

4. Гильмиярова Ф. Н., Радомская В. М., Виноградова Л. Н. Укр. биох. ж., 1982, 54, 1, с. 13.
5. Меерсон Ф. З., Лифшиц Р. И., Павлова В. И. Вopr. мед. химии, 1981, 27, 1, с. 35.
6. Мелик-Агаева Е. А. Автореф. канд. дис. Ереван, 1975.
7. Мхитарян В. Г. Тр. Ермединститута, вып. XI. Ереван, 1960, с. 41.
8. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаева Е. А. Биол. ж. Армении, 1974, 27, 6, с. 3.
9. Мхитарян В. Г., Межлумян Л. М. Ж. exper. и клин. мед. АН Арм ССР, 1978, 18, 3, с. 13.
10. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. Вестник ЛГУ, 1969, 21, 4, с. 42.
11. Савин А. В. В кн.: Тканевая гипоксия и ее коррекция. Новосибирск, 1981, с. 63.
12. Элerte Д. Л., Майоре А. Е., Горштейн Э. С., Ремберг Л. А. В кн.: Биологич. мембраны и патол. клетки. Рига, 1986, с. 62.
13. Dubois K. P. and Potter V. P. J. Biol. Chem., 1943, 150, 185.
14. Fiske and Subbarow J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
15. Hogeboom G. H. In: Methods in Enzymology, 1955, 1, 17.
16. Lowry O. N., Rosenbrough N. S., Farr A. L., Randall R. T. J. Biol. Chem., 1951, 193, 256.
17. Nacas M. Period biologicorum., 1980, 82, 3, 375.
18. Nair P. P. Ann. of the New York Academy of Sciences, 1972, 203, 53.
19. Natelson S., Pincus Y., Lugowoy J. J. Biol. Chem., 1948, 175, 745.
20. Nordman J., Nordman N., Gauchery O. Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 1826.
21. Norwood William Y., Yugwall Joanne S., Norwood Carol R., Fossel Frck. Amer. J. Physiol., 1983, 244, 3, 205.
22. Regunathan S., Sundaesan R. J. Neurochem., 1984, 43, 5, 1346.
23. Weitzel G., Buddecke E., Schneider P. J. Physiolog. Chem., 1961, 323, 3/8, 211.

УДК 612.112 : 577.156

М. Р. ГРИГОРЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ИХ АКТИВАЦИИ

Исследовали активацию полиморфноядерных лейкоцитов γ -гексахлорциклогексаном, приводящим к синтезу лейкотриена B_4 , методом флуоресцентной оценки концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в лейкоцитах, насыщенных квином. Показано, что стимуляция лейкоцитов приводит к резкому увеличению поступления Ca^{2+} в клетку. Добавление к клеткам ЭГТА и антагонистов Ca^{2+} не влияет на базальный уровень внутриклеточного Ca^{2+} , но ингибирует прирост концентрации этих ионов под действием стимула.

В настоящее время полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) стали предметом тщательного изучения ввиду раскрытия в них ряда систем, обладающих высокой метаболической активностью и играющих значительную роль не только в физиологии, но и в патологических процессах. Активация ПМЯЛ различными стимуляторами вызывает метаболический взрыв, сопровождающийся бурной генерацией свободных радикалов, выбросом различных физиологически активных веществ, лизосомальных ферментов и т. д. Все эти процессы непосредственно связаны с увеличением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (Ca_{in}^{2+}). Однако механизмы сдвигов уровня Ca^{2+} в клетке далеко не изучены,

Особенно малочисленны исследования, посвященные механизмам регуляции поступления Ca^{2+} в клетку. Сравнительно недавно было показано, что активация протеинкиназы С приводит к закрытию кальциевых каналов в тромбоцитах [1]. Этот факт был рассмотрен в качестве важного элемента ауторегуляции клеток, связанного с известным феноменом десенситизации рецепторов к различным воздействиям. Однако остается неясным, является ли этот механизм универсальным для процессов регуляции транспорта Ca^{2+} в различных клетках или же присущ только кровяным пластинкам.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния антагонистов Ca^{2+} на его проникновение в клетки лейкоцитов и регуляции активатором протеинкиназы С форболовым эфиром кальциевых каналов ПМЯЛ.

Материал и методы

Выделение ПМЯЛ производилось из свежей цитратстабилизированной крови практически здоровых доноров методом осаждения эритроцитов декстраном Т-500 [3]. Осадок лейкоцитов трижды отмывался в фосфатном буфере (рН 7,4), после чего клетки ресуспендировались в буфере Михаэлиса, приготовленном по прописи Оврена-Коллера и содержащем 1 мМ CaCl_2 . Рабочая суспензия содержала 500 тыс. клеток ПМЯЛ в 1 мл. Подсчет клеток осуществлялся на счетчике частиц «Picoscale» (ВНР).

Для оценки сдвигов концентрации Ca^{2+} был использован флуоресцентный краситель квин, который обладает высоким сродством к Ca^{2+} , а связывание с этими ионами приводит к многократному увеличению квантового выхода хромофора [7, 10]. Насыщение ПМЯЛ квином проводилось путем добавления красителя к суспензии клеток на предпоследнем этапе отмывки в конечной концентрации 20 мкМ и инкубации в течение 30 минут. Затем клетки отмывались от незахваченного индикатора и ресуспендировались в рабочем буфере.

Измерение флуоресценции квина в ПМЯЛ проводилось на компьютеризованном спектрофлуориметре RF-500 «Shimadzu» (Япония) и кюветах с длиной оптического пути 1 см. Для этого 100 мкл суспензии ПМЯЛ добавляли к 2 мл среды инкубации и регистрировали флуоресценцию при длине ее волны 495 нм, возбуждения—340 нм. Ширина щелей возбуждения составляла 5, флуоресценции—10 нм. Все измерения проводились при комнатной температуре. По окончании измерений клетки разрушались в присутствии 1 мМ CaCl_2 дигитонином (50 мкМ), и замерялась интенсивность флуоресценции квина при его насыщении кальцием (F_{\max}). После этого к раствору добавляли MnCl_2 (0,5 мМ), вытесняющий Ca^{2+} из комплекса с красителем, и замерялась флуоресценция квина, не связанного с кальцием (F_{\min}). Расчет концентрации Ca^{2+} в цитоплазме лейкоцитов проводился по формуле:

$$\text{Ca}^{2+} = K_{\text{дис.}} (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F),$$

где F —замеренный уровень флуоресценции квина в лейкоцитах, а $K_{\text{дис.}} = 115$ нМ [11].

Стимуляцию ПМЯЛ осуществляли с помощью γ -гексахлорциклогексана (ГХЦГ), индуцирующего резкое повышение метаболической активности клеток, сопровождающееся выбросом свободных радикалов, развитием агрегации и т. д. Известно, что эффект ГХЦГ опосредуется образованием в лейкоцитах одного из основных регуляторов их функционального состояния—лейкотриена B_4 [5]. ГХЦГ растворяли в диметилформамиде и добавляли в пробу до конечной концентрации 200 мкМ.

В работе использованы следующие реактивы: квин «Amersham» (Англия); 4-форбол-12-миристат-13-ацетат, простаглицин, ЭГТА, дилтиазем «Sigma» (США); дигитонин (ФРГ); нифедипин «Germed» (ГДР); верапамил «ЛЕК» (Югославия); буфер Михаэлиса (Франция); остальные реактивы—отечественного производства.

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1а, ГХЦГ вызывает быстрый рост флуоресценции квина в ПМЯЛ, свидетельствующий об увеличении концентрации Ca_{in}^{2+} , причем его эффект на уровень Ca_{in}^{2+} по времени сравним с его воздействием на образование свободных радикалов в клетке [5]. Эти данные соответствуют результатам ряда авторов о повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме ПМЯЛ, стимулированных другими агентами, в частности, комплементом или форбилметронилиллейцилфенилаланином [4, 8].

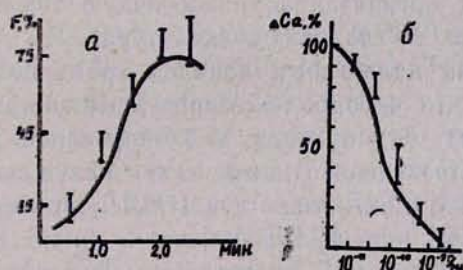


Рис. 1, а. Изменение интенсивности флуоресценции квина в полиморфноядерных лейкоцитах под действием ГХЦГ (200 мкМ). По оси ординат—изменение интенсивности флуоресценции, абсцисс—время. б. Подавление увеличения уровня Ca^{2+} в полиморфноядерных лейкоцитах под действием ФМА. По оси ординат—изменение уровня Ca^{2+} в % от базального уровня, абсцисс—концентрация ФМА.

При введении в инкубационную среду ЭГТА базальный уровень Ca_{in}^{2+} не меняется, но прирост его концентрации под действием ГХЦГ резко понижается, а иногда и полностью исчезает (таблица). Аналогичный эффект оказывают на изменения концентрации Ca_{in}^{2+} и антагонисты—нифедипин, верапамил, дилтиазем. Действие этих препаратов исследовано при изучении изменений концентрации Ca_{in}^{2+} клеток различных тканей. Для клеток гладкой мускулатуры было показано, что в концентрациях 10^{-5} — 10^{-4} М антагонисты блокируют кальциевые каналы [9]. Как видно из таблицы, все эти агенты в 2—3 раза уменьшают прирост уровня Ca_{in}^{2+} под действием ГХЦГ в ПМЯЛ. Но еще

более мощно, чем антагонисты, понижает прирост концентрации Ca_{in}^{2+} под действием ГХЦГ простаглицлин, который является активатором аденилатциклазы.

Влияние различных агентов на уровень Ca_{in}^{2+} в полиморфноядерных лейкоцитах ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Концентрация Ca_{in}^{2+} , μM
Нестимулированные лейкоциты	83,4 ± 14,2
Лейкоциты, стимулированные ГХЦГ (200 μM)	636,4 ± 43,5
Лейкоциты, стимулированные ГХЦГ на фоне:	
Простаглицлина ($5 \times 10^{-9} M$)	106,3 ± 12,7
Нифедипина ($10^{-4} M$)	141,8 ± 18,1
Верапамила ($10^{-4} M$)	152,2 ± 22,8
Дилтиазема ($10^{-4} M$)	158,6 ± 17,8
ЭГТА (1 μM)	91,1 ± 19,7

Таким образом, полученные данные подтверждают феномен резкого увеличения концентрации Ca_{in}^{2+} под действием активирующих ПМЯЛ факторов. При этом влияние на этот процесс ЭГТА и антагонистов Ca^{2+} показывает, что по крайней мере часть Ca^{2+} поступает в клетку при стимуляции извне через раскрывающиеся кальциевые каналы. Последние, поскольку они чувствительны к антагонистам Ca^{2+} , по-видимому, имеют организацию, аналогичную таковой в других клетках (тромбоциты и гладкая мускулатура).

При изучении кальциевых каналов тромбоцитов рядом авторов было показано, что 4-форбол-12-миристал-13-ацетат (ФМА) активирует протеинкиназу С и приводит к блокированию поступления Ca^{2+} в клетку [2, 12]. Проведенное нами исследование показало, что аналогичный эффект ФМА оказывает и в ПМЯЛ, причем в концентрациях, в которых он активирует протеинкиназу С (рис. 16). Таким образом, активация протеинкиназы С является тем фактором, который прекращает поступление Ca^{2+} в ПМЯЛ, обеспечивая закрытие кальциевых каналов. Вместе с аденилатциклазой активаторы протеинкиназы С определяют механизм обратной связи, срабатывание которого может играть важную роль в ауорегуляции лейкоцитов, ограничении степени образования в них свободных радикалов, агрегации и прочих проявлений внутрисосудистой активации, имеющей огромное значение в различных патологических процессах.

Итак, проведенное исследование показало, что активация ПМЯЛ ГХЦГ, одним из действий которого является индукция синтеза лейкотриена B_4 , приводит к увеличению поступления Ca^{2+} в лейкоциты. Это вполне согласуется с представлениями об ионофорных свойствах лейкотриенов [6]. При этом активация, включающая воздействие на протеинкиназу С, приводит к блокаде дальнейшего поступления Ca^{2+} в клетку. Совокупность процессов регуляции кальциевого гомеостаза ПМЯЛ определяет их активацию в условиях нормы и патологии и реактивность клеток к различным воздействиям. Последнее особенно важ-

но для разработки методов коррекции функционального состояния ПМЯЛ в патологии. Очевидно, что воздействие на протеинкиназу С может явиться важным элементом терапевтических мероприятий, требующим, однако, дальнейших исследований.

НИЛ фармакологии мозгового кровообращения ЕрМИ

Поступила 28/XII 1987 г.

Մ. Ռ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

ՊՈԼԻՄՈՐՖՈՆՈՒԿԼԵԱՐ ԼԵՅԿՈՑԻՏՆԵՐԻ ԿԱԼՑԻՈՒՄԱԿԱՆ ԽՈՂՈՎԱԿՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ԽԹԱՆՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Պոլիմորֆոնուկլեար լեյկոցիտների ակտիվացումը γ -հեքսաքլորցիկլոհեքսանով ուսումնասիրվել է կվինով հագեցված լեյկոցիտների ներբջջային կալցիումի քանակը բնորոշող ֆլուորեսցենտային մեթոդով: Ի հայտ է բերված, որ լեյկոցիտների խթանումը զգալիորեն ավելացնում է կալցիում իոնների ներթափանցումը բջջի մեջ:

էԳՏԱ-ի և կալցիումի անտագոնիստների (նիֆեդիպինի, վերապամիլի, դիլտիազեմի) ավելացումը բջջներին շփոխելով ներբջջային կալցիում իոնների նախնական քանակները, ընտրողաբար անդրադառնում է վերջիններիս ներթափանցմանը բջջի մեջ խթանման ազդեցության ներքո:

M. R. GRIGORIAN

STUDY OF CALCIC CANALS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES IN THEIR ACTIVATION

By the method of fluorescent estimation of intracellular calcium concentration in leukocytes the activation of polymorphonuclear leukocytes by γ -hexachlorocyclohexane has been studied in leukotrien B₄ synthesis. It is shown that stimulation of leukocytes causes acute increase of Ca²⁺ entering the cell. In adding to the cell EGTA and calcium antagonists the basal level of Ca²⁺ is not changed, but the inhibiting effect of these preparations on the increase of calcium ions quantity is revealed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авдонин П. А., Алтухова И. П. Биохимия, 1985, 50, 8, с. 1235.
2. Di Virgilio F., Vicentini L., Treves S. Biochem J., 1985, 229, 2, 361.
3. Gabig T. G., Berman S. A., Babor B. M. Blood, 1979, 53, 6, 1133.
4. Gennaro R., Pozzan T., Romeo D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 5, 1416.
5. Meade C., Harvey J., Boot J. R. Biochem. Pharmacol., 1981, 33, 2, 289.
6. O'Flaherty J. T., Hammett M. J., Shwmake T. B. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1981, 103, 2, 552.
7. Rink T., Shmith S., Tsien R. FEBS LETT, 1982, 148, 1, 21.
8. Schell-Frederick E. Cell. Calcium, 1984, 5, 3, 237.
9. Thulestus O. Vasa, 1986, 15, 2, 111.
10. Tsien R. Y. Nature, 1981, 290, 5806, 527.
11. Tsien R. Y., Pozzan T., Rink T. J. J. Cell. Biol., 1982, 94, 2, 325.
12. Verghese M., Fox K., McPhail L., Snyderman R. J. Biol. Chem., 1985, 260, 11, 5769.