

ОСМОРЕГУЛЯТОРНЫЕ РЕАКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЛЯГУШЕК В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ И БЛОКАДЫ Ca^{2+} -КАНАЛОВ

© М. Ю. Скоркина

Белгородский государственный университет, Белгород, Россия
E-mail: marina_skorkina@mail.ru

Резюме

Изучена кинетика осморегуляторных реакций клеток в условиях активации и блокады Ca^{2+} -каналов на модели полифункционального ядерного эритроцита лягушки. Установлено, что как активация, так и блокада Ca^{2+} -каналов способствует набуханию ядер и возрастанию ядерно-цитоплазматических отношений в условиях гипотонической экспозиции. Осморегуляторные реакции клеток после активации Ca^{2+} -каналов проявляются уменьшением их объема. При воздействии блокатора Ca^{2+} -каналов верапамила отмечается переменное возрастание и сокращение объема эритроцитов с временными интервалами в 30 и 60 с. Ярко выраженная функциональная активность ядерной оболочки в ответ на гипотоническое воздействие в условиях активации и блокады Ca^{2+} -каналов свидетельствует об участии ионов Ca^{2+} в механизмах ядерно-цитоплазматического переноса.

Ключевые слова эритроциты, осморегуляторные реакции, Ca^{2+} -каналы, верапамил.

Введение

Поддержание клеточного объема представляет собой фундаментальный физиологический механизм, который контролируется посредством универсальных регуляторных систем – внутриклеточных мессенджеров, одними из которых выступают ионы Ca^{2+} [1]. Адаптивный ответ клеток на осмотическое набухание реализуется с участием мембранных ионотранспортных систем [2]. В животных клетках регуляторное снижение объема сопровождается потерей хлорида натрия в результате активации специфических каналов для натрия и хлора одновременно. В ряде случаев регуляторное сокращение объема зависит от притока Ca^{2+} в клетку [3], тогда как в других типах клеток ответ связан с немедленным выходом Ca^{2+} из клеточных депо [4]. В некоторых типах клеток в ответ на осмотическое набухание увеличивается синтез гликогена и замедляется гликолиз [5], ингибируется протеолиз и ускоряется синтез белка [2, 6]. Регуляторное возрастание объема связано с захватом хлорида натрия и хлорида калия, которые накапливаются в клетке при активации обменных каналов натрия на водород и ионов хлора на гидрокарбонат или активации транспортера для ионов натрия, калия и хлора [7]. Морфологической основой в поддержании объемного гомеостаза выступает мембранный резерв клеток. Его биологическая роль помимо активации волюмо-чувствительных путей транспорта

ионов [8] заключается также в реализации специфических видов клеточной подвижности [9], активации и стимуляции внутриклеточных метаболических реакций [10, 11]. Несмотря на широкий спектр исследований, охватывающих проблему изучения механизмов осморегуляторных реакций клеток, выполненных к настоящему моменту, участие ядра в этих реакциях не описано. В научной литературе практически не встречаются данные об изменении объема ядра и резерва кариолеммы. Целью выполненного исследования было изучение кинетики осморегуляторных реакций ядерных эритроцитов — клетки в целом и ядра — при активации и блокаде Ca^{2+} -мембранных транспортных систем в условиях гипоосмотического набухания.

Материал и методика

Эксперименты выполнены на эритроцитах лягушек *Rana ridibunda* Pall. Кровь брали путем пункции сердца. Стабилизацию крови производили гепарином (5 Ед/мл). Изучение осморегуляторных реакций эритроцитов при гипоосмотическом стрессе выполняли в условиях активации и блокады мембранных кальциевых каналов в опытах *in vitro*. Активацию Ca^{2+} -каналов производили путем инкубации эритроцитов в среде Хенкса, содержащей 10^{-6} ммоль/л Ca^{2+} , в течение 15 мин при комнатной температуре. Инкубация эритроцитов в кальциевой среде приводит к повышению его внутриклеточной концентрации [12] и вызывает их преждевремен-

ное старение [13]. Блокаду Ca^{2+} -каналов осуществляли путем инкубации в среде Хенкса, содержащей 10^{-6} ммоль/л верапамила, в течение 15 мин при комнатной температуре. По окончании времени инкубации из каждой пробы готовили по два однослойных суспензионных препарата. Один содержал пробы клеток в гипотонической среде (0,2%-ный раствор хлорида натрия), а второй — в изотонической среде (0,65%-ный раствор хлорида натрия). На препаратах через каждые 30 с в течение 10 мин, а затем дополнительно через каждые 10 мин в течение одного часа экспозиции регистрировали изображения с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест» (рег. удостовер. № 29 20010702 6102-04 от 16 02 2004). На изображениях измеряли табличные размеры всех эритроцитов и ядер. По измеренным табличным размерам клеток вычисляли значения морфометрических индексов (показатели объема, ядерно-цитоплазматические отношения, площадь поверхности, коэффициент резервной поверхности мембран). Коэффициент резервной поверхности мембраны в каждый временной интервал рассчитывали как отношение площади поверхности клетки в 0,2%-ном растворе хлорида натрия к площади поверхности клетки в 0,65%-ном растворе хлорида натрия. Достоверность различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При экспозиции эритроцитов в гипотонической среде после кальциевой нагрузки установлено набухание ядер и регуляторное сокращение объема клеток. Объем ядер возрастал на протяжении всего времени воздействия. Наиболее значительные различия по сравнению с изотонической средой установлены на 150, 420 и 1800 с инкубации. К окончанию времени инкубации (3600 с) прирост объема составил 170 % ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Отсутствие восстановления объема ядра к концу инкубации свидетельствует о развитии дисрегуляторных реакций в клетке. В частности, показано, что приток кальция в клетку является мощным проапоптотическим сигналом, который активирует систему внутриклеточных каспаз и запускает механизмы апоптоза [14]. На морфологическом уровне начало апоптотических реакций проявляется в сжатии клеток и изменение их морфологии [13]. В выполненных экспериментах отмечено регуляторное сокращение объема клеток в гипотонической среде после кальциевой нагрузки на 180 с (62,17 %, $p < 0.05$), 360 с (64,88 %, $p < 0.05$) и 540 с (70,46 %, $p < 0.05$) инкубации.

Реактивность плазмалеммы на гипотоническое воздействие проявлялась с интервалом в 180 с, а кариолеммы — с интервалом в 150 с. Важной морфологической характеристикой для оценки развивающихся компенсаторных реакций в клетке является показатель ядерно-цитоплазматических отношений (ЯЦО). Ярко выраженное увеличение ЯЦО в ответ на гипотоническую среду наблюдалось на 30 с (46,15 %, $p < 0.05$), 150 с (84,61 %, $p < 0.05$), к концу инкубации — 3600 с (73,33 %, $p < 0.05$) по сравнению с изотонической средой. Функциональная активность ядерной оболочки в ответ на гипотоническое воздействие связана с участием ионов Ca^{2+} в механизмах

ядерно-цитоплазматического переноса. Согласно современным представлениям в кариолемме субъединицы ядерных пор функционируют в качестве ионных каналов. Исследованиями, выполненными на АСМ, в ядерной поре идентифицирована центральная гранула, которая может функционировать как ионный канал и одновременно как путь для белков/РНК [15]. Кроме того, показано, что белок субъединицы, составляющий ядерную пору, мобильный и изменяет свою конфигурацию в зависимости от цитоплазматической окружающей среды [16].

Рядом работ установлено, что гипотонический шок (50 % ионичности) стимулирует увеличение свободного кальция в цитозоле. В обзорах литературы приведены примеры различных клеток, в которых уровень внутриклеточного кальция возрастает в ответ на острое осмотическое набухание [17, 18]. В связи с этим в следующей серии исследований нами был использован блокатор медленных кальциевых каналов (L-каналы) верапамил. Кальциевые антагонисты в микромолярных количествах модулируют рецептороуправляемые каналы, подавляя их проницаемость для кальция и усиливая проницаемость для натрия [19]. В результате проведенных экспериментов установлено уменьшение объема клеток к 90 с инкубации на 32,18 % ($p < 0.05$), которое сменялось регуляторным возрастанием объема к 150 с воздействия до значений изотонии, а затем к 180 с — сокращением объема на 15,43 % ($p < 0.05$).

При воздействии блокатора Ca^{2+} -каналов объем ядра резко увеличивался уже через 30 с инкубации на 172 % ($p < 0.05$) и на протяжении всей экспозиции был достоверно выше значений в изотонической среде. Восстановления объема ядра к окончанию экспозиции не наблюдали. ЯЦО в условиях блокады кальциевых каналов на протяжении всего времени гипотонической нагрузки были повышены. Наибольшие различия с изотонической средой отмечали на 30 с (0.43 ± 0.06 усл. ед.) и 150 с (0.26 ± 0.01 усл. ед.) инкубации. Не исключено, что наблюдаемые реакции со стороны кариолеммы при блокаде мембранных Ca^{2+} -каналов связаны с повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в гипотонической среде [17], что в свою очередь оказывает активирующее воздействие на процессы в ядре.

Важной особенностью клеточных структур является их способность поддерживать объемный гомеостаз в условиях гипотонической нагрузки. Основой адаптационного морфогенеза выступает мембранный резерв клеток, который был оценен количественно на основе коэффициента резервной поверхности. При гипотонической нагрузке плазмалемма и кариолемма задействуют дополнительную резервную поверхность, заложенную в складчатости мембраны и обеспечивающую их морфологическую целостность. Не исключено, что данный процесс происходит за счет структурирования подмембранных слоев цито- и кариоплазмы и образования цитомеров [20]. Используемый мембранный резерв плазмалеммы после кальциевой и верапамилевой нагрузок в условиях гипотонической среды в первые 90 с воздействия возрастал. Начиная со 120 с

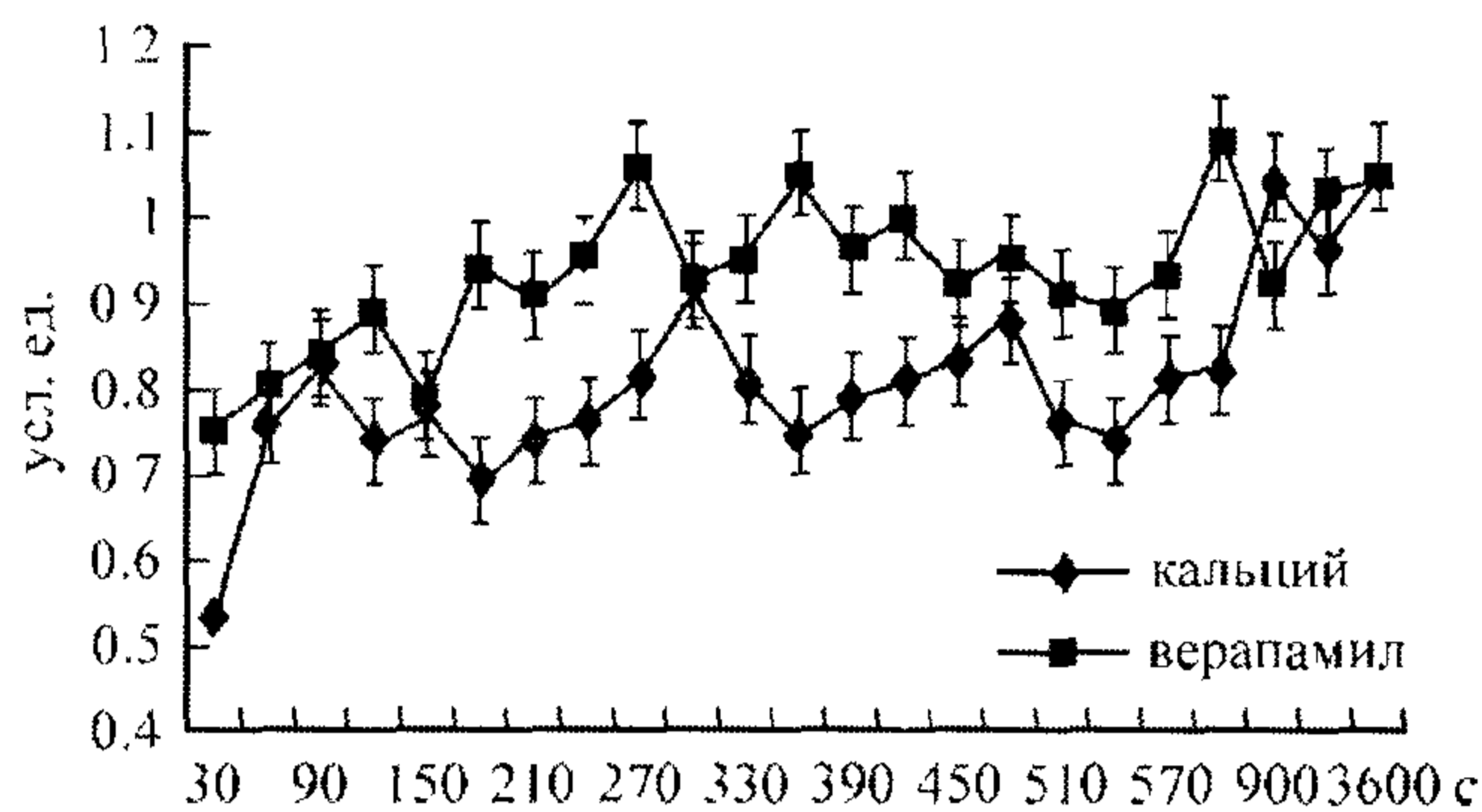


Рис. 1. Динамика мембранного резерва плазмалеммы в гипотонической среде.

По оси X отложено время инкубации в секундах, по оси Y — коэффициент резервной поверхности плазмалеммы, в усл. ед.

экспозиции кинетика реакций носила разнонаправленный характер. В условиях кальциевой нагрузки используемый мембранный резерв снижался, а при блокаде кальциевых каналов верапамилом возрастал (рис. 1). Воздействие на кальциевые каналы верапамилом при снижении осмолярности среды, индуцирует работу кальциевых каналов L-типа [21], активируя тем самым Na^+/K^+ -котранспорт и приток воды в клетку, в результате чего происходит увеличение объема и максимальное использование мембранных резервных структур для компенсаторного ответа. Равновесное перераспределение мембранных структур, задействованное в ответ на гипотоническое воздействие при активации и блокаде кальциевых каналов, наблюдали на 150, 300 и 3600 с экспозиции.

Со стороны кариолеммы прослеживалась тенденция к увеличению использования мембранного резерва в условиях кальциевой нагрузки и снижению при блокаде кальциевых каналов в первые 270 с инкубации. Динамика ответа коэффициента резервной поверхности кариолеммы на гипотоническое воздействие была сходной в промежутках с 300 по 360 с и с 390 с до конца инкубации (рис. 2).

Большее использование мембранного резерва кариолеммы при активации кальциевых каналов может быть связано с возбуждением рецептора P_2 на мембране эритроцитов в условиях гипотонической нагрузки,

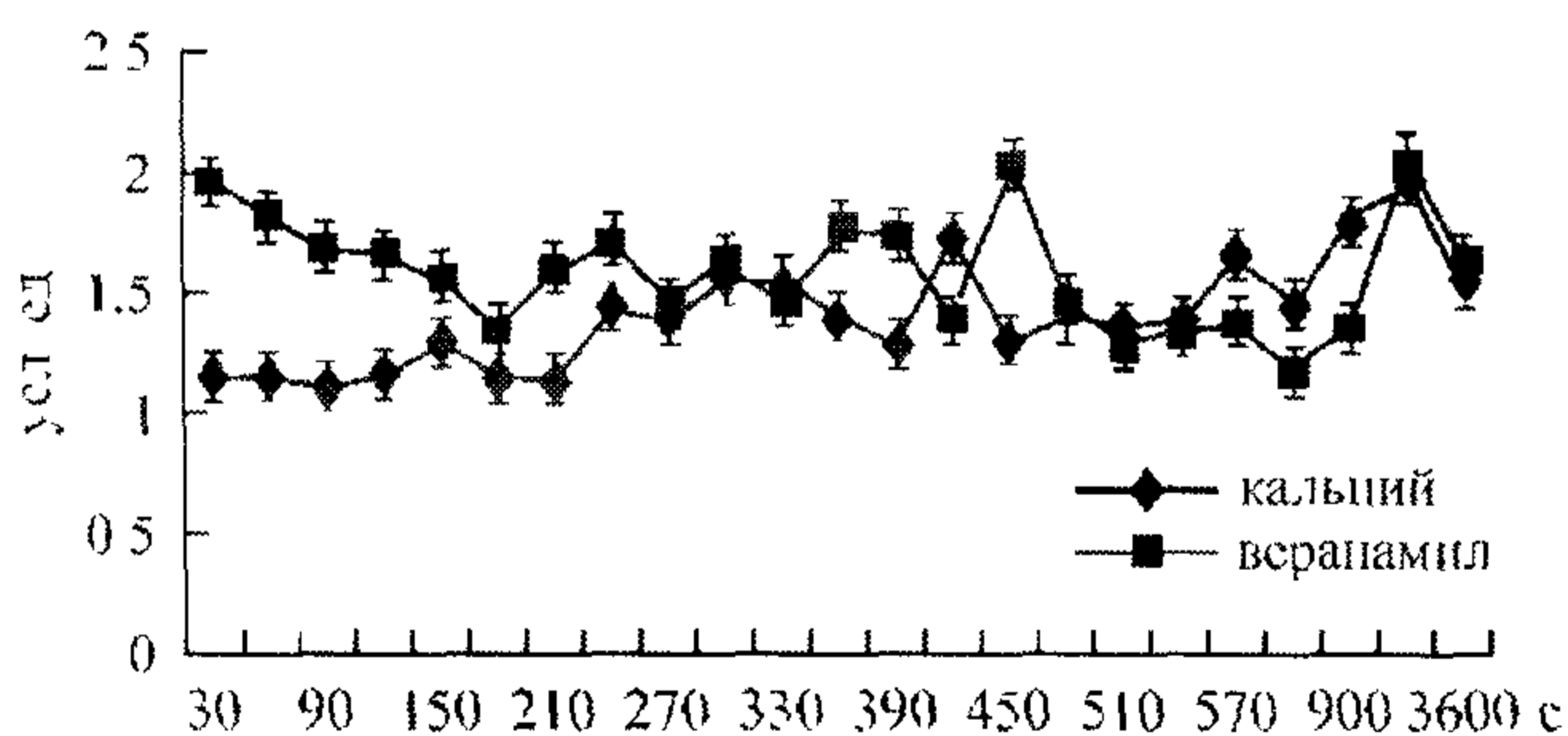


Рис. 2. Динамика мембранного резерва кариолеммы в гипотонической среде.

По оси X отложено время инкубации в секундах, по оси Y — коэффициент резервной поверхности кариолеммы, в усл. ед.

что приводит к повышению цитозольного Ca^{2+} , который запускает внутриядерные эндонуклеазы, повреждающие структуру ядра [10].

Таким образом, ответ клетки на гипотоническое воздействие представляет собой интегральную реакцию, морфофункциональная база которой — мембранный резерв плазмалеммы и кариолеммы. Объективным количественным критерием, отражающим кинетику осморегуляторных реакций, выступает коэффициент резервной поверхности. После Ca^{2+} -нагрузки наблюдается набухание ядер в гипотонической среде. При этом объем клеток сокращается и лишь к концу инкубации отмечается его прирост до значений изотонической среды. Отсутствие восстановления объема ядра на фоне сжатия клеток является показателем развития дисрегуляторных реакций. При воздействии ингибитора Ca^{2+} -каналов верапамила наблюдается регуляторное возрастание и сокращение объема клеток с временными интервалами в 30 и 60 с. Объем ядра резко возрастает на 30 с инкубации и на протяжении всей времени экспозиции остается повышенным. Стимуляция и блокада Ca^{2+} -каналов инициирует возрастание ЯЦО в сторону увеличения объема ядра.

Работа выполнена при поддержке гранта в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Список литературы

- [1] Гусев Н. Б. Внутриклеточные Ca-связывающие белки // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 5. С. 2—9.
- [2] Häussinger D., Lang F. Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1074 (4). P. 331—350.
- [3] Montrose-Rafizadeh C., Guggio W. B. Role of intracellular calcium in volume regulation by rabbit medullary thick ascending limb cells // Am. J. Physiol. 1991. V. 260. P. F402—F409.
- [4] Terreros D. A., Kanli H. Role of intracellular calcium in renal proximal tubule cell volume regulation // Am. J. Physiol. 1992. V. 263. P. R1086—R1092.
- [5] Baquet A., Lavoigne A., Hue L. Comparison of the effects of various amino acids on glycogen synthesis, lipogenesis and ketogenesis in isolated rat hepatocytes // Biochem. J. 1991. V. 273. P. 57—62.
- [6] Stoll B., Grem K. W., Lang F., Häussinger D. Liver cell volume and protein synthesis // Biochem. J. 1992. V. 287. P. 217—222.
- [7] Strange K. Cellular volume homeostasis // Adv. Physiol. Educ. 2004. V. 28. P. 155—159.
- [8] Чеботарева Н. А. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликолиза // Усп. биол. хим. 2007. Т. 47. С. 233—258.
- [9] Федорова М. З., Надеждин С. В., Головкин С. Н., Зубарева Е. В. Сравнительная оценка «мембранного резерва» клеток крови земноводных и млекопитающих // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2007. Т. 43. № 5. С. 419—422.
- [10] Minton A. P. Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: predictions and observation // J. Pharm. Sci. 2005. V. 94. P. 1668—1675.

- [11] *Al-Habori M.* Macromolecular crowding and its role as intracellular signaling of cell volume regulation // *The Internat. J. Biochem. and Cell Biology.* 2001. V. 33(9). P. 844—864.
- [12] *Light D. B., Attwood A. J., Siegel C., Baumann L.* Cell swelling increases intracellular calcium in *Necturus* erythrocytes // *J. Cell Sci.* 2002. V. 116. P. 101—109.
- [13] *Bratosin D., Estruquier J., Petit F., Arnoult D.* Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effectors pathways operating in the absence of mitochondria // *Cell Death and Differentiation.* 2001. V. 8. P. 1143—1156.
- [14] *Romero P. J., Romero E. A.* Effect of cell ageing on Ca^{2+} influx into human red cells // *Cell Calcium.* 1999. V. 26. P. 131—137.
- [15] *Folpreht G. S., Oberleithner H.* Aldosterone activates the nuclear pore transported in cultured kidney cells image with atomic force microscopy // *Pflüger Arch.* 1996. V. 432. S. 831—838.
- [16] *Mazzanti M.* Ion permeability of the nuclear envelope // *News Physiol.Sci.* 1998. V. 113. P. 44—50.
- [17] *Foskett J. K.* The role of calcium in the control of volume regulatory transport pathways // *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation.* 1994. P. 259—277.
- [18] *McCarty N. A., O'Neil R.* Calcium signaling in cell volume regulation // *Physiol. Rev.* 1992. V. 72. P. 1037—1061.
- [19] *Авдонин П. В., Чеглаков И. Б.* Модуляция рецептороуправляемых каналов тромбоцитов кальциевыми антагонистами // *Фармакология.* 1999. № 4. С. 25—28.
- [20] *Федченко Н. П., Федченко Н. П., Гарец В. И.* Цитометры — новый тип информогенных форменных элементов в организме // *Вопросы морфологии XXI века.* СПб., 2008. С. 298—306.
- [21] *Nohanty M. J., Ye M., Li X., Rossi N. F.* Hypotonic swelling-Induced Ca^{2+} release by an IP_3 -Intensitive Ca^{2+} store // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. V. 281. P. C555—C562.

Получена 24 XI 2010

OSMOREGULATORY REACTIONS OF FROG ERYTHROCYTES
UNDER CONDITIONS OF ACTIVATION AND BLOCKADE OF Ca^{2+} -CHANNELS

M. Yu. Skorkina

Belgorod State University, Belgorod, Russia

ABSTRACT

The kinetics of cell osmoregulatory reactions under conditions of activation and blockade of Ca^{2+} -channels was studied on a model of frog polyfunctional nuclear erythrocyte. Both activation and blockade of Ca^{2+} -channels has been established to promote swelling of nuclei and an increase of the nuclear-cytoplasmic ratios under conditions of hypotonic exposure. The osmoregulatory cell reactions after activation of Ca^{2+} -channels are expressed as a decrease of the cell volume. The blockator of Ca^{2+} -channels verapamil produces an alternated increase and decrease of the erythrocyte volume with time intervals of 30 and 60 s. The clearly expressed functional activity of the nuclear membrane in response to the hypotonic action under conditions of activation and blockade of Ca^{2+} -channels indicates participation of Ca^{2+} ions in mechanisms of the nuclear-cytoplasmic transfer.

Key words: erythrocyte, osmoregulatory reactions, Ca^{2+} -channels, verapamil.