

АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АТФАЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ФОТОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

О. В. Земченкова¹, В. Г. Артюхов², О. В. Башарина², С. И. Позднякова², Я. В. Ким²

¹ Воронежская медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

² Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 06.06.2011 г.

Аннотация. Исследовано влияние УФ-света (240—390 нм) в дозах 151 и 755 Дж/м² на активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран лимфоцитов крови доноров в присутствии ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксиддисмутаза) и блокатора белкового синтеза — циклогексимида. Показано, что присутствие каталазы и супероксиддисмутаза в физиологических концентрациях при УФ-модификации лимфоцитов оказывает защитное действие на плазматическую мембрану и блокирует фотоинактивацию исследуемого фермента. Повышение активности Ca^{2+} -АТФазы фотомодифицированных лимфоцитов в ходе их суточной инкубации обусловлено в основном синтезом белка de novo.

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТФаза, каталаза, лимфоциты, супероксиддисмутаза, пероксидное окисление липидов, УФ-свет.

Abstract. It has been examined the influence of UV-light (240—390 nm) in doses 151 and 755 J/m² on the activity of Ca^{2+} -ATPase plasmatic membrane of photomodify lymphocytes of donors blood in the presence of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) and the blocker of protein synthesis — cycloheximide. It has been shown that occurrence of catalase and superoxide dismutase in physiological concentration of UV-irradiated lymphocytes render shielding effect on plasmatic membrane and blockade photoinactivation of observable enzymes. The increasing of activity of Ca^{2+} -ATPase of photomodify lymphocytes in the course of diurnal incubation is caused basically for synthesis of protein de novo.

Keywords: Ca^{2+} -ATPase, catalase, lymphocytes, superoxide dismutase, lipid peroxidation, UV-light.

ВВЕДЕНИЕ

Для стимуляции в организме пролиферативных процессов (репаративной регенерации тканей, гемопозеза, иммуногенеза) современная медицина широко использует различные методы светолечения [1, 2]. Одним из широко распространенных методов терапии является аутотрансфузия УФ-облученной крови (АУФОК). Ведущее место в лечебном эффекте АУФОК принадлежит перестройке иммунной системы организма. Объектами непосредственного воздействия УФ-света являются все компоненты крови, в том числе иммунокомпетентные клетки и гуморальные факторы иммунитета. Облученная кровь при возвращении в кровяное русло активизирует массу циркулирующих лимфоцитов. Предполагается, что передача вызванных светом изменений от фотомодифицированных клеток к интактным является следствием образования облученными лейкоцитами активных форм кислорода (АФК) и немедленной инициации каскада АФК-образующих

реакций в объеме всей циркулирующей крови [1, 3]. Известно, что ключевым моментом в фотомодификации клеток УФ-излучением является индукция пероксидного фотоокисления липидов (ПФОЛ). Это приводит к изменению структуры мембран и нарушению их целостности. В результате как ПФОЛ, так и непосредственного действия АФК на системы транспорта ионов повышается проницаемость мембран для различных веществ, в том числе — для ионов кальция. Цитоплазматический кальций используется в качестве ключевого сигнального мессенджера фактически во всех типах живых клеток. В Т-лимфоцитах повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} запускает транскрипцию эффекторных цитокинов [4]. Снижение концентрации ионов кальция в клетке приводит к ослаблению активации Т-клеток [5].

Следует отметить, что увеличение содержания кальция внутри клетки приводит к активации многих ферментов, в том числе NO-синтазы, что приводит к усилению ПОЛ. Таким образом, поддержание концентрации Ca^{2+} в определенном диапазоне является важной задачей живой клетки.

© Земченкова О. В., Артюхов В. Г., Башарина О. В., Позднякова С. И., Ким Я. В., 2011

Эукариотические клетки содержат системы транспорта Ca^{2+} в плазматической мембране, в митохондриях и в эндоплазматическом ретикулуме. Как правило, плазматическая мембрана содержит три системы: Ca^{2+} -каналы, специфичную АТФазу и Na^+ - Ca^{2+} обменник. Вход Ca^{2+} в клетки по градиенту концентрации осуществляется, в основном, по Ca^{2+} -каналам плазматической мембраны. Выход Ca^{2+} осуществляется Ca^{2+} -АТФазой и Na^+ / Ca^{2+} -обменником. Уровень кальция поддерживается также Ca^{2+} -АТФазой эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондриальными Ca^{2+} -транспортирующими системами [6]. Известно, что объем эндоплазматического ретикулума составляет около 1 % от общего объема Т-лимфоцитов, поэтому только вход экстраклеточного Ca^{2+} через ионные каналы может обеспечить необходимый для активации лимфоцитов уровень внутриклеточного Ca^{2+} [7].

В последнее время появляется все больше работ, в которых ионные каналы рассматриваются как возможные участники процессов, связанных как с пролиферацией, так и с программируемой смертью клеток. В ряде работ [8, 9] показано, что вход кальция через каналы TRPV6 может модулировать пролиферацию трансформированных клеток и менять их резистентность к апоптотической гибели. В процессе выведения Ca^{2+} за пределы клетки важнейшую роль играет Ca^{2+} -АТФаза плазматических мембран — ионный насос, способный переносить Ca^{2+} против 10000-кратного градиента.

В связи с вышеизложенным возникает необходимость проведения исследований, направленных на изучение активности Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран лимфоцитов, обеспечивающей поддержание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} под действием УФ-света в терапевтическом диапазоне доз, используемых при АУФОК-терапии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение лимфоцитов из периферической крови доноров осуществляли путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколлуурографина ($\rho = 1,077$ г/см³).

УФ-облучение лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) в отсутствие и в присутствии ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы) проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете (20 ± 1 °С) 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.

Нативные и облученные лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в отсутствие и в присутствии каталазы в конечной концентрации 10^{-6} моль/л, супероксиддисмутазы ($2 \cdot 10^{-7}$ моль/л) и циклогексимида (10^{-4} моль/л) при температуре 37 °С в атмосфере с $[CO_2] = 5\%$.

Для определения активности Ca^{2+} -АТФазы клетки лизировали путем гипоосмотического шока и центрифугированием осаждали плазматические мембраны [10]. Активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран определяли по количеству продукта гидролиза АТФ-фосфата по методу Лоури и Лопеса в модификации Скулачева [11]. Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu RF-5301 РС (Япония).

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 ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в работе [12] нами показано, что активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран увеличивается на 13 % непосредственно после облучения клеток в дозе 755 Дж/м². Повышение активности Ca^{2+} -АТФазы на начальных стадиях ПФОЛ может происходить за счет накопления гидроперекисей фосфолипидов [13]. Наблюдаемая активация кальциевого насоса может быть вызвана также повышением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме — как за счет его выхода из внутриклеточных депо (митохондрии и эндоплазматическая сеть), так и в результате повышения пассивной проницаемости наружной мембраны для ионов (в результате ПОЛ). Ионы Ca^{2+} , связываясь с кальмодулином, активируют фермент. Выявленное нами повышение активности фермента направлено на нормализацию концентрации Ca^{2+} в цитоплазме.

Активность многих мембранных ферментов, в том числе и Ca^{2+} -АТФазы, существенно зависит от вязкости и химической природы окружающих липидов: чем ниже текучесть липидного бислоя, тем меньше скорость гидролиза АТФ [14].

Снижение активности фермента на 38 % после 4 часов инкубации может быть связано с тем, что

в ходе инкубации клеток в питательной среде происходит повышение уровня ПОЛ. Известно, что Ca^{2+} -АТФаза инактивируется при повышении уровня ПОЛ в мембране вследствие обеднения микроокружения фермента полиеновыми фосфолипидами [13].

Чтобы определить вклад ПОЛ в процесс инактивации фермента, мы исследовали влияние ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы) на активность Ca^{2+} -АТФазы лимфоцитов при их УФ-облучении.

Повышение активности Ca^{2+} -АТФазы в присутствии СОД (рис. 1) указывает на то, что в фотомодифицированных клетках СОД оказывает защитное действие на плазматическую мембрану, и, следовательно, снижение активности Ca^{2+} -АТФазы в среде без антиоксидантов обусловлено (даже отчасти) повышением ПФОЛ. Установлено, что применение антиоксидантов наиболее эффективно при их внесении в среду за 10—20 мин до облучения, так как их фотопротекторные свойства зависят не только от присутствия в растворе, но и от взаимодействия с мембраной. Так, было показано [15] увеличение защитного действия СОД по отношению к эритроцитарной мембране при внесении антиоксиданта перед облучением. Тот факт, что фотопротекторные свойства СОД проявляются в большей степени в том случае, если воздействию УФ-света предшествовала инкубация эритроцитарных клеток с ферментом, можно рассматривать как косвенное доказательство того, что в эритроцитах СОД может быть локализована на мембране. В

случае лимфоцитов больший защитный эффект проявляется при добавлении СОД после облучения лимфоцитов (151 Дж/м²). Вероятно, для лимфоцитов большую роль в развитии ПФОЛ играет темновая стадия процесса; возможно, не происходит сорбция СОД на мембране.

После УФ-модификации лимфоцитов в присутствии каталазы не выявлено достоверных изменений в активности Ca^{2+} -АТФазы как непосредственно после облучения, так и через 4 часа инкубации (рис. 2). По-видимому, H_2O_2 , разрушаемый каталазой, вносит меньший вклад в повреждение мембран УФ-облученных клеток (по крайней мере, на начальных стадиях). Увеличение активности УФ-облученной Ca^{2+} -АТФазы в присутствии каталазы (фермент добавляли сразу после облучения лимфоцитов) в ходе суточной инкубации клеток может быть обусловлено усилением процесса ПОЛ, в том числе за счет образования H_2O_2 (например, в ходе супероксиддисмутазной реакции).

Кроме того, в активации Ca^{2+} -АТФазы определенную роль может играть синтез белка *de novo*, о чем свидетельствует снижение активности фермента в лимфоцитах, инкубируемых в присутствии циклогексимида (рис. 3). Известно [16], что продуцируемые УФ-облученными лимфоцитами АФК могут активировать факторы транскрипции и стимулировать таким образом синтез ряда белков. Вероятно, УФ-облучение индуцирует образование достаточного количества АФК для активации данных факторов.

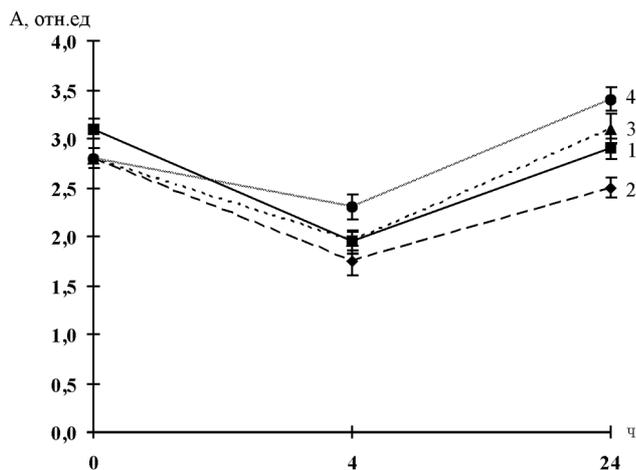


Рис. 1. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы фотомодифицированных лимфоцитов в присутствии СОД. Обозначения: 1 — нативные клетки; 2, 3, 4 — фотомодифицированные в дозе 151 Дж/м² клетки (2 — инкубируемые в отсутствие СОД; 3 — облучаемые в присутствии СОД; 4 — инкубируемые в присутствии СОД)

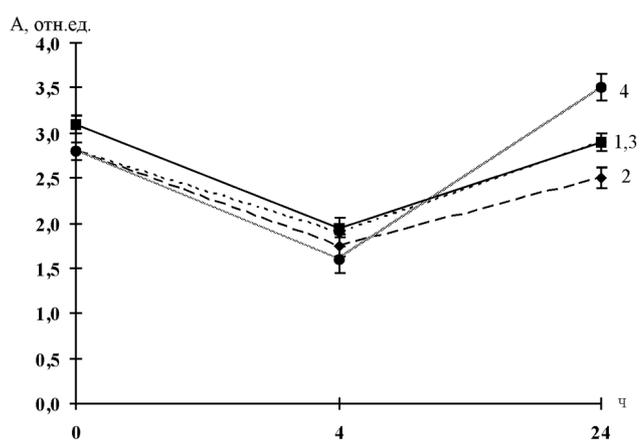


Рис. 2. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы фотомодифицированных лимфоцитов в присутствии каталазы. Обозначения: 1 — нативные клетки; 2, 3, 4 — фотомодифицированные в дозе 151 Дж/м² клетки (2 — инкубируемые в отсутствие каталазы; 3 — облучаемые в присутствии каталазы; 4 — инкубируемые в присутствии каталазы)

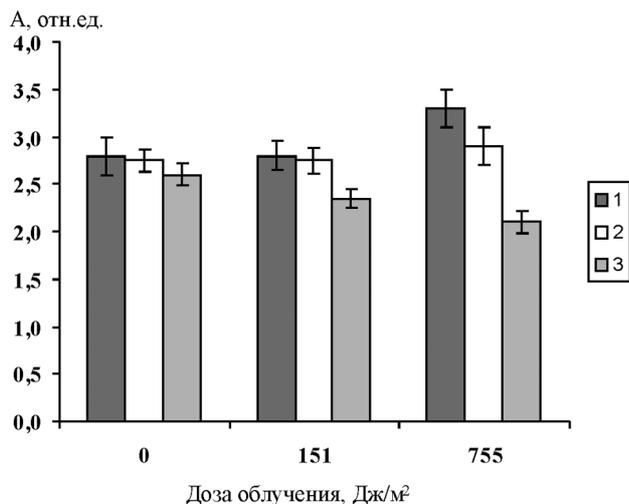


Рис. 3. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы в интактных и фотомодифицированных лимфоцитах, инкубируемых в присутствии циклогексимида. Обозначения: 1 — клетки после выделения; 2, 3 — клетки, инкубируемые в течение 24 часов в отсутствие и в присутствии циклогексимида соответственно

Таким образом, использование каталазы и СОД при УФ-модификации лимфоцитов оказывает защитное действие на плазматическую мембрану и препятствует фотоинаktivации исследуемого фермента. Следовательно, снижение (хотя бы частично) активности Ca^{2+} -АТФазы при УФ-облучении является следствием интенсификации процессов ПОЛ. Повышение активности Ca^{2+} -АТФазы фотомодифицированных лимфоцитов в ходе их суточной инкубации обусловлено в основном синтезом белка *de novo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карандашов В. И. Фототерапия / В. И. Карандашов, Е. Б. Петухов, В. С. Зродников. — М.: Медицина, 2001. — 392 с.
2. Antipa C. Contributions to LL L therapy. In: Lasers in medicine and dentistry/ C. Antipa — Rijeka, Vitograf, 2000. — P. 344—353.
3. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е. Е. Дубинина [и др.] // *Вопр. мед. химии*. — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561—581.

4. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration / R. E. Dolmetsch [et al.] // *Nature*. — 1997. — Vol. 386. — P. 855—858.

5. A mutation on Orail causes immune deficiency by abrogating CR AC channel function / S. Feske [et al.] // *Nature*. — 2006. — Vol. 441. — P. 179—185.

6. Зинченко В. П. Внутриклеточная сигнализация / В. П. Зинченко, Л. П. Долгачева. — Пушкино: Электронное изд-во «Аналитическая микроскопия», 2003.

7. Feske S. / Calcium signaling in lymphocyte activation and disease / S. Feske // *Nat. Rev. Immunol.* — 2007. — Vol. 7. — P. 690—702.

8. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation / E. C. Schwarz [et al.] // *Cell Calcium*. — 2006. — Vol. 39. — P. 163—173.

9. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca^{2+} /NFAT-dependent pathways / V. Lehen'kyi [et al.] // *Oncogene*. — 2007. — Vol. 26. — P. 7380—7385.

10. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.

11. Финашин А. В. Влияние тритона X-100 и глутарового альдегида на активность Ca^{2+} и Mg^{2+} -АТФаз эритроцитов при облучении / А. В. Финашин, В. Д. Крупин, В. В. Товстяк // *Укр. Биохим. Журнал*. — 1997. — Т. 69, № 1. — С. 99—103.

12. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов / В. Г. Артюхов [и др.] // *Радиац. Биология. Радиоэкология*. — Т. 51, № 2. — С. 252—257.

13. Архипенко Ю. В. Повреждение саркоплазматического ретикулума скелетных мышц при ишемии: роль перекисного окисления липидов / Ю. В. Архипенко, В. Е. Каган, Ю. П. Козлов // *Биохимия*. — 1983. — Т. 48, № 3. — С. 493—501.

14. Пестов Н. Б. Регуляция Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран / Н. Б. Пестов, Р. И. Дмитриев, М. И. Шахпаронов // *Успехи биологической химии*. — 2003. — Т. 43. — С. 99—138.

15. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В. Г. Артюхов [и др.]. — Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та., 1997. — 264 с.

16. Зимин А. А. Пролиферация нормальных и опухолевых клеток в присутствии сыворотки крови больных раком молочной железы после курса фототерапии видимым и ближним инфракрасным светом / А. А. Зимин, К. А. Самойлова, Н. А. Жеваго // *Цитология*. — 2010. — Т. 52, № 9. — С. 785—792.

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

Zemchenkova O. V. — assistant, Voronezh N. N. Burdenko Medical Academy, department of biochemistry; 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 — доцент, к.б.н., Воронежский государственный университет, кафедра биофизики и биотехнологии; e-mail: bov-bio@yandex.ru

Позднякова Софья Игоревна — студентка биолого-почвенного факультета, Воронежский государственный университет, кафедра биофизики и биотехнологии; e-mail: cocodrilla@mail.ru

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

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

Pozdnyakova S. I. — student of Biology and Soil sciences, Voronezh State University, department of biophysics and biotechnology; e-mail: cocodrilla@mail.ru

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