

Т.Л.Давидовська, І.Б.Філіппов, О.В.Цимбалюк, М.Ф.Шуба, Л.С.Холодна

## Фактор переносу модулює гальмівну дію нейромедіаторів на гладенькі м'язи кишечника

*Установлено, що фактор переноса (ФП) к антигенам Staphylococcus aureus, блокує аденозинтрифосфат (АТФ), обумовлений компонент тормозних синаптичних потенціалів, угнетающее действие экзогенного АТФ трансформірує в возбуждающее (вместо гиперполяризации плазматической мембраны гладкомышечных клеток вызывает деполяризацию) гладких мышц taenia coli. Субстанция ( $10^{-6}$  мг/мл) трансформірує расслабляющее действие нитропруссиды натрия на гладкомышечные полоски в возбуждающее. Концентрации ФП ( $10^{-5}$  -  $10^{-3}$  мг/мл) несколько потенцируют расслабляющее действие экзогенного оксида азота. Механизмы, связанные с активацией как  $\alpha$ - так и  $\beta$ -адренорецепторов в гладких мышцах taenia coli не чувствительны к действию субстанции.*

### ВСТУП

У попередніх наших дослідженнях було показано [4,10], що такі активні субстанції золотистого стафілокока, як  $\alpha$ -токсин, білок А, пептидоглікан впливають також на регуляторні механізми скорочення - розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) *taenia coli*, *caecum* і міометрія морських свинок. Ефективним механізмом боротьби імунної системи з бактеріальною інфекцією вважають синтез лімфоцитами активної речовини олігорибонуклеопептидної природи з молекулярною масою 1 – 3 кДа, яка отримала назву «Фактор переносу» (ФП) [8,12]. Пептидна частина молекули ФП за кількістю та комбінацією амінокислотних залишків, що визначають його антигенну специфічність, варіює. За допомогою амінокислотного аналізу ФП різної антигенспецифічності у його пептидному компоненті виявлено 18 з 20 амінокислот. Це дає можливість стверджувати, що антигенспецифічність ФП зумовлена довільною комбінацією амінокислот у пептидному ланцюгу, що забезпечує  $8^{18}$  потенційних комбінацій [8,9,12]. Імунологічні дослідження [14] показали, що ФП не токсичний для

організму і не є антигеном. За кордоном випускають медичні препарати лейкоцитарних ультрафільтратів з активністю ФП. Їх отримують з лейкоцитарної маси людини та мольозива імунізованих тварин. Використовуються такі препарати в клініці для лікування захворювань, викликаних вірусом СНІДу, Епштейна – Барра на тлі онкологічного процесу, енцефаліту, гепатиту А, В, С, герпесу, грибкових захворювань (хронічні кандидози) та захворювань, зумовлених бактеріями (пневмонія – збудник *Actinobacillus pleuropneumoniae*, бруцельоз – *Brucellus abortus*, септичний шок тощо) [2, 8].

Метою нашого дослідження було вивчити вплив ФП до антигенів золотистого стафілокока на гальмівну дію нейромедіаторів у ГМ кишечника.

### МЕТОДИКА

Досліди проводили на гладеньком'язових смужках (ГМС) *taenia coli* морських свинок зі збереженими інтрамуральними нервовими елементами. Скоротливу активність м'язових препаратів досліджували в ізометричному режимі за допомогою електромеханічного

перетворювача 6МХ-1С та електричного потенціометра КСП-4. У дослідях використовували розчин Кребса (ммоль/л): NaCl - 120,4, KCl - 5,9, NaHCO<sub>3</sub> - 15,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,2, MgCl<sub>2</sub> - 1,2, CaCl<sub>2</sub> - 2,5, глюкоза - 11,5; рН 7,4. Гіперкалієвий розчин з концентрацією іонів K<sup>+</sup> 80 ммоль/л готували заміною у вихідному розчині Кребса частини іонів натрію на еквімолярну кількість іонів калію. Номінально безкальцієвий розчин Кребса готували заміною у ньому іонів кальцію на еквімолярну кількість Mg<sup>2+</sup>. ФП у концентраціях 10<sup>-6</sup> - 10<sup>-3</sup> мг/мл додавали до розчину Кребса.

Бичачий специфічний ФП до корпускулярного антигена було отримано на кафедрі мікробіології та загальної імунології біологічного факультету Київського національного університету з діалізованого безклітинного екстракту лейкоцитів тварин, сенсibilізованих до корпускулярного антигена штаму *St. aureus Cowan-1* (стандартний продуцент білка А) [9].

Відведення електричної активності ГМС здійснювали за допомогою модифікованого методу одинарного сахарозного містка [1]. Синаптичні потенціали викликали поодиноким подразненням інтрамуральних нервових волокон у товщі м'язової смужки імпульсами електричного струму тривалістю 0,5 - 1,0 мс за наявності атропіну концентрацією 10<sup>-5</sup> моль/л.

У дослідях використовували речовини: динатрієва сіль аденозин-5'-трифосфорної кислоти (АТФ, «Reanal»); ізопреналін («Sigma», США), NG-nitro-L-arginin (L-NNA, «Sigma», США), Cibacron Blue F3G-A (СВ, «RBI», США); піридоксилсульфат-6-азофеніл-2',4'-бісульфонієва кислота (ПСАБК, «RBI», США); ацетилхолін хлорид (АХ, «Мосмедпрепарати», Росія), норадреналін («Sigma», США), атропін сульфат (Воронезький хімзавод, Росія); нітропрурид натрію (НПН, «Союзхімреактив», Росія).

Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи критерій t Стьюдента. Статистично достовірними вважали значення P<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій серії експериментів досліджувався вплив ФП на пригнічувальну дію АТФ (10<sup>-5</sup> моль/л) на спонтанні скорочення м'язових смужок. Аплікація АТФ супроводжувалася розслабленням ГМС і пригніченням їх поодиноких спонтанних скорочень (рис. 1,а,б). Після цього до розчину Кребса з АТФ додавали ФП у концентрації 10<sup>-6</sup> мг/мл. Це призводило до появи поодиноких спонтанних скорочень, амплітуда та частота яких з часом підвищувались і перевищували контроль (до початку дії АТФ). Описані зміни спостерігалися через 2 - 4 хв від початку аплікації ФП. З часом (на 8 - 10-й хвилині дії ФП) напруження м'язових препаратів поверталася до рівня, який відповідав вихідному (див.рис. 1,б). При одночасній аплікації ФП та АТФ відбувалося значне збільшення амплітуди та тривалості поодиноких спонтанних скорочень. За цих умов на 5 - 7-й хвилині аплікації вказаних речовин збільшувалося механічне напруження препаратів, а також амплітуда та тривалість поодиноких спонтанних скорочень (див. рис. 1,в). Складається враження, що за наявності ФП (як і апаміну нейротоксину бджолоїної отрути [15]) АТФ викликає в ГМК шлунково-кишкового тракту збудження замість гальмування. Наступні наші дослідження підтвердили цю можливість. Так, АТФ за наявності ФП викликав у ГМК деполяризацію замість гіперполяризації (рис. 2,б).

За нормальних умов активація екзогенним АТФ P<sub>2y</sub>-рецепторів, викликає гіперполяризацію ГМК, яка є причиною пригнічення збудження та скорочення вісцеральних ГМ. ФП дозозалежно, ефективно та зворотно пригнічував гальмівну дію АТФ на ГМК. За даних умов АТФ викликав у останніх збудження (деполяризацію) замість гальмування (гіперполяризації) і, відповідно, скорочення замість розслаблення. За наявності ФП, як і апаміну, АТФ викликає в ГМК шлунково-кишкового тракту також збудження. На основі цього факту виникла необхідність дослідити

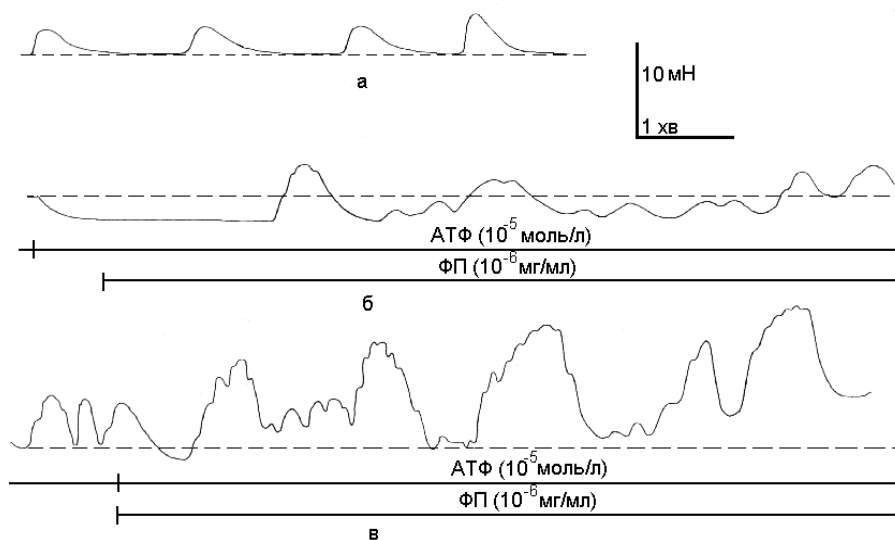
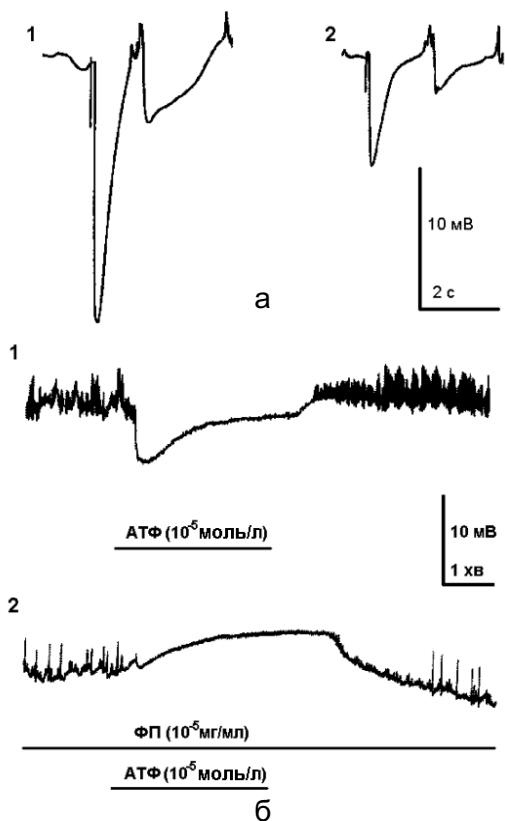


Рис. 1. Вплив фактора переносу (ФП) на розслаблюючу дію АТФ та спонтанні скорочення гладеньком'язових смужок *taenia coli*: а - спонтанні скорочення в контролі, б - пригнічення скорочення дією АТФ та наступне його відновлення та підсилення ФП, в - зміни спонтанних скорочень після одночасної аплікації АТФ та ФП. Пунктирні лінії - вихідний рівень тетанічного скорочення м'язових смужок.



дію ФП на генерацію неадренергічних нехолінергічних (НАНХ) гальмівних синаптичних потенціалів у вісцеральних м'язах.

За нормальних умов НАНХ-гальмівний синаптичний потенціал, викликаний поодиноким інтрамуральним подразненням, складається, принаймні, з двох компонентів - початкового «швидкого» і наступного «повільного». Як правило, амплітуда першого компонента завжди значно більша, ніж другого. Двокомпонентний гальмівний синаптичний потенціал складається з двох гальмівних синаптичних потенціалів, які зумовлені дією різних нейромедіаторів – АТФ і оксиду азоту (NO). Додавання до розчину Кребса

Рис. 2. Вплив фактора переносу (ФП) на генерацію гальмівних синаптичних потенціалів атропінізованих гладеньком'язових смужок (ГМС) *taenia coli* (а) та зміни їх мембранного потенціалу (б) при дії АТФ на тлі впливу субстанції: 1 - контроль; 2 - при наявності ФП. Рискою позначено предгальмівний потенціал подразнення інтрамурального нервового плетення ГМС. Час попередньої аплікації субстанції становив 30 хв.

ФП у максимально ефективній концентрації ( $10^{-3}$  мг/мл) призводило до блокування «швидкого» компонента і більш виразного прояву «повільного» компонента гальмівного синаптичного потенціалу (див. рис. 2,а). Наступне додавання до розчину Кребса з ФП блокатора синтезу NO  $N^G$ -нітро-L-аргініну

( $10^{-3}$  моль/л) зумовлювало блокування повільного компонента. Отже, ФП ефективно та зворотно пригнічує швидкий компонент НАНХ-гальмівного синаптичного потенціалу, зумовленого АТФ. ФП не блокував гальмівну дію NO на ГМ. Цим ФП відрізняється від апаміну, який повністю блокує гальмівні синаптичні потенціали вздовж усього шлунково-кишкового тракту морської свинки, окрім дистальних відділів товстого кишечника [3]. Таким чином, ФП здатний модифікувати гальмівну дію АТФ на ГМ кишечника, очевидно, внаслідок блокування певних внутрішньоклітинних шляхів проведення сигналу від  $P_{2U}$ -рецепторів до активації низькопровідних кальційзалежних калієвих каналів плазматичної мембрани ГМК.

Відомо, що АТФ ефективно пригнічує М-холінергічне збудження - скорочення в ГМ травного тракту. У зв'язку з цим доцільно було дослідити, чи буде цей ефект АТФ модулюватися ФП. Важливо було з'ясувати гальмівний ефект АТФ на тонічний компонент скорочення при наявності ФП, який ініціювався через активацію  $M_2$ -холінорецепторів. У контролі аплікація АТФ під час розвитку тонічного компонента скорочення ініційованою дією АХ, призводить до розслаблення м'язової смужки (рис. 3,а). Через 3 - 4 хв до розчину Кребса з АХ та АТФ додавали ФП у концентрації  $10^{-6}$  мг/мл. Це призводило до появи спонтанних фазних скорочень, амплітуда, час-

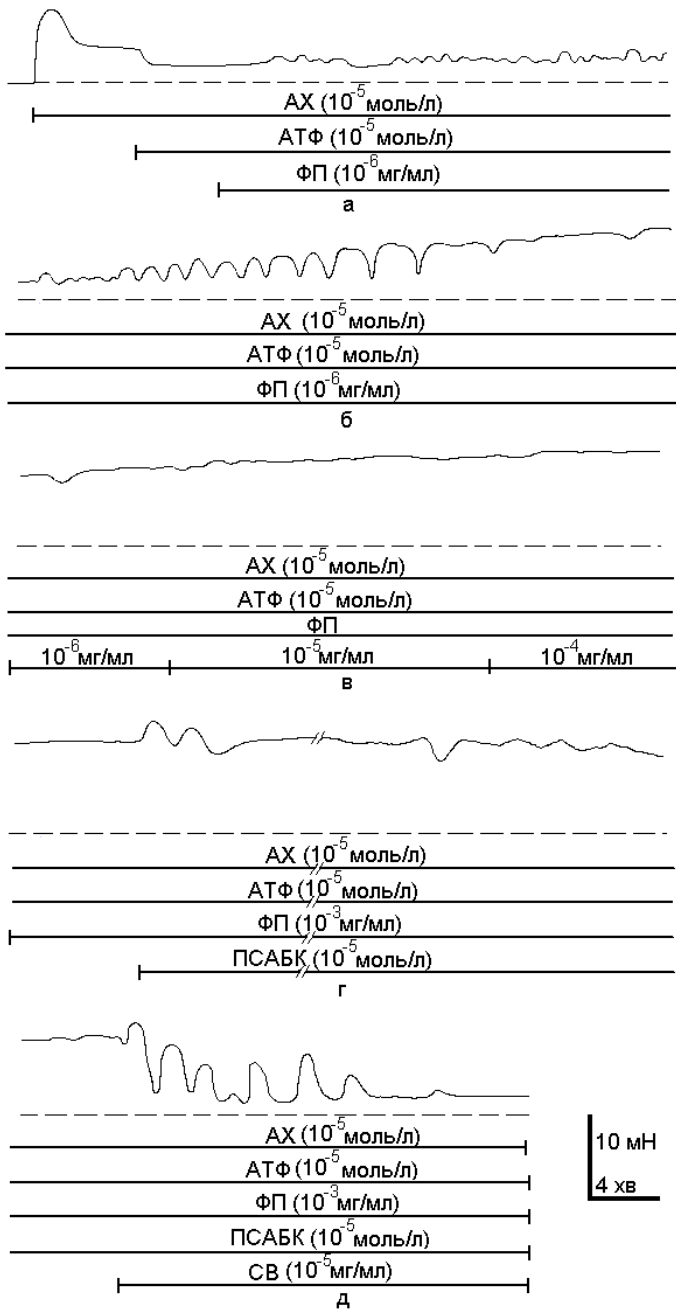
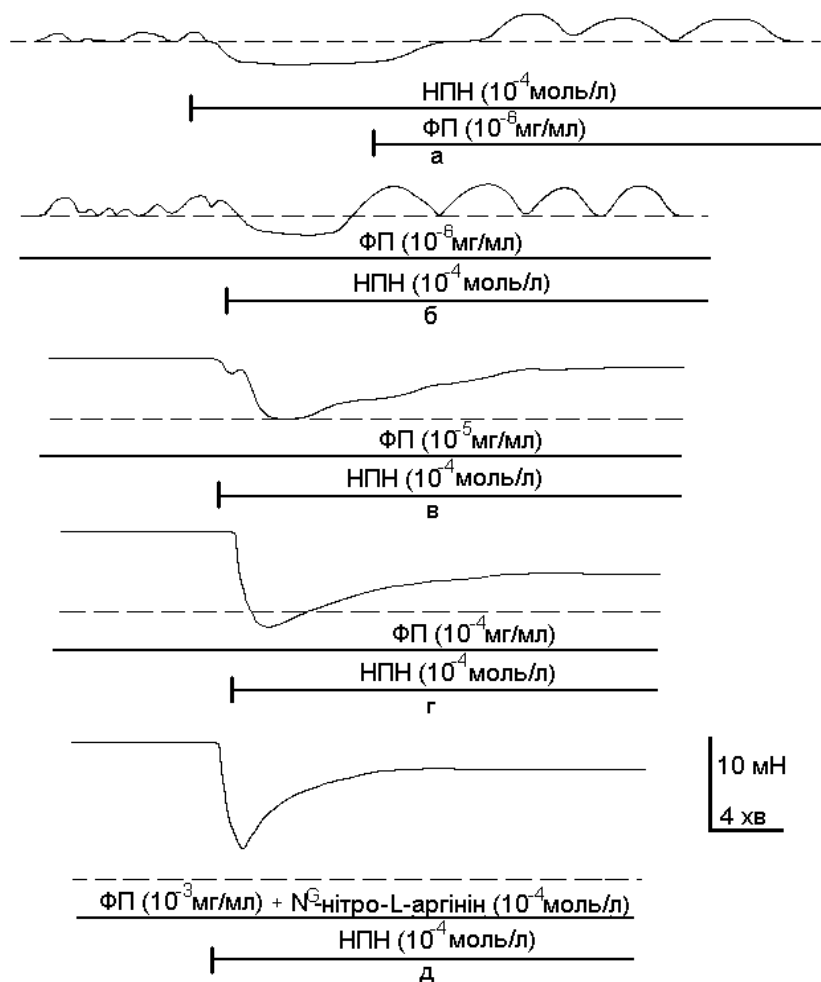


Рис. 3. Вплив різних концентрацій фактора переносу на розслаблюючу дію екзогенного АТФ, аплікованого на плато тонічного компонента ацетилхолінового скорочення (а, б, в), г - те саме за наявності бісульфонієва кислота (ПСАБК), д - при наявності ПСАБК і F3G-A (СВ).

тота та тривалість яких з часом збільшувалися. На 30 – 40-й хвилині дії ФП спонтанні скорочення зливались у суцільний тетанус, амплітуда якого значно перевищувала тонічний компонент ацетилхолінового скорочення в контролі (див. рис. 3,б). Наступне збільшення концентрації ФП до  $10^{-5}$  –  $10^{-4}$  мг/мл призводило до росту амплітуди тетанічного скорочення (див. рис. 3,в). Але подальше збільшення концентрації ФП до  $10^{-3}$  мг/мл практично не змінювало амплітуду тетанічного скорочення м'яза (див. рис. 3, г). Наступне додавання до розчину Кребса (з АТФ, ФП, АХ) блокатора пуринорецепторів ПСАБК ( $10^{-5}$  моль/л) спричинювало часткове зниження тетанічного скорочення ГМС. З огляду на це, було зроблено припущення,

що і ФП, і ПСАБК діють на одну й ту саму ланку ланцюга проведення сигналу від пуринорецептора до скоротливого апарата ГМК. Потім до того самого розчину Кребса додавали неселективний блокатор пуринорецепторів СВ ( $10^{-5}$  моль/л) (див. рис. 3,д). Це призводило до зниження тетанічного скорочення ГМС майже до вихідного рівня. Отже, АТФ на тлі ФП проявляє збуджувальну дію на ГМК, тобто замість розслаблення спричиняє скорочення м'язової смужки. Ці результати вказують на те, що за умов дії ФП на тонічний компонент ацетилхолінового скорочення ГМ *taenia coli* потенціюються рецепторзалежні механізми надходження зовнішніх іонів  $Ca^{2+}$  у ГМК.



Виходячи з того, що ФП підсилював спонтанну скоротливу активність, деполаризував мембрану ГМ, тим самим потенціюючи вхід зовнішніх іонів  $Ca^{2+}$  у ГМК, метою наступних досліджень було вивчення дії ФП на спонтанну скоротливу активність ГМС на тлі дії НПН як екзогенного джерела оксиду азоту, який є одним з чинників гальмування в ГМ. Адже, як видно з рис. 4,а, НПН у концентрації  $10^{-4}$  моль/л пригнічує поодинокі спонтанні

Рис. 4. Вплив нітропрусиду натрію (НПН) на спонтанні скорочення м'язової смужки *taenia coli*, модифіковані фактором переносу (ФП): а - ФП усуває пригнічувальну дію НПН на скорочення, а потім і посилює їх; б, в, г - пригнічення НПН скорочень, модифікованих різною концентрацією ФП, д - пригнічення НПН скорочень, модифікованих ФП і L-NNA.

скорочення ГМС. Однак наступне додавання до розчину Кребса з НПН ФП ( $10^{-6}$  мг/мл) призводило не тільки до усунення пригнічувальної дії НПН на спонтанні скорочення, але й до його посилення порівняно з контролем. У наступній серії експериментів ми досліджували дію НПН на скорочення ГМС, викликані різною концентрацією ФП. Встановлено, що на тлі дії порогової концентрації ФП ( $10^{-6}$  мг/мл) НПН тимчасово пригнічує скорочення, після чого виникають ритмічні фазні скорочення аналогічні тим, що викликаються ФП на тлі дії НПН (рис. 4,а). Як видно з рис. 4, в,г, аналогічно діє НПН і на тонічні скорочення, викликані більшими концентраціями ФП ( $10^{-5}$  -  $10^{-3}$  мг/мл). У цьому разі після швидкого початкового розслаблення смужки, викликаного НПН, скорочення повністю не відновлювалося. Коли ж НПН додавався до розчину Кребса за наявності ФП та інгібітора NO-синтаз L-NNA, то розслаблювальна дія екзогенного оксиду азоту помітно послаблювалася (див. рис. 4, д). На тлі ФП і L-NNA ( $10^{-4}$  моль/л) спостерігали підвищення амплітуди тонічного скорочення, а розслаблювальний ефект НПН (його швидкий компонент) був такого самого порядку, як і

в попередньому досліді (див. рис. 4, г). З часом тонічне скорочення повністю не відновлювалося. Збільшення спонтанних скорочень ГМС за умов впливу різних концентрацій ФП, очевидно, зумовлено збільшенням входу в ГМК іонів кальцію та синхронізацією і злиттям поодиноких фазних скорочень у суцільний тетанус. В основі ж пригнічення цих скорочень НПН лежить NO-цГМФ-залежна активація кальційзалежних калієвих каналів, що призводить до гіперполяризації ГМК та пригнічення потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу [7,11]. Однак пригнічувальний ефект НПН з часом послаблюється, що пов'язано, мабуть, з наявністю ФП.

У наступній серії експериментів вивчали вплив ФП на механізми, гальмування в ГМ *taenia coli*, пов'язані з активацією  $\alpha$ - та  $\beta$ -адренорецепторів. Як показали результати експериментів (рис. 5), аплікація агоніста адренорецепторів (НА  $10^{-5}$  моль/л) на тонічному компоненті ацетилхолінового скорочення супроводжувалася розслабленням препаратів до рівня, дещо більшого від вихідного. Аплікація ФП у концентрації  $10^{-6}$  мг/мл не призводила до змін тонуусу ГМС, досягнутого внаслідок дії НА. Цей рівень не змінювався

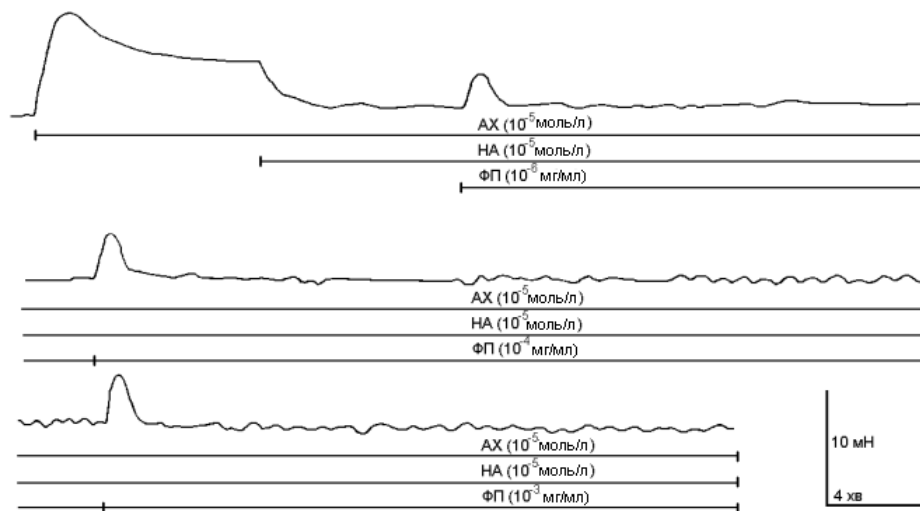


Рис. 5. Вплив фактора переносу на тонічну складову ацетилхолініндукованого скорочення гладеньком'язових смужок *taenia coli*, модифікованих норадреналіном (НА).

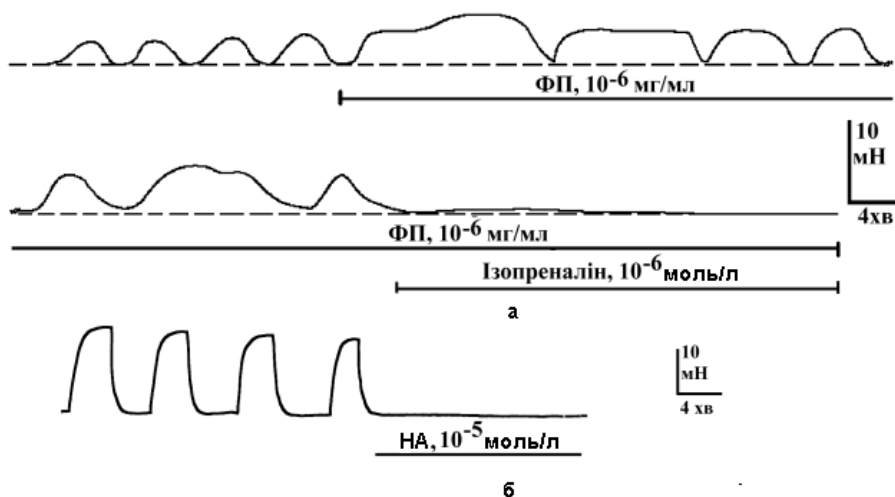


Рис. 6. Вплив ізопреналіну (а) та норадреналіну (б) за наявності пропраналолу на спонтанні скорочення гладеньком'язових смужок *taenia coli*, модифікованих фактором переносу (ФП).

за часом, незважаючи на наявність у розчині ФП. Аналогічні ефекти було зареєстровано також при аплікації ФП у більших концентраціях ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  мг/мл). Вивчення впливу агоніста  $\beta$ -адренорецепторів ізопреналіну на ГМС, модифіковані ФП ( $10^{-6}$  мг/мл), показало, що за даних умов спостерігається швидке припинення активованих спонтанних скорочень (рис. 6,а). Отже, ФП не пригнічує гальмівну дію екзогенного НА, хоча кінцевий ефект гальмування ГМ АТФ і НА однакові: активація апамінчутливих кальційзалежних калієвих каналів низької провідності мембрани ГМК. Ця різниця в дії, на наш погляд, може бути зумовлена активацією НА  $\beta$ -адренорецепторів або  $\alpha_2$ -адренорецепторів, бо відомо, що активація останніх завжди викликає гальмування вісцеральних ГМ. Це підтверджується тим, що на тлі дії ізопреналіну ( $10^{-6}$  моль/л) або НА при блокуванні  $\beta$ -адренорецепторів, ФП не усуває його ефекту (див. рис. 6, а,б).

Отже, виходячи з наведених вище результатів дослідження, можна припустити, що ФП здатний модифікувати гальмівну дію АТФ на ГМ кишечника, очевидно, внаслідок блокування певних внутрішньоклітинних шляхів проведення сигналу від  $P_{2U}$ -рецепторів

до активації кальційзалежних калієвих каналів малої провідності плазматичної мембрани ГМК. Механізми формування відповідей вісцеральних ГМ на дію таких гальмівних нейромедіаторів, як НА та оксид азоту не чутливі до дії ФП.

**T.L.Davidovska, I.B.Philypov,  
O.V.Tsimbalyuk, M.F.Shuba, L.S.Kholodna**

#### **TRANSFER FACTOR MODULATES INHIBITORY ACTION OF NEUROTRANSMITTERS ON INTESTINAL SMOOTH MUSCLES**

It has been shown that Transfer factor (TF) to *Staphylococcus aureus* antigens blocked ATP-induced component of the inhibitory junction potential in taenia coli smooth muscle from guinea-pig, and converted an inhibitory action of exogenous ATP into an exciting one (instead of the hyperpolarization of the smooth muscle, TF induced its depolarization). TF at  $10^{-6}$  mg/ml converted the relaxing effects of sodium nitroprusside (nitric oxide donor) into exciting ones in smooth muscle strips. Higher concentrations ( $10^{-5}$  –  $10^{-3}$  mg/ml) of TF slightly amplified the relaxing effect of sodium nitroprusside. Both a- and b-adrenergic activation in taenia coli smooth muscle were not sensitive to that agent.

*Kyiv Shevchenko National University Physiology  
Institute*

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kiev*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артеменко Д.П., Бурый В.А., Владимірова І.А., Шуба М.Ф. Модифікація методу одинарного сахарозного мостика // Физиол. журн. – 1982. – №3. – С. 374 – 380.
2. Бастен А., Крофт С. Фактор переносу: клінічне використання і експериментальні дослідження. – В кн.: Імунологічна інженерія / Під ред. Э. Джирша. – М.: Медицина, 1982. – 362 с.
3. Владимірова І.А., Шуба М.Ф. Синаптичні процеси в гладких м'язках // Нейрофізіологія. – 1984. – **16**, №3. – С.307–319.
4. Давидовська Т. Л., Цимбалюк О. В., Данилова В. М. та ін. Вплив активних субстанцій стафілококу на АТРазну активність натурального актоміозину та міозину гладеньких м'язів // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, №4. – С. 24 – 28.
5. Давидовська Т.Л., Цимбалюк О.В., Мірошніченко М.С. Токсин стафілокока модулює регуляторні механізми скорочення–розслаблення кільцевих гладеньких м'язів товстого кишечника // Біополімери і клітина. – 2001. – **17**, №1. – С.36 – 42.
6. Давидовська Т.Л., Цимбалюк О.В., Давидовська Н.В. та ін. Кінетична характеристика кофеїнової контрактури гладеньких м'язів саесум // Вісн. КНУ, Біологія. – 2001. – Вип. 33. – С.13–16.
7. Зима А.В., Белевич А.З., Цицюра Я.Д., Шуба М.Ф. Действие окиси азота на Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы в гладкомышечных клетках таenia coli морской свинки // Физика живого. – 1996. – **4**, № 1. – С.67–72.
8. Любченко Т.А., Голева О.Г., Холодна Л.С. та ін. Біологічна активність Фактора переносу індукованого бактеріальними антигенами // Мікробіол. журн. – 1997. – **59**, №5. – С. 83 – 100.
9. Любченко Т.А., Голева О.Г., Холодна Л.С. та ін. Людський специфічний Фактор переносу до антигенів Staphylococcus aureus // Физиол. журн. – 1997. – **43**, №3–4. – С. 25 – 32.
10. Филиппов И. Б., Шуба М. Ф., Давидовская Т. Л. та ін. Влияние активных субстанций золотистого стафилококка (белка А и пептидогликана) на сокращения гладких мышц, вызванные действием нейромедиаторов // Нейрофизиология. – 1996. – **28**, № 1. – С. 30 – 35.
11. Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, Gordienko DV. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles // Annu. Rev. Physiol. – 1999. – **61**. – P. 85 – 115.
12. Burger D.R., Vanderbark A.A., Vetto R.M., Klesztus P. Human Transfer Factor: Specificity and structural models // Immunol. Of Transfer Factor / Eds. C.H. Kirkpatrick., D.R. Burger, H.S. Lawrence. – N.-Y: Acad. Press, 1983. – P.33 – 42.
13. Fudenberg H.H., Fudenberg H.L. Transfer Factor. Past, present and future // Research and applications of Transfer Factor and DLE / Eds. B. Huo, R.Wang, Z. Zon. – Beijing (Chine). Xue Yuan press – 1989. – P. 551 – 598.
14. Kirkpatrick C.H., Hamad A.R., Morton L.C. Murine transfer factors: dose-response relationships and routes of administration // Cell Immunol. – 1995. – **164**, № 2. – P.203–206.
15. Shuba M.F., Vladimirova I.A. Effect of apamin on the electrical responses of smooth muscle to adenosine-5'-triphosphate and to non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation // Neuroscience. – 1980. – **5**, №5. – P.853–859.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;  
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов  
до редакції 29.04.2002*