

6. Gallin E. K. Calcium- and voltage-activated potassium channels in human macrophages // Biophys. J.—1984.—46, N 12.— P. 821—825.
7. Gallin E. K., Sheehy P. A. Differential expression of inward and outward potassium currents in the macrophage-like cell line Z774.1 // J. Physiol.—1985.—369.— P. 475—500.
8. Gallin E. K., Livengood D. R. Inward rectification in mouse macrophages: evidence for a negative resistance region // Amer. J. Physiol.—1981.—241, N 1.— P. C9—C17.
9. Hamill O. P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // Pflugers Arch.—1981.—391, N 2.— S. 85—100.
10. Kolb H. A., Schwarze W. Properties of a cation channel of large unit conductance in lymphocytes, macrophages and cultured muscle cells // Biophys. J.—1984.—43, N 1.— P. 136—138.
11. Kouri J., Noa M., Diaz B., Niubo E. Hyperpolarization of rat peritoneal macrophages phagocytosing latex particles // Nature.—1980.—283, N 5750.— P. 868—869.
12. Schwarze W., Kolb H. A. Voltage-dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membranes // Pflugers Arch.—1984.—402, N 3.— S. 281—291.
13. Ypey D. L., Clapham D. E. Development of a delayed outward-rectifying K conductance in cultured mouse peritoneal macrophages // Proc.—1984.—81, N 10.— P. 3083—3087.

Ин-т хирургии им. А. В. Вишневского
АМН СССР, Москва

Поступила 15.06.87

УДК 577.354

Влияние конканавалина А на внутриклеточную концентрацию ионов кальция и трансмембранный потенциал лимфоцитов кролика

Е. Д. Наливайко, С. Л. Миронов

При активации лимфоцитов происходит модификация разнообразных мембранных и цитоплазматических процессов и структур. Исследования последних 10 лет показали, что приложение митогенов вызывает рост внутриклеточной концентрации ионизированного кальция [1], снижение трансмембранного потенциала [2], активацию натриевого насоса [3], увеличение количества функционирующих калиевых каналов и их проводимости [4], защелачивание внутриклеточного pH [5] и пр. Участие в активации фосфатидилинозитольной системы подтверждается повышением внутриклеточной концентрации инозитол-1,4,5-трифосфата в ответ на приложение митогенов [6] и митогенными эффектами активаторов протеинкиназы С [7]. Эффекты вышеупомянутой системы в конечном счете реализуются через изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} — $[\text{Ca}]_i$, являющегося признанным вторичным посредником, поэтому можно предположить, что именно изменения $[\text{Ca}]_i$ и являются ключевым моментом в запуске пролиферативного ответа лимфоцитов. Это и определило цель нашего исследования — выяснить взаимосвязь изменений $[\text{Ca}]_i$ и трансмембранного потенциала в ответ на приложение митогена, а также определить источник повышения $[\text{Ca}]_i$ и динамику этого процесса.

Методика

Лимфоциты периферической крови кролика получали по стандартной процедуре [8] в градиенте фикола верографина ($\rho=1,077$), затем оставшиеся эритроциты лизировали 0,87 %-ным раствором хлорида аммония, а осадок дважды отмывали в нормальном растворе, содержащем (ммоль/л): NaCl — 130, KCl — 2, CaCl_2 — 3,5, MgCl_2 — 2, трис-HCl — 10 (pH 7,3), глюкоза — 10. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Жизнеспособность клеток определяли по их окрашиванию трипановым синим, при этом 95—98 % клеток не накапливали краситель. Специфика лейкоцитарной

крови кролика — низкое содержание моноцитов — позволила обойтись без их отделения; лимфоциты в смеси мононуклеаров составляли не менее 95 %.

Измерение $[Ca]_i$ и трансмембранного потенциала производили с помощью флюоресцентных зондов Quin-2 и RH-160 соответственно. Эфир зонда Quin-2/AM добавляли к суспензии лимфоцитов в концентрации 30 мкмоль/л. После инкубации при температуре 37°C в течение 45 мин производили пятикратное разбавление нормальным раствором и продолжали инкубацию еще в течение 45 мин, после чего производили отмывку. Инкубацию с RH-160 (25 мкмоль/л) проводили при температуре 37°C в течение 15 мин, затем клетки отмывали.

Нагруженные соответствующим флюоресцентным зондом лимфоциты ресуспендировали и разбавляли нормальным раствором до концентрации 10^6 клеток/мл. Суспензию помещали в стеклянные кюветы вместимостью 1,5 мл и длиной оптической оси 1 см. Для проведения исследований использовали спектрофотометр «Spekol-10» (Карл Цейсс, ГДР). В кюветодержатель помещали две кюветы — с суспензией клеток и чистым раствором. Тестируемые вещества добавляли в обе кюветы в равном количестве, затем значение амплитуды сигнала для второй кюветы вычитали из такого для первой кюветы.

Результаты

На рис. 1 показаны спектры возбуждения флюоресценции Quin-2. Видно, что при повышении $[Ca]$ в зависимости от длины волны могут происходить как увеличение, так и уменьшение флюоресценции. Поскольку используемый спектрофлюориметр имел непрозрачную для

Рис. 1. Спектры возбуждения флюоресценции Quin-2 в нормальном (1) и бескальциевом (2) растворах:

По оси абсцисс — длина волны возбуждения флюоресценции (длина волны эмиссии — 495 нм), по оси ординат — интенсивность флюоресценции, произвольные единицы.

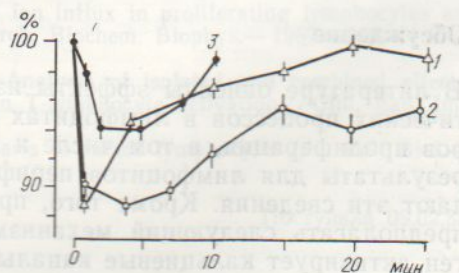
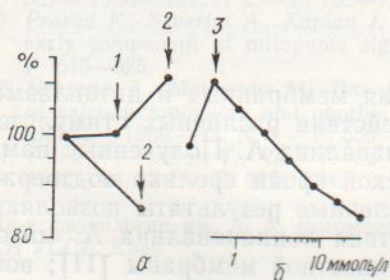
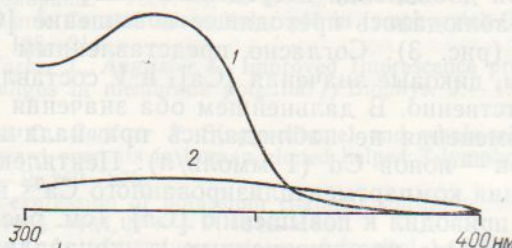


Рис. 2. Измерение $[Ca]_i$ и трансмембранного потенциала для лимфоцитов в состоянии покоя:

а — изменения флюоресценции Quin-2 в нормальном и бескальциевом растворах после пермеабилзации клеток тритоном X-100, стрелка (1 — введение в среду 10 ммоль/л ЭГТА, 2 — 0,5 % тритона X-100); б — изменения флюоресценции RH-160 после добавления в среду 1 мкмоль/л валиномицина (стрелка 3) и последующего повышения концентрации ионов K в среде. По оси ординат — флюоресценция, % начального уровня.

Рис. 3. Временной ход изменений трансмембранного потенциала (1), уровня $[Ca]_i$ после введения в среду конканавалина А (2) или пентилентетразола (3).

По оси ординат — флюоресценция соответствующего зонда, % исходного значения.

ультрафиолетового света стеклянную оптику, мы регистрировали флюоресценцию Quin-2 при длине волны возбуждения 365 нм, соответствующей одной из наиболее интенсивных линий в спектре излучения ртутной лампы ДРШ-250-2 [9], которой был укомплектован осветитель. Для выделения полезного сигнала флюоресценции использовали отсекающий фильтр с половинным пропусканием при 460 нм.

На рис. 2, а показаны изменения флюоресценции Quin-2 в лимфоцитах при действии детергента тритон X-100 (0,5 %) в нормальном и в бескальциевом растворах. Для таких пермеабилizированных детергентом клеток флюоресценция зонда, насыщенного Ca^{2+} , составляет $F_{\text{мин}}$, а флюоресценция свободной формы зонда — $F_{\text{макс}}$. Используя эти значения, можно связать флюоресценцию Quin-2 и $[\text{Ca}]_i$ следующим соотношением: $F = (F_{\text{мин}} [\text{Ca}]_i + F_{\text{макс}} \cdot K_{\text{Ca}}) / ([\text{Ca}]_i + K_{\text{Ca}})$, где K_{Ca} (0,12 мкмоль/л) — константа диссоциации Quin-2 с Ca^{2+} . Из этого соотношения и результатов определения F , $F_{\text{мин}}$, $F_{\text{макс}}$, представленных на рис. 2, а, получаем, что для лимфоцитов в состоянии покоя $[\text{Ca}]_i = 0,15$ мкмоль/л. Изменения флюоресценции зонда RH-160 при длине волны возбуждения 500 нм [10] были противоположны изменениям потенциала мембраны. На рис. 2, б показано, что при введении в раствор 1 мкмоль/л ионофора валиномицина, который превращает поверхность мембраны в равновесный калиевый электрод, происходит увеличение флюоресценции RH-160. Для определения потенциала мембраны по закону Нернста — $V = RT/F \cdot \lg ([\text{K}]_o / [\text{K}]_i)$ мы предположили, что внутриклеточная концентрация K^+ составляет 120 ммоль/л. В описанном эксперименте $[\text{K}]_o = 0,5$ ммоль/л, поэтому $V = -150$ мВ. При дальнейшем повышении $[\text{K}]_o$ флюоресценция закономерно снижалась. В полулогарифмических координатах измеренные значения хорошо описываются линейной зависимостью, что, очевидно, отражает закон Нернста. Этот калибровочный график дает для потенциала покоя лимфоцитов значение около -90 мВ.

При добавлении к суспензии лимфоцитов 10 мкг/мл конканавалина А наблюдалось преходящее повышение $[\text{Ca}]_i$ и мембранного потенциала (рис. 3). Согласно представленным на рис. 2 калибровочным кривым, пиковые значения $[\text{Ca}]_i$ и V составляли 1 мкмоль/л и -50 мВ соответственно. В дальнейшем оба значения возвращались к исходным. Эти изменения не наблюдались при наличии блокаторов кальциевых каналов — ионов Cd (1 ммоль/л). Пентилентетразол — индуктор освобождения компартментализированного Ca^{2+} из внутриклеточных депо — также приводил к повышению $[\text{Ca}]_i$ (см. рис. 3). Однако эти изменения были меньше индуцированных конканавалином А, и соответствующее пиковое значение $[\text{Ca}]_i$ составляло около 0,3 мкмоль/л.

Обсуждение

В литературе описаны эффекты изменения мембранных и цитоплазматических процессов в лимфоцитах при действии различных стимуляторов пролиферации, в том числе и конканавалина А. Полученные нами результаты для лимфоцитов периферической крови кролика подтверждают эти сведения. Кроме того, представленные результаты позволяют предполагать следующий механизм действия конканавалина А: митоген активирует кальциевые каналы поверхностной мембраны [11]; возникающий при этом входящий кальциевый ток деполяризует ее, что способствует дальнейшему поступлению Ca^{2+} в цитоплазму из внешней среды. Этот способ повышения $[\text{Ca}]_i$ не является единственным. Свой вклад в наблюдаемый эффект должен вносить механизм освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо. По-видимому, это происходит по механизму Ca^{2+} -индуцированного освобождения Ca^{2+} [12], поскольку при исключении возможности поступления Ca^{2+} из внешней среды при добавлении блокаторов кальциевой проводимости — ионов Cd эффекты изменения $[\text{Ca}]_i$ при действии конканавалина А не наблюдались. Оценить вклад внутриклеточных депо в полное увеличение $[\text{Ca}]_i$, индуцированное митогеном, можно, используя данные о действии пентилентетразола на $[\text{Ca}]_i$ в лимфоцитах (см. рис. 3). Исходя из этого, можно заключить, что внутриклеточные депо дают не более 30 % в общий эффект повышения $[\text{Ca}]_i$ при действии конканавалина А.

В заключение следует отметить, что в нашей работе показана также принципиальная возможность использования общедоступной аппа-