

О РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ АТФ В УФ-ОБЛУЧЕННЫХ ЛИМФОЦИТАХ

О. В. Земченкова¹, В. Г. Артюхов², О. В. Башарина², Я. В. Ким², М. А. Наливкина²

¹Воронежская медицинская академия им. Н.Н. Бурденко

²Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 21.01.2011 г.

Аннотация. Исследовано влияние УФ-света (240—390 нм) в дозах 151 и 755 Дж/м² на интенсивность процессов пероксидного окисления липидов, активность Ca²⁺-АТФазы плазматических мембран и уровень энергообеспеченности лимфоцитов крови доноров в отсутствие и в присутствии аутологичной плазмы крови. Показано, что при инкубации УФ-облученных лимфоцитов в присутствии плазмы происходит снижение интенсивности и светосуммы спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции, что, вероятно, связано с защитным антиоксидантным действием компонентов плазмы. Установлено, что изменение активности Ca²⁺-АТФазы плазматических мембран фотомодифицированных лимфоцитов в ходе их инкубации направлено на нормализацию внутриклеточной концентрации Ca²⁺. Вследствие чего УФ-облученные лимфоциты приобретают способность к восстановлению внутриклеточного уровня АТФ, что отражает адаптационные возможности клеток.

Ключевые слова: лимфоциты, УФ-свет, АТФ, Ca²⁺-АТФаза, пероксидное окисление липидов, аутологичная плазма.

Abstract. Influence of UV-light (240—390 nm) in doses 151 and 755 J/m² on intensity of processes of lipid peroxidation, activity of Ca²⁺-ATPase of plasma membrane and level of energy of lymphocytes of blood of donors in the presence and absence of autologous plasma was investigated. It was shown, that during incubation of UV -irradiated lymphocytes at presence of plasma there is a decrease in intensity and light summ spontaneous luminol-dependent chemiluminescence, which is probably related to the protective antioxidant action of components of plasma. It was established, that change of activity Ca²⁺-ATPase of plasma membrane of photomodified lymphocytes during their incubation is directed toward normalization of endocellular concentration of Ca²⁺. Due to this UV-irradiated lymphocytes getting ability to restoration of endocellular level of ATP that reflects adaptive abilities of cells.

Keywords: lymphocytes, UV-light, ATP, Ca²⁺-ATPase, lipid peroxidation, autologous plasma.

ВВЕДЕНИЕ

В многоклеточном организме выживание клеток находится под контролем множества цитокинов различной природы. Такой контроль необходим для поддержания гомеостаза тканей, который достигается за счет баланса между скоростями клеточной пролиферации и клеточной гибели. Так, установлено, что ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-7 значительно продлевают время жизни покоящихся Т-лимфоцитов в культуре *in vitro* [1]. Кроме того, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ИЛ-15, а также интерфероны α и β полностью предотвращают гибель активированных Т-клеток *in vitro* [2]. Наряду с данными о контроле клеточного выживания паракринными факторами, есть результаты, указывающие на то, что контроль выживания клеток могут осуществлять также аутокринные факторы [3]. Имеются немногочисленные сведения о том, что механизм контроля выживания клеток непосредственно связан с их энергетиче-

ским метаболизмом. В качестве одного из основных сигнальных мессенджеров фактически во всех типах живых клеток используются цитоплазматические ионы кальция. В клетках крови изменение концентрации внутриклеточного кальция ассоциировано с множеством клеточных событий, включая активацию клеточных киназ и фосфатаз, регуляцию цитоскелетсвязывающих белков, транскрипционный контроль и модуляцию поверхностных рецепторов [4]. В Т-лимфоцитах повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ при связывании Т-клеточного рецептора с чужеродным антигеном запускает транскрипционные программы, ведущие к секреции эффекторных цитокинов и координации иммунного ответа [5]. Снижение уровня ионов кальция в клетке приводит к ослаблению активации Т-клеток и развитию различных форм иммунодефицита [6]. Возрастающее количество внутриклеточного кальция в клетках крови, как и во всех эукариотических клетках, осуществляется двумя путями: высвобождением компартментализованного Ca²⁺ из внутриклеточных депо и путем акти-

© Земченкова О. В., Артюхов В. Г., Башарина О. В., Ким Я. В., Наливкина М. А., 2011

вазии входа Ca^{2+} через плазматическую мембрану из наружной среды. Поскольку объем эндоплазматического ретикулума составляет всего около 1% от общего объема Т-лимфоцитов, считается, что только вход экстраклеточного Ca^{2+} через ионные каналы может обеспечить в течение многих часов и даже дней необходимый для активации лимфоцитов уровень внутриклеточного Ca^{2+} [7].

Установлено, что УФ-облучение изолированной крови индуцирует многообразные структурно-функциональные изменения как клеток, так и плазмы [8]. Известно, что непосредственно после УФ-облучения суспензии лимфоцитов происходит дозозависимое увеличение уровня пероксидного фотоокисления липидов [9] за счет фотоиндуцированного образования активных форм кислорода (АФК). Последние принимают участие во внутриклеточной и межклеточной передачах активационного сигнала [10]. Кроме того, важную роль в межклеточной сигнализации играют полипептидные ростовые факторы, которые могут инициировать множественные эффекты: от процессов регуляции роста, дифференцировки и экспрессии генов до инициирования апоптоза. Выявлено, что дефицит факторов роста воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу. Так, культивирование лимфоцитов в бессывороточной питательной среде, лишенной ростовых факторов, индуцировало гибель половины количества клеток здоровых доноров путем апоптоза [11]. В работе [12] показано, что при культивировании УФ-облученных лимфоцитов с аутологичной облученной плазмой крови клетки не обнаруживают такого увеличения числа хромосомных нарушений и такого подавления пролиферативного ответа на митоген, какие регистрируются при культивировании с необлученной плазмой.

Целью нашей работы было исследование параметров энергообеспеченности, интенсивности процессов пероксидного окисления липидов (ПФОЛ) и активности Ca^{2+} -АТФазы лимфоцитов под действием УФ-света в дозах 151 и 755 Дж/м², что соответствует терапевтическому диапазону доз, применяемых при аутоотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение лимфоцитов из периферической крови доноров осуществляли путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$).

УФ-облучение лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) и аутологичной плазмы проводили при их непре-

рывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильр УФС-1 с полосой пропускания 240—390 нм в течение 1 и 5 минут. Интенсивность облучения составляла 151 Дж/(м²·мин). Объем вносимого в кювету образца — 2 мл.

Облученные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в отсутствие и с добавлением 18% аутологичной необлученной плазмы при температуре 37 °С в атмосфере с $[\text{CO}_2] = 5\%$. Нативные лимфоциты инкубировали при тех же условиях как без добавления плазмы, так и с добавлением необлученной и облученной аутологичной плазмы.

Концентрацию АТФ определяли с помощью люциферазной биолюминесцентной реакции с использованием стандартного набора реагентов («Люмтек», Россия). Регистрацию интенсивности люминесценции проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Япония).

Для определения активности Ca^{2+} -АТФазы клетки лизировали путем гипоосмотического шока и центрифугированием осаждали плазматические мембраны [13]. Активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран определяли по методу [14]. Все измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu RF-5301 PC (Япония).

Об интенсивности процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) судили по уровню спонтанной (нестимулированной) люминол-зависимой хемилюминесценции [15]. Регистрацию проводили в течение 500 с на биохемилуминометре БХЛ-06М, оценивали максимальную интенсивность и светосумму хемилюминесценции.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ «Excel». Отличия величин тестируемых показателей в контрольных и опытных сериях экспериментов оценивали с помощью метода попарной статистики, используя t-критерий Стьюдента, с уровнем значимости 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что непосредственно после УФ-облучения суспензии лимфоцитов в дозах 151 и 755 Дж/м², в клетках происходит дозозависимое увеличение уровня спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции (рис. 1). Накопление продуктов ПОЛ приводит к изменению свойств как бислойных участков мембраны, свободных от белковых компонентов, так и липопротеидных мембранных

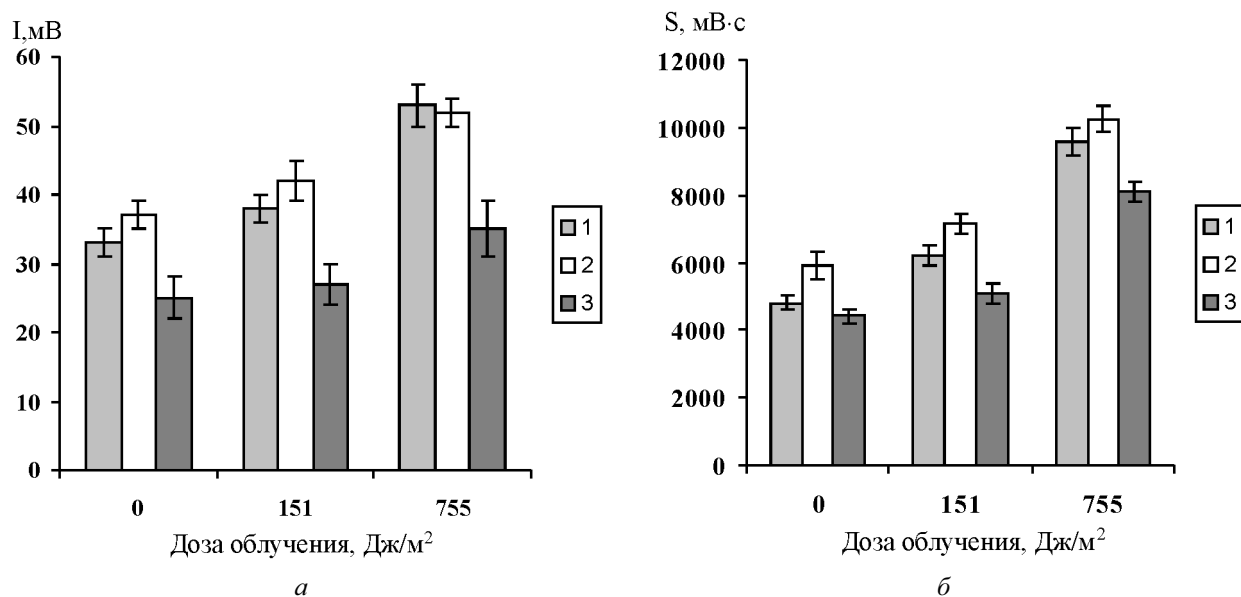


Рис. 1. Изменение уровня спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции при УФ-облучении лимфоцитов (*a* — интенсивность, *б* — светосумма). Обозначения: 1 — лимфоциты непосредственно после облучения; 2, 3 — лимфоциты после 24-часовой инкубации в отсутствие и в присутствии плазмы соответственно

комплексов. Действие процесса ПОЛ на мембраносвязанные белки наиболее ярко проявляется на интегральных белках, структурно-функциональная организация которых существенно определяется свойствами липидного микроокружения [16]. Нами показано, что активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран увеличивается на 13 % после облучения клеток в дозе 755 Дж/м². Использование меньшей дозы облучения не приводит к статистически достоверному изменению активности фермента. Эффект активации Ca^{2+} -АТФазы, по-видимому, имеет в своей основе действие первичных молекулярных продуктов ПОЛ — гидропероксидов фосфолипидов, обладающих детергентным эффектом, а более позднее (через 4 часа после облучения) ингибирование фермента (рис. 2) может быть обусловлено главным образом изменениями, возникающими при накоплении конечных продуктов ПОЛ [17]. Снижение активности Ca^{2+} -АТФазы приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , который, в свою очередь, может активировать ферменты метаболизма и запускать транскрипционные программы. С другой стороны, увеличение внутриклеточного Ca^{2+} вызывает активацию апоптоза при истощении запасов АТФ в клетках. Определение концентрации АТФ в облученных лимфоцитах показало, что через 4 часа после облучения уровень АТФ снижается, что связано с ингибированием ключевых ферментов окисления глюкозы [9]; через сутки инкубации облучен-

ных лимфоцитов уровень АТФ незначительно возрастает. В случае инкубирования облученных клеток с плазмой уровень АТФ возвращается к исходным показателям (рис. 3). Это, по-видимому, связано с защитным антиоксидантным действием компонентов плазмы: через сутки инкубации в присутствии плазмы в лимфоцитах снижается уровень ПОЛ: максимальная интенсивность хемилюминес-

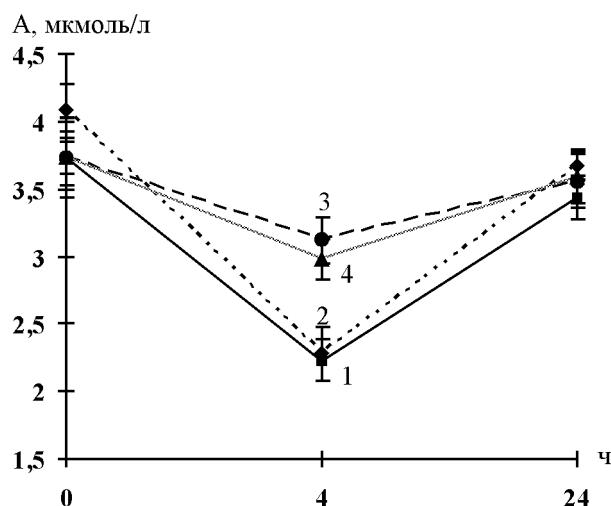


Рис. 2. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы лимфоцитов под действием УФ-света. Обозначения: 1 — нативные лимфоциты; 2 — фотомодифицированные в дозе 755 Дж/м² лимфоциты, инкубируемые в отсутствие аутологичной плазмы крови; 3, 4 — фотомодифицированные в дозе 151 и 755 Дж/м² лимфоциты, инкубируемые в присутствии аутологичной плазмы крови

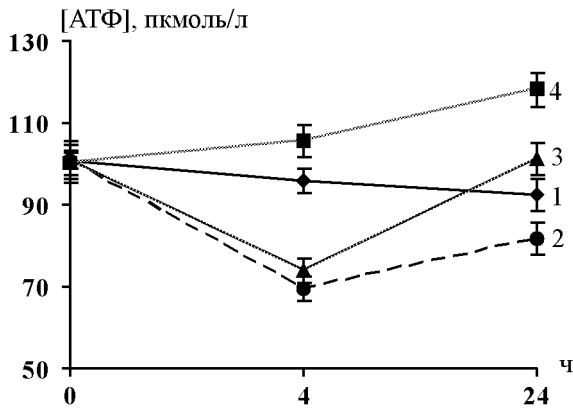


Рис. 3. Изменение концентрации АТФ в ходе суточной инкубации лимфоцитов. Обозначения: 1 — нативные лимфоциты; 2, 3 — фотомодифицированные в дозе 755 Дж/м² лимфоциты, инкубируемые в отсутствие и присутствии аутологичной плазмы соответственно; 4 — нативные лимфоциты, инкубируемые в присутствии фотомодифицированной в дозе 755 Дж/м² аутологичной плазмы

ценции облученных лимфоцитов уменьшилась на 25% относительно инкубируемых нативных клеток (рис. 1).

При добавлении облученной плазмы к лимфоцитам уровень АТФ в процессе инкубации клеток через 4 часа не отличается от исходного, а через сутки даже превышает данный параметр (рис. 3). В этом случае выявляется также незначительное снижение активности Ca²⁺-АТФазы через 4 часа с последующим возвратом к исходному значению (рис. 2). В работе [18] было показано, что УФ-облучение лимфоцитов в дозе 151 Дж/м² приводит к нормализации внутриклеточной концентрации Ca²⁺, что осуществляется с участием компонентов фосфоинозитидного механизма передачи сигнала. Результаты нашей работы указывают на участие Ca²⁺-АТФазы плазматических мембран лимфоцитов в регуляции внутриклеточной концентрации Ca²⁺, который является одним из модуляторов функциональных свойств лимфоцитов в условиях воздействия УФ-излучения. По всей видимости, кроме того, что плазма оказывает антиоксидантное действие, при фотомодификации плазмы происходит быстрое увеличение пула ростовых факторов, выходящих из тромбоцитов, что, в свою очередь, приводит к повышению митогенной активности плазмы крови [12]. Таким образом, способность клеток к восстановлению или поддержанию уровня внутриклеточного АТФ отражает адаптационные возможности облученных лимфоцитов и свидетельствует об их функциональной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IL-7 enhances the survival and maintains the size of native T cells / J. C. Rathmell [et al] // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 167. — P. 6869—6876.
2. T-cell survival / P. Marrack [et al] // *Immunol. Rev.* — 1998. — Vol. 165. — P. 279—285.
3. Ishizaki Y. / Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture / Y. Ishizaki, J. F. Burne, M. C. Raff // *J. Cell Biol.* — 1994. — Vol. 126. — P. 1069—1077.
4. Revankar C. M. / Altered Ca²⁺ homeostasis in polymorphonuclear leukocytes from chronic myeloid leukaemia patients / C. M. Revankar, S. H. Advani, N. R. Naik // *Mol. Cancer.* — 2006. — Vol. 275. — P. 55—65.
5. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration / R. E. Dolmetsch [et al] // *Nature.* — 1997. — Vol. 386. — P. 855—858.
6. A mutation on Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function / S. Feske [et al] // *Nature.* — 2006. — Vol. 441. — P. 179—185.
7. Feske S. / Calcium signaling in lymphocyte activation and disease / S. Feske // *Nat. Rev. Immunol.* — 2007. — Vol. 7. — P. 690—702.
8. Карандашов В. И. Фототерапия / В. И. Карандашов, Е. Б. Петухов, В. С. Зродников — М.: Медицина, 2001. — 392 с.
9. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов / В. Г. Артюхов [и др.] // *Радиационная биология. Радиоэкология.* — 2011. — Т. 51, № 2. — С. 252—257.
10. Reth M. / Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation / M. Reth // *Nature Immunol.* — 2002. — Vol. 3. — P. 1129—1134.
11. Модуляция программируемой гибели лимфоцитов периферической крови при хронической вирусной инфекции / О. Б. Жукова [и др.] // *Цитология.* — 2007. — Т. 49, № 1. — С. 26—31.
12. Стимуляция репарации ДНК растворимыми факторами фотомодифицированной крови в клетках человека, поврежденных УФ- и ионизирующей радиацией / О. И. Зубанова [и др.] // *Цитология.* — 2002. — Т. 44, № 5. — С. 463—469.
13. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272с.
14. Финашин А. В. Влияние тритона X-100 и глутарового альдегида на активность Ca²⁺ и Mg²⁺-АТФаз эритроцитов при облучении / А. В. Финашин, В. Д. Крупин, В. В. Товстяк // *Укр. Биохим. Журнал.* — 1997. — Т. 69, № 1. — С. 99—103.
15. Владимиров Ю. А. Биохимиллюминесценция / Ю. А. Владимиров — М.: Наука, 2000. — С. 294—302.
16. Модификация ферментной системы транспорта Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме при перекисном окислении липидов. Молекулярные механизмы увеличения проницаемости мембраны для Ca²⁺ / В. Е. Каган [и др.] // *Биохимия.* — 1983. — Т. 48, № 1. — С. 320—327.

17. *Архипенко Ю. В.* Модификация ферментной системы транспорта Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме при перекисном окислении липидов. Молекулярные механизмы изменения активности Ca^{2+} -АТФазы / Ю. В. Архипенко, В. Е. Каган, Ю. П. Козлов // Биохимия. — 1983. — Т. 48, № 3. — С. 493—501.

18. Вторичные мессенджеры — цАМФ, Ca^{2+} , NO — модулируют функциональные свойства лимфоцитов человека в условиях их УФ-облучения / М. А. Наквасина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — Т. 150, № 12. — С. 637—641.

Земченкова Ольга Владимировна — ассистент, Воронежская медицинская академия им. Н. Н. Бурденко, кафедра биохимии; e-mail: zov-bio@mail.ru

Zemchenkova O. V. — department of biochemistry, assistant, Voronezh N. N. Burdenko Medical Academy; e-mail: zov-bio@mail.ru

Артюхов Валерий Григорьевич — зав. кафедрой, профессор, д.б.н., Воронежский государственный университет, кафедра биофизики и биотехнологии; e-mail: avg@main.vsu.ru

Artyukhov V. G. — head of department, professor, Voronezh State University, department of biophysics and biotechnology; e-mail: avg@main.vsu.ru

Башарина Ольга Владимировна — кафедра биофизики и биотехнологии, доцент, к.б.н., Воронежский государственный университет; e-mail: bov-bio@yandex.ru

Basharina O. V. — docent, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: bov-bio@yandex.ru

Ким Яна Валерьевна — студентка 6 курса биолого-почвенного факультета, кафедра биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет; e-mail: samtakoy.ya@mail.ru

Kim Y. V. — 6 courses a student of Biology and Soil sciences, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University; e-mail: samtakoy.ya@mail.ru

Наливкина Марина Александровна — студентка 5 курса биолого-почвенного факультета, кафедра биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет

Nalivkina M. A. — 5 courses a student of Biology and Soil sciences, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University