

*А.В.Бизюкин, З.Ф.Хараева*

## НОВОЕ О КАЛЬЦИЕВЫХ МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Российский государственный медицинский университет, Москва

### NOVEL FINDINGS ABOUT CALCIUM REGULATION MESHANISMS OF OXYDATIVE METABOLISM IN PHAGOCYTES

*A.V.Bizjikin, Z.F.Charaeva*

#### S u m m a r y

The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in intracellular and extracellular generation of reactive oxygen species (ROS) in phagocytes was evaluated. It was shown that  $\text{Ca}^{2+}$  deficiency caused by EGTA and riosidine influenses upon extra- and intracellular ROS generation in different ways. Ionofor A 23187 activated the extracellular generation of ROS, but intracellular generation of ROS was reduced completely. Obtained results suggest that calcium ionofors may have antimutagenic effect. The possible reasons for different effects of calcium deficiency on enzyme systems responsible for generation of ROS were discussed.

#### Р е з ю м е

Изучена роль  $\text{Ca}^{2+}$  во вне- и внутриклеточных процессах продукции активных форм кислорода (АФК) в фагоцитирующих клетках крови. Получены результаты, что дефицит ионов кальция, вызванный применением ЭГТА и риосидина по-разному влияет на вне- и внутриклеточные процессы продукции АФК. Ионофор А 23187, активируя внеклеточную продукцию АФК, полностью отменял внутриклеточную. Высказывается предположение о механизмах антимутогенного действия кальциевых ионофоров. Обсуждаются возможные причины различных эффектов дефицита  $\text{Ca}^{2+}$  на различные ферментные системы, ответственные за продукцию АФК.

#### В в е д е н и е

Роль ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в окислительном метаболизме фагоцитирующих клеток представляется достаточно неоднозначной. Известные стимуляторы окислительного метаболизма формил-метионил-лейцил-фенилаланин (ФМЛП), форболмиристатацетат (ФМА) и кальциевый ионофор А 23187, провоцируя "дыхательный взрыв" в фагоцитах, по-разному влияют на изменение концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме. Так, кратковременное увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  предшествует генерации активных форм кислорода (АФК) в фагоцитах, стимулированных пептидом ФМЛП [3]. Стимуляция ФМА не приводит к изменению внутрицитоплазматической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [13]. Кальциевый ионофор А 23187 встраивается в мембрану фагоцитов и приводит к резкому увеличению  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме [9].

Сравнительное изучение роли  $\text{Ca}^{2+}$  во вне- и внутриклеточных процессах генерации АФК, возможно, откроет новые аспекты в механизмах свободнорадикальной активации фагоцитов.

#### Э к с п е р и м е н т а л ь н а я   ч а с т ь

Лейкомассу крови здоровых доноров выделяли по общепринятой методике [6]. Клеточный состав лейкомаcсы определяли на автоматических гематологических анализаторах COBAS ARGOS 5 DIFF и COBAS HELIOS 5 DIFF. Анализ клеточного состава лейкомаcсы показал, что  $40 \pm 6\%$  составляли лимфоциты,  $6 \pm 2\%$  — моноциты и  $54 \pm 7\%$  — нейтрофилы. Лимфоциты не продуцируют АФК [14]. Таким образом, среди лейкоцитов, способных продуцировать АФК, приблизительно 90% составляли нейтрофилы.

Количество мертвых клеток считали после окрашивания их раствором трипанового синего. В клеточной суспензии было  $98 \pm 2\%$  живых клеток.

Продукцию АФК определяли с использованием флюоресцентного красителя гидроэтидина (ГЭ) [1].

Стандартный образец содержал  $10^6$  кл/мл. Фагоциты стимулировали ФМА ( $2 \times 10^{-7}$  М) и ФМЛП ( $2 \times 10^{-7}$  М), который имеет собственный рецептор на плазмолемме лейкоцитов крови человека. Типичные кинетические кривые активации клеток ФМА и ФМЛП

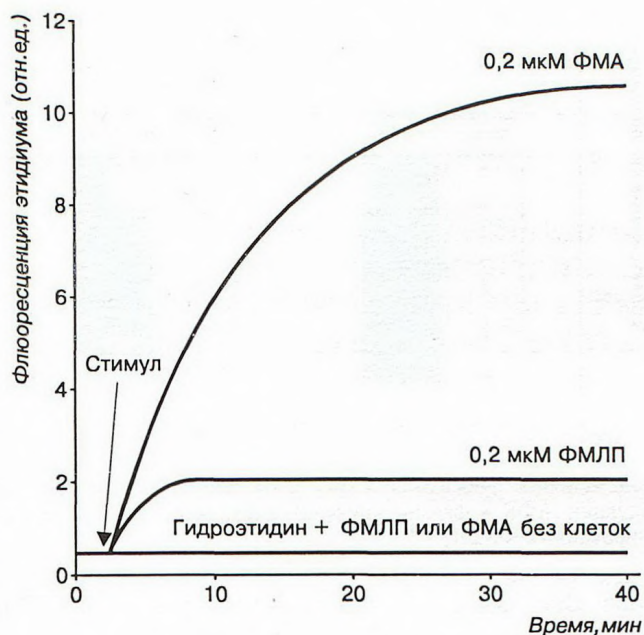


Рис.1. Типичные кинетические кривые активации фагоцитирующих клеток человека ФМА и ФМЛП.

представлены на рис.1. Из рисунка видно, что ФМА и ФМЛП не влияют на превращение ГЭ в этидиум.

Для изучения роли  $\text{Ca}^{2+}$  в процессах свободнорадикальной активации фагоцитирующих клеток были использованы ЭГТА в концентрации 2 мМ (в качестве специфического  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего агента, не проникающего внутрь клетки) и риосидин (риодиин, производный 1,4-дигидропиридина), блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов как на наружной мембране, так и на внутриклеточных органеллах в концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  М (при такой концентрации блокируется более 50%  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [2]; а также  $\text{Ca}^{2+}$  ионофор — антибиотик А23187 в нецитотоксичной концентрации 0,5 нг/мл.

Все препараты (А 23187, риосидин и ЭГТА) в использованных концентрациях не влияли на жизнеспособность лейкоцитов в течение 30—40 минут. Они также не влияли на превращение ГЭ в этидиум, люминесценцию этидиума и не обладали свойствами ловушек радикалов в реактиве Фентона.

## Результаты и обсуждение

Получены данные, что предварительное инкубирование лейкоцитов с риосидином и ЭГТА по-разному влияет на внутриклеточную продукцию АФК в клетках, стимулированных ФМА, и ФМЛП. В лейкоцитах, стимулированных ФМА, риосидин был причиной усиления эндогенной генерации активных метаболитов кислорода на  $154 \pm 14\%$ , а ЭГТА — на  $67 \pm 20\%$  (рис.2.). В фагоцитах же, активированных ФМЛП, риосидин, наоборот, ингибировал внутриклеточную продукцию АФК на  $77 \pm 15\%$ , а ЭГТА — на  $56 \pm 17\%$  (рис.3.)

На внеклеточную продукцию АФК риосидин и ЭГТА влияли одинаково независимо от типа активатора. В лейкоцитах, стимулированных ФМА, предварительное инкубирование с риосидином снижало эндогенную продукцию АФК на  $35 \pm 13\%$ , а ЭГТА — на  $42 \pm 4\%$

(см.рис.2.). При использовании ФМЛП в качестве активатора риосидин также ингибировал внеклеточную продукцию радикалов на  $68 \pm 13\%$ , а ЭГТА — на  $72 \pm 26\%$  (см.рис.3.).

Добавление ионофора А 23187 в суспензию лейкоцитов приводило к появлению экзогенной генерации АФК и никак не влияло на внутриклеточную продукцию активных производных кислорода. После предварительной инкубации с А 23187 фагоциты уже не реагировали на активаторы.

Традиционно полагают, что выход ионов кальция из везикул эндоплазматического ретикулума и поступление  $\text{Ca}^{2+}$  из внешней среды предшествует и является обязательным условием активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ [12] и, следовательно, принимает участие в активации НАДФН-оксидазы [4]. Таким образом, подразумевается участие  $\text{Ca}^{2+}$  только в активации НАДФН-оксидазы и метаболизме арахидоновой кислоты.

О механизме внутриклеточной генерации АФК до сих пор нет однозначного мнения. Механизм внутриклеточной продукции АФК может быть связан с разобщением дыхательной цепи митохондрий [10], ксантиноксидазой или миелопероксидазой нейтрофилов, которые могут продуцировать активные производные кислорода внутрь клетки [11]. Метаболиты арахидоновой кислоты продуцируются как наружу, так и внутрь плазмолеммы. Источником внутриклеточных АФК могут быть также супероксидные радикалы, продуцируемые НАДФН-оксидазой снаружи плазмолеммы. Но тем не менее эти радикалы в силу их незначительной реакционной способности, видимо, могут диффундировать внутрь клетки.

Можно сделать предположение, что если дефицит  $\text{Ca}^{2+}$  (вызванный применением риосидина или ЭГТА) будет одинаково влиять как на вне- так и на внутри-

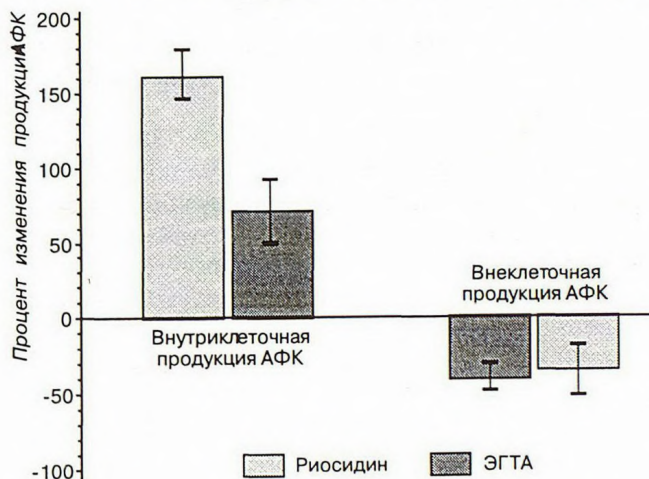


Рис.2. Влияние риосидина и ЭГТА на вне- и внутриклеточную продукцию АФК в фагоцитирующих клетках крови доноров, стимулированных ФМА.

На рис.2 и 3 по оси ординат отложены значения  $((I_0 - I_k) / I_k) \times 100\%$ , где  $I_0$  — интенсивность люминесценции этидиума в суспензии клеток, стимулированных ФМА или ФМЛП соответственно, после предварительной инкубации с риосидином или ЭГТА;  $I_k$  — интенсивность люминесценции этидиума в суспензии клеток, стимулированных ФМА или ФМЛП соответственно, без предварительной инкубации с риосидином или ЭГТА.

клеточную продукцию АФК, то механизм генерации радикалов внутри и снаружи фагоцита один и тот же (то есть, вероятно, связан со свободнорадикальными процессами в наружной мембране). Действительно, именно такие результаты получены при активации фагоцитирующих клеток крови ФМЛП. И риосидин, и ЭГТА ингибировали как вне-, так и внутриклеточную продукцию приблизительно на 68% (см.рис.3.). Эти результаты согласуются с предположениями о механизме действия ФМЛП, высказанными в работах *C.Dahlgren* [7,8]. Механизм активирующего действия данного пептида как на эндо-, так и экзогенную продукцию АФК ассоциируется с генерацией супероксидных радикалов НАДФН-оксидазой (продуцируемых наружу, но способных диффундировать внутрь клетки) — с активацией метаболизма арахидоновой кислоты (активные производные арахидоновой кислоты образуются как внутри, так и снаружи плазмолеммы) и с продукцией активных галоген-производных миелопероксидазы, которые так же могут образовываться внутриклеточно.

Таким образом, наши результаты позволяют утверждать, что при данной постановке опыта было зарегистрировано влияние дефицита  $\text{Ca}^{2+}$  (вызванное применением риосидина и ЭГТА) на свободнорадикальные реакции, происходящие в плазмолемме (то есть была измерена зависимость продукции активных производных кислорода, образующихся по обе стороны мембраны, от  $\text{Ca}^{2+}$ ). И были еще раз подтверждены эффекты  $\text{Ca}^{2+}$  на продукцию АФК, продуцируемых или НАДФН-оксидазой, либо миелопероксидазой, или на образование радикальных производных арахидоновой кислоты, либо на все эти процессы вместе.

Совершенно иная картина получена при активации клеток ФМА. Риосидин и ЭГТА традиционно ослабляли внеклеточную продукцию АФК [15] и были причиной значительного усиления внутриклеточной генерации АФК. Это позволяет сделать предположение о том, что в данном случае механизмы вне- и внутриклеточной продукции АФК в фагоцитах, стимулированных ФМА, различны.

Кальциевый ионофор-антибиотик А 23187 увеличивает вход  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь фагоцитов и на порядок увеличивает цитоплазматическую концентрацию свободного  $\text{Ca}^{2+}$ , что приводит к изменению трансмембранного потенциала и блокированию всех потенциал-зависимых кальциевых каналов. Существует мнение, что кальциевые ионофоры активируют образование свободнорадикальных производных арахидоновой кислоты [16]. Действительно, мы наблюдали увеличение экзогенной продукции АФК в фагоцитах, стимулированных ионофором. Можно было бы ожидать активирующего эффекта ионофоров и на внутриклеточную продукцию АФК за счет активных метаболитов арахидоновой кислоты, продуцируемых с внутренней стороны плазмолеммы. Однако А 23187 (по нашим данным) и иономицин (по данным *C.Dahlgren* [7]) полностью ингибировали внутриклеточную продукцию АФК в фагоцитирующих клетках крови, активируемых ФМА и ФМЛП. Эти результаты позволяют предположить наличие антимутагенного эффекта у кальциевых ионо-

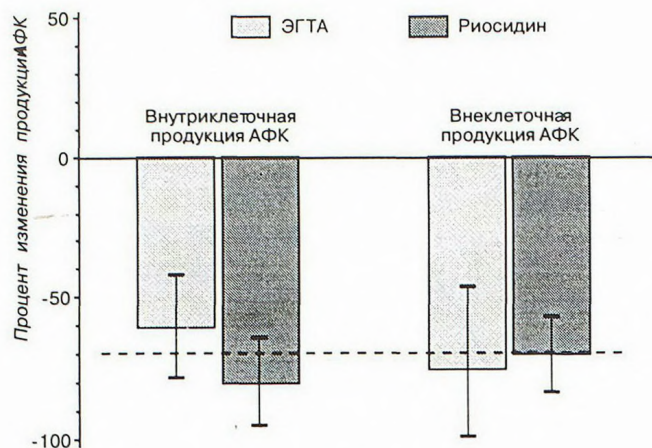


Рис.3. Влияние риосидина и ЭГТА на вне- и внутриклеточную продукцию АФК в фагоцитирующих клетках крови доноров, стимулированных ФМЛП.

форов. Действительно, такой эффект описан *H.C.Birnboim*. Автор пытался обнаружить корреляцию между внеклеточной продукцией АФК и количеством повреждений ДНК в гранулоцитах, стимулированных различными мутагенами. Поскольку корреляция отсутствовала, то было высказано предположение о существовании неких гипотетических факторов, которые опосредованно (после усиления внеклеточной генерации АФК) стимулируют повреждение ДНК [5]. Очень заманчиво, с нашей точки зрения, было бы предположить об участии в свободнорадикальном повреждении ДНК и активных метаболитов кислорода, продуцируемых внутриклеточно. Тогда становится понятен и механизм антимутагенного действия ионофора А 23187.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бизюкин А.В., Коркина Л.Г., Величковский Б.Т. // Бюл. exper. биол.— 1995.— № 4.— С.361—365.
2. Белевич Г.В., Дюбур Г.Я., Добрецов Г.Е., Курек Н.К., Спирин М.М. // Биол. мембраны.— 1988.— Т.5, № 7.— С.768—778.
3. Axtell R.A., Sandbond R.R., Smolen J.A., Ward P.A., Boxer L.A. // Blood.— 1990.— Vol.75, № 6.— P.1324—1332.
4. Bellavite P. // Free Radical. Biol.— 1988.— Vol.4.— P.225—261.
5. Birnboim H.C. // Biochem. Cell. Biol.— 1988.— Vol.66, № 5.— P.374—381.
6. Boyum A. // Scand. J.Clin. Lab. Invest.— 1968.— Suppl.97.— P.77.
7. Dahlgren C. // Biochim. Biophys. Acta.— 1987.— Vol.930, № 1.— P.33—38.
8. Dahlgren C. // Inflammation.— 1988.— Vol.12, № 4.— P.335—349.
9. Hoffman T., Lizzio E.F. // J.Immunol.Meth.— 1989.— Vol.112.— P.9—14.
10. Kobzik L., Godleski J., Brain J. // J.Leukocyte Biol.— 1990.— Vol.47, № 4.— P.295—303.
11. Markey B.A., Phan S.H., Varani J. et al. // Free Radical Biol.Med.— 1990.— Vol.9, № 4.— P.307—314.
12. Marodi L., Korchak H.M., Johnston R.B. // J.Immunol.— 1991.— Vol.146, № 8.— P.2783—2789.
13. Perianin A., Snyderman R. // J.Biol.Chem.— 1989.— Vol.264, № 2.— P.1005—1009.
14. Robinson J.P., Bruner L.H., Bassoe C.-F. et al. // J.Leukocyte Biol.— 1988.— Vol.43.— P.304—310.
15. Shridi F., Robak J. // Pharmacol. Res. Commun.— 1988.— Vol.20, № 1.— P.13—21.
16. Weissman G., Serhan C., Korchak H.M., Smolen J.E. // International Cellular Culture Congress, 2-nd: Proceedings.— New York, 1981.— P.527—552.

Поступила 15.07.96.