

УДК 577.053.4:577.2.04

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

И. В. ПУХТЕЕВА¹⁾, Н. В. ГЕРАСИМОВИЧ¹⁾, Д. С. РЫБАЧЕНОК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Содержание внутриклеточного цАМФ и цГМФ определяли радиоиммунным методом с помощью стандартных наборов (ИБОХ НАН РБ). Анализ показал, что пуриновые нуклеотиды в различной степени влияют на систему циклических нуклеотидов в тимocyтах и лимфоцитах периферической крови. Было установлено, что экзогенный АТФ достоверно увеличивал содержание цАМФ и цГМФ в тимocyтах, а система циклических нуклеотидов в лимфоцитах периферической крови проявляла ярко выраженные изменения при действии аденозина. Цель работы – проанализировать изменения концентрации циклических нуклеотидов в клетках иммунной системы крыс при воздействии пуриновых нуклеотидов. Объектом исследования являлись клетки тимуса (тимocyты) и лимфоциты периферической крови крыс. Результаты данной работы могут иметь важное практическое значение с точки зрения углубления представлений о реализации молекулярных механизмов воздействия различных биологически активных веществ через систему циклических нуклеотидов как одних из основных внутриклеточных посредников.

Ключевые слова: сигнальная трансдукция; циклические нуклеотиды; аденозин; АТФ; клетки иммунной системы.

THE FUNCTIONING OF THE SYSTEM OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN THE CONDITIONS OF INFLUENCE OF EXTRACELLULAR PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

I. V. PUHTEEVA^a, N. V. GERASIMOVICH^a, D. S. RYBACHENOK^a

^aBelarusian State University, International Sakharov Environmental Institute,
Dolgobrodskaya street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

Corresponding author: puhteeva@mail.ru

Образец цитирования:

Пухтеева И. В., Герасимович Н. В., Рыбаченок Д. С. Функционирование системы циклических нуклеотидов в условиях экстраклеточного воздействия физиологически активных веществ // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2017. № 1. С. 40–45.

For citation:

Puhteeva I. V., Gerasimovich N. V., Rybachenok D. S. The functioning of the system of cyclic nucleotides in the conditions of influence of extracellular physiologically active substances. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2017. No. 1. P. 40–45 (in Russ.).

Авторы:

Ирина Викторовна Пухтеева – старший преподаватель кафедры экологической медицины и радиобиологии.

Наталья Васильевна Герасимович – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры экологической медицины и радиобиологии.

Доротея Станиславовна Рыбаченок – студентка V курса факультета экологической медицины.

Authors:

Irina V. Puhteeva, senior lecturer of the chair of environmental medicine and radiobiology.

puhteeva@mail.ru

Natalya V. Gerasimovich, PhD (biological), associate professor; associate professor of the chair of environmental medicine and radiobiology.

nvgerasimovich@mail.ru

Dorothea Rybachenok, 5 years student of the faculty of environmental medicine.

dorothea.stanislovovna@mail.ru

The purpose of the work is to analyze possible changes of concentration of cyclic nucleotides in cells of the immune system of rats at influence of purine nucleotides. The objects of the research were thymus cells (thymocytes) and lymphocytes of peripheral blood of rats. The maintenance of intracellular cAMP and cGMP was defined by a radio immune method by means of reference sets (IBOH NAN RB). It is showed that purine nucleotides in different degrees affect the system of cyclic nucleotides in thymocytes and lymphocytes of peripheral blood. So, exogenous ATP authentically increased the maintenance of cAMP and cGMP in thymocytes, and the system of cyclic nucleotides in lymphocytes of peripheral blood showed pronounced changes at action of an adenosine. Results of this work can have important practical value from the point of view of deepening of ideas of realization of molecular mechanisms of influence of various biologically active agents through system of cyclic nucleotides as one of the main intracellular intermediaries.

Key words: signal transduction; cyclic nucleotides; adenosine; ATP; cells of the immune system.

Введение

Циклические нуклеотиды являются универсальными регуляторами биохимических процессов в живых клетках. Главная роль циклического нуклеотида в клетке – это стимулирование фосфорилирования белков рибосом, которое катализируется протеинкиназами. Это, в свою очередь, влияет на характер и количество синтезируемых белков в клетке. Изучение содержания цАМФ и цГМФ в клетках имеет важное диагностическое значение, так как циклические нуклеотиды влияют на регуляцию метаболизма и отражают степень воздействия факторов различной природы на организм. Например, снижение содержания внутриклеточного цАМФ приводит к тому, что цАМФ-зависимые протеинкиназы остаются неактивными, не могут фосфорилировать мембранные кальциевые каналы, которые остаются закрытыми и, таким образом, снижается ток ионов кальция из внеклеточного пространства, который мог бы играть роль «кальциевой искры», необходимой для массивного высвобождения ионов кальция из депо (саркоплазматического ретикулума) [1]. Повышение уровня цАМФ – наиболее ранний признак стрессовой ситуации в клетке, поэтому чрезмерная активация циклических нуклеотидов нередко ведет к развитию патологических реакций.

Пурины обладают мощными иммуномодулирующими свойствами и являются одними из основополагающих веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности клеток. Они постоянно присутствуют в организме, а также ежедневно поступают с пищей и принимают участие во многих физиологических жизненно важных процессах в ядре клеток [2].

Наиболее известным представителем веществ этого класса является нуклеозид аденозин, который влияет на все аспекты иммунной системы. Так, аденозин и его аналоги препятствуют развитию различных воспалительных заболеваний, ревматоидного артрита, воспаления плевры, нефритов, колитов, увеитов (воспаление сосудистой оболочки глаза) и токсического шока. Считается, что эффекты аденозина частично обусловлены ингибированием вредоносных процессов, инициируемых иммунной системой, включая выделения провоспалительных (обеспечивают мобилизацию воспалительного ответа) цитокинов и радикалов кислорода. Проводятся активные поиски терапевтических средств, основанных на воздействии рецепторов аденозина, для лечения и профилактики инфекционных, аутоиммунных, ишемических и дегенеративных заболеваний [3].

Аденозин образуется как внутриклеточно, так и внеклеточно при участии ряда ферментных систем. В клетках аденозин образуется в результате дефосфорилирования АМФ при участии 5'-нуклеотидазы и при гидролизе S-аденозилгомоцистеина при участии S-аденозилгомоцистеингидролазы. Внеклеточный аденозин возникает при гидролизе АТФ, АМФ и цАМФ, высвобождающихся в кровоток из клеток сосудистого эндотелия, гладкой мускулатуры и циркулирующих клеток крови как экзоцитозом (клеточный процесс, при котором внутриклеточные везикулы (мембранные пузырьки) сливаются с внешней клеточной мембраной), так и вследствие лизиса клеток [4].

Аденозин угнетает пролиферацию, дифференцировку и функции иммунных клеток. Показано значение аденозина в качестве регулятора активности аденилатциклазы и уровня цАМФ, медиатора действия таких нуклеотидов, как цАМФ, АМФ, АТФ. Аденозин увеличивает уровень АМФ либо через аденилатциклазный комплекс, либо через подавление активности фосфодиэстеразы. Имеются наблюдения, что аденозин в низких концентрациях подавляет, а в более высоких вызывает увеличение уровня цАМФ, в частности, в конечной концентрации 100 мкмоль аденозина активирует аденилатциклазу. Лимфоциты сходны с нервными клетками по присутствию рецепторов аденозина и способности аденозина связываться со специфическими рецепторами, повышая внутриклеточный уровень цАМФ. В-лимфоциты продуцируют аденозин путем сочетанного действия ферментов, которые производят или используют аденозин. В них высока активность 5'-нуклеотидаз и относительно низкая активность аденозинкиназы и аденозиндеаминазы.

Т-лимфоциты продуцируют аденозин гораздо меньше, поскольку они содержат относительно мало 5'-нуклеотидаз и имеют высокоактивную аденозинкиназу и аденозиндезаминазу [4].

Молекулы АТФ, выходящие из клеток при повреждениях тканей, стимулируют клетки иммунной системы к запуску воспаления – защитной реакции организма. Однако слишком сильное и длительное воспаление может привести к нежелательным последствиям, например, ревматоидному артриту. АТФ в качестве переносчика информации помогает клеткам иммунной системы уничтожать клетки, инфицированные патогенными бактериями. Он является также непосредственным предшественником синтеза циклического аденозинмонофосфата – вторичного посредника передачи в клетку гормонального сигнала. Кроме того, ему отводится важное место в регуляции множества биохимических процессов. Являясь аллостерическим эффектором ряда ферментов, АТФ, присоединяясь к их регуляторным центрам, усиливает или подавляет их активность [5].

В связи с этим целью работы являлся анализ возможных изменений концентрации циклических нуклеотидов в клетках иммунной системы крыс при воздействии пуриновых нуклеотидов.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на крысах-самцах массой 180–200 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. В ходе исследования соблюдались принципы гуманного отношения к животным. Объектом исследования являлись клетки тимуса (timoциты) и лимфоциты периферической крови крыс, выделенные по стандартной методике [6]. В каждой серии экспериментов было использовано по 10 животных с трехкратным повторением ($n=30$).

Содержание внутриклеточного цАМФ и цГМФ определяли с помощью радиоиммунного метода с применением стандартных наборов (ИБОХ НАН РБ). Радиоиммунный метод, или анализ (РИА), – высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген-антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (^{125}J , ^{14}C , ^3H , ^{51}Cr и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (бета- или гамма-излучение). Интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител [7].

Наибольшее распространение получил метод конкуренции за специфические антитела, меченого радиоактивным изотопом антигена и такого же антигена, но свободного от радиоактивной метки, количество которого необходимо определить в исследуемой биологической среде.

С этой целью в исследуемую жидкость, в которой предполагается наличие антигена, добавляют известное количество такого же меченого антигена и стандартное количество антисыворотки с соответствующими антителами. Если в исследуемой жидкости отсутствует искомым специфический антиген, то около 70–80 % меченого антигена связывается с антителами, обуславливая высокую радиоактивность образующегося преципитата (осадок). Если в биологической среде присутствует искомым антиген, он конкурирует с меченым антигеном и связывает часть антител. В результате радиоактивность преципитата падает по сравнению с контролем. На этом принципе основано количественное определение антигенов или антител. [7]

Для анализа экстраклеточного действия АТФ и аденозина препарат вносили в суспензию клеток (10^6 клеток/мл) в конечной концентрации 1 мкмоль/л и инкубировали в течение 10 мин (37°C) [8].

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2010. Результаты экспериментов выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, а достоверность различий в группах оценивали по t -критерию Стьюдента. При этом различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [9].

Результаты исследования и их обсуждение

Содержание цАМФ и цГМФ в клетках в значительной мере определяется соотношением между активностью аденилатциклазы и гуанилатциклазы (катализирующих их образование из АТФ и ГТФ), с одной стороны, и активностью фосфодиэстераз, катализирующих их распад – с другой. Гормоны, соединяясь с рецепторами поверхности клеток, активируют ферменты, фиксированные в клеточных мембранах. Это приводит к изменению внутри клеток как соотношения, так и уровня цАМФ и цГМФ, а также изменяет ход ряда внутриклеточных биохимических процессов [10–11].

На основании данных, представленных на рис. 1, отмечено, что содержание цАМФ в тимоцитах и лимфоцитах периферической крови крыс выше, чем цГМФ, в 3 и 2,5 раза соответственно.

В норме концентрация цГМФ в клетках примерно в 100 раз меньше концентрации цАМФ, то есть примерно 10^{-7} М. Действие цАМФ и цГМФ может быть противоположным в зависимости от их концентрации.

По результатам, приведенным на рис. 2, можно сделать вывод о том, что содержание цАМФ в тимоцитах при добавлении АТФ без инкубации выше примерно в 2 раза, чем этот же показатель в случае инкубации с препаратом в течение 10 мин. Стоит отметить, что уровень стимулированного цАМФ выше базального уровня в интактных клетках примерно в 6 раз.

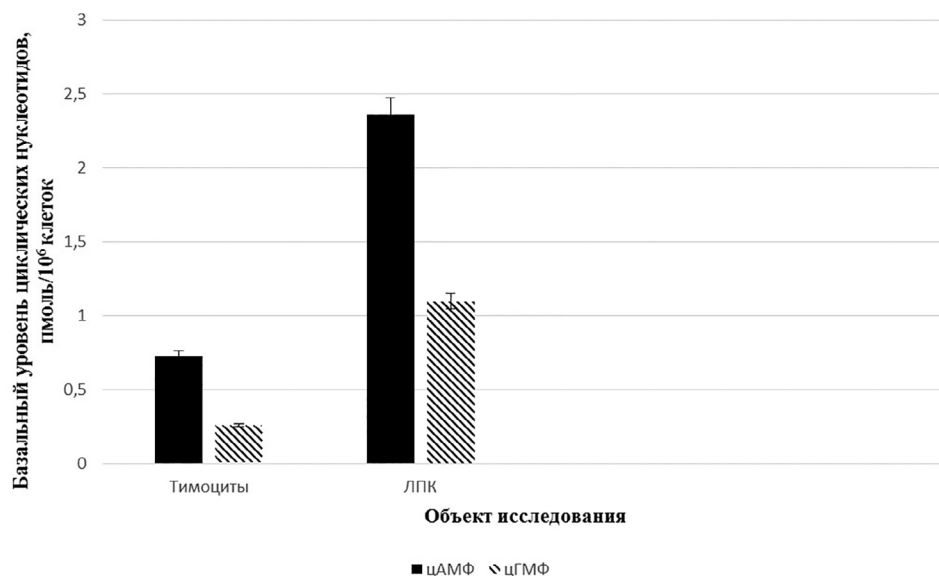


Рис. 1. Содержание цАМФ и цГМФ в тимоцитах и лимфоцитах периферической крови крыс

Fig. 1. The content of cAMP and cGMP in thymocytes of the peripheral blood of rats

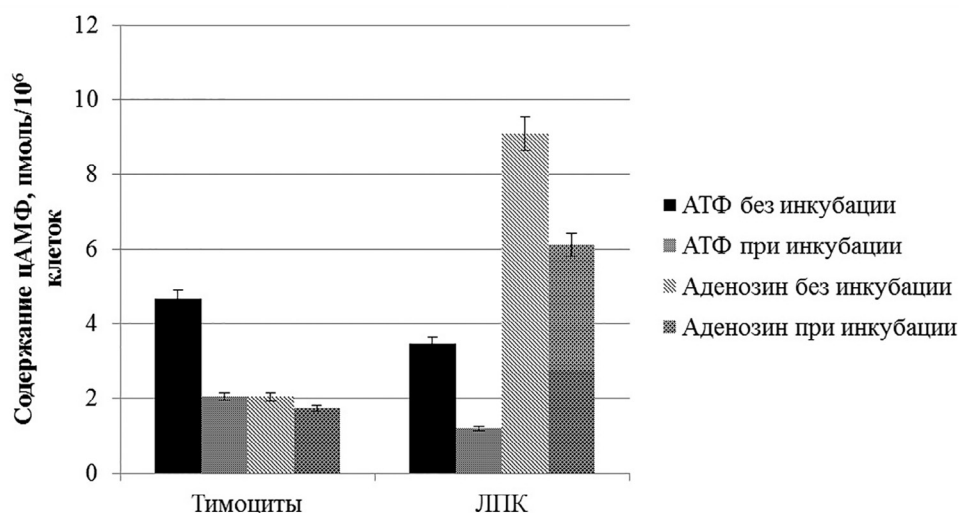


Рис. 2. Уровень цАМФ в тимоцитах и лимфоцитах периферической крови крыс при воздействии на них АТФ и аденозина

Fig. 2. cAMP concentration in thymocytes and lymphocytes of rats' peripheral blood under the effect of ATP and adenosine

Концентрация цАМФ в лимфоцитах периферической крови при добавлении АТФ повышается примерно в 3 раза относительно базального уровня в интактных клетках. В случае инкубации суспензии клеток с препаратом в течение 10 мин происходит постепенное снижение уровня цАМФ более чем в 2,5 раза, но этот показатель остается повышенным по сравнению с базальным уровнем примерно в 1,5 раза.

Содержание цАМФ в тимоцитах при добавлении аденозина как без инкубации, так и в случае 20-минутной инкубации суспензии клеток с препаратом не имеет достоверных различий. При этом отмечается повышение концентрации цАМФ относительно базального уровня примерно в 2,5 раза.

Концентрация цАМФ в лимфоцитах периферической крови при добавлении аденозина без инкубации выше, чем в случае придинкубации с препаратом в течение 20 мин, примерно в 1,5 раза. При этом уровень стимулированного аденозином цАМФ выше базального в 4 раза.

В отличие от аденилатциклазы, которая локализована в плазматической мембране, гуанилатциклаза, синтезирующая цГМФ из ГТФ, находится как в мембраносвязанном, так и в растворимом состоянии. Соотношения этих двух форм фермента в различных тканях разные [12].

Результаты исследований, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что содержание цГМФ в тимоцитах при добавлении АТФ без инкубации выше, чем содержание цГМФ с добавлением АТФ при инкубации в 6 раз, и выше, чем базальный уровень примерно в 11 раз. При этом количество цГМФ в лимфоцитах периферической крови при добавлении АТФ как без инкубации, так и при инкубации практически одинаковое, однако это в 2 раза выше базального уровня этого циклического нуклеотида в изучаемых клетках.

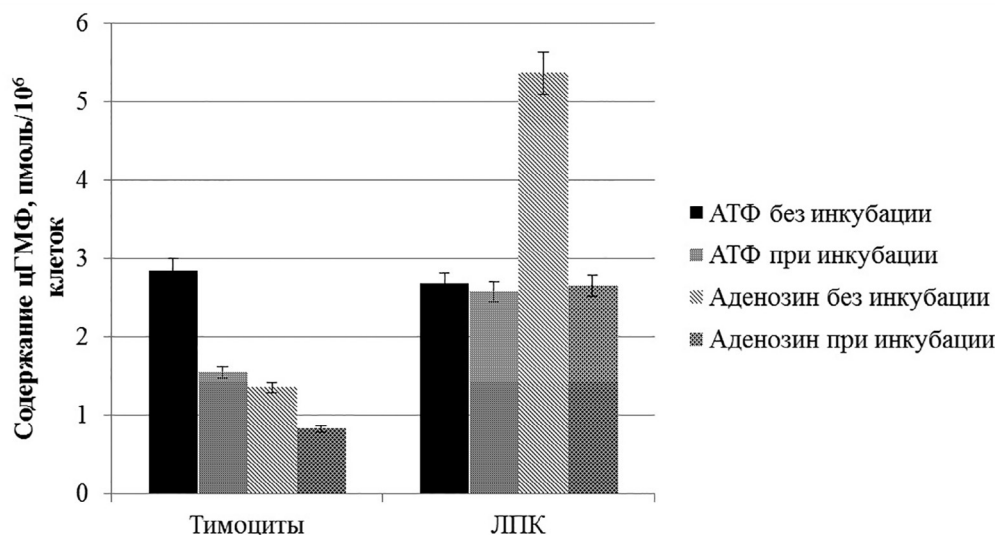


Рис. 3. Уровень цГМФ в тимоцитах и лимфоцитах периферической крови крыс при воздействии на них АТФ и аденозина

Fig. 3. cGMP concentration in thymocytes and lymphocytes of rats' peripheral blood under the effect of ATP and adenosine

При сравнительном анализе концентрации цГМФ в тимоцитах при добавлении аденозина показано, что изучаемый показатель при непосредственном добавлении в суспензию клеток в полтора раза выше, чем после инкубации с препаратом в течение 20 мин. Однако это все же выше базального уровня цГМФ в тимоцитах в 5 раз и в 3 раза соответственно.

Уровень цГМФ в лимфоцитах периферической крови при добавлении аденозина без инкубации в 2 раза выше, чем после инкубации. Содержание цГМФ при стимуляции клеток аденозином в 5 раз выше базального уровня в интактных лимфоцитах периферической крови.

Заключение

Установленный эффект повышения содержания циклических нуклеотидов при добавлении пуриновых нуклеотидов можно объяснить тем, что АТФ и аденозин воздействуют на соответствующие рецепторы: аденозин активирует P1 – пуринорецепторы (A1 – рецепторы), которые имеют высокое сродство к аденозину, а АТФ и ее структурные аналоги стимулирует P2 – пуринорецепторы [13].

Таким образом, из полученных в ходе исследования данных можно сделать следующие выводы. Экзогенный АТФ достоверно увеличивал содержание цАМФ (в 6 раз) и цГМФ (в 11 раз) в тимоцитах. В то же время в лимфоцитах периферической крови этот эффект был менее выраженным: при обработке клеток АТФ увеличивалось содержание цАМФ в 1,5 раза и цГМФ – в 2 раза. Наряду с этим, система циклических нуклеотидов в лимфоцитах периферической крови проявляла ярко выраженные изменения при действии аденозина, где уровень цАМФ увеличился в 4 раза, а уровень цГМФ – в 5 раз. В тимоцитах уровень цАМФ – в 3 раза, а уровень цГМФ увеличился в 5 раз.

Результаты данной работы могут иметь важное практическое значение с точки зрения углубления представлений о реализации молекулярных механизмов воздействия различных биологически активных веществ через систему циклических нуклеотидов как одних из основных внутриклеточных посредников.

Библиографические ссылки

1. Зинченко В. П., Долгачева Л. П. Внутриклеточная сигнализация. М., 2003.
2. Tasken K., Stokka A. J. The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. Vol. 34. P. 476–479.
3. Тапбергенев С. О., Тапбергенев Т. С. Ферменты метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунный статус при стрессорных состояниях разного происхождения // *Успех совр. естествозн.* 2009. № 7. С. 92–93.
4. Серебряная Н. Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа // *Иммунология.* 2010. № 5. С. 273–281.
5. Юрьева О. В., Дубровина В. И. Роль сигнальных систем циклических нуклеотидов в регуляции иммунного патогенеза // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* 2012. № 2. С. 159–163.
6. Лимфоциты: Методы : пер. с англ. / под ред. Дж. Клауса. М., 1990.
7. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. / под ред. А. И. Карпищенко. М., 2013.
8. Рогачева О. Н., Стефанов В. Е., Щеголев Б. Ф. Сравнительный анализ структуры и энтальпии гидролиза молекул цАМФ и цГМФ методами квантовой биохимии // *Вестн. СПбГУ.* Сер. 3. 2007. Вып. 2. С. 86–90.
9. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии : учебник. Горловка, 2008.
10. Артюхов В. Г. и др. Вторичные мессенджеры цАМФ, Ca²⁺, NO – модулируют функциональные свойства лимфоцитов в условиях УФ-облучения // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2010. № 12. С. 637–641.
11. Feng G. Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotides phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection // *J. Sci. Transl. Med.* 2011. Vol. 3. P. 83–86.
12. Vezzosi D. Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease // *Eur. J. Endocrinol.* 2011. Vol. 65. P. 177–182.
13. Северин Е. С., Саватеева М. В. Молекулярно-физиологические механизмы функционирования мембранных рецепторных систем // *Acta Naturae* (русская версия). 2011. Т. 3, № 1 (8). С. 20–29.

References

1. Zinchenko V. P., Dolgacheva L. P. Intracellular signaling. Moscow, 2003 (in Russ.).
2. Tasken K., Stokka A. J. The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. Vol. 34. P. 476–479.
3. Tapbergenov S. A., Tapbergenov T. S. Enzymes of purine nucleotides metabolism and immune status under stress conditions of different origin. *The success of modern natur. sci.* 2009. No. 7. P. 92–93 (in Russ.).
4. Serebrynaya N. B. Nucleotides as regulators of the immune response. *Immunology.* 2010. No. 5. P. 273–281 (in Russ.).
5. Yurieva O. V., Dubrovina V. I. Role of cyclic nucleotide signal systems in regulatin of immune- and pathogenesis. *Newsletter ESSC SB RAMS.* 2012. No. 2. P. 159–163 (in Russ.).
6. Klaus. J. (ed). Lymphocytes. Methods. Moscow, 1990 (in Russ.).
7. Karpischenko A. I. (ed) Medical laboratory technology: a guide for clinical laboratory diagnostics: in 2 vol. Moscow, 2013 (in Russ.).
8. Rogacheva O. N., Stefanov V. E., Schegolev B. F. Comparative analysis of structure and enthalpy hydrolysis molecules cAMP and cGMP methods of quantum biochemistry. *Messenger of SPbSU.* 2007. Ser. 3, issue 2. P. 86–90 (in Russ.).
9. Atramentova L. A., Utevskaja O. M. Statistical methods in biology: textbook. Gorlovka: Lihtar. 2008. 248 p. (in Russ.).
10. Artiukhov V. G., et al. Secondary messengers cAMP, Ca²⁺, NO – modulate the functional properties of lymphocytes in the conditions of UV-irradiation. *Newsl. of experiment. biol. and med.* 2010. No. 12. P. 637–641 (in Russ.).
11. Feng G. Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotides phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection // *J. Sci. Transl. Med.* 2011. Vol. 3. P. 83–86.
12. Vezzosi D. Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur. J. Endocrinol.* 2011. Vol. 65. P. 177–182.
13. Severin E. Molecular and physiological mechanisms of membrane receptor systems. *Acta Naturae.* 2011. Vol. 3, No. 1 (8). P. 20–29 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 02.06.2017
Received by editorial board 02.06.2017