

приведены средние арифметические значения, $\pm$ стандартная ошибка.

Полученные результаты подтверждают факт существования истинной индукции ферментов белкового катаболизма при введении смеси аминокислот, однако вопросы, связанные с пониманием механизмов экспрессии генов при негормональной индукции, еще далеки от своего окончательного решения, что делает актуальной дальнейшую разработку задач, связанных с выяснением особенностей функционального статуса хроматина при этой форме индукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борщевская Т.А., Добрецов Г.Е., Петров В.А., Молек. биол., 9, 5, 676-682, 1975.
2. Вардеванян А.О., Вардапетян Р.Р., Тирацун С.Г., Паносян Г.А. Физиол. раст., 32, 6, 1114-1119, 1985.
3. Вардеванян П.О., Тирацун С.Г., Галстян Р.Г., Шибид Г.Х., Давтян М.А. Вopr. мед. химии (деп. рук. ВИНТИ 07. 05. 1990, N 2400-13).
4. Давтян А.М., Вардеванян А.О., Акопян Л.М., Карагезян К.Г. Биолог. журн. Армении, 42, 9-10, 946-949, 1989.
5. Давтян М.А., Вардеванян П.О., Тирацун С.Г., Шибид Г.Х. Биохимия, 52, 5, 737-742, 1987.
6. Давтян М.А., Вардеванян П.О., Тирацун С.Г., Шибид Г.Х. Биолог. журн. Армении, 41, 1, 38-45, 1988.

Поступила 30.1.1997

Биолог. Журн. Армении, 1-2 (51), 1998

УДК 612.014.462.4

ПРОСТАГЛАНДИН F_{2a} СТИМУЛИРОВАННОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭРИТРОЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

А.В. ГЮЛЬХАНДАНЯН*, М.П. МАХАУТ-СМИТ**, А.К. БЛБУЛЯН***

*Институт биохимии НАН Армении 375044, Ереван

**Кембриджский университет, Кембридж, Англия

***Центр перинатологии, акушерства и гинекологии МЗ Армении, Ереван

Используя Ca^{2+} -й флуоресцентный индикатор фура-2, изучали влияние простагландина F_{2a} на Ca^{2+} -й отклик единичной клетки линии человеческих эритролейкемических клеток. Выявлено преходящее увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Форма Ca^{2+} -й кривой в условиях присутствия ЭГТА несколько отличается от кривой, полученной при его отсутствии. Предполагается, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в основном обусловлено выходом Ca^{2+} из внутриклеточных запасов.

Օգտագործելով Ca^{2+} -ական լուսածորող ֆուրա-2 ինդիկատորը, ուսումնասիրել է ենթաբնութի՝ պրոստագլանդին F_{2a} -ի, ազդեցությունը մարդու էրիթրոլեյկեմիկ բջիջներին

գոհ եզակի բջի Ca^{2+} -ական պատասխանի վրա: Ակատվել է ներբջջային ($[Ca^{2+}]_i$) Ca^{2+} -ի քանակության անցողիկ ավելացում: Ca^{2+} -ական կորի ձևը էՊՏԱ-ի առկայության պայմաններում որոշ չափով տարբերվում է կորից, ստացված խելատորի բացակայության դեպքում: Ենթադրվում է, որ $[Ca^{2+}]_i$ -ի անցողիկ ավելացումը տեղի է ունենում հիմնականում ներբջջային պահեստներից Ca^{2+} -ի դուրս գալու հետևանքով:

By use of Ca^{2+} -fluorescent indicator fura-2 the influence of enzaprost (prostaglandin F_{2a}) on Ca^{2+} response of single cell of the human erythroleukemia cells line has been investigated. The transient increase of intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) was observed. The shape of Ca^{2+} curve in the presence of EGTA differed slightly from that of in the absence of chelator. The transient increase of $[Ca^{2+}]_i$ resulted mainly due to Ca^{2+} release from intracellular stores.

Простагландин F_{2a} - фура 2 - человеческие эритролейкемические клетки - внутриклеточный Ca^{2+} - ЭГТА

Как показывают литературные данные, биохимические и биофизические основы физиологического действия простагландинов недостаточно ясны. Нередко эффекты простагландинов даже из одной и той же группы оказываются противоположными. Рецепторы, специфически распознающие простагландины, обнаружены на плазматических мембранах разных клеток, в том числе клеток крови [1,9-11,13,16].

Один из представителей простагландинов серии F - простагландин F_{2a} (ПГФ $_{2a}$) оказывает сократительное действие на гладкую мускулатуру, активирует пролиферацию ряда клеточных линий, главным образом через стимуляцию фосфолипазы C [7,15]. Отметим, что активация многих клеток ассоциирована с увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) [4]. Однако действие ПГФ $_{2a}$ на изменение Ca^{2+} изучено недостаточно.

Нами с помощью кальциевого флуоресцентного индикатора фура-2 исследовано влияние энзапроста (клиническое название простагландина F_{2a}) на изменение Ca^{2+} в единичных клетках линии человеческих эритролейкемических клеток, долгоживущей клеточной линии, моделирующей тромбоциты и мегакарициты (предшественники тромбоцитов) в аспектах внутриклеточного сигналирования.

Материал и методика. Использована линия эритролейкемических клеток человека, культивируемых в термостате при 37°.

Внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} определяли с помощью флуоресцентной микроскопии. 1 мл клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 40 мин с Ca^{2+} -чувствительным флуоресцентным индикатором фура-2АМ (ацетоксиметилловый эфир фура-2). Конечная концентрация фура-2АМ составляла 1 мкМ. После инкубации клетки собирали центрифугированием при 350хg в течение 20 мин. Супернатант отбрасывали, клетки ресуспендировали до конечного объема 1 мл в забуференной солевой среде, содержащей в мМ: 145 NaCl, 5 KCl, 1MgSO $_4$, 10 глюкозы, 10 Hepes, pH 7,35. Затем 0,1 мл клеток помещали в специальную кювету для исследований. Флуоресценцию красителя фура-2 измеряли фотометрией единичной клетки с использованием спектрофотометрической системы "Caim" (Caim Research Ltd., Англия), присоединенной к инвертированному микроскопу "Nicon Diaphot" (Nicon, Англия). Луч от ксеноновой лампы (Photon Technology Inc., Англия) проходил через вращающийся диск, содержащий 4 фильтра с полосой пропускания 340 нм и 2 фильтра с полосой пропускания 380 нм. Этот двойной возбуждающий луч фокусировался на клетку через линзу объектива. Луч эмиссии в интервале 400-600 нм отбирался двумя дихроичными зеркалами, далее проходил через широкополосный фильтр (485 нм) и попадал на фотоумножитель (Thorn EMI, Англия). Клеточная аутофлуоресценция была незначительной. Сигнал после фотоумножителя

обрабатывался и выводился на компьютер, служащий также для записи данных. Отношение интенсивностей флуоресценции 340/380 определяет содержание цитозольного свободного Ca^{2+} [6].

Добавки простагландина F_{2a} производили через инъекционную микропипетку из боросиликатного стекла, подведенную вплотную к клетке под контролем микроскопа с помощью микроманипуляторов. Была использована специальная система инъекции под давлением. Простагландин растворяли в забуференной солевой среде в соответствующей концентрации и вводили внутрь инъекционной микропипетки с помощью специальной микроиглы. Инъекция под давлением происходила не сразу, а в течение заданного времени.

Результаты и обсуждение. Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках регулируется различными механизмами, включающими Ca^{2+} -е транспортные пути как плазматической мембраны, так и внутриклеточных органелл [5,12]. Известно, что стимуляция клеточных рецепторов некоторыми группами простагландинов, например простагландинами группы Е, может приводить к повышению уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [2,3,11,16,17]. Хотя и ПГФ_{2a} также может связываться с клеточными рецепторами и стимулировать клеточную пролиферацию [7,15], однако относительно его влияния на изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сравнительно мало данных.

Мы проверили отклик единичной человеческой эритролейкемической клетки на добавку ПГФ_{2a} в условиях присутствия в среде инкубации 1 мМ Ca^{2+} . Из рис.1 видно, что в ответ на внесение ПГФ_{2a} (концентрация ПГФ_{2a} в инъекционной пипетке 125 мкМ) происходит увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Этот отклик преходящий (transient), с пиком на 50 сек, и возвращающийся обратно к базовой линии флуоресценции (отношение 340/380). При этом, хотя добавка и завершена, через некоторое время происходит еще один спонтанный всплеск Ca^{2+} .

Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ внутри клеток может происходить как вследствие

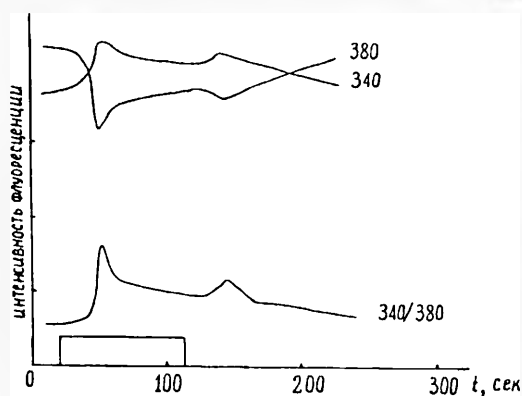


Рис. 1. Изменение флуоресценции фуро-2, отражающей содержание $[\text{Ca}^{2+}]_i$, под действием ПГФ_{2a} в единичной клетке в присутствии Ca^{2+} в среде инкубации. 0,1 мл клеточной суспензии в среде инкубации, содержащей (в мМ): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO_4 , 1 CaCl_2 , 10 глюкозы, 10 Нерес, рН 7,35, помещали в кювету для исследований. Прямоугольником отмечено добавление 125 мкМ ПГФ_{2a} .

выхода Ca^{2+} из внутриклеточных запасов, эндоплазматического ретикулума и митохондрий, так и последующего входа его внутрь через плазматическую мембрану. Отметим, что Ca^{2+} -я проницаемость плазматических мембран невозбудимых клеток регулируется степенью наполненности ионами Ca^{2+} внутриклеточных Ca^{2+} - запасующих компартментов, в основном эндоплазматического ретикулума. Выход Ca^{2+} из внутриклеточных компартментов в цитоплазму может приводить к входу внесклеточного Ca^{2+} внутрь клеток. Этот процесс активации входа Ca^{2+} в клетки при мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} называется

объемным (capacitative) входом Ca^{2+} [12].

Он во многих случаях происходит по так называемым - I_{crac} каналам (I_{crac} , calcium release-activated calcium current - кальциевый ток, активируемый высвобождением Ca^{2+}) [8]. Отметим, что до последнего времени не было известно, обладают ли человеческие эритролейкемические клетки способностью объемного входа внутрь ионов Ca^{2+} , зависящего от внутриклеточных запасов Ca^{2+} . Однако совершенно недавно было показано, что такой компонент входа Ca^{2+} в человеческие эритролейкемические клетки существует, и происходит транспорт Ca^{2+} по каналам типа I_{crac} [14]. Не исключено также, что PGF_{2a} сам может увеличивать пассивную Ca^{2+} -ю проницаемость плазматических мембран; при этом также может иметь место вход Ca^{2+} внутрь по градиенту концентрации.

Уменьшение $[Ca^{2+}]_i$ может происходить из-за входа Ca^{2+} во внутриклеточные органеллы, а также вследствие активной "откачки" Ca^{2+} из цитоплазмы Ca^{2+} - АТФ-азой плазматических мембран и работы Na^+/Ca^{2+} - обменника плазматических мембран.

Чтобы оценить вклад внутриклеточных Ca^{2+} -запасающих компартментов в преходящем увеличении $[Ca^{2+}]_i$, мы проверили действие простагландина на клетки в отсутствие Ca^{2+} в среде инкубации и при наличии 1 мМ хелатора ионов Ca^{2+} - ЭГТА. На рис.2 представлена форма кривой изменения Ca^{2+} в цитоплазме клетки.

Видно, что даже в отсутствие внесклеточного Ca^{2+} происходит преходящее увеличение $[Ca^{2+}]_i$. При этом форма Ca^{2+} -го отклика несколько отличается от кривой, представленной на рис.1: на рис.2 пик $[Ca^{2+}]_i$ более резкий и возвращение к базовой линии флуоресценции происходит быстрее.

На основании полученных данных можно прийти к выводу, что индуцированное PGF_{2a} преходящее увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в человеческих эритролейкемических клетках определяется главным образом высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых запасов. Незначительная компонента входа Ca^{2+} через плазматическую мембрану внутрь клеток скорее всего также имеет место, поскольку возвращение к базовой линии флуоресценции после всплеска Ca^{2+} в условиях отсутствия ЭГТА (рис.1) происходит медленнее, чем в присутствии хелатора (рис.2).

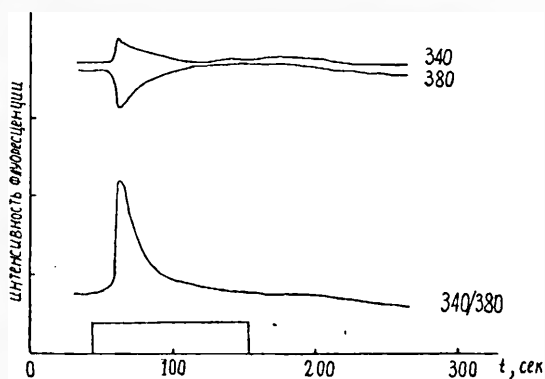


Рис. 2. Ca^{2+} -й отклик единичной клетки под действием PGF_{2a} в присутствии ЭГТА в среде инкубации. Условия те же, что и в подписи к рис. 1, только 1 мМ $CaCl_2$ заменен на 1 мМ ЭГТА.

ЛІТЕРАТУРА

1. Габриелян Э.С., Акопов С.Э. Клетки крови и кровообращение, Ереван, 1985.
2. Aboolian A., Van der Molen M., Nord E.P. Am. J. Physiol., 25, 1135-1143, 1989.
3. Adachi M., Ryo R., Yoshida A. Tashigavara K., Yamaguchi M., Hoshijima M., Takai Y., Sato T. Cancer Res., 49, 3805-3808, 1989.
4. Akerman K.E.O. Medical Biol., 60, 313-325, 1983
5. Berridge M.J. Nature, 361, 315-325, 1993
6. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. J.Biol.Chem., 260, 3440-3450, 1985.
7. Hakeda Y., Harada S., Matsumoto T., Tezuka K., Higashino K., Kodama H., Hashimoto-Goto T., Ogata E., Kumegawa M. J.Biol.Chem., 266, 21044-21050, 1991.
8. Hoth M., Penner R. J.Physiol., 465, 359-386, 1993.
9. Kelley L.L., Blackmore P.F., Graber S.E., Stewart S.J. J.Biol.Chem., 265, 17657-17664, 1990.
10. Morinelli T.A., Zhang L.M., Newnan W.H., Meier K.M. J.Biol.Chem., 269, 5693-5698, 1994.
11. Negishi M., Ito S., Hayaishi O. J.Biol.Chem., 264, 3916-3923, 1989.
12. Putney J.M. J. Cell Calcium, 11, 611-629, 1990
13. Shenker A., Goldsmith P., Unson C.G., Spiegel A.M. J.Biol.Chem., 266, 9309-9313, 1991.
14. Somasundaram B., Mason M.J., Mahaut-Smith M.P. J.Physiol., 1997 (in press).
15. Watanabe T., Waga I., Honda Z., Kurokawa K., Shimizu T. J.Biol.Chem., 270, 8984-8990, 1995.
16. Yamaguchi D.T., Hahn T.J., Beecker T.G., Kleeman C.R., Muallem S. J.Biol.Chem., 263, 10745-10753, 1988.
17. Yokohama H., Tanaka T., Ito S., Negishi M., Hayashi H., Hayaishi O. J.Biol.Chem., 263, 1119-1122, 1988.

Поступила 8.IV.1997