

М. Ю. Скоркина, М. З. Фёдорова, А. В. Муравьёв

Мембранный резерв лимфоцитов в условиях кальциевой нагрузки

Под влиянием кальциевой нагрузки установлено снижение жесткости лимфоцитов на 34 % ($p < 0,05$), которое сопровождается увеличением числа глобулярных образований поверхности, при этом в умеренно-гипотонической среде использование клетками резерва плазмалеммы снижается (≈ 15 %). Интенсивное использование ядром резерва внутриклеточного бассейна наблюдается в течение первых 120 секунд инкубации, а в последующие секунды воздействия – интенсивность понижается. Вовлечение запасов мембранных бассейнов в регуляцию объема при снижении осмолярности среды позволяет снизить лимфоцитам осмотическое натяжение плазмалеммы и сохранить целостность клетки.

Ключевые слова: лимфоциты, мембранный резерв, коэффициент осмотического натяжения, кальциевая нагрузка.

M. Ju. Skorkina, M. Z. Fiodorova, A. V. Muraviov

Membrane Reserve of Lymphocytes in Conditions of Calcic Loading

Decrease to rigidity of lymphocytes found in 34% ($p < 0.05$) is established under the calcium load, which is accompanied by an increase in the number of globular formations of the surface, while in moderately hypotonic environment the use of cells the membrane reserve is reduced ($\approx 15\%$). The intensive use of the nuclear of the reserve pool of intracellular occurs during the first 120 seconds of incubation, and the subsequent impact of a second - is reduced. Involvement of membrane reserves in the volume regulation allows to reduce the osmotic tension of the plasma membrane lymphocytes and preserves the integrity of the cell under the decrease in osmolarity medium.

Keywords: cells, membrane reserve, the ratio of osmotic tension, calcium load.

Реакции клеток крови на осмотические воздействия сопровождаются локальной деформацией мембраны, интенсивность проявления которой зависит от скорости объем-чувствительных ионных потоков [1] и регулируется элементами Ca^{2+} -сигнального каскада [2, 13, 10]. Значительное мембранное натяжение, возникающее при осмотическом стрессе, компенсируется привлечением резервов поверхностного и внутриклеточного мембранных бассейнов, что позволяет животным клеткам совершать быстрые флуктуации объема как в буферном растворе [11], так и при снижении осмолярности среды [5]. По данным литературы величина мембранного резерва варьируется в зависимости от типа клеток и метода измерения. Мембранный резерв фибробластов, определяемый с использованием оптического пинцета, составляет около 1 % [11], в то же время резерв лимфоцитов, определенный методом patch-clamp – около 70 % [12]. Значительных величин достигает показатель резерва нейронов от 50 % до 300 % [14, 16] и ооцитов Xenopus – более 500 % [15].

Целью проведенного исследования было изучение влияния кальциевой нагрузки на интен-

сивность использования лимфоцитами и их ядрами резервных структур поверхностного и внутриклеточного бассейнов.

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены на базе научно-исследовательской лаборатории «Физиология адаптационных процессов» кафедры анатомии и физиологии живых организмов НИУ БелГУ. Мембранный резерв лимфоцитов здоровых доноров, а также влияние ионов Ca^{2+} на интенсивность использования мембранных запасов изучали методом морфометрии на модели осмотической регуляции объема клеток в умеренно-гипотонической среде.

Использовали венозную кровь здоровых доноров (100 человек) в возрасте от 25 до 45 лет, проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы г. Белгорода. Полученную кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин. Удаляли верхний слой плазмы. Собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов разрушали 0,83 % раствором хлорида аммония. Клетки дважды отмывали изотонич-

ным буферным раствором (раствор Дульбекко, pH=7,4).

Кальциевую нагрузку осуществляли *in vitro* путем инкубации 30 мкл концентрированной суспензии лимфоцитов в 150 мкл среды Хенкса, содержащей 10^{-6} ммоль/л Ca^{2+} , в течение 15 мин при комнатной температуре. В качестве контроля служили лимфоциты без добавления ионов Ca^{2+} , проинкубированные при тех же условиях с добавлением среды Хенкса. По истечении времени инкубации пробы центрифугировали, убрали надосадочную жидкость. В каждой опытной и контрольной пробе полученную суспензию лимфоцитов делили на три части по 10 мкл в каждой. К первой части добавляли 50 мкл аутологичной плазмы, ко второй – 50 мкл 0,4 % раствора хлорида натрия, к третьей – 50 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия. Формировали однослойные суспензионные препараты из каждой пробы, в которых через каждые 30 сек в течение 10 минут, а затем дополнительно через каждые 15, 30 и 60 мин регистрировали изображения лимфоцитов на анализаторе изображений «ВидеоТест». На полученных изображениях измеряли габаритные размеры лимфоцитов и их ядер. По измеренным габаритным размерам клеток вычисляли значения морфометрических индексов по следующим формулам: $V=4/3(\pi r^3)$; $S=4\pi r^2$, где V – объем, S – площадь поверхности, r – радиус.

Об осморегуляторных реакциях плазмалеммы и кариолеммы судили по кинетике их набухания и восстановления исходного объема в течение 60 мин в умеренно гипотоническом растворе хлорида натрия. Функциональную активность лимфоцитов и ядер оценивали по коэффициенту осмотического натяжения клеток и показателю использования их относительного мембранного резерва. Расчет функциональных параметров осуществляли по следующим формулам:

$$K_{os} = S_{0,4}/S_{0,9}$$

где K_{os} – коэффициент осмотического натяжения мембраны;

$S_{0,4}$ – площадь поверхности клеток/ядер в 0,4% растворе хлорида натрия;

$S_{0,9}$ – площадь поверхности клеток/ядер в 0,9% растворе хлорида натрия.

$$MR = \frac{S_{0,4}-S_p}{V_p}$$

где MR – относительный мембранный резерв ($мкм^{-1}$);

$S_{0,4}$ – площадь поверхности клеток/ядер в 0,4 % растворе хлорида натрия ($мкм^2$);

S_p – площадь поверхности клеток/ядер в аутологичной плазме ($мкм^2$);

V_p – объем клеток/ядер в аутологичной плазме ($мкм^3$).

С целью изучения изменений рельефа поверхности, сопровождающих фазы регуляторного увеличения и уменьшения объема, в работе использованы методы полуконтактного АСМ-сканирования. Сканирование проводили во влажной камере [3] на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT MDT, Зеленоград) с частотой развертки 0,6–0,8 Hz, используя кантилеверы серии NSG03, с жесткостью 1,1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. На полученных сканах строили кривые профиля участков поверхности размером 3,5x3,5 мкм, на которых определяли габаритные размеры и подсчитывали количество глобулярных выступов, а также углублений, образовавшихся в мембране после нагрузок.

Упруго-эластические свойства клеток крови изучали методом эластографии с применением модифицированных кантилеверов в виде полусфер с радиусом закругления 5 мкм. В качестве экспериментальных данных для определения локальной упругости клеток были использованы силовые кривые, которые получали в широком диапазоне как до, так и после контакта кантилевера с поверхностью объекта. Для расчета модуля Юнга силовые кривые подвода, полученные в эксперименте, преобразовывали из системы координат D-z к системе F-Δh, где D – ток рассогласования фотодиода, z – расстояние, на которое перемещается кантилевер пьезосканером АСМ при подводе к поверхности. Силу прижатия зонда к образцу находили, исходя из закона Гука:

$$F = k * x, \quad (1)$$

где k – жесткость зонда, x – глубина проникновения зонда в образец.

Модуль Юнга системы образец-игла рассчитывали, исходя из формулы [4]:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E \Delta h^{\frac{3}{2}} \quad (2)$$

где F – сила, действующая на образец;

R – радиус закругления зонда;

Δh – глубина проникновения зонда в поверхность образца;
 E – модуль Юнга.

Полученные экспериментальные данные статистически обработаны. Достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Под влиянием ионов Ca^{2+} модуль Юнга лимфоцитов здоровых доноров снижался на 34 % ($p < 0,05$), а глубина погружения кантилевера возрастала на 142 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Модуль Юнга и морфология поверхности лимфоцитов в условиях кальциевой нагрузки

Параметры		Контроль	Опыт
Модуль Юнга, μPa		3,5±0,2	2,3±0,3*
Глубина погружения кантилевера, нм		345,2±3,7	835,7±10,0*
Углубления в мембране	Глубина, нм	17,3±0,6	14,9±2,1
	Диаметр, нм	221,8±24,0	194,4±1,2
	Количество	18,0±1,1	51,0±2,6*
Глобулярные выступы	Высота, нм	41,3±3,7	26,5±1,6*
	Количество	36,0±0,9	86,0±2,8*

* – статистически достоверные различия между значениями контрольной и опытной проб по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Под влиянием ионов Ca^{2+} на поверхности лимфоцитов появлялись небольшие глобулярные образования и углубления в виде кластеров (рис.

1а). В контроле поверхность клеток была сглажена, на ней были видны небольшие углубления (рис. 1б).

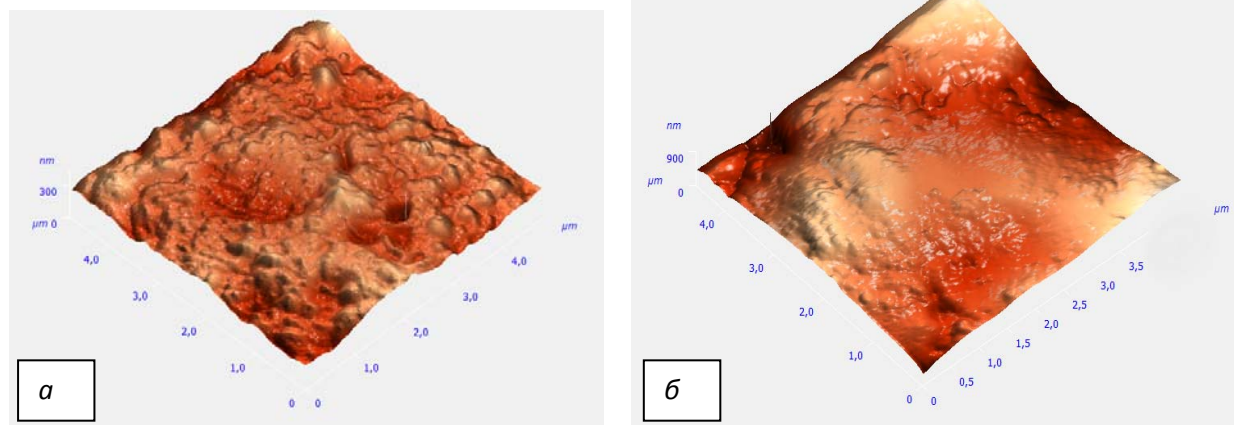


Рис. 1. Рельеф поверхности лимфоцитов здоровых доноров:
 а – после инкубации клеток с ионами Ca^{2+} ; б – в аутологичной плазме

Выраженная шероховатость поверхности, наблюдаемая на сканах участков мембран после Ca^{2+} -нагрузки, связана с увеличением количества глобулярных выступов на 139 % ($p < 0,05$), при этом их высота снижалась на 56 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. табл. 1). Количество углублений в мембране под влиянием Ca^{2+} увеличивалось на 183 % ($p < 0,05$), их габаритные размеры находились в пределах недостоверных различий с контролем.

Под влиянием кальциевой нагрузки установлено уменьшение объема лимфоцитов и их ядер на протяжении часовой инкубации в умеренно-

гипотонической среде. Коэффициент осмотического натяжения плазмалеммы в течение первых 210 секунд инкубации находился в пределах недостоверных различий с контролем, а затем снижался на 26 % ($p < 0,05$) к 240-й секунде воздействия гипотонической среды (табл. 2). Выявленный факт указывает на активное участие поверхностного резерва плазмалеммы в механизмах регуляции объема.

Под влиянием Ca^{2+} максимальное вовлечение мембранного резерва клеткой (≈ 24 %) наблюдалось на 30-й секунде инкубации (рис. 2).

Таблица 2

Коэффициент осмотического натяжения плазмалеммы и кариолеммы лимфоцитов под влиянием кальциевой нагрузки

Время, с	Плазмалемма, усл. ед.		Кариолемма, усл. ед.	
	Контроль	Ca ²⁺	Контроль	Ca ²⁺
30	1,11±0,03	1,09±0,03	1,17±0,04	1,17±0,03
60	1,16±0,03	1,17±0,03	1,25±0,04	1,16±0,04
90	1,16±0,03	1,09±0,02	1,29±0,04	1,18±0,04
120	1,18±0,04	1,13±0,03	1,24±0,04	1,24±0,04
150	1,17±0,03	1,09±0,03	1,18±0,03	1,30±0,04*
180	1,16±0,03	1,16±0,03	1,23±0,03	1,29±0,03
210	1,15±0,03	1,11±0,03	1,23±0,03	1,23±0,04
240	1,25±0,04	0,99±0,04*	1,28±0,04	1,19±0,04
270	1,13±0,03	1,11±0,03	1,31±0,04	1,15±0,03*
300	1,18±0,04	1,14±0,03	1,22±0,04	1,18±0,04
330	1,18±0,03	1,11±0,03	1,24±0,04	1,20±0,04
360	1,13±0,03	1,11±0,03	1,19±0,03	1,27±0,05*
390	1,03±0,02	1,11±0,04	1,11±0,03	1,16±0,05
420	1,02±0,03	1,13±0,04	1,14±0,04	1,29±0,05*
450	1,08±0,04	1,17±0,04	1,12±0,03	1,04±0,03
480	1,06±0,04	1,09±0,02	1,12±0,04	1,05±0,03
510	1,05±0,04	1,07±0,03	1,14±0,03	1,06±0,03
540	1,13±0,03	1,11±0,03	1,15±0,02	1,99±0,07*
570	1,15±0,03	1,16±0,03	1,19±0,03	1,14±0,03
600	1,10±0,03	1,11±0,03	1,16±0,03	1,09±0,03
900	1,21±0,03	1,07±0,03	1,19±0,03	1,18±0,04
1800	1,14±0,04	-	1,25±0,04	-
3600	1,25±0,03	-	1,42±0,04	-

* Достоверность различий значений под влиянием Ca²⁺ по сравнению с контролем по критерию Стьюдента (p<0,05).

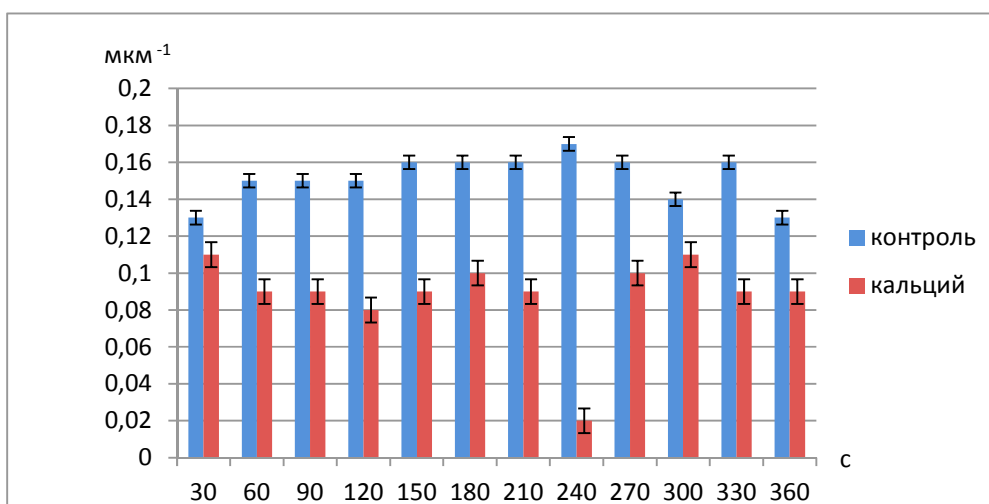


Рис. 2. Относительный мембранный резерв, используемый лимфоцитами под влиянием кальция при снижении осмолярности среды

Несмотря на то, что мембранный резерв плазмалеммы, задействованный лимфоцитами под влиянием ионов Ca²⁺, был ниже в среднем на 15 % (p<0,05) по сравнению с контролем, в течение 210 секунд инкубации лимфоциты активно использовали запасы плазмалеммы в реакциях осморегуляции. Лишь на 240-й секунде инкубации использо-

вание резервного бассейна плазмалеммы лимфоцитами под влиянием Ca²⁺ снижалось на 47 % (p<0,05) по сравнению с контролем

Коэффициент осмотического натяжения кариолеммы под влиянием Ca²⁺ в первые 120 секунд инкубации находился в пределах недостоверных различий с контролем, начиная со 150-й

секунды увеличивался на 9 % ($p < 0,05$), а к концу инкубации (540-я секунда) – на 42 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. табл. 2). В условиях кальциевой нагрузки величина мембранного резерва, используемого ядром на 30-й секунде инкубации, возрастала на 21 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, затем снижалась и к 120-й се-

кунде инкубации вновь достигала контрольных значений. Выявленный факт указывает на активное участие резервов внутриклеточного бассейна в регуляции объема ядра в течение первых 120 секунд инкубации (рис. 3).

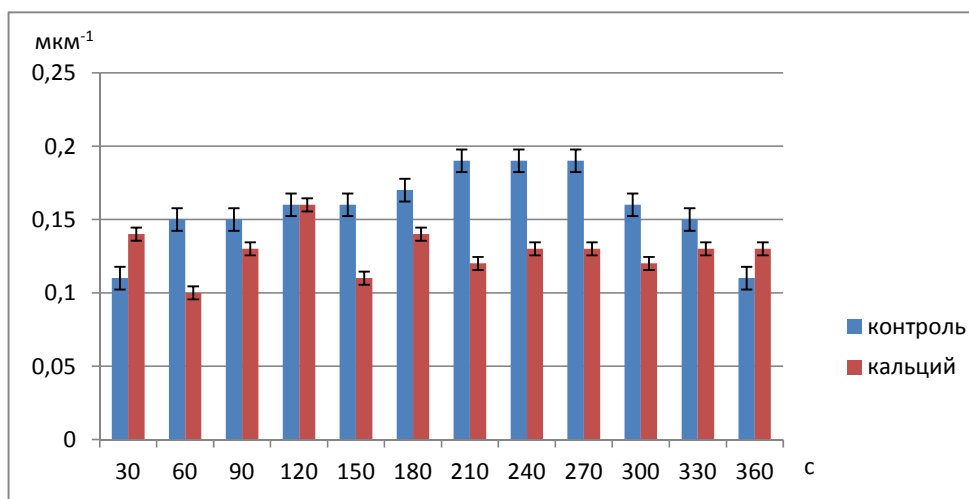


Рис. 3. Относительный мембранный резерв, используемый ядрами под влиянием кальция при снижении осмолярности среды

Под влиянием кальциевой нагрузки максимальное использование мембранного резерва клеткой (≈ 24 %) наблюдается на 30-й секунде, в то время как ядром (≈ 28 %) – на 120-й секунде инкубации в гипотонической среде, что свидетельствует о большем запасе внутриклеточных мембранных резервов, чем поверхностных. К окончанию времени воздействия гипотонического раствора (900 с инкубации) наблюдается гибель лимфоцитов.

Таким образом, под влиянием кальциевой нагрузки снижается жесткость клеток и увеличивается число морфологических образований на поверхности, что указывает на ведущую роль экзогенного Ca^{2+} в сигнальных механизмах перестройки структур цитоскелета [6]. Обилие глобулярных выступов на поверхности лимфоцитов в условиях кальциевой нагрузки, вероятно, связано с дезорганизацией элементов цитоскелета и формированием актинсвязывающих доменов в подмембранном пространстве, которые по данным ряда авторов способствуют формированию выпячиваний или выступов на плазмалемме [7, 8, 9]. Не исклю-

чено, что такая дестабилизация белков цитоскелета под влиянием ионов Ca^{2+} , вызывает снижение использования мембранного резерва лимфоцитами в гипотонической среде. Несмотря на это, вовлечение поверхностных резервов плазмалеммы в регуляцию объема в первые минуты воздействия позволяет лимфоцитам снизить коэффициент осмотического натяжения мембраны и, тем самым, сохранить целостность клетки. Уменьшение значений коэффициента осмотического натяжения мембраны к концу инкубации свидетельствует о том, что гибель клеток после 900-й секунды не связана с явлением гипоосмотического лизиса, а скорее всего является результатом апоптоза, запускаемого в ядре с участием ионов Ca^{2+} . На это косвенно может указывать тот факт, что объем ядра в гипотонической среде уменьшается, а коэффициент осмотического натяжения кариолеммы возрастает, при этом ядро интенсивно привлекает резервы внутриклеточного мембранного бассейна в первые 120 секунд инкубации, а затем интенсивность использования дополнительных структур снижается.

Библиографический список

1. Орлов, С. Н. Регуляция объема клеток : патофизиологическое значение [Текст] / С. Н. Орлов, К. Н. Новиков // Физиологический журнал им.

И. М. Сеченова. – 1996. – Т. 82 (8–9). – С. 1–15.

2. Ткачук, В. А. Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций [Текст] / В. А. Ткачук // СОЖ. – 2001. – Т. 7, № 1. – С. 10–15.

3. Пат. 98248 Российская Федерация, полезная модель «Влажная камера для исследования клеток крови» [Текст] / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, С. Д. Чернявских, заявитель и патентообладатель БелГУ. – № 2010105541, заявл. 06.02.2010; опубл. 27.05.2011.

4. Capella, B. Force-distance curves by atomic force microscopy [Text] / B. Capella, G. Dieter // Surf. Sci. Rep. – 1999. – V. 34. – P. 1–104.

5. Groulx, N., Membrane reserves and hypotonic cell swelling [Text] / N. Groulx, F. Bourdreault, S.N. Orlov, R. Grygorczyk // J. Membr. Biol. – 2006. – V. 214. – P. 43–56.

6. Hoffman, E.K. Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease [Text] / E.K. Hoffman // Cell Physiol. Biochem. – 2000. – V. 10. – P. 273–288.

7. Insall, R.H. Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks [Text] / R.H. Insall, L.M. Machesky // Dev. Cell. – 2009. – V. 17. – P. 310–322.

8. Itoh, T. Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains [Text] / T. Itoh, T. Takenawa // Prog. Lipid. Res. – 2009. – V. 48. – P. 298–305.

9. McMahon, H.T. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling

[Text] / H.T. McMahon, J.L. Gallop // Nature. – 2005. – V. 438. – P. 590–596.

10. Mohanty, M.J. Hypotonic swelling-induced Ca^{2+} release by an IP_3 -intensive Ca^{2+} -store [Text] / M.J. Mohanty, M. Ye, X. Li, N.F. Rossi // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2001. – V. 281. – P. 555–562.

11. Raucher, D., Characteristic of a membrane reservoir buffering membrane tension [Text] / D. Raucher, M. Sheetz // Biophysical J. – 1999. – V, 77. – P, 1992–2002.

12. Ross, P.E. Membrane chloride conductance and capacitance in Jurkat T-lymphocytes during osmotic swelling [Text] / P.E. Ross., S.S. Garber, M.D. Cahalan // Biophys. J. – 1994. – V. 66. – P. 169–178.

13. Sechi, S.A. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane [Text] / S.A. Sechi, J. Wehland // J. Cell Science. – 2000. – V. 113. – P. 3685–3695.

14. Wan, X. Responses of neurons to extreme osmomechanical stress [Text] / X. Wan, J.A. Harris, C.E.J. Morris // Membr. Biol. – 1995. – V. 145. – P. 21–31.

15. Zhang, Y. On the discrepancy between whole cell and membrane patch mechanosensitivity in *Xenopus* oocytes [Text] / Y. Zhang, P.P. Hamill O.P. // J. Physiol. – 2000. – V. 523(Pt 1). – P. 101–115.

16. Zhang, Z. Osmometry in osmosensory neurons [Text] / Z. Zhang, C.W. Bourque // Nat. Neurosci. – 2003. – V. 6. – P. 1021–1022.