие АХ; F_0 — максимальная сила, развиваемая препаратом при избытке АХ; K_M — сродство АХ к рецептору; k — коэффициент кооперативности. Данное уравнение перепишем для случая развития мышцей сокращения на АХ в присутствии ФП:

$$F_A = \frac{K_u}{K_u + [A]} \cdot \left[F_0 \cdot \frac{[AX]^k}{K_M + [AX]^k} \right],$$

где K_u — кажущаяся константа ингибирования; F_A — сила, развиваемая ГМП в ответ на действие АХ в присутствии ФП; $[A]$ — концентрация ФП. Поскольку величины F , F_A , $[AX]$ известны из экспериментов, то выражение для определения K_u

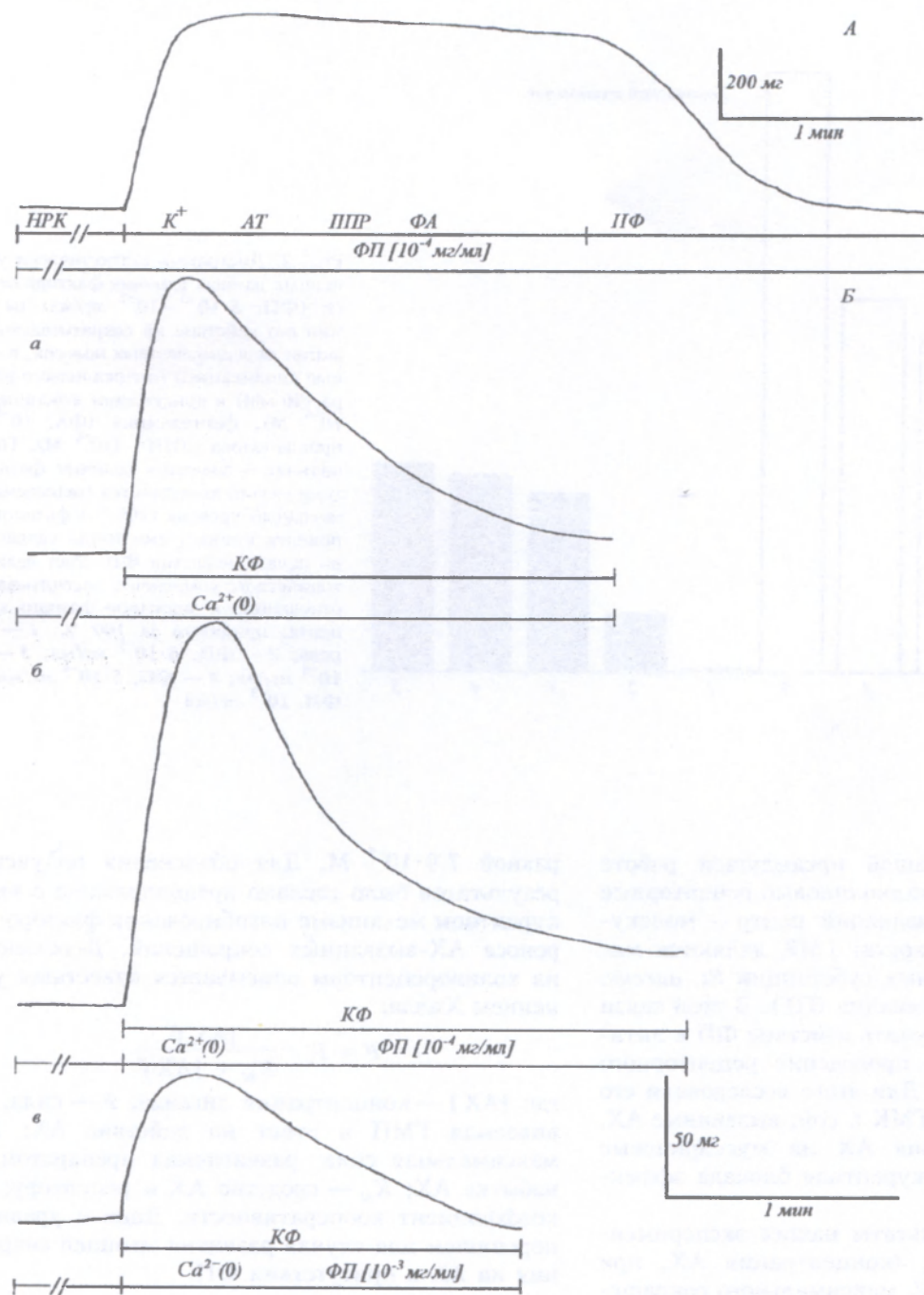


Рис. 3. А — влияние нифедипина (НФ) в концентрации 10^{-5} М на изменение тонического компонента гиперкальциевой контрактуры (К⁺, 90 мМ) в присутствии фактора переноса (ФП, 10^{-4} мг/мл), фентоламина (ФА, 10^{-6} мг/мл), атропина (АТ, 10^{-6} мг/мл), пропранолола (ППР, 10^{-6} мг/мл). НПК — нормальный раствор Кребса; Б — влияние ФП на вызванные кофеином (КФ, 20 мМ) сокращения в номинально бескальциевом растворе (Ca^{2+} , 0): а — в отсутствие и б, в — в присутствии ФП в концентрациях 10^{-4} , 10^{-3} мг/мл соответственно

исходя из двух предыдущих уравнений приобретает следующий вид:

$$K_u = [A] \cdot \frac{F_A/F}{1 - F_A/F}$$

Произведенные вычисления показали, что K_u для *t. coli* составляет $6,5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл (коэффициент вариации $S_v = 14,2\%$), что меньше, чем для БА ($8,4 \cdot 10^{-4}$ мг/мл) и ПГ ($5,8 \cdot 10^{-4}$ мг/мл), установ-

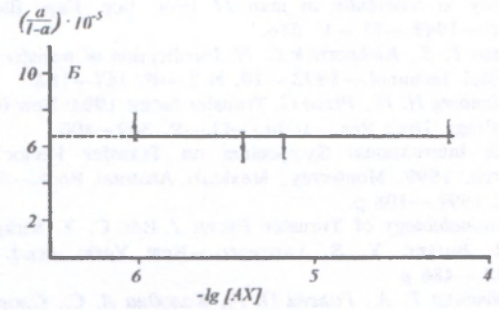
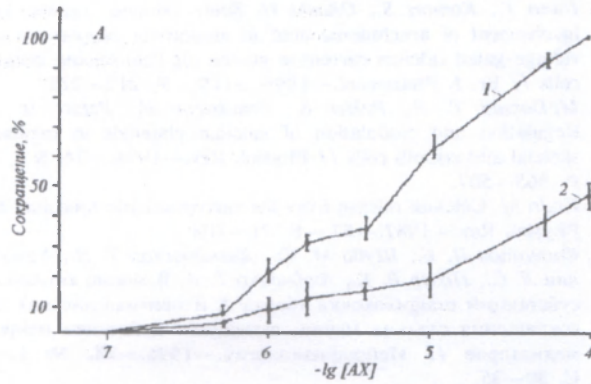


Рис. 4. А — кривые доза—эффект, полученные на изолированных полосках *taenia coli* при аппликации ацетилхолина в отсутствие (1) и присутствии (2) фактора переноса (ФП) в концентрации 10^{-4} мг/мл; Б — определение кажущейся константы ингибирования (ФП, 10^{-7} мг/мл) сократительных ответов гладких мышц *taenia coli* морских свинок на аппликацию ацетилхолина: a — отношение сократительных ответов, определяемое выражением v_i/v , где v_i — сократительный ответ в присутствии ФП; v — сократительный ответ в отсутствие этого вещества, но при той же концентрации ацетилхолина

ленных нами ранее для ГМК миометрия [13]. График, построенный в координатах K_u — $(-lg [AX])$ (рис. 4, Б), оказался прямой, параллельной оси абсцисс, что, согласно методу Хантера и Даунса [14], подтверждает ранее сделанное предположение о неконкурентном характере ингибирования ФП (10^{-4} мг/мл) АХ-сокращений. Установлено, что в номинально бескальциевом растворе Кребса исследуемая субстанция также угнетает «АХ вызванные ответы».

В заключение можно отметить, что ФП, являясь биологически активным веществом, оказывает непосредственное действие на функциональное состояние ГМК кишечника. Центральным звеном в цепи событий, приводящих к модуляции этим веществом сокращений, является изменение мембранных и внутриклеточных механизмов транслокации ионов Ca^{2+} , а именно: активируя потенциалзависимый вход Ca^{2+} в клетку, ФП приводит в зависимости от концентрации к потенцированию (10^{-4} мг/мл) или ингибированию (10^{-3} мг/мл) Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} из реанодинчувствительного депо СР гладкомышечных клеток. Исследуемая субстанция изменяет также чувствительность системы транспорта Ca^{2+} в инозитолтрифосфатчувствительной части саркоплазматического ретикулума, угнетая ее.

Т. Л. Давидовська, Н. С. Мірошниченко, Н. П. Фадєєнко,
Н. В. Давидовська, Л. С. Холодна, Т. А. Любченко, О. Г. Голєва

Специфічний фактор переносу до антигенів *Staphylococcus aureus* впливає на активацію скорочення гладеньком'язових клітин товстого кишечника

Резюме

Вивчали вплив бичачого фактора переносу (ФП) у концентрації 10^{-3} — 10^{-7} мг/мл на скорочення гладеньком'язових смужок (ГМС) *taenia coli*, спричинені гіперкальсєвим розчином, а також дією нейромедіатора. З'ясовано, що ФП понижє потенціалзалежний вхід Ca^{2+} у клітину, змінює чутливість системи транспорту катіонів у саркоплазматичному ретикулумі. ФП (10^{-4} мг/мл) пригнічує викликані ацетилхоліном скорочення за неконкурентним механізмом.

T. L. Davidovskaya, N. S. Miroshnichenko, N. P. Fadeyenko,
N. V. Davidovskaya, L. S. Kholodnaya, T. A. Lyubchenko,
O. G. Goleva

Specific transfer factor to *Staphylococcus aureus* antigens influences on the activation of caecum smooth muscle contraction

Summary

The influence of a transfer factor of cell-mediated immune response (TF) (10^{-3} — 10^{-7} mg/ml) on the guinea-pig *taenia coli* smooth muscle contraction was investigated under isometric conditions by tensometric method. It was found that TF stimulated potential-dependent cell membrane Ca^{2+} reallocations, changed the cations transport system sensitivity in sarcoplasmic reticulum, inhibited contraction of pharmacomechanical coupling type by dose-dependent manner.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawrence H. S. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.—1949.—71.—P. 516.
2. Rozzo T. S., Kirkpatrick C. H. Purification of transfer factors // Mol. Immunol.—1992.—29, N 2.—P. 167—182.
3. Fudenberg H. H., Pizza G. Transfer factor 1993: New frontiers // Progr. Drug Res.—1994.—42.—P. 309—400.
4. XIth International Symposium on Transfer Factor (2—5 March, 1999, Monterrey, Mexico): Abstract Book.—Monterrey, 1999.—108 p.
5. Immunobiology of Transfer Factor / Eds C. Y. Kirkpatrick, P.R. Burger, Y. S. Lawrence.—New York: Acad. press, 1983.—486 p.
6. Любченко Т. А., Голева О. Г., Холодная Л. С., Смирнов В. В., Вершигора А. Ю. Біологічна активність фактора переносу, індукованого бактеріальними антигенами // Мікробіол. журн.—1997.—59, № 5.—С. 83—100.
7. Kirkpatrick C. H., Hamad A. R., Morton L. C. Murine transfer factor: dose response relationship and routes of administration // Cell. Immunol.—1995.—164, N 2.—P. 203.
8. Любченко Т. А., Голева О. Г., Холодная Л. С., Степанчук В. А., Вершигора А. Ю. Людський специфічний фактор переносу до антигенів *Staphylococcus aureus* // Фізіол. журн.—1997.—43, № 3—4.—С. 25—32.
9. Лакін Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. школа, 1990.—352 с.
10. Unno T., Komori S., Ohashi H. Some evidence against the involvement of arachidonic acid in muscarinic suppression of voltage-gated calcium current in guinea pig ileal smooth muscle cells // Br. J. Pharmacol.—1996.—119.—P. 213—222.
11. McDonald T. F., Pelzer S., Fraitwein W., Petzer D. J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth cells // Physiol. Rev.—1994.—74, N 2.—P. 365—507.
12. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum // Physiol. Rev.—1987.—57.—P. 71—108.
13. Филиппов И. Б., Шуба М. Ф., Давидовская Т. Л., Холодная Л. С., Позур В. К., Любченко Т. А. Влияние активных субстанций стафилококка (белка А и пептидогликана) на сокращения гладких мышц, вызванные действием нейромедиаторов // Нейрофизиология.—1996.—28, № 1.—С. 30—35.
14. Hunter A., Downs C. E. The inhibition of ardinase by amino acids // J. Biol. Chem.—1945.—157, N 2.—P. 427—438.

УДК 577.3

Поступила в редакцию 13.04.99