

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОГО КАЛЬЦИЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

М. А. Наквасина, М. А. Гюппенен, И. А. Колтаков, В. А. Хотина, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 15.09.2016 г.

Аннотация. Исследована роль внеклеточного кальция в регулировании структурно-функциональных свойств лимфоцитов человека. Выявлено, что инкубирование лимфоцитов в растворе Хенкса, не содержащем ионы кальция, и в растворе Хенкса с избытком кальция (13 ммоль/л) индуцирует значительные изменения метаболических процессов и состояния поверхности лимфоцитов по сравнению с таковыми для клеток в присутствии кальция в нормальной концентрации (1,3 ммоль/л). Эти нарушения инициируют запуск процессов гибели лимфоцитов в условиях дефицита и избытка кальция преимущественно по механизму апоптоза (митохондриальный путь) и в меньшей степени — некроза.

Ключевые слова: лимфоциты, кальций, ферменты, метаболические процессы, апоптоз, некроз.

Abstract. The role of extracellular calcium in regulation of structural and functional characteristics of human lymphocytes was investigated. It was revealed that the incubation of lymphocytes in the Hank's balanced salt solution, which does not contain calcium ions, and in Hank's solution with high concentration of calcium (13 mmol/L) induces a significant change of the metabolic processes in lymphocytes and the state of their surface compared to the same cells in Hank's solution with normal concentration of calcium (1,3 mmol/L). Present in the cases of deficient or excessive calcium concentrations, these abnormalities initiate the death processes in lymphocytes, which are predominantly represented by apoptosis (mitochondrial pathway) and in a lesser extent by necrosis.

Keywords: lymphocytes, calcium, enzymes, metabolic processes, apoptosis, necrosis.

Эффективными регуляторами структурно-функционального состояния клеток являются ионы кальция, участвующие в процессах стабилизации мембран, мембранного транспорта, передачи информации в клетку, активации ферментов, межклеточной коммуникации, клеточной гибели [1—6].

На кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского госуниверситета установлено [7], что наличие экзогенного кальция в суспензии лимфоцитов в условиях их УФ-облучения и генерации активных форм кислорода влияет на величину и направленность изменений уровня внутриклеточного кальция, активности Ca^{2+} -АТФазы, структурное состояние плазматических мембран и процессы гибели исследуемых клеток. Однако

механизмы влияния внеклеточного кальция на структурно-функциональное состояние лимфоцитов во многих аспектах полностью не раскрыты.

С целью расширения представлений о роли внеклеточного кальция в регулировании структурно-функциональных свойств лимфоцитов человека нами изучены изменения уровня каталитической активности некоторых ферментов (лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глутатионредуктазы), метаболического индекса, поверхностных свойств и процессов гибели клеток, суспендированных в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция: в растворе Хенкса без кальция («бескальциевая» среда); в растворе Хенкса с концентрацией кальция — 1,3 ммоль/л (норма); в растворе Хенкса с концентрацией кальция — 13 ммоль/л (среда с избытком кальция).

© Наквасина М. А., Гюппенен М. А., Колтаков И. А., Хотина В. А., Артюхов В. Г., 2016

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились лимфоцитарные клетки, выделенные из гепаринизированной крови человека путём центрифугирования крови доноров в градиенте плотности фиколл—урографина ($\rho=1,077$ г/мл). Концентрация лимфоцитов — $2 \cdot 10^6$ кл/мл. После выделения лимфоцитов их суспендировали в растворе Хенкса, не содержащем ионы кальция; в растворе Хенкса с концентрацией кальция — 1.3 ммоль/л; в растворе Хенкса с концентрацией кальция — 13 ммоль/л. Далее проводили их инкубацию в течение 1 и 2 ч при 37 °С, затем исследовали изменения структурно-функционального состояния клеток.

Перед определением активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глутатионредуктазы (ГР) лимфоциты разрушали при помощи ультразвукового гомогенизатора Qsonica sonicators Q500 при мощности 500 Вт и частоте 20 кГц в течение 1 мин. Плазматические мембраны осаждали путем центрифугирования при 13000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге MiniSpin (Германия). Супернатант использовали для определения активности ферментов.

Для определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) из лимфоцитов выделяли митохондрии. Клетки ресуспендировали в среде выделения (250 ммоль/л сахараза, 20 ммоль/л Neres Na—HCl , pH 7.5; 10 ммоль/л KCl , 1,5 ммоль MgCl_2 , 1 ммоль/л этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), 1 ммоль/л этилендиаминтетраацетат натрия (EDTA), 1 ммоль/л дитиотреитол (DTT), 1 ммоль/л фенилметилсульфонилфторид (PMSF)). После разрушения лимфоцитов ядерную фракцию и клеточные мембраны осаждали при 800 об/мин в течение 10 мин, из надосадочной жидкости осаждали митохондрии при 13000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге MiniSpin. Митохондрии ресуспендировали в среде выделения. Для разрушения мембран митохондрий использовали Triton X-100 (0.1 %).

Каталитическую активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-2000: для ЛДГ — по скорости окисления НАДН при 340 нм, для СДГ — по скорости восстановления дихлорфенолиндофенола при 600 нм, для ГР — по скорости окисления НАДФН при 340 нм.

Уровень метаболической активности лимфоцитов определяли на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF1501 флуоресцентным методом, основанным на дифференциальном окрашивании ДНК и РНК акридиновым оранжевым.

Исследование структурного состояния мембран лимфоцитов проводили с помощью флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF1501.

Определение количества жизнеспособных, апоптотических и некротизированных клеток проводили при помощи метода проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Guava easyCyte 8HT (Merk Millipore, США) при помощи набора FITC Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit («Invitrogen», США). Обработку данных проводили при помощи программы InCyte. Цитометрические данные анализировали с использованием двухпараметрических цитограмм распределения клеток.

Обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ «Statgraphics». Статистически значимую достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами проанализированы изменения функциональной активности ферментов энергетического метаболизма — ЛДГ и СДГ, а также антиоксидантного фермента — ГР лимфоцитов, инкубированных в течение 1 и 2 ч в средах с различной концентрацией кальция (рис. 1—3). Уровень активности указанных ферментов в лимфоцитах, инкубированных в растворе Хенкса с нормальной концентрацией кальция, был принят за 100 % (контроль, норма).

Обнаружено статистически достоверное снижение уровня каталитической активности лактат-

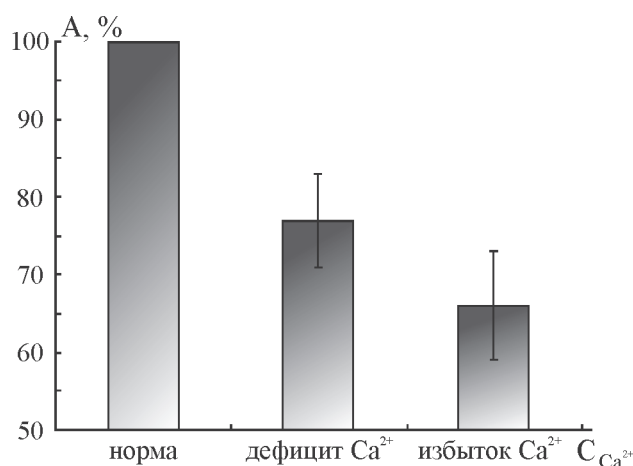


Рис. 1. Уровень каталитической активности лактатдегидрогеназы лимфоцитов, суспендированных в течение 1 ч в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция.

дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глутатионредуктазы лимфоцитов (рис. 1—3) в условиях дефицита и избытка внеклеточного кальция по отношению к контролю (клетки в присутствии кальция в концентрации 1.3 ммоль/л). Следовательно, при отклонениях концентрации внеклеточного кальция от нормы происходит снижение интенсивности энергетического метаболизма в цитозоле и митохондриях иммуноцитов. Значительное падение уровня активности глутатионредуктазы в средах с дефицитом и избытком кальция по сравнению с нормой приведет к снижению концентрации восстановленного глутатиона — низкомолекулярного антиоксиданта, дезактивирующего АФК и участвующего в процессах функционирования глутатионзависимых ферментов.

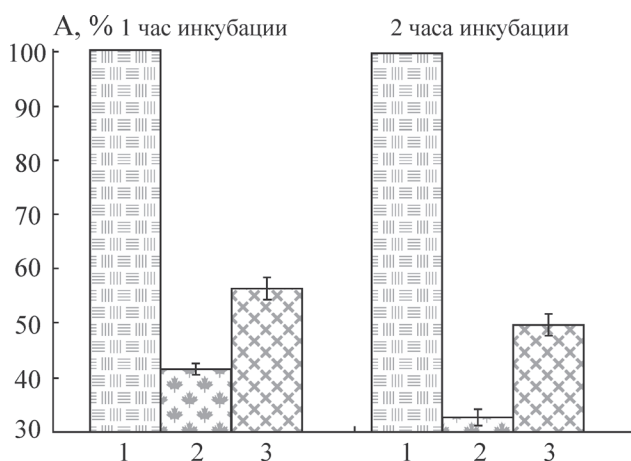


Рис. 2. Уровень каталитической активности сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов, суспендированных в течение 1 и 2 ч в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция: 1 — раствор Хенкса (норма); 2 — раствор Хенкса (с дефицитом кальция); 3 — раствор Хенкса (с избытком кальция), через 1 и 2 часа инкубации

Для оценки общей метаболической активности и уровня РНК в клетках принято определять величину метаболического индекса. Метаболический индекс — это отношение интенсивности флуоресценции красителя (акридинового оранжевого), связанного с РНК, в его максимуме, к интенсивности флуоресценции красителя, связанного с ДНК.

При исследовании изменений метаболического индекса лимфоцитов, суспендированных в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция (рис. 4), выявлено, что наибольшая величина метаболического индекса характерна для лимфоцитов в условиях нормы, наименьшая — в «бескальциевой» среде. Отклонения от нормального

содержания экзогенного кальция в среде вызывают значительное снижение уровня РНК и общей метаболической активности лимфоцитов.

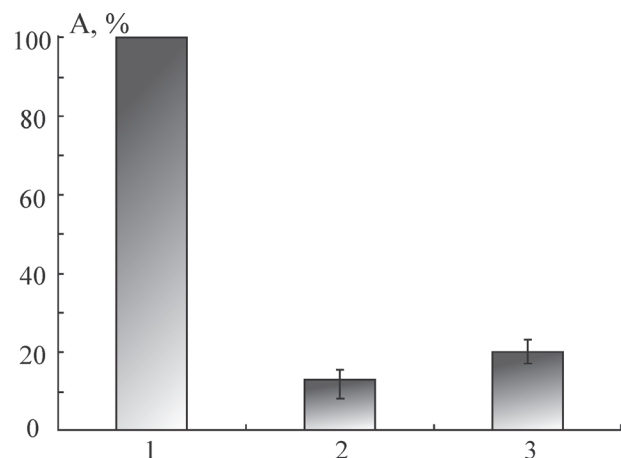


Рис. 3. Уровень каталитической активности глутатионредуктазы лимфоцитов, суспендированных в течение 1 ч в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция: 1 — раствор Хенкса (норма); 2 — раствор Хенкса (с дефицитом кальция); 3 — раствор Хенкса (с избытком кальция)

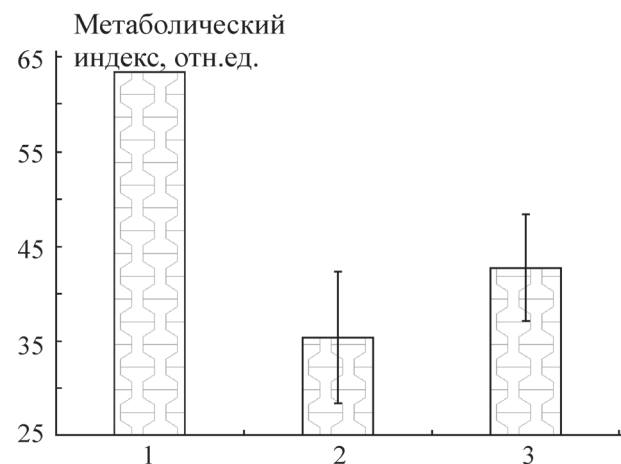


Рис. 4. Метаболический индекс лимфоцитов, суспендированных в течение 1 ч в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция: 1 — раствор Хенкса (норма); 2 — раствор Хенкса (с дефицитом кальция); 3 — раствор Хенкса (с избытком кальция)

С использованием флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) изучены изменения поверхностных свойств мембран лимфоцитов, суспендированных в растворах Хенкса с различной концентрацией кальция.

λ_{\max} флуоресценции зонда в присутствии лимфоцитов с нормальной концентрацией Ca^{2+} — 466 нм, в «бескальциевой среде» — 469—470 нм, в

среде с избытком кальция — 467—468 нм. Обнаружено статистически достоверное снижение интенсивности флуоресценции АНС в его максимуме для лимфоцитов, суспендированных в «бескальциевой» среде, по сравнению с таковым для клеток в присутствии Ca^{2+} в нормальной концентрации (рис. 5). В среде с избытком кальция наблюдалась тенденция к снижению I_{max} флуоресценции зонда по сравнению с величиной исследуемого показателя для контроля (норма).

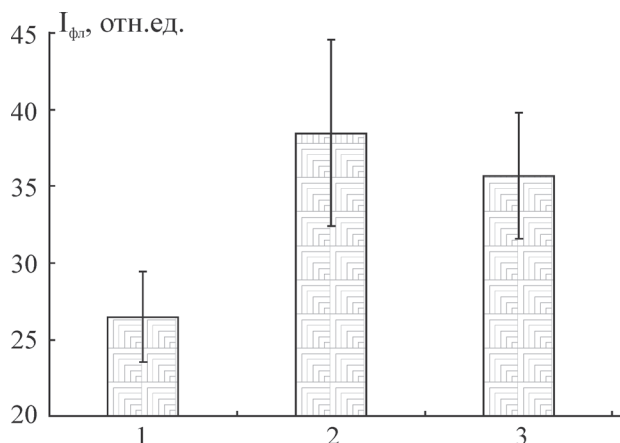


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции (в максимуме) АНС в комплексе с лимфоцитами при различных концентрациях кальция: 1 — раствор Хенкса (с дефицитом кальция); 2 — раствор Хенкса (норма); 3 — раствор Хенкса (с избытком кальция)

Длинноволновый сдвиг λ_{max} флуоресценции зонда в средах с дефицитом и избытком кальция свидетельствует об изменении микроокружения хромофорных групп АНС на более полярное и гидрофильное по отношению к таковому для комплекса зонд — лимфоциты при нормальной концентрации кальция. Это приводит к росту электростатической отталкивающей силы между АНС и мембраной в участках связывания АНС и уменьшению флуоресценции системы АНС — мембрана.

Таким образом, результаты экспериментов, полученные с использованием АНС, позволяют заключить, что в «бескальциевой» среде и среде с высоким содержанием кальция наблюдаются изменения поверхностных свойств лимфоцитов по сравнению с таковыми для клеток в условиях нормальной концентрации кальция.

Обнаруженные нами процессы снижения интенсивности метаболических процессов и нарушения состояния поверхности лимфоцитов в условиях дефицита и избытка внеклеточного

кальция могут быть следствием реализации процессов гибели исследуемых клеток.

С целью определения типа гибели лимфоцитов, суспендированных в бескальциевой среде и среде с избытком кальция, проведен проточно-цитометрический анализ. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1
Данные цитофлуориметрического анализа лимфоцитов, суспендированных в течение 2-х часов при различных концентрациях кальция

Образец	Количество клеток, %		
	Живые клетки	Апоптотические клетки (ранние стадии апоптоза)	Некротизированные клетки
Норма	94.2 ± 0,1	5.7 ± 0,4	0.1 ± 0.05
Бескальциевая среда	29.4 ± 0.4	65.8 ± 0.8	4.8 ± 0.8
Среда с избытком кальция	24.5 ± 0.2	62.0 ± 0.7	13.5 ± 0.3

Обобщая полученные в ходе проведения проточно-цитофлуориметрического анализа результаты, можно заключить, что в «бескальциевой» среде и в среде с избытком кальция через 2 ч инкубации осуществляются процессы гибели клеток — преимущественно апоптоз — и в меньшей степени — некроз. Причем в среде с избытком кальция количество клеток, погибших в результате некроза (13.5 %), выше по сравнению с таковым в «бескальциевой» среде (4,8 %).

Снижение количества АТФ, восстановленного глутатиона, образование активных форм кислорода, увеличение свободного кальция в цитоплазме — факторы, стимулирующие образование пор в митохондриальной мембране [8]. Следствием открывания пор является набухание митохондриального матрикса, нарушение целостности наружной митохондриальной мембраны и высвобождение межмембранных белков — апоптогенных факторов: цитохрома с, прокаспаз 2, 3, 9, эндонуклеазы G и AIF (фактора, индуцирующего апоптоз). По всей вероятности, в условиях дефицита и избытка кальция в среде суспендирования лимфоцитов запускается митохондриальный путь апоптоза.

Повышение уровня ионов кальция в цитоплазме свыше 10^{-4} — 10^{-3} моль/л является одним из факторов инициации некроза. Ca^{2+} способен проникать в клетку через поврежденную плазматическую мембрану и Ca^{2+} -каналы, а также освобож-

даться из внутриклеточных депо (митохондрии, эндоплазматический ретикулум). Выход Ca^{2+} из депо может стимулироваться самим цитозольным кальцием по механизму кальций-индуцированного высвобождения кальция из ЭПР и стимулированного кальцием открытия высокопроницаемых митохондриальных пор. Эти процессы могут участвовать в развитии и некроза, и апоптоза. Цитоплазматический кальций активирует кальпаины — кальций-зависимые цистеиновые протеазы, способствующие разрушению лизосомальных мембран и мобилизации лизосомальных ферментов (в частности, протеаз катепсинов). Катепсины активируют проапоптотический белок Bid и каспазу-3 и способствуют запуску апоптоза. В то же время катепсины разрушают белки цитоскелета и клеточных мембран и тем самым нарушают их целостность, что приводит к некрозу [9].

Можно предположить, что в процессы нарушения кальциевого гомеостаза лимфоцитов в условиях избытка кальция в среде суспендирования вовлечены неселективные Ca^{2+} -каналы и (или) потенциалчувствительные Ca^{2+} -каналы L-типа плазматической мембраны; депозависимые высокочувствительные Ca^{2+} -каналы на плазматической мембране, активируемые выбросом кальция из депо; Са-АТФаза плазматической мембраны и мембраны ЭПР, кальций-связывающие белки ЭПР (кальцекевстрин, кальретикулин, эндоплазмин); кальмодулин как активная форма кальция; Ca^{2+} -каналы ЭПР, чувствительные к инозитолтрифосфату; переносчики кальция на митохондриальной мембране (кальциевый унипортер, опосредующий обмен $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, и $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ -антипортер). Мы полагаем, что «критическими точками» в запуске процессов клеточной гибели лимфоцитов при этом будет активация комплекса кальций—кальмодулин, участвующего в изменении функциональных свойств клеточных белков, активация каналов (зависимая от уровня кальция) в митохондриальной мембране, обеспечивающая выход проапоптотических факторов в цитозоль, и вход кальция в ядро с активацией эндонуклеаз. Падение уровня АТФ, восстановленного глутатиона, интенсификация свободнорадикальных реакций в условиях снижения уровня РНК и активности СДГ, ЛДГ и ГР вносят вклад в изменение состояния митохондрий и реализацию митохондриального пути апоптоза.

В «бескальциевой» среде, по-видимому, кальциевый потенциал на плазматической мембране падает и открываются Ca^{2+} -каналы, снижая уровень цитозольного кальция ниже минимально до-

пустимого для клеток. Можно предположить, что ключевым моментом в этих условиях будет выход кальция в цитозоль из ядра, митохондрий и ЭПР.

Полученные результаты необходимо учитывать при обсуждении вопросов, касающихся изучения влияния экзогенного кальция на структурно-функциональное состояние и процессы гибели лимфоцитов. Они могут быть использованы для прогнозирования процессов функционирования иммунцитов при патологиях, сопровождающихся нарушением концентрации кальция в крови пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berridge M.J. Calcium signal and cell proliferation / M.J. Berridge // *Bio Essays*. — 1995. — P. 491—500.
2. Duchen M.R. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signaling and cell death / M.R. Duchen // *J. Physiol.* — 1999. — V. 516.1 — P. 1—17.
3. Schwarz E.C. Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells / E.C. Schwarz, B. Qu, M. Hoth // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2013. — V. 1833. — P. 1603-1611
4. Izquierdo J.H. Calcium, Channels, Intracellular Signaling and Autoimmunity / J.H. Izquierdo, F. Bonilla-Abadía, C.A. Canas, G.J. Tobón // *Reumatologia Clinica*. — 2014. — V. 10(1) — P. 43—47
5. Литвинов И.С. Роль снижения концентрации ионов внеклеточного кальция в активации Т-клеток в периферической крови человека / И.С. Литвинов, И.В. Мерсиянова // *Биоорганическая химия*. — 2015. — Т. 41, № 4. — С. 432—442.
6. Биохимия человека Р. Марри [и др.] В 2—х т. Т. 2. М.: Мир, 1993. — 415 с.
7. Лидохова О.В. Исследование процессов модуляции структурно-функциональных свойств лимфоцитов человека в условиях воздействия УФ-света и активных форм кислорода: роль ионов кальция, цАМФ и NO: дис. ... канд. Биол. наук : 03.01.02 : защищена 29.11.13 / О.В. Лидохова. — Воронеж, 2013. — 162 с.
8. Глазунова В.А. Митохондриальные механизмы апоптоза в ответ на повреждение ДНК / В.А. Глазунова, А.А. Штиль // *Молекулярная биология*. — 2008. — Т. 42, № 5. — С. 765—771.
9. Узденский А.Б. Управляемый некроз / А.Б. Узденский // *Биологические мембраны*. — 2010. — Т. 27, № 1 — С. 7—17.

Наквасина М. А., Гюппенен М. А., Колтаков И. А., Хотина В. А., Артюхов В. Г.

*Воронежский государственный университет
Наквасина М. А., доктор биологических наук,
профессор кафедры биофизики и биотехнологии
Тел.: +7-473-2208586
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru*

*Voronezh State University
Nakvasina M. A., Ph.D, Sc.D., Full Professor;
Dept. of Biophysics and Biotechnology
Ph.: + 7-473-2208586
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru*

*Гюппенен М. А., магистр кафедры биофизики
и биотехнологии*

*Gyuppenen M. A., Master; Dept. of Biophysics
and Biotechnology*

*Колтаков И. А., кандидат биологических наук,
доцент кафедры биофизики и биотехнологии*

*Koltakov I. A., Ph.D., Associate Professor; Dept.
of Biophysics and Biotechnology*

*Хотина В. А., студентка кафедры биофизики
и биотехнологии*

*Khotina V. A., student, Dept. of Biophysics and
Biotechnology*

*Артюхов В. Г., доктор биологических наук,
профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехно-
логии
Тел.: +7-473-2208586
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Artyukhov V. G., Ph.D, Sc.D., Full Professor;
Head of the Dept. of Biophysics and Biotechnology
Tel .: + 7-473-2208586
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*