

УДК 577.15.612.438.014

С. Гребіник, асп.

КАЛЬЦІЄВИЙ СИГНАЛ У ТИМОЦИТАХ ТА МТ-4 КЛІТИНАХ ЗА ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ЧИННИКІВ

Проведено порівняльне дослідження впливу позаклітинного АТФ (АТРо) та фулеренів C₆₀ на концентрацію цитозольного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) у нормальних (ізолювані тимоцити щури) та трансформованих (лінія МТ-4 лімфобластного лейкозу) Т-клітинах.

The comparative study of extracellular ATP (ATP_o) and fullerenes C₆₀ effect on the free cytosolic calcium concentration ([Ca²⁺]_i) in normal (isolated rat thymocytes) and transformed (lymphoblastic leukemia MT-4 line) T-cells was carried out.

Вступ. Визначальним фактором, від якого залежить виникнення внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу, є підвищення концентрації катіону у цитозолі ([Ca²⁺]_i). Завдяки існуванню систем регуляції входу Ca²⁺ через плазматичну мембрану та механізмів буферування катіона у внутрішньоклітинних депо клітини здатні генерувати Ca²⁺-сигнали певної величини, амплітуди та локалізації. Через зміни [Ca²⁺]_i та їх поєднання з іншими сигнальними каскадами забезпечується контролювання низки клітинних процесів, до яких належать не лише проліферація та апоптоз, але й трансформація та онкогенез. Так, припускають, що деяким трансформованим клітинам та пухлинним клітинним лініям притаманні зниження залежності проліферації від Ca²⁺ та ремоделювання Ca²⁺-сигналів, спрямоване на формування резистентності до апоптозу через уникнення його Ca²⁺-залежних шляхів [7]. У зв'язку з цим актуальними є дослідження особливостей кальцієвого гомеостазу за дії сполук, які можуть специфічно впливати на формування кальцієвого сигналу у нормальних і трансформованих клітинах. Позаклітинний АТФ як агоніст P2 пуринергічних рецепторів плазматичної мембрани може ініціювати виникнення кальцієвого сигналу за двома механізмами – через активацію P2X рецепторів-каналів плазматичної мембрани, або ж через активацію спряжених з G-білками P2Y рецепторів та мобілізацію Ca²⁺ з ендоплазматичного ретикулула під дією утворюваного фосфоліпазою C інозитолтрифосфату [10]. Представник вуглецевих наноструктур фулерен завдяки нанорозмірам та гідрофобності може вбудовуватись у ліпідний бішар мембран та впливати на проведення регуляторних сигналів [11]. Метою роботи було оцінити рівень вільного цитозольного Ca²⁺ у нормальних та трансформованих Т-лімфоцитах за дії вказаних екзогенних чинників.

Матеріали і методи. Тимоцити було ізолювано з тимусу щурів лінії Вістар обох статей вагою 120 – 150 г. Тимус вилучали, перетирали через чотири шари нейлонової сітки у буфер А такого складу (мМ): KCl – 5, NaCl – 120, CaCl₂ – 1, глюкоза – 10, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 4, HEPES – 10, рН 7,4. Отриману суспензію центрифугували (600g, 10 хв), а осад клітин ресуспендували до концентрації 2-5 × 10⁶ кл/мл. Т-клітини лінії МТ-4 лімфобластного лейкозу людини отримували з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького. Концентрацію вільного цитозольного Ca²⁺ вимірювали за допомогою зонда фура-2АМ (Sigma США). Клітини (3 × 10⁷ / мл) у буфері А навантажували фура-2АМ протягом 40 хв при 25⁰С, відмивали від надлишку зонду двократним центрифугуванням (600g, 10 хв) та ресуспендували у кальцієвмісному (за присутності 1 мМ CaCl₂) або у безкальцієвому середовищі (позбавлений CaCl₂ буфер А, що містив 0,1мМ ЕГТА) в залежності від умов експерименту. Інкубацію навантажених зондом клітин (2,5 × 10⁶ клітин / мл) проводили при 25⁰ С.

Спектр флуоресценції фура-2 реєстрували на спектрофотометрі Shimadzu RF-510 (Японія), λ_{збудж.} = 330 та 375 нм, λ_{випр.} = 505 нм. Концентрацію Ca²⁺ у цитозолі клітин ([Ca²⁺]_i) розраховували як описано у [5]. У роботі використано стабільні водні колоїдні розчини фулеренів C₆₀ (ступінь очищення – 95%, концентрація – 2×10⁻⁴М), отримані у Технічному університеті Ільменау (Німеччина). Колоїдні розчини містили окремі гідратовані молекули C₆₀ та кластери C₆₀ розміром 12-50нм. Обробку даних та побудову графіків проводили на IBM PC з використанням спеціалізованих прикладних програм Excel та Origin.

Результати та обговорення. Зважаючи на існування двох основних шляхів підвищення концентрації цитозольного Ca²⁺ як початкового етапу активації Са-залежних регуляторних шляхів у клітині – посилення входу катіона через плазматичну мембрану або його вивільнення з внутрішньоклітинних депо, експерименти з навантаженими індо-1 Т-клітинами проводили за різних умов внесення досліджуваних чинників – у середовище, що містило 1мМ CaCl₂, тобто за наявності спрямованого у клітину кальцієвого градієнта (для оцінки входу Ca²⁺ через плазматичну мембрану), або у позбавлене іонів Са середовище (для оцінки виходу Ca²⁺ з ендоплазматичного ретикулула). Величина [Ca²⁺]_i у тимоцитах і у МТ-4 клітинах не відрізнялась і складала 117± 6 нМ відповідно. Внесення АТФ у Ca²⁺-вмісне середовище інкубації призводило до швидкого підвищення [Ca²⁺]_i, як у тимоцитах, так і у МТ-4 клітинах, що вказує на підвищення кальцієвої проникності плазматичної мембрани внаслідок активації позаклітинним АТФ пуринергічних P2X-рецепторів [9]. Спричинене дією АТФ підвищення [Ca²⁺]_i у тимоцитах складало 140% порівняно з контрольним рівнем (Рис. 1). Припускають, що внаслідок активації P2X-рецепторів у цитозолі тимусних попередників Т-лімфоцитів забезпечується підвищення концентрації Ca²⁺, необхідне для їх проліферації [2]. Звертає на себе увагу той факт, що підвищення [Ca²⁺]_i у МТ-4 клітинах за дії позаклітинного АТФ було значно більшим (305% порівняно з контрольним рівнем), ніж у тимоцитах (Рис.1). Відомо, що діючи через P2X-рецептори та спричиняючи значне підвищення [Ca²⁺]_i позаклітинний АТФ може відігравати роль індуктора клітинної загибелі [3, 9]. Проте, як показано нами раніше, клітини МТ-4 виявляють набагато вищий порівняно з тимоцитами рівень екто-АТФазної активності, завдяки чому попереджається цитотоксична дія нуклеотида на трансформовані Т-клітини [1]. Внесення фулерену C₆₀ у Ca²⁺-вмісне середовище інкубації призводило до незначного підвищення [Ca²⁺]_i, як у тимоцитах, так і у МТ-4 клітинах (Рис. 1). Відомо, що завдяки гідрофобним взаємодіям між хвостами жирних кислот у складі мембранних ліпідів та молекулами C₆₀ останні легко дифундують у ліпідний бішар, час дифузії складає декілька мілісекунд [12].

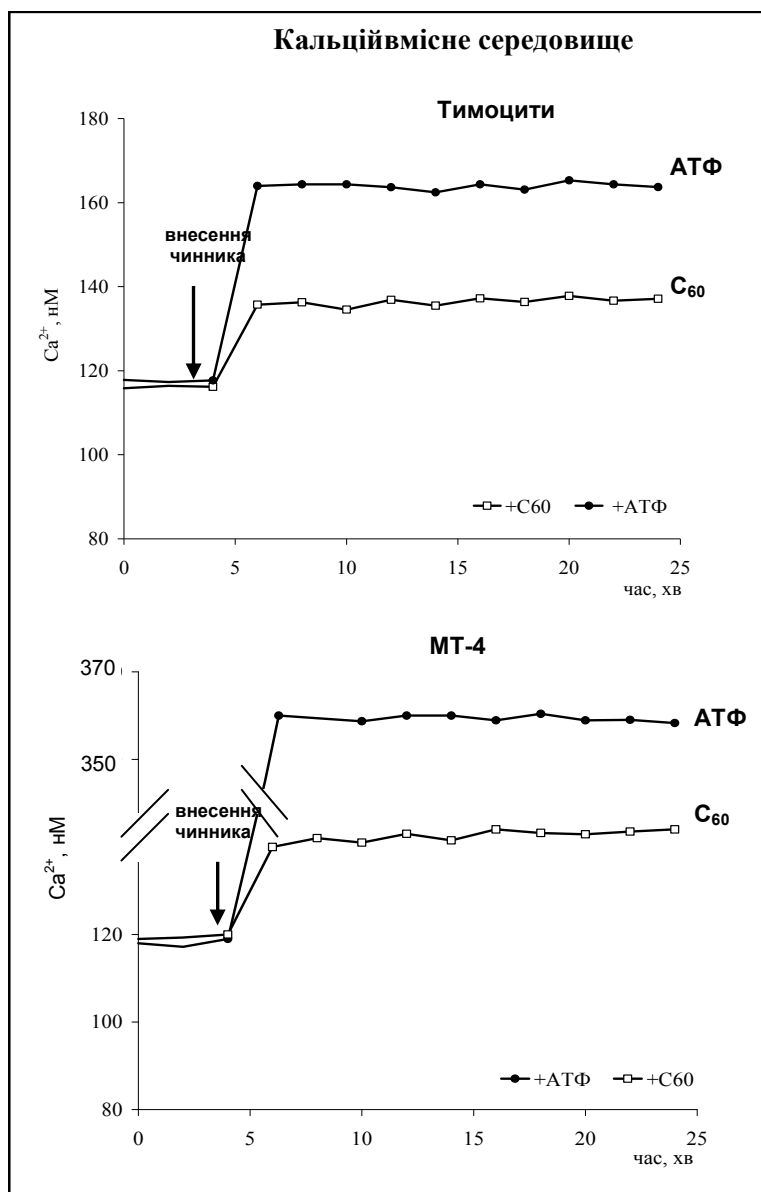


Рис. 1. Концентрація вільного цитозольного Ca²⁺ у тимоцитах та MT – 4 клітинах після внесення 1мМ АТФ чи фулеренів C₆₀ (10⁻⁵ М) в Ca²⁺-вмісне середовищу інкубації

Навіть за підвищення концентрації C₆₀ та формування кластерів відбувається їх спонтанна дезагрегація всередині ліпідного бішару без механічного ушкодження мембрани, хоча можливими є локальні конформаційні зміни та формування мікропор [15], що і може бути причиною деякого посилення входу катіону через плазматичну мембрану Т-клітин. Ці дані узгоджуються з наведеними у роботі [8], де з використанням водних нанокристалічних суспензій C₆₀ продемонстровано залежне від концентрації C₆₀ посилення входу катіону з позаклітинного середовища у ендотеліальні клітини людини HUVEC. Внесення C₆₀ до кінцевої концентрації 6 мкг/мл у Ca²⁺-вмісне середовище спричиняло швидке підвищення [Ca²⁺]_i до рівня 160 нМ.

На Рис. 2 представлено результати оцінки концентрації цитозольного Ca²⁺ у Т-клітинах за умови внесення досліджуваних чинників у безкальцієве середовище інкубації. Згідно отриманих даних, за такої умови АТФ не змінює величину [Ca²⁺]_i у тимоцитах або у клітинах MT-4.

Отже, індуковане нуклеотидом посилення входу катіону у клітини (Рис. 2) слід пов'язувати з активацією

P2X рецепторів, які контролюють провідність катіонних каналів плазматичної мембрани і експерсію яких доведено у тимоцитах, Т-лімфоцитах крові та лейкоцитних Т-лімфоцитах [4, 13].

Нами виявлено відмінності у відповіді нормальних і трансформованих клітин на дію фулерену C₆₀, внесеного у безкальцієве середовище. Концентрація цитозольного Ca²⁺ у тимоцитах після внесення C₆₀ складала 98 ± 2 нМ і у подальший період не змінювалась, тоді як у клітинах MT-4 спостерігалось тривале підвищення показника, який на 20-й хвилині досягав рівня 128 ± 4 нМ (Рис. 2). Отже, у клітинах MT-4 фулерен C₆₀ спричиняє вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо.

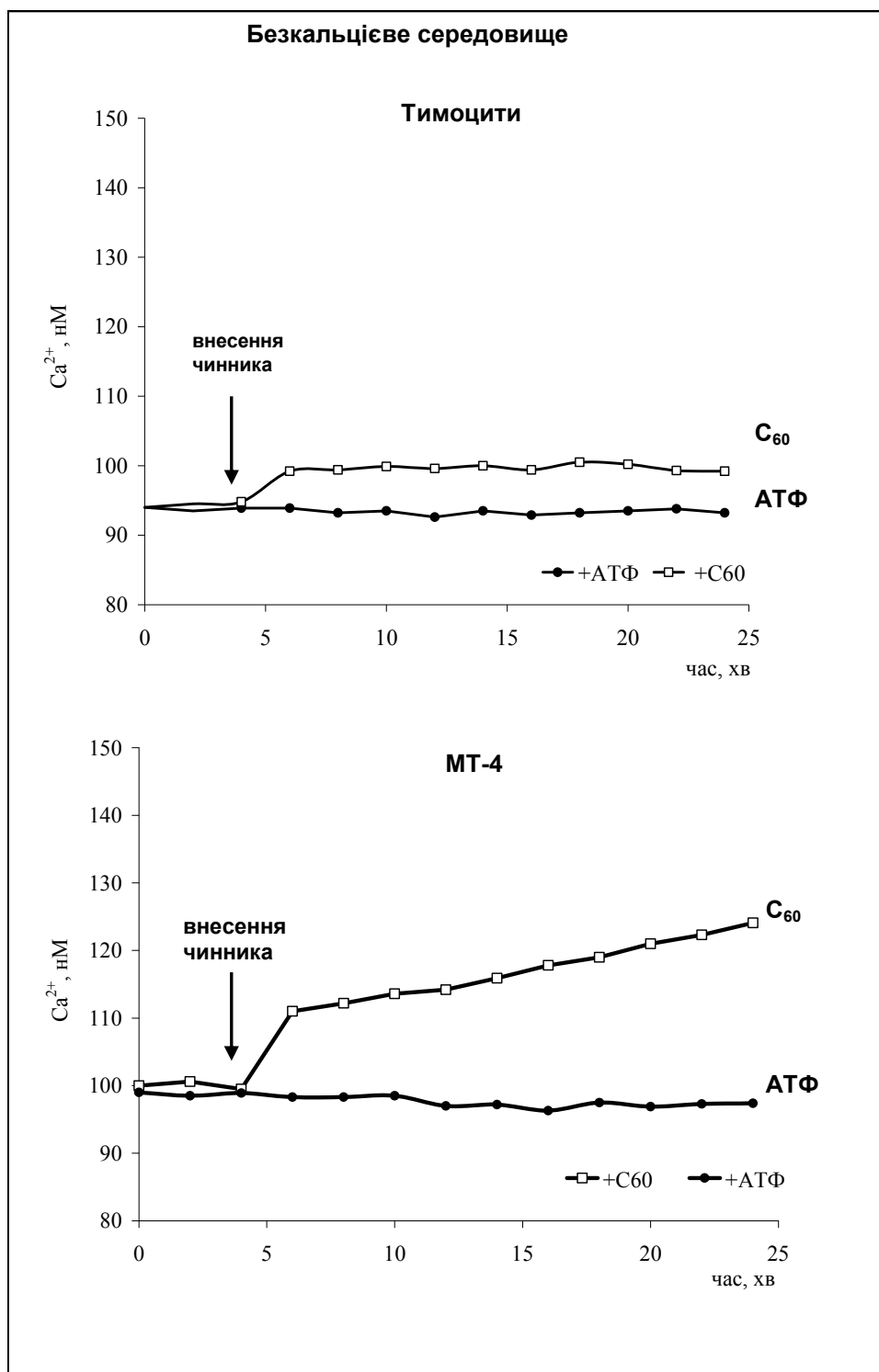


Рис. 2. Концентрація вільного цитозольного Ca^{2+} у тимоцитах та MT-4 клітинах після внесення 1мМ АТФ чи фулеренів C_{60} (10^{-5} М) у безкальцієве середовище інкубації

Існує низка даних щодо проникнення фулеренів C_{60} через плазматичну мембрану та їх виявлення у цитоплазмі клітин різних типів, зокрема, макрофагів та пухлинних клітин, проте надходження фулеренів C_{60} у внутрішньоклітинний простір потребує певного часу – від 4-х до 6 год [14]. У зв'язку з цим виявлене нами вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо за дії C_{60} на клітини MT-4 не можна пояснити безпосереднім впливом фулерену на мембрану ЕПР. Можна припустити, що фулерен C_{60} впливає на стан локалізованих у плазматичній мембрані

клітин MT-4 регуляторних систем, що контролюють ступінь наповнення кальцієвого депо ЕПР.

Виявлена здатність фулерену C_{60} впливати на систему внутрішньоклітинного буферування іонів Ca у онкотрансформованих клітинах є важливою з огляду на те, що однією з причин резистентності таких клітин до апоптозу є знижений вихід Ca^{2+} з ЕПР, недостатній для того, щоб ініціювати накопичення катіону у мітохондріях, які відіграють ключову роль у активації апоптозу [6, 7].

1. Гребнік С.М., Артеменко О.Ю., Перепелиця О.М., Матишевська О.П. Зміна концентрації цитозольного Ca^{2+} за дії позаклітинного АТФ та екто-АТФ-азна активність у тимоцитах і трансформованих клітинах MT-4 // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81. – № 2. – С. 27 – 33. 2. Adriouch S., Dox C., Welge V., et.al. Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function. of the Mouse P2X7 Receptor // J. Immunol. – 2002. – 169, №8 – P. 4108–4112. 3. Courageo M., Lepin S., Hours M. Involvement of sodium in early phosphatidylserine exposure and phospholipid scrambling induced by P2X7 purinoceptor activation in thymocytes // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, №21. – P.21815–21823. 4. Glass R., Townsed-Nicholson A., Burnstock G. P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridisation study // Cell Tissue Res. – 2000. – 300, №2 – P.295–306. 5. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260. – P. 3440 – 3450. 6. Flourakis M., Prevarskaya N. Insights into. Ca^{2+} homeostasis of advanced prostate cancer cells // Biochimica et Biophysica Acta. – 2008. – P.295–306. 7. Llewellyn Roderick H., Simon J. Cook. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival // Nature reviews. Cancer – 2008. – Vol. 8. – P. 361–375. 8. Monique P., Simakova O., Jeffrey D.,

et.al. Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: Fullerenol C60 (OH)₂₄ induced tissue factor and ICAM-1 membrane expression and apoptosis in vitro // International Journal of Nanomedicine. – 2008. – Vol. 3. – P. 59–68. 9. North R. Molecular physiology of P2X receptors // Physiol. Rev. – 2002. – 82, №4 – P.1013–1067. 10. Pizzo P., Zanovello P., Bronte V., Di Virgilio. Extracellular ATP causes lysis of mouse thymocytes and activates a plasma membrane ion channel // J. Biochem. – 1991. – 274. – P. 139–144. 11. Qiao R., Aaron P., Andrew S. et.al. Translocation of C60 and Derivatives across lipid Bilayer // Nano letters. – 2007. – Vol. 7, №3. – P.614–619. 12. Sayes, C. M., Forthner, J.D., Guo W., Lyon D., Boyd A. M., Ausman, K. D., Tao Y. J., Sitharaman, B. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes // nano letters – 2004. – Vol. 4, № 2 – P.1881–1887. 13. Sluyter R., Barden J., Wiley J. Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes // Cell Tissue Res. – 2001. – 304. – P.231–236. 14. Wong-Ekkabut J., Baoukina S., Triampo W., et.al. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes // Nat Nano. – 2008. – Vol. 3, №. 6. – P. 363–368. 15. Tabata Y., Ikada Y. Biological functions of fullerene // Pure Appl. Chem. – 1999. – Vol.71. – P. 2047–2053.

Надійшла до редколегії 06.10.11

УДК [591.524.12:574.5] (285.33) (477)

В. Трохимець, канд. біол. наук, І. Марченко, студ.,
Ж. Богун, студ., З. Бур'ян, студ.

СЕЗОННА ДИНАМІКА ЛІТОРАЛЬНОГО ЗООПЛАНКТОНУ НИЖНЬОЇ ЧАСТИНИ КАНІВСЬКОГО ВОДОСХОВИЩА (РАЙОН С. БОБРИЦІ)

Представлено результати досліджень сезонної динаміки видового складу, щільності та біомаси літорального зоопланктону нижньої частини Канівського водосховища протягом 2006 року. Проведено аналіз цієї групи гідробіонтів у межах дослідної станції.

The results of investigation of seasonal dynamics of species composition, density and biological weight of littoral zooplankton from under part of the Kaniv reservoir in 2006 are presented. We studied this group of water organisms from the experimental station.

Вступ. Моніторинг зоопланктону дніпровських водосховищ є актуальним питанням сучасних гідробіологічних досліджень. Необхідність його проведення обумовлена тим, що вони належать до найкрупніших штучно створених людиною водойм України, у межах яких суцесійні процеси ще не завершені. З іншого боку, зоопланктон – це індикаторна група гідробіонтів, яку часто використовують для проведення біоіндикації стану водойм. Важливе значення має зоопланктон і як частина раціону риб, а також як основа кормової бази молоді риб. Канівське водосховище – друге в каскаді дніпровських водосховищ, що належить за площею плеса до великих [3]. На сьогоднішній день моніторингові спостереження зоопланктону в межах його акваторії протягом кількох останніх десятиків років мали локальний та епізодичний характер [2, 9]. Тому постає потреба проведення моніторингу еколого-фауністичних особливостей зоопланктону Канівського водосховища, що зумовило актуальність представлених досліджень.

Об'єкти та методи досліджень. Об'єктами досліджень були представники основних груп зоопланктону: коловертки (клас Rotatoria), гіллястовусі ракоподібні (ряд Cladocera), веслоногі ракоподібні (клас Copepoda), черепашкові ракоподібні (клас Ostracoda) і личинки двостулкових молюсків (клас Bivalvia). Визначення перших трьох груп зоопланктону проведено до рівня виду, а бделоїдних коловерт і черепашкових ракоподібних – до таксонів надвидового рівня. Матеріалом слугував зоопланктон, зібраний удень протягом 2006 року в межах станції поблизу села Бобриці (N 49°47.523' E 31°24.878'). Збирали матеріал конічною планктонною сіткою [1, 4], а його аналіз проводили за використання загальноприйнятих методик [1, 4–8, 10]. Зоопланктон збирали по сезонах (весна – 30 квітня, літо – 13 липня, осінь – 30 вересня) за подібних погодних умов: відсутність дощу та дуже сильного вітру. У межах дослідної станції в різні сезони за наявності обстежували 2 біотопи: зарослий – присутня вища водна рослинність і водорості (влітку до 70% проективного покриття з переважанням рдесника пронизанолістого, нитчастих водо-

ростей та елодеї канадської), незарослий – ділянки без вищої водної рослинності.

Результати та їх обговорення. Під час денних досліджень було відмічено 48 видів зоопланктону (табл. 1). За фауністичним спектром угруповання переважали представники ротаторного комплексу (24 види): *Asplanchna priodonta* Gosse, 1850; *A.sieboldi* (Leydis, 1850); *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766; *Br.quadridentatus* Hermann, 1783; *Conochilus unicornis* Rousselet, 1892; *Epiphanes senta* (O.F.Müller, 1773); *Euchlanis deflexa* (Gosse, 1851); *E.dilatata* Ehrenberg, 1832; *E.pyriformis* Gosse, 1851; *E.triquetra* Ehrenberg, 1838; *Keratella cochlearis* Gosse, 1851; *K.quadrata* (O.F.Müller, 1786); *Lacinularia flosculosa* (O.F.Müller, 1758); *Lecane bulla* (Gosse, 1851); *L.closterocerca* (Schmarda, 1859); *L.hamata* (Stokes, 1896); *L.lunaris* (Ehrenberg, 1832); *L.quadridentata* (Ehrenberg, 1832); *Lepadella patella* (O.F.Müller, 1773); *Polyarthra dolichoptera* Idelson 1925; *Scardium longicaudatum* (O.F.Müller, 1786); *Synchaeta pectinata* Ehrenberg, 1832; *Trichocerca capucina* (Wierzeiski and Zacharias, 1893); *Tr.rattus* (O. F. Müller, 1776). Гіллястовусі ракоподібні були представлені 14 видами: *Acroperus harpae* (Baird, 1835); *Alona rectangula* Sars, 1862; *Alonella nana* (Baird, 1843); *Biapertura affinis* (Leydig, 1860); *Bosmina longirostris* (O.F.Müller, 1776); *Chydorus latus* Sars, 1862; *Ch.sphaericus* (O.F.Müller, 1785); *Daphnia cucullata* Sars, 1862; *Graptoleberis testudinaria* (Fischer, 1848); *Ilyocryptus agilis* Kurz, 1878; *Monospilus dispar* Sars, 1862; *Pleuroxus aduncus* (Jurine, 1820); *P.trigonellus* (O.F.Müller, 1776); *Rhynchotalona rostrata* (Koch, 1841). Веслоногі ракоподібні були представлені 10 видами: *Acanthocyclops viridis* (Jurine, 1820); *Cyclops strenuus* Fischer, 1851; *Eucyclops macrurus* (Sars, 1863); *E.serrulatus* (Fischer, 1851); *Macrocyclus albidus* (Jurine, 1820); *Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857); *Microcyclus varicans* (Sars, 1863); *Thermocyclops crassus* (Fischer, 1853); *Eurytemora velox* (Lilljeborg, 1853); *Heterocope caspia* Sars, 1897.