

ФАКТОР ПЕРЕНОСУ ІМУННОЇ РЕАКТИВНОСТІ ДО КОРПУСКУЛЯРНИХ АНТИГЕНІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА МОДУЛЮЄ АТФ-азну АКТИВНІСТЬ ТА СУПЕРПРЕЦИПІТАЦІЮ АКТОМІОЗИНУ СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА

О.В. Цимбалюк, Т.Л. Давидовська, К.І. Богуцька

Київський національний університет імені Тараса Шевченка; біологічний факультет, кафедра біофізики
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна

biophys@univ.kiev.ua

Надійшла до редакції 15 лютого 2005 р.

У представлений роботі досліджувався вплив фактора переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* на АТФ-азну активність та реакцію суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза. Очікувані результати експериментальних досліджень вказують на здатність цієї імуноактивної субстанції лейкоцитів підсилювати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність та змінювати параметри реакції суперпреципітації актоміозину, а за певних умов – частково усувати пригнічувальну дію донора екзогенного оксиду азоту – нітропрусиду натрію.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фактор переносу, актоміозин, суперпреципітація, АТФ-аза, серцевий м'яз, NO.

Фактор переносу (ФП) імунної реактивності до корпускулярних антигенів золотистого стафілокока – це мембраносекретований діалізабельний компонент лізату імуноактивних клітин, здатний за короткий проміжок часу підсилювати антигенспецифічну імунну відповідь [1-5]. З літературних джерел [6, 7] відомо, що ця імуноактивна субстанція лейкоцитів деполаризує мембрану гладеньких м'язів (ГМ) *taenia coli* версальних свинок та підсилює їх спонтанні скорочення. Вона активує потенціалзумовлений транспорт позитивних іонів кальцію до гладеньком'язових клітин, модулює механізми збуджувальної дії такого агоніста як ацетилхолін (збільшує як початковий фазний, так і наступний тонічний компоненти агоніст викликаних скорочень гладеньком'язових смужок). У той же час, блокатор кальцієвих каналів L-типу ніфедипін пригнічує, підвищений фактором переносу, тонічний компонент ацетилхолінових скорочень. Також відомо, що фактор переносу усуває пригнічувальну дію екзогенного донора NO – нітропрусиду натрію (НПН) на спонтанні скорочення гладеньких м'язів *taenia coli*, потенціюючи появу ритмічних скорочень. ФП модулює пригнічувальну дію НПН на механізми збуджувальної дії ацетилхоліну в цих же м'язах. Регуляторні механізми гальмівної дії екзогенного аденозин-5'-трифосфату (АТФ) в гладеньких м'язах кишечника фактором переносу трансформуються у збуджувальну. Встановлено також, що фактор переносу не пригнічує гальмівну дію екзогенного норадреналіну на ГМ кишечника, хоча кінцевий ефект гальмування АТФ та норадреналіну однакові щодо активації апамянчутливих Ca^{2+} -залежних калієвих каналів низької провідності мембрани гладеньком'язових клітин. Отже, судячи з приведених вище даних літературних джерел, фактор переносу є ефективним модулятором мембранних та внутрішньоклітинних механізмів передачі сигналів нейромедіаторів збудження та гальмування в збудливих клітинах.

Метою нашої роботи було дослідити дію фактора переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* на функціональну активність скорочувального апарату серцевого м'яза, робота якого, як відомо [8], супроводжується взаємодією контрактильних білків – актину та міозину. Саме міозин є молекулярним мотором, який забезпечує перетворення хімічної енергії гідролізу АТФ у механічну роботу м'язового скорочення [8, 9]. Відповідно до цього, функціональною характеристикою білків скорочувального апарату є АТФ-азна активність, яка визначається інтенсивністю гідролізу АТФ з утворенням АДФ та фосфату. У даній роботі ми вивчали дію фактора переносу на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність та суперпреципітацію натурального актоміозину. Цікавим також було дослідити властивості цієї субстанції щодо здатності модулювати пригнічену нітропрусидом натрію його АТФ-азну активність.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

Виділення натурального актоміозину проводили за методом Маргосян [10] з деякими модифікаціями. Екстракцію актоміозину проводили розчином, що містив 0,2 М КСl, 0,15 М трис-НСl, рН 8,8, 1 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl_2 , 0,2 мМ PMSF, 1 мМ NaN_3 , 3,5 мМ АТФ. Білковий препарат очищали перекладанням 10 об'ємами води та розчиняли в 0,6 М КСl. Склад препаратів контролювали методом електрофорезу.

АТФ-азну активність актоміозину вимірювали за кількістю утвореного при гідролізі АТФ неорганичного фосфату, який визначали за методом Фіске-Суббароу [11]. Вимірювання АТФ-азної активності актоміозину проводили в інкубаційному середовищі (загальний об'єм складав 1,8 мл), яке

містило 20 мМ імідазол, рН 7,5, 5 мМ $MgCl_2$ та 0,1 мМ $CaCl_2$ (іонна сила середовища створювалась 0,08 мМ KCl). АТФ-азну реакцію ініціювали додаванням до середовища інкубації білка, концентрація якого в кінцевому об'ємі реакційної суміші становила 0,28 мг/мл. Тривалість інкубації актоміозину при температурі 37°C у присутності АТФ (1,0 мМ) становила 5 хв. АТФ-азну реакцію зупинили додаванням трихлороцтової кислоти до кінцевої концентрації 2,5%.

Кінетику процесу суперпреципітації (СПП) актоміозину реєстрували за зміною оптичної густини при довжині хвилі 450 нм протягом 15 хв. в реакційній суміші (загальний об'єм – 2 мл): 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 0,15 М KCl , 20 мМ трис- HCl , рН 7,5, 0,1 мг/мл білка. Реакцію суперпреципітації ініціювали внесенням до середовища розчину АТФ. З одержаних кінетичних кривих знаходили $t_{1/2}$ – час, який необхідний для досягнення половини ($D_M - D_0$), де D_0 – початкова оптична густина актоміозину в ході реакції суперпреципітації, D_M – оптична густина актоміозину після завершення реакції суперпреципітації.

У дослідах використовували препарати ФП, отримані на кафедрі мікробіології та загальної імунології біологічного факультету Київського національного університету.

ФП вносили в середовище інкубації актоміозину і витримували при температурі 37°C протягом 15 хв. до початку ініціації АТФ-азної реакції з метою зрівноважування температурних умов та надання можливості провзаємодіяти з білками.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятою методикою [12].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.

Досліджували дію фактора переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* в концентраціях 10^{-7} - 10^{-2} мг/мл на показники Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності препаратів натурального актоміозину з серцевого м'яза за умов низької іонної сили інкубаційного середовища (рис. 1).

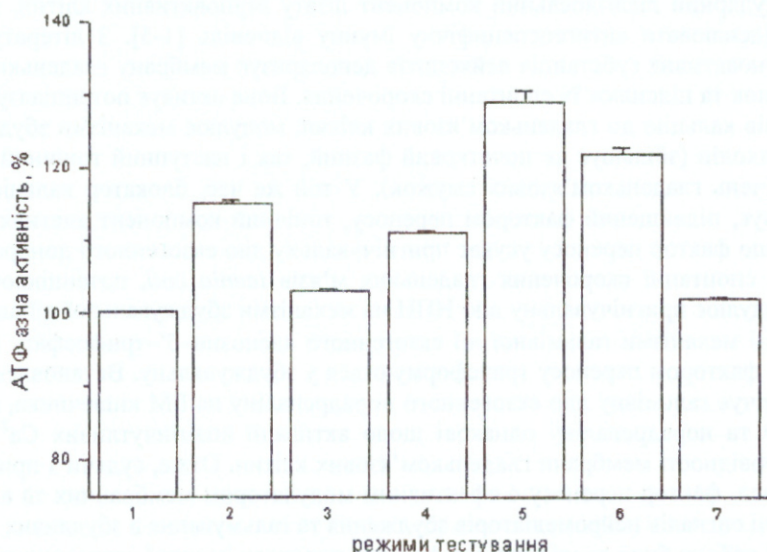


Рис. 1. Гістограма залежності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності актоміозину серцевого м'яза від концентрації фактора переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* в середовищі інкубації. За 100% прийнято АТФ-азну активність актоміозину в контролі (1). 2, 3, 4, 5, 6, 7 – концентрації ФП відповідно: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} та 10^{-7} мг/мл.

Встановлено, що ФП в концентрації 10^{-7} мг/мл не викликав у порівнянні з контролем, прийнятим за 100%, статистично достовірних змін ($102,0 \pm 0,3\%$, $n=8$, $p>0,05$) АТФ-азної активності актоміозину. При наступному збільшенні концентрації субстанції до 10^{-6} мг/мл спостерігали підвищення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності актоміозину, яке складало ($122,4 \pm 0,8\%$, $n=8$, $p<0,05$). Максимальна активація АТФ-азної активності актоміозину досягалася в присутності фактора переносу в концентрації 10^{-5} мг/мл. За даних умов вона становила по відношенню до контролю, прийнятого за 100%, ($129,8 \pm 1,5\%$, $n=8$, $p<0,05$). Під час подальшого зростання концентрації субстанції до 10^{-4} мг/мл відбувалось зниження ефекту активації фактором переносу ферментативної активності актоміозину, яка становила ($111,0 \pm 0,4\%$, $n=8$, $p<0,05$). З'ясовано також, що фактор переносу в концентрації 10^{-3} мг/мл не викликав статистично достовірних змін АТФ-азної активності актоміозину. Її показники були на рівні контролю. Збільшення концентрації

Фактор переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів ...

збільшенні на один порядок знову приводило до підвищення ферментативної активності препаратів, вимірювана якої становила $(115,3 \pm 0,5)\%$, $n=8$, $p<0,05$).

У наступній серії експериментів досліджували дію фактора переносу на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність, модульовану попередньо впливом нітропрусиду натрію. Перш за все, було встановлено, що нітропрусид натрію в концентрації 5 мМ у порівнянні з контролем, прийнятим за 100%, пригнічує (на $(39,8 \pm 1,6)\%$, $n=9$, $p<0,05$) АТФ-гідролазну активність препаратів актоміозину (рис. 2).

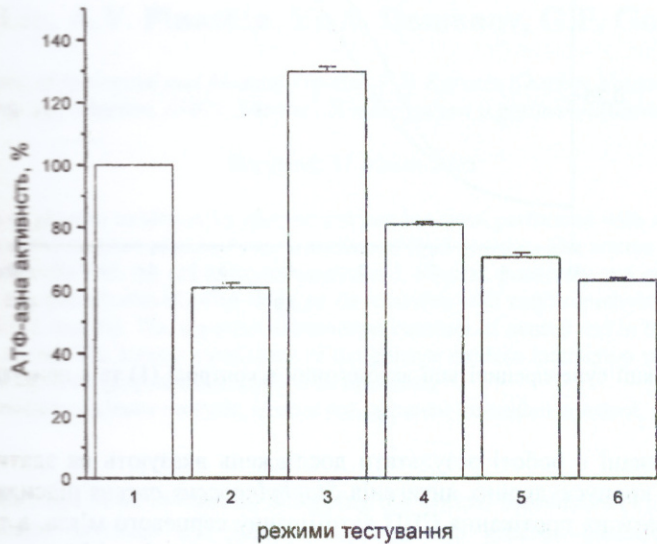


Рис. 2. Гістерезис змін фактором переносу (ФП) імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності актоміозину серцевого м'язу, пригніченої донором екзогенного NO – нітропрусидом натрію (НПН). За 100% прийнято АТФ-азну активність у контролі (1). 2 – АТФ-азна активність за умов додавання НПН (5 мМ) до середовища інкубації; 3 – за умов додавання ФП (10^{-5} мг/мл); 4 – за умов попередньої інкубації (10 хв.) препаратів в середовищі, до складу якого входив фактор переносу (10^{-5} мг/мл) та наступного додавання до нього нітропрусиду натрію (5 мМ); 5 – за умов попередньої інкубації (10 хв.) препаратів актоміозину в середовищі, до складу якого входив НПН (5 мМ) та наступного додавання до нього фактора переносу (10^{-5} мг/мл); 6 – за умов одночасного внесення до середовища інкубації актоміозину НПН (5 мМ) та ФП (10^{-5} мг/мл).

Внесення в інкубаційне середовище, до складу якого входив нітропрусид натрію у зазначеній вище концентрації, фактора переносу в концентрації 10^{-5} мг/мл супроводжувалось не зменшенням, а навпаки – збільшенням Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності, у порівнянні зі значенням цього параметру в присутності НПН. Порівняно з контролем (АТФ-азна активність за відсутності НПН), прийнятим за 100%, АТФ-азна активність препаратів актоміозину за даних умов становила $(80,0 \pm 0,8)\%$, $n=9$, $p<0,05$.

В іншій серії дослідів проводили попередню (протягом 10 хв.) інкубацію препаратів актоміозину в середовищі, до складу якого входив фактор переносу. У подальшому до цієї суміші додавали нітропрусид натрію в концентрації 5 мМ. Встановлено, що субстанція лейкоцитів певною мірою усуває пригнічувальний ефект НПН на АТФ-азну активність актоміозину. Величина цього параметра становила $(70,4 \pm 1,4)\%$, $n=9$, $p<0,05$. Крім того, проводили попарне комбінування речовин так, що у тестоване середовище вносили одночасно фактор переносу (10^{-5} мг/мл) та нітропрусид натрію у зазначеній вище концентрації. З'ясовано, що за даних умов, АТФ-азна активність була такого ж порядку, як і при дії нітропрусиду натрію.

На рис. 3 наведено кінетичні криві Mg^{2+} -залежної реакції суперпреципітації актоміозину серцевого м'язу в контролі (1) та в присутності фактора переносу в концентрації 10^{-2} мг/мл (2). Криві суперпреципітації актоміозину характеризувались значенням часового параметра $t_{1/2}$, яке для контролю становило 3,4 хв., а в присутності ФП – 2,5 хв., тобто в присутності фактора переносу в досліджуваній концентрації спостерігалось зменшення максимального значення оптичної густини, а також часу досягнення її напіваксімуму в порівнянні з контролем.

Таким чином, у роботі проведено дослідження впливу фактора переносу на біохімічні процеси, що відносять молекулярний механізм скорочення м'язів, – АТФ-гідролазну реакцію та суперпреципітацію актоміозинового комплексу.

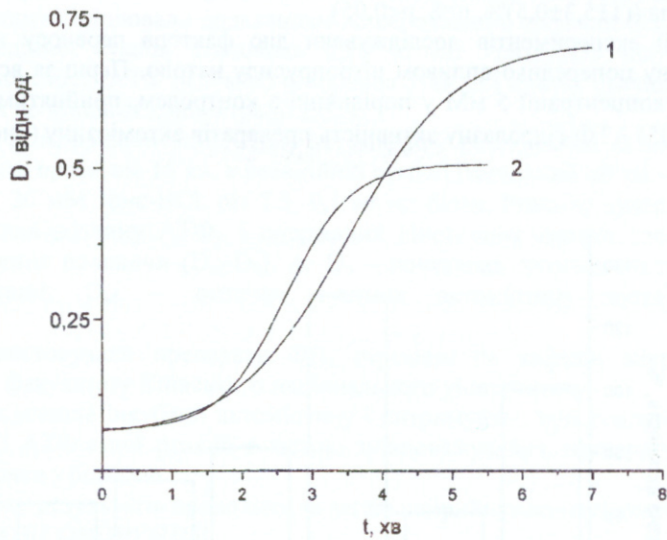


Рис. 3. Кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину в контролі (1) та в присутності фактора переносу в концентрації 10^{-2} мг/мл (2).

ВИСНОВКИ. Одержані в роботі результати досліджень вказують на здатність фактора переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* підсилувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність та впливати на протікання СПП актоміозину серцевого м'яза, а також за певних умов – частково усувати пригнічувальну на нього дію нітропрусиду натрію. Можна припустити, що фактор переносу здатний взаємодіяти з актоміозиновим комплексом: така взаємодія супроводжується зміною величини АТФ-азної активності та параметрів реакції суперпреципітації актоміозину. Можливо, модифікація білків скорочувального апарату серцевого м'яза фактором переносу може мати захисне значення при стафілококовому ураженні міокарду.

Автори вдячні професору кафедри мікробіології та загальної імунології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, доктору біологічних наук Холодній Л.С. за люб'язно наданий для досліджень фактор переносу імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lawrence H.S., Borkowsky W. Transfer factor-current status and future prospects // *Biotherapy*. – 1996. – V. 9, № 1-3. – P. 1-5.
2. Kirkpatrick C.H. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules // *Mol. Med.* – 2000. – V. 6, № 4. – P. 332-341.
3. Holeva O.H., Paster I.P., Lyubchenko T.A., Paster Ie.U., Kholodna L.S., Zamotaierva H.A., Hrodzins'kyi D.M. The immune reactivity transfer factor as a modulator of lymphocyte functional activity in rats // *Fiziol. Zh.* – 2000. – V. 46, № 4. – P. 58-65.
4. Любченко Т.А., Голева О.Г., Холодна Л.С., Смирнов В.В., Вершигора А.Ю. Біологічна активність Фактора переносу індукваного бактеріальними антигенами // *Мікробіол. журн.* – 1997. – Т. 59, № 5. – С. 83-100.
5. Любченко Т.А. Імунобіологічна активність фактора переносу імунної реактивності, індукваного бактеріальними антигенами: Дис ... канд. біол. наук: 14.03.08. – К., 1999. – 150 с.
6. Давидовська Т.Л., Філіппов І.Б., Цимбалюк О.В., Шуба М.Ф., Холодна Л.С. Фактор переносу модулює гальмівну дію нейромедіаторів на гладенькі м'язи кишечника // *Фізіол. журн.* – 2002. – Т. 43, № 5. – С. 9-16.
7. Fadeenko N.P., Davidovskaya T.L., Lyubchenko T.A., Goleva E.G., Kholodnya L.S., Shuba M.F. Transfer factor role on signal transduction // *Abstracts of the XI International Congress of transfer factor*. – Mexico (Mexico). – 1999. – P. 18.
8. Зима В.Л. Белковые моторы: структура и генерация механической силы // *Укр. биохим. журн.* – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 23-38.
9. Данилова В.М. Біохімічні механізми регуляції скорочення гладеньких м'язів // *Біополімери і клітина*. – 1996. – Т. 12, № 4. – С. 5-24.
10. Margossian S. S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain and its influence on ATP hydrolysis // *J. Biochem.* – 1985. – V. 260, № 25. – P. 13747-13754.
11. Северин С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1989. – 509 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.