

**СОДЕРЖАНИЕ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ КОМПОНЕНТОВ G-БЕЛКОВ
(краткое сообщение)**

С.С. БОНДАРЬ, И.В. ТЕРЕХОВ

*ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», медицинский институт,
ул. Болдина, 128, Тула, 300012, Россия, e-mail: trft@mail.ru*

Аннотация. У больных с ревматоидным артритом и у практически здоровых лиц в мононуклеарных клетках периферической крови методом иммуноферментного анализа исследовано содержание компонентов сигнальной системы G-белков. Результаты проведенного анализа показали, что ревматоидный артрит протекает на фоне повышенного уровня в МНК субъединицы $\alpha 1$ G-белка и $\gamma 12$. Указанные обстоятельства свидетельствуют о целесообразности разработки соответствующих внешних воздействия, в том числе электромагнитной природы, для коррекции метаболических процессов в клетках, за счет изменения активности системы вторичных посредников, ассоциированных с G-белками.

Ключевые слова: G-белки, ревматоидный артрит, метаболизм, сигнальная трансдукция.

**CONTENT OF G-PROTEIN COMPONENTS IN MONONUCLEAR CELLS OF PERIPHERAL
BLOOD IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (brief report)**

S.S. BONDAR', I.V. TEREKHOV

Tula State University, medical Institute, St. Boldin, 128, Tula, 300012, Russia, e-mail: trft@mail.ru

Abstract. The content of components of the G-protein signaling system was studied in mononuclear cells of peripheral blood by the method of immunoenzymatic analysis in patients with rheumatoid arthritis and in practically healthy individuals.

The results of the analysis showed that rheumatoid arthritis occurs against the background of an elevated level in the MNC subunit of $\alpha 1$ G-protein and $\gamma 12$. These circumstances indicate the advisability of developing appropriate external influences, including electromagnetic nature, for the correction of metabolic processes in cells due to changes in the activity of the system of secondary mediators associated with G-proteins.

Key words: G-proteins, rheumatoid arthritis, metabolism, signal transduction

Введение. Ответные реакции клетки на внешние факторы, включая гормоны, нейротрансмиттеры, нейромодуляторы, а также явления физической природы, важнейшую роль играют G-белки (белки, связывающие гуанозинозные нуклеотиды), обеспечивающие передачу сигнала от рецептора к исполнительному аппарату клетки [9, 10, 12]. Являясь посредниками в передаче рецепторного сигнала, G-белки, как гетеротриммеры, состоят из α , β и γ субъединиц. При этом α -субъединица обладает каталитической активностью, позволяющей расщеплять гуанозинтрифосфат (ГТФ) до гуанозиндифосфата (ГДФ) [7-13]. Субъединицы β и γ , существующие в связанной друг с другом форме, не обладают каталитическими свойствами, соединяясь с α -субъединицей, обеспечивают блокаду ее каталитической активности в отсутствие рецепторного сигнала, связывая ГДФ [11].

Показано, что Gs белки стимулируют цАМФ-зависимые сигнальные пути, обеспечивая, в частности, активацию аденилатциклазы в ответ на активацию β_1 , β_2 -адренорецепторов, D1-дофаминовых рецепторов, 5HT4, 6, 7-серотониновых рецепторов, H2-гистаминовых рецепторов, D1-рецепторов дофамина и т.п., тогда как Gi сопряжены с M2 и M4 изоформами ацетилхолиновых рецепторов, 5HT1, H2 и H4-гистаминовыми рецепторами, α_2 (A, B, C)-адренорецепторами, D2-D4 дофаминовыми рецепторами, CXCR4 рецепторами хемокинов, метаботропными глутаматными рецепторами, рецепторами ГАМК, опиоидными, рецепторами каннабиноидов, мелатонина, рецепторами соматостатина [5, 8]. Активация Gs и Gi белков сопровождается соответственно усилением либо снижением активности аденилатциклазы и продукции вторичного посредника передачи сигнала внутрь клетки – цАМФ, что приводит к формированию соответствующего биологического эффекта.

В регуляции активности G-белков важную роль играют RGS белки (регуляторы сигнальных путей G-белков), обладающие свойством ГТФ-аз, обеспечивая ускорение гидролиза ГТФ и прекращение передачи сигнала внутрь клетки и восстановление чувствительности рецепторного аппарата к лиганду, определяя готовность сигнального каскада к восприятию следующего информационного сигнала. Доказана важная роль этих факторов в предупреждении гипертрофии миокарда, регуляции реактивности иммуно-

компетентных клеток к воздействию митогенов, бактериальных компонентов, регуляции клеточного стресса, активации *T*-лимфоцитов, синаптической пластичности и др. процессах.

Одним из факторов физической природы, способным модулировать клеточную активность, является низкоинтенсивное электромагнитное излучение частотой 1 ГГц, стимулирующее восстановление естественных соотношений содержания и активности в клетках протеинкиназ различных сигнальных путей [2].

Цель исследования – изучение содержания в МНК отдельных субъединиц *G*-белков, а так же регуляторов сигнальных путей *G*-белков.

Материалы и методы исследования. В соответствии с целью настоящей работы были обследованы 37 пациентов женского пола с ревматоидным артритом в возрасте от 34 до 56 лет, составившие основную группу. Контрольную группу составили 16 практически здоровых молодых человек из числа доноров крови в возрасте от 20 до 43 лет.

Материалом для исследования служила венозная кровь, забиравшаяся в утренние часы (с 7:00 до 7:30) из локтевой вены. Для проведения исследования внутриклеточных маркеров 1 мл цельной крови вносили во флакон, содержащий 4 мл среды *DMEM*, гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и *L*-глутамин (0,6 мг/мл). Подготовленные таким образом образцы облучали в течение 45 минут аппаратом микроволновой терапии «Акватон-02» (ООО «ТЕЛЕМАК», г. Саратов), на частоте $1,0 \pm 0,03$ ГГц (плотность потока энергии 50 нВт/см^2) [3, 4, 6].

В клеточных лизатах методом *иммуноферментного анализа* (ИФА) оценивали содержание (концентрацию) субъединицы $\alpha 1$ (*GNA11*) и $\gamma 12$ (*GNG12*) *G*-протеина, а также белков *RGS1* и *RGS2*. Исследование выполняли на автоматическом анализаторе *Personal LAB (Adaltis Italia S.p.A., Италия)*, с использованием наборов реактивов производства *CUSABIO BIOTECH* (Китай).

Статистическую обработку проводили с помощью программы *Statistica 7.0*. Результаты исследования представлены в виде: среднее значение признака (\bar{x}) медиану (*Me*), 25 и 75 процентиля (25%, 75%). Статистическую значимость (*p*) межгрупповых различий в независимых выборках оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни, в связанных – с использованием критерия Вилкоксона.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлено содержание исследованных белков в группе контроля и основной группе.

Таблица 1

Исходное содержание исследованных факторов в группах

Фактор	Контрольная группа				Основная группа			
	\bar{x}	25%	<i>Me</i>	75%	\bar{x}	25%	<i>Me</i>	75%
<i>GNA11</i> , нг/мл	0,8	0,51	0,77	1,09	0,586	0,44	0,515	0,56
<i>GNG12</i> , нг/мл	0,665	0,565	0,72	0,765	0,521	0,345	0,605	0,68
<i>RGS1</i> , нг/мл	0,672	0,584	0,699	0,76	0,71	0,575	0,68	0,84
<i>RGS2</i> , нг/мл	0,531	0,384	0,49	0,678	0,588	0,374	0,634	0,76

Проведенный анализ показал, что у пациентов с субклиническим иммунно-воспалительным процессом содержание в МНК субъединицы *GNA11* ниже, чем в контрольной группе в среднем на 26,2% ($p=0,0017$), а *GNG12* на 22,0% ($p=0,0001$). При этом уровень белка *RGS1* в основной группе был на 5,2% выше ($p=0,48$), чем в группе контроля, а *RGS2* – на 11,0% ($p=0,4$).

Результаты оценки динамики *RGS2* в облученных МНК свидетельствуют о прогрессивном снижении содержания в клетке исследованных факторов после однократного воздействия микроволн на клетки. При этом спустя сутки после воздействия, в облученных МНК основной группы, содержание исследованного фактора приближалось к уровню данного фактора в группе контроля до воздействия на клетки микроволн. Напротив, в клеточных культурах, не подвергавшихся воздействию микроволн, имеет место тенденция к повышению содержания в МНК белка *RGS2*.

Пониженный уровень ингибиторной субъединицы в МНК реконвалесцентов ВП, в сочетании со снижением уровня *GNG12*, способствуют активации аденилатциклазы 2-го типа и накоплению в клетке цАМФ [2]. Несколько повышенный уровень негативного регулятора активности *G*-белков – протеина *RGS1*, и в особенности – *RGS2*, не способствует нормализации функционального состояния МНК, определяя повышенную клеточную реактивность иммунокомпетентных клеток у реконвалесцентов ВП. Таким образом у обследованных больных имеет место стимуляция активности сигнального пути *G*-белков, что способствует сохранению повышенной чувствительности клеток к различным внешним воздействиям, опосредуемых соответствующими рецепторами, в частности, *Ca*-чувствительными рецепторами, рецепторами к простагландинам *E1* и *E2*, метаболитными глутаматными рецепторами, $\alpha 2$ -адренергическими рецепторами, *M1*, *M4* мускариновыми рецепторами, рецепторами апелина и т.п. В этих условиях, снижение содержания в клетке *RGS*-белков, определяющее замедление гидролиза АДФ,

способствует сохранению сигнальной активности *G*-белков и реактивности соответствующих клеточных типов.

Анализ результатов проведенного исследования свидетельствует о чувствительности содержания компонентов *G*-белков в МНК к воздействию низкоинтенсивных микроволн частотой 1 ГГц, в особенности γ -субъединицы и регуляторного белка *RGS2*, позволяя говорить о чувствительности *Ca*-зависимых механизмов клеточной регуляции к излучению. При этом в облученных культурах отмечено повышение содержания *GNAI* и *GNGI2*, которое более выражено в МНК практически здоровых лиц. Проведенный анализ показал, что однократное воздействие на клетки микроволн частотой 1 ГГц способствует формированию положительной динамики содержания в МНК соответствующих молекулярных компонентов, что определяет усиление функционирования в облученных клетках эффекторных молекулярных механизмов, контролируемых *GNAI1*, в том числе изменение активности терминальных протеинкиназ *MAPK/SAPK*-сигнального пути – протеинкиназы *ERK* [1]. Указанное обстоятельство определяет сохранение активности рецепторного аппарата клетки и ее чувствительности к управляющим воздействиям, в том числе гормонов и других сигнальных молекул, в том числе простагландинов и хемокинов [8].

Заключение. Фаза реконвалесценции внебольничной пневмонии сопровождается статистически значимым снижением содержания в МНК субъединицы *GNAI1* и *GNGI2* с тенденцией к повышению в клетках содержания вспомогательных белков *RGS1* и *RGS2*.

В облученных культурах МНК практически здоровых лиц спустя сутки после воздействия уровень *GNAI1* возрастал в среднем на 71,3% ($p=0,005$), а *GNGI2* на 111,1% ($p=0,0017$), при соответствующем повышении содержания данных белков в группе контроля на 80,5% ($p=0,009$) и 129,2% ($p=0,0012$) соответственно. Облучение так же способствовало уменьшению содержания в клетках белка *RGS1* в основной группе на 59,4% ($p=0,01$), а *RGS2* – на 6,8% ($p=0,1$), при изменении их в группе контроля на 49,3% ($p=0,015$) и 7,5% ($p=0,07$) соответственно.

Учитывая универсальный характер воздействия микроволн на клетки, а также общие молекулярные механизмы, инициируемые микроволнами, можно полагать, что облучение способствует изменению метаболической активности не только иммунокомпетентных клеток, но и негемопэтических клеток за счет изменения функциональной активности рецепторного аппарата, в частности, метаболитных глутаматных рецепторов, адренергических, *M*-холинорецепторов и рецепторов хемокинов.

Результаты исследования позволяют говорить о том, что низкоинтенсивные микроволны частотой 1 ГГц являются важным фактором, влияющим на функциональную активность клеток, в том числе на их чувствительность к гормональным и паракринным сигнальным регуляторам. Представляется перспективным дальнейшее исследование биологических эффектов данного физиотерапевтического фактора в аспекте его использования для реабилитации, в том числе иммунореабилитации и нейрореабилитации, а также восстановления клеточной пластичности после перенесенных стрессов, в том числе, ишемической и гипоксической природы.

Литература

1. Солодухин К.А., Никифоров В.С., Громов М.С., Парфенюк В.К., Бондарь С.С., Терехов И.В. Влияние низкоинтенсивного СВЧ-облучения на внутриклеточные процессы в мононуклеарах при пневмонии // Медицинская иммунология. 2012. Т.14, №6. С. 541–544.
2. Терехов И.В., Петросян В.И., Дягилев Б.Л., Солодухин К.А., Аржников В.В., Бондарь С.С. Молекулярные механизмы иммунореабилитации при использовании низкоинтенсивного СВЧ-излучения // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2011. Т.1, № 5. С. 34–37.
3. Терехов И.В., Солодухин К.А., Никифоров В.С., Ицкович В.О., Шуленин К.С. Особенности биологического эффекта низкоинтенсивного СВЧ-облучения в условиях антигенной стимуляции мононуклеаров цельной крови // Физиотерапевт. 2013. №1. С. 26–32.
4. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Бондарь С.С. Состояние рецепторзависимых сигнальных путей в агранулоцитах периферической крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием микроволнового излучения // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2016. №93(3). С. 23–28. DOI: 10.17116/kurort2016323-28.
5. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Никифоров А.А., Бондарь С.С. Продукция цитокинов клетками цельной крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием низкоинтенсивного СВЧ-облучения // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-57. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/4815.pdf> (дата обращения: 30.06.2014). DOI: 10.12737/5025
6. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Функциональное состояние клеток цельной крови при внебольничной пневмонии и его коррекция СВЧ-излучением // Фундаментальные исследования. 2014. № 10 (4). С. 737–741.

7. Clapham D.E., Neer E.J. G protein beta gamma subunits. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1997. № 37. P. 167–203. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167.
8. Damaj B.B., McColl S.R., Neote K., Songqing N., Ogborn K.T., Hébert C.A., Naccache P.H. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops // FASEB J. 1996. № 10(12). P. 1426–1434.
9. Larson K.C., Lipko M., Dabrowski M., Draper M.P. Gng12 is a novel negative regulator of LPS-induced inflammation in the microglial cell line BV-2 // Inflamm Res. 2010. № 59(1). P. 15–22. DOI:10.1007/s00011-009-0062-2.
10. Lee M.J., Evans M., Hla T. The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway // The Journal of Biological Chemistry. 1996. № 271(19). P. 11272–11279. DOI:10.1074/jbc.271.19.11272.
11. Morishita R., Saga S., Kawamura N. Differential localization of the gamma 3 and gamma 12 subunits of G proteins in the mammalian brain // J. Neurochem. 1997. № 68(2). P. 820–827. DOI:10.1046/j.1471-4159.1997.68020820.
12. Raymond J.R., Mukhin Y.V., Gelasco A., Turner J., Collinsworth G., Gettys T.W., Grewal J.S., Garnovskaya M.N. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction // Pharmacology & Therapeutics 2002. № 92 (2-3). P. 179–212. DOI:10.1016/S0163-7258(01)00169-3.
13. Zhong M., Clarke S., Vo B.T., Khan S.A. The essential role of *Gia2* in prostate cancer cell migration // Mol Cancer Res. 2012. № 10(10). P. 1380–1388. DOI:10.1158/1541-7786.

References

1. Solodukhin KA, Nikiforov VS, Gromov MS, Parfenyuk VK, Bondar' SS, Terekhov IV. Vliyanie nizkointensivnogo SVCh-oblucheniya na vnutrikletochnye protsessy v mononuklearakh pri pnevmonii [Effect of low intensity microwave radiation on intracellular processes in mononuclear cells in pneumonia]. Meditsinskaya immunologiya. 2012;14(6):541-4. Russian.
2. Terekhov IV, Petrosyan VI, Dyagilev BL, Solodukhin KA, Arzhnikov VV, Bondar' SS. Molekulyarnye mekhanizmy immunoreabilitatsii pri ispol'zovanii nizkointensivnogo SVCh-izlucheniya [Molecular mechanisms of immune rehabilitation when using low-level microwave radiation]. Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy. 2011;1(5):34-7. Russian.
3. Terekhov IV, Solodukhin KA, Nikiforov VS, Itskovich VO, Shulenin KS. Osobennosti biologicheskogo efekta nizkointensivnogo SVCh-oblucheniya v usloviyakh antigennoy stimulyatsii mononuklearov tsel'noy krov i [Features of the biological effect of low intensity microwave irradiation, under conditions of antigen stimulation of mononuclear cells whole blood]. Fizioterapevt. 2013;1:26-32. Russian.
4. Terekhov IV, Khadartsev AA, Bondar' SS. Sostoyanie retseptorzavisimyykh signal'nykh putey v agranulotsitakh perifericheskoy krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoy pnevmonii pod vliyaniem mikrovolnogo izlucheniya [State of recuperability signaling pathways in agranulocytes peripheral blood of patients community-acquired pneumonia under the influence of microwave radiation]. Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury. 2016;93(3):23-8. DOI: 10.17116/kurort2016323-28. Russian.
5. Terekhov IV, Khadartsev AA, Nikiforov AA, Bondar' SS. Produktsiya tsitokinov kletkami tsel'noy krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoy pnevmonii pod vliyaniem nizkointensivnogo SVCh-oblucheniya [Production of cytokines by whole blood cells of patients with community-acquired pneumonia under the influence of microwave irradiation]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie. 2014 [cited 2014 Jun 30];1 [about 6 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/4815.pdf>. DOI: 10.12737/5025
6. Terekhov IV, Khadartsev AA, Nikiforov VS, Bondar' SS. Funktsional'noe sostoyanie kletok tsel'noy krovi pri vnebol'nichnoy pnevmonii i ego korrektsiya SVCh-izlucheniem [the Functional state of whole blood cells with community-acquired pneumonia and its correction of microwave radiation]. Fundametal'nye issledovaniya. 2014;10 (4):737-41. Russian.
7. Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1997; 37: 167-203. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167.
8. Damaj BB, McColl SR, Neote K, Songqing N, Ogborn KT, Hébert CA, Naccache PH. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. FASEB J. 1996; 10(12): 1426-34.
9. Larson KC, Lipko M, Dabrowski M, Draper MP. Gng12 is a novel negative regulator of LPS-induced inflammation in the microglial cell line BV-2. Inflamm Res. 2010; 59(1): 15-22. DOI:10.1007/s00011-009-0062-2.
10. Lee MJ, Evans M, Hla T. The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(19): 11272-9. DOI:10.1074/jbc.271.19.11272.

11. Morishita R, Saga S, Kawamura N. Differential localization of the gamma 3 and gamma 12 subunits of G proteins in the mammalian brain. *J. Neurochem.* 1997; 68(2): 820–7. DOI:10.1046/j.1471-4159.1997.68020820.

12. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* 2002; 92 (2-3): 179-212. DOI:10.1016/S0163-7258(01)00169-3.

13. Zhong M, Clarke S, Vo BT, Khan SA. The essential role of Gi α 2 in prostate cancer cell migration. *Mol Cancer Res.* 2012; 10(10):1380-8. DOI:10.1158/1541-7786.

Библиографическая ссылка:

Бондарь С.С., Терехов И.В. Содержание в мононуклеарных клетках периферической крови у больных ревматоидным артритом компонентов g-белков (краткое сообщение) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2017. №4. Публикация 2-23. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2017-4/2-23.pdf> (дата обращения: 06.12.2017). DOI: 10.12737/article_5a3215990e63d3.14029522.