

БИОФИЗИКА

УДК 57.047

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАПЕПТИДА ТАФЦИНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ pH ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ

С.К. Пирутин^{1,3,*}, В.Б. Туровецкий¹, Н.Ю. Сарычева², А.Б. Дружко³,
В.Н. Калихевич⁴, А.А. Каменский²¹ Кафедра биофизики и ² кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики, РАН; Россия, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3;⁴ кафедра химии природных соединений, Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет; Россия, 198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., д. 26
* e-mail: pirutin@yandex.ru

С использованием зондовой микрофлуориметрии одиночных клеток показано, что при действии на мышинные перитонеальные макрофаги тафцина в концентрациях, вызывающих увеличение их фагоцитарной активности (0,1 и 1,0 мкг/мл), наблюдается двухфазное изменение внутриклеточного pH (pH_i) во времени. В начальный период происходит снижение pH_i , достигающее предельной выраженности через 5 мин инкубации. Затем величина pH_i растет, достигая максимального значения через 30 мин взаимодействия клеток с агентом, после чего изменения наблюдаемого параметра не происходит вплоть до 55-й мин. Обнаружено, что при введении в среду инкубации клеток блокатора системы Na^+/H^+ -обмена этилизопропиламилорида на фоне действия тафцина повышение внутриклеточного pH не происходит. Это позволяет предположить, что наблюдаемое повышение pH_i при действии тафцина на второй фазе клеточного ответа связано с работой системы Na^+/H^+ -обмена.

Ключевые слова: тафцин, макрофаги, внутриклеточный pH, Na^+/H^+ -обменник.

В связи с активным применением в медицине биологически активных эндогенных пептидов и их синтетических аналогов в последние годы значительное внимание уделяется исследованиям механизмов их действия [1–3]. Одним из таких пептидов является регуляторный нейротропный тетрапептид — тафцин, проявляющий свойства иммуномодулятора и стимулятора пиноцитоза и фагоцитоза [4, 5]. Важное место при анализе механизма действия биологически активных пептидов занимает изучение их влияния на отдельные системы клеточной регуляции, к числу которых относится и система внутриклеточной pH-регуляции [6–8]. Как было показано ранее [9], действие регуляторного тетрапептида тафцина на перитонеальные макрофаги мышей приводит к сходным по характеру дозозависимому возрастанию их фагоцитарной активности и внутриклеточного pH с максимумом в области концентраций пептида, близких по значению к его физиологическому уровню в крови здоровых людей (0,26 мкг/мл) [10].

Цель настоящей работы — изучение временной зависимости влияния тафцина на внутриклеточный pH изолированных перитонеальных макрофагов и участия Na^+/H^+ -обменника в подщелачивании внутриклеточного содержимого при действии пептида.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на перитонеальных макрофагах беспородных белых мышей. Выделение клеток и посадку их на стекла осуществляли, как описано ранее [11]. Клетки инкубировали в растворе Хенкса с добавлением 10 ммоль/л HEPES (pH 7,2; “Serva”, Германия).

В работе использовали тетрапептид тафцин в концентрациях 0,1 и 1,0 мкг/мл, в которых, как ранее было показано [9], он вызывает увеличение фагоцитарной активности макрофагов и их внутриклеточного pH.

Определение величины внутриклеточного pH осуществляли при помощи микрофлуориметрического метода анализа одиночных клеток с использованием флуоресцентного зонда флуоресцеиндиацетата (5 мкг/мл, “Serva”, Германия) [9, 12]. Регистрацию интенсивности флуоресценции отдельных клеток проводили на фотометрирующем люминесцентном микроскопе “ЛЮМАМ ИЗ” (“ЛОМО”, Россия) в узких полосах спектра излучения двух форм флуоресцеина при $\lambda_1=520$ нм и $\lambda_2=570$ нм. Более подробно методика определения внутриклеточного pH описана ранее [13].

После определения pH_i нативных клеток к ним добавляли тафцин в указанных выше концентрациях

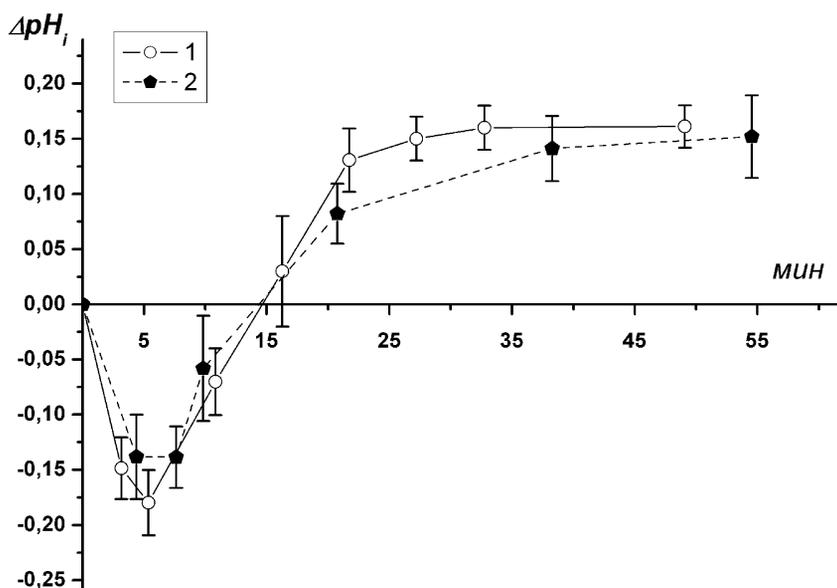


Рисунок. Изменение внутриклеточного рН мышинных перитонеальных макрофагов во времени при действии тафцина. По оси абсцисс: время после введения в среду инкубации тафцина в концентрации 0,1 мкг/мл (1) и 1,0 мкг/мл (2); По оси ординат: изменение внутриклеточного рН по сравнению с контролем (ΔpH_i).

и определяли меняющуюся во времени величину исследуемого параметра. Эксперименты проводили минимум в пяти независимых сериях, по три образца в каждой. В каждом образце измерение производилось на ~60 клетках выбранных в поле зрения случайным образом. Величина внутриклеточного рН макрофагов в контроле составляла $7,18 \pm 0,01$. Эксперименты проводили при температуре 22°C. Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и их среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Различия между средними арифметическими значениями параметров считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены данные, полученные при анализе динамики изменения внутриклеточного рН (pH_i) макрофагов во времени при действии тафцина в концентрациях 0,1 и 1,0 мкг/мл, вызывающих, как было показано нами ранее [9], выраженное повышение уровня фагоцитоза и величины внутриклеточного рН. Как видно из рисунка, пептид в обеих исследованных концентрациях действует сходным образом, вызывая двухфазное изменение pH_i . В начальный период времени происходит его снижение, достигающее наибольшей выраженности примерно через 5 мин взаимодействия пептида с клеткой и составляющее около 0,17 ед. рН по сравнению с контролем. К 12–15 мин инкубации величина внутриклеточного рН возвращается к исходному уровню. В дальнейшем происходит постепенное повышение величины pH_i (на

0,10–0,15 ед. рН выше уровня контроля) к 20–25 мин. Этот уровень внутриклеточного рН уже не меняется вплоть до 45–50 мин инкубации. Подобное двухфазное изменение величины pH_i с начальным подкислением внутриклеточного содержимого и последующим его подщелачиванием весьма характерно для ответа клеток на действие многих биологически активных факторов [13, 14], в том числе известного хемотаксического стимулятора нейтрофилов трипептида N-формил-мет-лей-фен [15]. Изучение временной зависимости изменений pH_i нейтрофилов при действии этого пептида показало, что при 37°C максимальное подкисление внутриклеточного содержимого наблюдается уже через 0,5 мин инкубации и составляет около 0,07 ед. рН по сравнению с уровнем контроля. Ко второй минуте взаимодействия клеток с пептидом происходит восстановление pH_i до исходного уровня, а затем наблюдается постепенное возрастание внутриклеточного рН, достигающее к 7 мин инкубации величины 0,12 ед. выше уровня контроля. По мнению авторов, на первом этапе взаимодействия молекул пептида с клеточными рецепторами происходит кратковременное повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток. Это, в свою очередь, вызывает активацию различных процессов, приводящих к повышению в клетке концентрации ионов водорода, что находит отражение в регистрируемом начальном понижении pH_i . В дальнейшем, за счет увеличения активности различных систем удаления избытка H^+ из клетки и, в первую очередь, по-видимому, системы Na^+/H^+ -обмена, происходит повышение внутриклеточного рН. Из полученных нами данных следует, что близкие по характеру, однако, более медленные изменения pH_i имеют место и при действии тетрапептида тафцина на

перитонеальные мышечные макрофаги. Наблюдаемые в рассмотренных выше случаях различия в динамике изменений внутриклеточного рН могут быть обусловлены рядом причин, в том числе, спецификой объектов исследования, особенностями изучавшихся пептидных регуляторов, а также различиями в использованных экспериментальных условиях, в частности, температурных. На возможность последней указывают данные о том, что снижение температуры инкубации с 37 до 22°C приводит к замедлению процессов связывания флуоресцентно-меченного тафцина с рецепторами клеточной поверхности перитонеальных макрофагов без изменения характера наблюдаемых при этом событий [16]. Обращает на себя внимание то, что наблюдавшееся авторами однородное распределение флуоресцентного производного пептида, наиболее выраженное к 5 мин инкубации, сменялось образованием кластеров, а затем, примерно, через 10 мин — их эндоцитозом, заканчивающимся в пределах менее чем 30 мин инкубации. Наши данные, представленные на рисунке, показывают, что примерно к этому же времени (20–25 мин после начала инкубации) происходит выход величины внутриклеточного рН макрофагов на постоянный (повышенный по сравнению с контролем) уровень. Весьма интересным в этом аспекте представляется и то, что, судя по имеющимся в литературе данным [17], зависимое от времени специфическое связывание [³H]-тафцина со стимулированными макрофагами при 22°C достигает максимального уровня через 15–20 мин инкубации. Примерно в эти же сроки достигает наименьшего значения уровень внутриклеточного цАМФ в макрофагах под действием тафцина [18]. При этом сниженный уровень цАМФ сохраняется в клетках не менее 60 мин. В этой связи уместно напомнить, что по нашим данным, представленным на рисунке, повышенное значение внутриклеточного рН поддерживается в макрофагах в течение не менее чем 50 мин их инкубации с пептидом. Представленные выше, а также полученные нами ранее данные показывают, что тафцин в определенных условиях способен вызывать как возрастание специфической функциональной активности, так и повышение внутриклеточного рН макрофагов. В этой связи представлялось интересным рассмотреть вопрос о механизме

Таблица

Изменение внутриклеточного рН мышечных перитонеальных макрофагов при действии тафцина и ЭИПА

Действующий агент	Изменение рН макрофагов по сравнению с контролем (Δ рН)
Тафцин	+0,25±0,03
ЭИПА	-0,20±0,02
ЭИПА + тафцин	-0,16±0,03

Примечание. Концентрация тафцина — 0,3 мкг/мл. Концентрация ингибитора Na⁺/H⁺-обмена этилизопропиламилорида (ЭИПА) — 12,5 мкМ.

подщелачивающего действие пептида. Учитывая важную роль системы Na⁺/H⁺-обмена в регуляции рН_i разного типа клеток [19], мы попытались оценить вклад данной системы в наблюдаемое при действии тафцина повышение внутриклеточного рН. Для решения этой задачи было изучено действие пептида в условиях селективного ингибирования активности Na⁺/H⁺-обменника плазматической мембраны макрофагов с помощью этилизопропиламилорида (ЭИПА). Как видно из данных, представленных в таблице, инкубация макрофагов в присутствии ЭИПА приводит к снижению внутриклеточного рН вследствие ингибирования системы Na⁺/H⁺-обмена в клетке. Введение в этих условиях в среду инкубации тафцина (0,3 мкг/мл) не приводит к достоверному изменению исходно сниженного уровня рН_i, тогда как в отсутствие в среде ЭИПА при действии пептида в этой же концентрации наблюдается выраженное подщелачивание внутриклеточного содержимого. Полученные данные указывают на участие системы Na⁺/H⁺-обмена в регистрируемом при действии тафцина повышении внутриклеточного рН макрофагов.

Таким образом, полученные нами результаты выявили двухфазный временной характер изменения внутриклеточного рН макрофагов при действии тафцина, а также показали участие системы Na⁺/H⁺-обмена в подщелачивающем действии пептида на клетку.

Авторы выражают благодарность за сотрудничество в данных исследованиях Золотилину Сергею Александровичу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. An Y., Li L., Yang D., Jia N., Xu C., Wang Q., Wang S., Yuan S. Anticancer activity of tuftsin-derived T peptide in postoperative residual tumors // *Anti-cancer drugs*. 2014. Vol. 25. N 8. P. 857–867.
2. Wiczorek Z., Zimecki M., Słoń J.J., Siemion I.Z. The immunomodulatory activity of tetra- and tripeptides of tuftsin-kentsin group // *Peptides*. 1994. Vol. 15. N 2. P. 215–221.
3. Wardowska A., Dzierzbicka K., Menderska A., Trzonkowski P. New conjugates of tuftsin and muramyl dipeptide as stimulators of human monocyte-derived dendritic cells // *Protein Pept. Lett.* 2013. Vol. 20. N 2. P. 200–204.

4. Siemion I.Z., Kluczyk A. Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery // *Peptides*. 1999. Vol. 20. N 5. P. 45–74.

5. Khan M.A., Aljarbou A., Khan A., Owais M. Immune stimulating and therapeutic potential of tuftsin-incorporated nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in leukopenic BALB/C mice // *FEMS Immunol. Med. Mic.* 2012. Vol. 66. N 1. P. 88–97.

6. Moolenaar W.H., Tsien R.Y., van der Saag P.T., de Laat S.W. Na⁺/H⁺ — exchange and cytoplasmic pH in the

action of growth factors in human fibroblasts // *Nature*. 1983. Vol. 304. N 5927. P. 645–648.

7. *Busa W.B., Nuccitelli R.* Metabolic regulation via intracellular pH // *Am. J. Physiol.* 1984. Vol. 246. N 4. P. 409–438.

8. *Frelin C., Vigne P., Ladoux A., Lazdunski M.* The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 174. N 1. P. 3–14.

9. *Туровецкий В.Б., Золотилин С.А., Сарычева Н.Ю., Калихевич В.Н., Каменский А.А.* Влияние тафцина на функциональную активность и внутриклеточный pH перитонеальных макрофагов мышей // *Бюл. exper. биол.* 1994. Т. 67. № 3. С. 265–267.

10. *Fridkin M., Najjar V.A.* Tuftsin: Its chemistry, biology, and clinical potential // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1989. Vol. 24. N 1. P. 1–40.

11. *Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б.* Модификация повреждающего действия ультрафиолетового излучения на мембраны перитонеальных макрофагов мышей // *Радиационная биология. Радиобиология.* 2002. Т. 42. № 2. С. 151–154.

12. *Heiple J.M., Taylor D.L.* Intracellular pH: Its measurement, regulation and utilization in cellular functions // *Proceedings of a conference held at the Kroc Foundation, Santa Ynez Valley, California, July 20–24, 1981.* NY: Alan R. Liss., 1982. P. 21–54.

13. *Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Дружко А.Б., Кудряшов Ю.Б.* Изменение внутриклеточного pH ма-

крофагов после УФ-облучения // *Радиационная биология. Радиобиология.* 2004. Т. 44. № 6. С. 681–683.

14. *Пархоменко И.М., Перитвилли Г.В., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б., Бровко Л.Ю.* Влияние малых доз ионизирующей радиации на внутриклеточный pH, содержание АТФ и синтетическую активность культивируемых фибробластов китайского хомячка // *Радиобиология.* 1993. Т. 33. № 1. С. 104–109.

15. *Weisman S.J., Punzo A., Ford C., Sha'afi R.I.* Intracellular pH changes during neutrophil activation: Na^+/H^+ antiport // *J. Leukoc. Biol.* 1987. Vol. 41. N 1. P. 25–32.

16. *Gottlieb P., Hazum E., Tzevoval E., Feldman M., Segal S., Fridkin M.* Receptor-mediated endocytosis of tuftsin by macrophage cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol. 119. N 1. P. 203–211.

17. *Bar-Shavit Z., Stabinsky Y., Fridkin M., Goldman R.* Tuftsin-macrophage interaction: specific binding and augmentation of phagocytosis // *J. Cell. Physiol.* 1979. Vol. 100. N 1. P. 55–61.

18. *Stabinsky Y., Bar-Shavit Z., Fridkin M., Goldman R.* On the mechanism of action of the phagocytosis-stimulating peptide tuftsin // *Mol. Cell. Biochem.* 1980. Vol. 30. N 2. P. 71–77.

19. *Grinstein S., Rothstein A.* Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger // *J. Membr. Biol.* 1986. Vol. 90. N 1. P. 1–12.

Поступила в редакцию
06.11.15

INFLUENCE OF TETRAPEPTIDE TUFTSIN ON INTRACELLULAR PH OF MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES

S.K. Pirutin^{1,3,}, V.B. Turovetsky¹, N.Y. Sarycheva², A.B. Druzhenko³,
V.N. Kalihevich⁴, A.A. Kamensky²*

¹ *Department of Biophysics and* ² *Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

³ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia;*

⁴ *Department of Natural Compounds Chemistry, Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University, Universitetsky pr. 26, Peterhof, St. Petersburg, 198504, Russia;*

* e-mail: pirutin@yandex.ru

It was demonstrated by means of probe microfluorimetry of single cells that tuftsin in concentrations 0.1 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (that increase murine peritoneal macrophages phagocytic activity) changed intracellular pH (pH_i) biphasically over time. At the beginning there was a decrease of pH_i reaching the ultimate expression after 5 min of incubation. After that pH_i value increased, reaching maximum 30 min later. The observed parameter (pH_i) did not change up to 55 min. It was found that after administration of the Na^+/H^+ exchange blocker ethylisopropylamiloride into the cells incubation medium during tuftsin treatment there was no increase of intracellular pH. This finding can be the evidence that the observed increase of pH_i during tuftsin treatment through the second phase of cellular response connected with the system of Na^+/H^+ exchange.

Keywords: *tuftsin, macrophages, intracellular pH, Na^+/H^+ exchanger.*

Сведения об авторах:

Пирутин Сергей Константинович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: pirutin@yandex.ru

Туровецкий Валерий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vbturovet@rambler.ru

Сарычева Наталья Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Дружко Анна Борисовна — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатории функциональной биофизики белка ИТЭБ РАН г. Пушкино. Тел.: 4-967-73-25-80; e-mail: druzhko@mail.iteb.ru

Калихевич Виктор Николаевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр., кафедры химии природных соединений химического факультета СПбГУ. Тел.: 8-812-363-67-22; e-mail: vkalihevich@jand.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru