

УДК 615.276.4:616-092:612.017.1]015.44.076.9

**Весніна Л.Е.**

## **РОЛЬ КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ В РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ПОВЕРХНЕВИХ МЕМБРАННИХ РЕЦЕПТОРІВ ЛІМФОЦИТІВ**

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики, Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

*Проведено визначення ролі кальційзалежних механізмів в регуляції експресії поверхневих мембранних імуноглобулінів А,М,Г та антигенних детермінант лімфоцитів CD3, CD4, CD8, CD23, CD72, HLA-DR та їх перегруповань у площині мембрани за допомогою реакції прямої та непрямой імунофлюоресценції. Показано, що незалежно від механізму пригнічення надходження кальцію у клітину - блокування мембранних каналів за допомогою верапамілу та фенігідіну, зв'язування поза- та внутрішньоклітинного кальцію ЕДТА та ВАРТА відповідно, відбуваються односпрямовані зміни, які характеризуються зниженням експресії та рухливості у площині мембрани поверхневих імуноглобулінових рецепторів та антигенних детермінант лімфоцитів. Зроблено висновок, що збереження фізіологічної концентрації кальцію у позаклітинному просторі та нормальне функціонування транспортних систем для іонів є суттєвими для більш віддалених за часом етапів формування груповань рецепторів у вигляді переважно петчів та кепів, а підтримання внутрішньоклітинної концентрації кальцію - для формування початкових угруповань - мембранних кластерів. Результати роботи свідчать, що на початкових етапах активації імунокомпетентних клітин підтримка кальцієвого гомеостазу забезпечує повноцінну експресію поверхневих мембранних рецепторів та адекватне перегруповання у площині мембрани і тим самим підтримує високий рівень функціональної активності лімфоцитів.*

Ключові слова: кальційзалежні механізми, лімфоцити, рецептори, експресія.

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи НДІ ГОРПФ "Вивчення локалізації та механізмів секреції регуляторних пептидних комплексів нирок за фізіологічних умов та під час типових патологічних процесів", № держреєстрації 0109U002187.

### **Вступ**

Кальцієві механізми відіграють важливу роль у підтриманні сталості внутрішнього середовища багатоклітинного організму на рівні нервової, ендокринної та імунної систем. Так, кальцієвою сигнальною системою на ранніх етапах забезпечуються активація, проліферація і виконання ефекторної функції імунокомпетентними клітинами, зокрема, опосередкування відповіді на стимуляцію TCR-CD3 рецепторного комплексу [13].

Роль кальцію як регулятора фізіологічних процесів, що відбуваються у клітині, добре відома. Нормальний рівень кальцію в цитозолі підтримується механізмами його активного транспорту через біомембрани та системою його компартменталізації у клітинних органелах. Зазвичай надходження кальцію у клітину за градієнтом концентрації врівноважується його активним виведенням, яке реалізується за участю представників родини  $Ca^{2+}$ -АТФ-аз і  $Na^{+}/Ca^{2+}$  обміном у збудливих тканинах. Рівень кальцію також регулюється його секвенуванням у клітинних органелах - ядрі, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі, зв'язуванням внутрішньоклітинними білками.

Порушення внутрішньоклітинного гомеостазу цього іону, що супроводжується значним підвищенням його концентрації у цитоплазмі клітини, лежить в основі механізму клітинної загибелі під час цілої низки патологічних станів, таких як ішемія, аутоімунні процеси та ін. [11].

Відомо, що за деяких фізіологічних умов може збільшуватись проникність плазматичних мембран зі зміною концентрації внутрішньоклітинного кальцію як сигнального механізму, що

значним чином сприятиме зміні функціональної активності клітин. Тому метою нашої роботи стало визначення ролі кальційзалежних механізмів в регуляції експресії поверхневих мембранних рецепторів лімфоцитів та їх перегруповань у площині мембрани.

### **Матеріали та методи**

Експериментальні дослідження проведено на 74 зразках периферійної крові здорових донорів віком 21-40 років. Перед початком дослідження отримано дозвіл комісії з етичних питань та біоетики Української медичної стоматологічної академії.

Суспензію лімфоцитів отримували за стандартним методом центрифугуванням у градієнті густини фікол-триомбразт ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ) із наступним відмиванням у фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4 [5]. Кількість клітин у суспензії становила в середньому  $1-1,5 \times 10^6/\text{мл}$  [4].

Для модуляції внутрішньоклітинного рівня  $Ca^{2+}$  використовували прямий антагоніст - верапаміл, якій взаємодіє з повільними  $Ca^{2+}$ -каналами клітинної мембрани і ділянками зв'язування  $Ca^{2+}$  на мембрані [2] та фенігідін - змішаний антагоніст кальцію, взаємодіє з повільними каналами плазматичної мембрани, впливає на процеси накопичення і звільнення  $Ca^{2+}$  всередині клітини (посилення депонування в мікосомлах, взаємодія з кальмодуліном) [1]. Інкубацію лімфоцитів із препаратом ізоптину гідрохлорид (верапаміл) (Knoll, Germany) проводили в концентраціях 0,025; 0,05; 0,01 мг/мл; з фенігідіном (Україна) в концентраціях 0,002; 0,004; 0,024 мг/мл [12] протягом 60 хвилин при 37° С.

Позаклітинний кальцій блокували за допомо-

гою хелатора - динатрієвої солі етилендіамінотетраоцтової кислоти – ЕДТА, що створює комплексні сполуки з іонами кальцію та магнію в позаклітинному середовищі. ЕДТА (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg/New York) використовували в концентрації  $2,5 \times 10^{-3}$  М та інкубували 60 хвилин при 37° С.

Внутрішньоклітинний кальцій зв'язували хелатором внутрішньоклітинного кальцію 1,2-біс(О-амінофеноксі)-етан-*N,N,N,N*-тетраоцтової кислоти (ВАРТА), яка завдяки гідрофобним властивостям надходить до клітини. ВАРТА (ICN Biomedicals, USA) додавали до суспензії мононуклеарів в концентрації  $2 \times 10^{-2}$  М [18] та інкубували 60 хвилин при 37°С.

Проникнення іонів кальцію всередину клітини індукували шляхом додавання до суспензії клітин кальцієвого іонофору А23187 (Sigma, USA) в кінцевій концентрації  $1 \times 10^{-7}$  М [18] та інкубації 60 хвилин при 37°С. А23187 в гідрофобній фазі утворює комплекси з кальцієм та опосередковує електронейтральний трансмембранний перенос двовалентного катіону  $Ca^{2+}$  на інший двовалентний катіон або два протони.

Досліджувані препарати інкубували із суспензією лімфоцитів у середовищі 199 (Sigma, USA) з додаванням 10% інактивованої телячої сироватки (BioMark, Україна), 10 мМ НЕРЕС (Sigma, USA), 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ДНЦЛЗ, Україна). В якості контролю використовували фосфатно-сольовий буфер (ФСБ).

Зміну функціональної активності лімфоцитів реєстрували за рівнем та характером флюоресценції поверхневих рецепторів за допомогою прямого та непрямого імуофлюоресцентного аналізу.

У реакції прямої імуофлюоресценції використано антитіла проти мембранних імуноглобулінів А,М,С людини, кон'юговані з ФІТЦ (Sanofi, France). Неспецифічному зв'язуванню запобігали шляхом адсорбції препарату антитіл на ацетонованому порошці печінки щурів. Для непрямого імуофлюоресцентного аналізу були використані моноклональні антитіла до поверхневих маркерів лімфоцитів – LT3 (CD3), LT4 (CD4), LT8 (CD8), LT23 (CD23), 3F3 (CD72), LT-DR (HLA-DR)

(Сорбент, Росія). В якості вторинних антитіл було використано кон'юговані з ФІТЦ анти-F(ab)<sub>2</sub>-антитіла (Сорбент, Росія).

Реєстрацію флюоресценції проводили на мікроскопі "Люмам-Р8" (ЛОМО, Росія), підраховували відносну кількість клітин з флюоресценцією (у відсотках). Результати оцінювали за інтенсивністю флюоресценції: власну (фонову) флюоресценцію (дуже слабе світіння) вважали негативною реакцією, виражену флюоресценцію - позитивною реакцією та виділяли слабкий, середній та сильний ступінь флюоресценції [10]. Контроль власної флюоресценції лімфоцитів проводили після їх відмивання у ФСБ.

За характером флюоресценції виділяли дифузний тип, коли рецептори рівномірно розподілені у площині мембрани та перегруповання у вигляді кластерів (окремі невеликі групи рецепторів), петчів (плями, більш впорядкована форма кластерів) та кепів (перегрупування у вигляді капелюшка) [3].

Морфологічний контроль клітин проводили у фазовому контрасті. Життєздатність клітин визначали в тесті з трипановим синім, у середньому вона становила 95-97% [5].

#### Результати та їх обговорення

Як відомо, в процесах активації імунокомпетентних клітин провідне значення посідає саме інтенсивність кальцієвого обміну між клітиною та середовищем [19]. Лімфоцити мають широкий спектр іонних каналів, які беруть участь в регуляції їх функціональної активності [14]. Тому на першому етапі дослідження було визначено вплив блокування кальцієвих каналів на рівень експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів.

Верапаміл достовірно пригнічував експресію поверхневих імуноглобулінових рецепторів, найбільш значим чином у концентрації 0,01 мг/мл – у 3,3, у концентрації 0,05 мг/мл - у 3,8 рази (рис. 1).

Спостерігалась зміна характеру перегруповань рецепторів у площині мембрани, яка стосувалась переважно зменшення формування кепів та петчів (табл. 1).

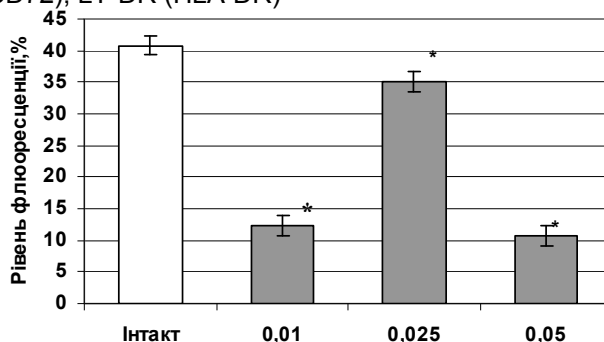


Рис. 1. Зміна експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів під дією верапамілу.

Тут, та на рисунку 2 по осі абсцис – концентрація препарату (мг/мл).

Тут, та в таблиці 1 - \* -  $p < 0,05$  - вірогідність

розбіжностей між інтактними лімфоцитами та лімфоцитами, інкубованими з верапамілом у різних концентраціях.

Таблиця 1

Зміна характеру перегрупувань поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів під дією верапамілу ( $M \pm \sigma$ )

Експресія антигенних детермінант Іg A, M, G (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=5)	Лімфоцити, інкубовані з верапамілом в дозі 0,01 мг/мл, (n=5)	Лімфоцити, інкубовані з верапамілом в дозі 0,025 мг/мл, (n=5)	Лімфоцити, інкубовані з верапамілом в дозі 0,05 мг/мл, (n=5)
0	59,20±4,15	87,80±3,96*	65,0±4,06*	89,40±3,05*
дифузне	3,0±2,0	3,80±4,09	4,80±4,15	0,80±0,84
кепи	12,20±4,82	3,20±1,64*	5,20±4,44	3,40±3,13*
петчі	18,80±5,50	3,0±2,35*	22,80±6,14	3,0±2,12*
кластери	6,80±4,66	2,20±1,10	2,20±2,17	3,40±0,55

Примітка: тут та в табл. 2,3,4 - 0 – клітини, у яких відсутня флюоресценція; дифузне – дифузне світіння мембрани.

Блокада кальцієвих каналів плазматичних мембран за допомогою змішаного антагоністу кальція фенігідину також показала пригнічення

рівня експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів у всіх використаних концентраціях (рис. 2).

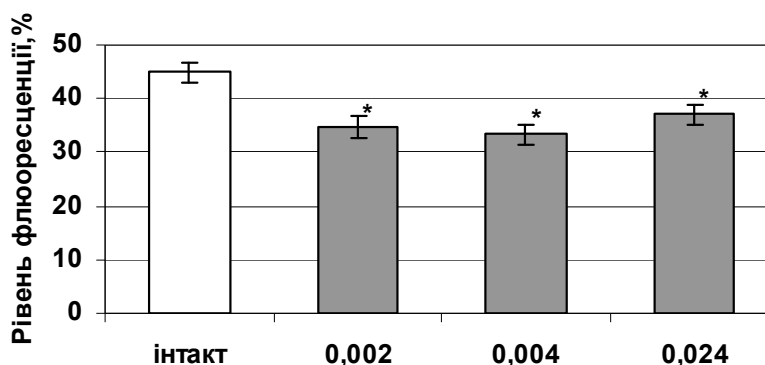


Рис. 2. Зміна експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів під дією фенігідину.

Слід відзначити, що зниження експресії мембранних імуноглобулінів під впливом фенігідину спостерігалось меншою мірою, ніж під впливом верапамілу, також менш вираженим було перегрупування рецепторів у площині мембрани.

Таким чином, пригнічення обміну іонів  $Ca^{2+}$  між клітиною та зовнішнім середовищем за рахунок блокади повільних каналів і ділянок зв'язування  $Ca^{2+}$  на мембрані фенігідіном, знижує рівень експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів та їхнє перегрупування у площині мембрани, тим самим знижуючи функціональну активність лімфоцитів.

У лімфоцитах після швидкого транзитного підйому вмісту  $[Ca^{2+}]_i$  внаслідок звільнення із внутрішньоклітинних джерел розпочинається тривале (більше 30 хвилин) підвищення за рахунок надходження  $Ca^{2+}$  ззовні [16], тому наступ-

ним етапом стали дослідження за умов зв'язування зовнішньо- та внутрішньоклітинного кальцію.

Використання хелатора зовнішньоклітинного кальція ЕДТА призвело до зниження рівня експресії імуноглобулінових рецепторів на 21,55% максимально в дозі  $2,5 \times 10^{-3}$  M (рис. 3), зниження інтенсивності флюоресценції та зменшення утворення кепів і петчів різних ступенів флюоресценції.

Також змінювалась експресія антигенних детермінант лимфоцитів: на 19,4% знижувалась експресія CD3, на 26,72% - CD4 та значно знижувалась (у 3,1 рази) експресія молекул CD23, що супроводжувалось незначним перегрупуванням рецепторів (рис. 3).

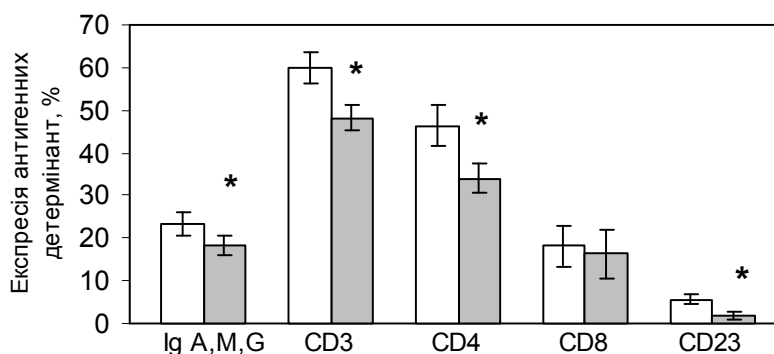


Рис. 3. Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією ЕДТА. Білі стовпчики - інтактна група; сірі стовпчики – використання ЕДТА в дозі  $2,5 \times 10^{-3}$  M; -  $p < 0,05$  – вірогідність розбіжностей між інтактними лімфоцитами та лімфоцитами, які інкубували з ЕДТА.

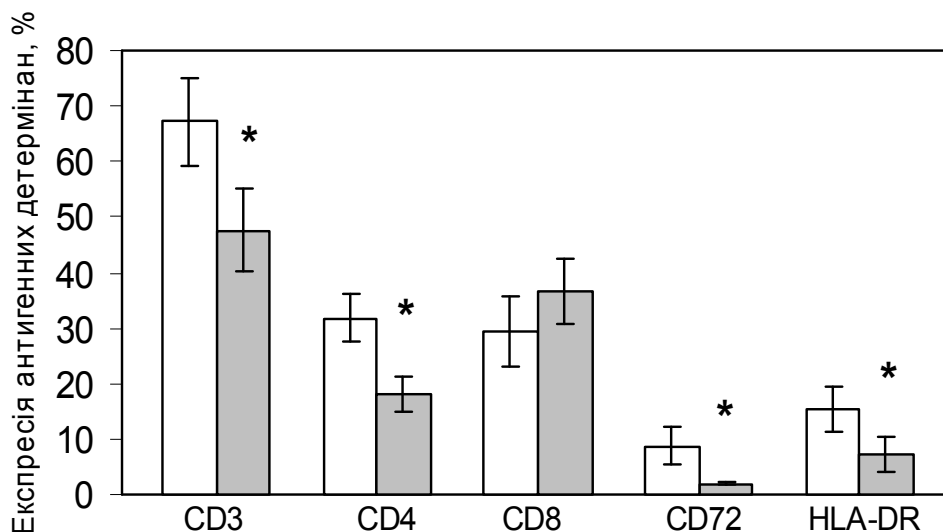


Рис. 4. Зміна експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією ВАРТА. Білі стовпчики - інтактна група; сірі стовпчики – використання ВАРТА в дозі  $2 \times 10^2$  М; \* -  $p < 0,05$  – вірогідність розбіжностей між інтактними лімфоцитами та лімфоцитами, які інкубували з ВАРТА.

Таблиця 2  
Зміна характеру перегрупувань поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією ВАРТА ( $M \pm \sigma$ )

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=6)	Лімфоцити, інкубовані з ВАРТА в дозі $2 \times 10^2$ М, (n=6)
1	2	3
CD 3		
0	32,83±7,94	52,33±7,26*
кели	0,0±0,0	0,0±0,0
петчі	11,0±5,59	7,0±1,79
кластери	1,67±2,34	6,33±2,42*
CD 4		
0	68,17±4,45	81,83±3,19*
кели	8,33±3,33	7,50±3,27
петчі	5,50±4,32	4,0±2,28
кластери	18,0±3,03	6,67±2,50*
CD 8		
0	70,67±6,47	63,33±5,72
кели	6,0±3,03	10,33±4,72
петчі	1,83±1,47	2,83±1,72
кластери	21,50±7,45	23,50±4,51
CD 72		
0	91,33±3,39	98,0±2,10*
кели	2,17±2,79	0,0±0,0
петчі	3,0±1,79	2,0±2,10
кластери	3,50±2,95	0,0±0,0
HLA-DR		
0	84,50±4,04	92,83±3,19*
кели	8,83±4,49	5,17±3,25*
петчі	6,67±3,33	0,0±0,0
кластери	0,0±0,0	2,0±0,89

Примітка: \* -  $p < 0,05$  – вірогідність розбіжностей між інтактними лімфоцитами та лімфоцитами, які інкубували з ВАРТА.

Таблиця 3  
Зміна характеру перегрупувань поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів під дією іонофору А23187 ( $M \pm \sigma$ )

Експресія антигенних детермінант Ig A, M, G (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=6)	Лімфоцити, інкубовані з А23187 в дозі 100 нмоль/л, (n=6)
0	66,20±3,96	63,20±3,42
кели	7,20±3,19	14,60±2,61*
петчі	20,40±4,62	20,0±3,16
кластери	6,20±4,76	2,20±1,10

Примітка: \* -  $p < 0,05$  – вірогідність розбіжностей між інтактними лімфоцитами та лімфоцитами, які інкубували з А23187.

Зміна характеру перегрупувань поверхневих рецепторів лімфоцитів під дією іонофору A23187 ( $M \pm \sigma$ )

Експресія антигенних детермінант (% позитивних клітин)	Інтактні лімфоцити, (n=6)	Лімфоцити, інкубовані з A23187 в дозі $1 \times 10^{-7}$ M, (n=6)
1	2	3
CD 3		
0	41,0 $\pm$ 7,01	37,17 $\pm$ 8,52
дифузне	2,17 $\pm$ 2,14	2,17 $\pm$ 3,06
кепи	8,33 $\pm$ 2,80	13,67 $\pm$ 5,05*
петчі	11,50 $\pm$ 2,66	4,67 $\pm$ 1,86*
кластери	37,0 $\pm$ 3,74	42,33 $\pm$ 4,08*
CD 4		
0	71,0 $\pm$ 6,45	74,67 $\pm$ 5,24
дифузне	2,0 $\pm$ 1,79	2,83 $\pm$ 2,32
кепи	5,17 $\pm$ 1,94	16,0 $\pm$ 5,62*
петчі	16,83 $\pm$ 3,31	1,0 $\pm$ 0,89
кластери	5,0 $\pm$ 3,90	5,50 $\pm$ 4,23
CD 8		
0	80,50 $\pm$ 5,58	77,50 $\pm$ 7,18*
дифузне	1,0 $\pm$ 1,26	0,0 $\pm$ 0,0
кепи	6,83 $\pm$ 4,07	5,17 $\pm$ 4,07
петчі	3,17 $\pm$ 1,94	3,33 $\pm$ 2,58
кластери	8,50 $\pm$ 4,23	14,0 $\pm$ 5,33*
CD 72		
0	91,0 $\pm$ 5,51	86,83 $\pm$ 4,71*
дифузне	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 1,10
кепи	0,67 $\pm$ 0,82	5,33 $\pm$ 1,97*
петчі	1,0 $\pm$ 1,55	1,0 $\pm$ 0,89
кластери	7,33 $\pm$ 4,27	5,83 $\pm$ 1,72
HLA-DR		
0	85,67 $\pm$ 4,32	88,0 $\pm$ 9,08
дифузне	1,17 $\pm$ 1,17	1,0 $\pm$ 1,26
кепи	3,0 $\pm$ 2,45	8,0 $\pm$ 7,35
петчі	7,0 $\pm$ 4,60	1,0 $\pm$ 0,63
кластери	3,17 $\pm$ 1,47	2,0 $\pm$ 1,55

Інкубація лімфоцитів з високоафінним хелатором внутрішньоклітинного кальцію ВАРТА сприяла зниженню експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів на 18,49% та зменшенню перегрупувань рецепторів у вигляді кепів, петчів і кластерів, що є ознакою зниження функціональної активності клітин.

Дослідження експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів на фоні зв'язування внутрішньоклітинного кальцію за допомогою ВАРТА показало вірогідне зниження експресії CD3 - на 29,03%, CD4 – на 42,92%, CD72 – на 76,93% та HLA-DR – на 53,74% (рис. 4).

Також змінювалось перегрупування рецепторів у площині мембрани – зменшувався на 37,01% рівень утворених кластерів із молекул CD3, збільшувалась кількість петчів CD3 у 3,8 рази (табл. 2). Кількість кластерів CD4 знижувалась у 2,7 рази, зникали петчі та на 37,94% знижувалась кількість кепів з молекул HLA-DR.

Отримані дані дали змогу зробити висновок, що використання хелатора внутрішньоклітинного кальцію ВАРТА призвело до зниження рівня експресії як поверхневих імуноглобулінових рецепторів та антигенних детермінант CD3, CD4, CD72 та HLA-DR.

Наступним етапом було досліджено експресію поверхневих рецепторів за умов підвищеного вмісту іонів кальцію всередині клітини, який моделювали використанням іонофору A23187

(перенос  $Ca^{2+}$  із позаклітинного середовища з концентрацією  $1 \times 10^{-3}$  M всередину клітини, де концентрація кальцію  $0,1 \times 10^{-6}$  M) [7].

Використання іонофору A23187 виявило тенденцію до підвищення експресії поверхневих імуноглобулінових рецепторів лімфоцитів та перегрупування переважно у вигляді кепів (табл. 3).

Кальцієвий іонофор A23187 здатен утворювати в гідрофобній фазі комплекси з кальцієм, опосередковувати електронейтральний трансмембранний перенос двовалентного катіону, що різко збільшує вміст іонів кальцію всередині клітини та сприяє стимуляції експресії поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів [3].

Обробка клітин кальцієвим іонофором A23187 призводила до вірогідного збільшення рівня експресії антигенних детермінант CD8 з 19,50 $\pm$ 5,58% до 22,50 $\pm$ 7,18% та CD72 з 9,0 $\pm$ 5,51% до 13,17 $\pm$ 4,71%.

Також отримані результати зміни перерозподілу рецепторів у площині мембрани – вірогідне підвищення кількості кепів та кластерів, зниження кількості петчів CD3, збільшення у 3,1 рази рівня кепів CD4, збільшення кількості кластерів CD8, збільшення у 8 разів кількості кепів CD72 (табл. 4).

В цілому, інкубація лімфоцитів за умов дії кальцієвого іонофору A23187 сприяла збільшенню рівня експресії антигенних детермінант CD8

та CD72, активізувала перерозподіл рецепторів у площині мембрани в бік переважного утворення кепів та кластерів.

Сприйняття клітиною активуючих сигналів призводить до процесів, які розпочинаються на мембрані в перші секунди та хвилини - зміна потоку одновалентних катіонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$ , ранішнє трансметилування ліпідів, активація фосфоліпази  $\text{A}_2$ , посилення потоку  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину, зміна концентрації циклічних нуклеотидів [3]. Процес активації лімфоцитів потребує обов'язкового підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [20].

Нами отримані дані, які свідчать, що незалежно від механізму пригнічення надходження кальцію у клітину - блокування мембранних каналів за допомогою верапамілу та фенігідіну, зв'язування поза- та внутрішньоклітинного кальцію, відбуваються односпрямовані зміни, які характеризуються зниженням експресії та рухливості у площині мембрани поверхневих імунoglobulinових рецепторів та антигенних детермінант лімфоцитів.

Зниження експресії мембранних рецепторів лімфоцитів тісним чином корелює зі зменшенням їх функціональної активності, можливості ліганд-рецепторної взаємодії під час розвитку імунної відповіді.

Не менш важливим для лімфоцитів є характер перерозподілу рецепторів у площині мембрани, в механізмах якого приймає участь кальцій. Кальцій залучається в процеси підтримки цитоскелету як безпосередньо, так і через низку  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих протеїнів та ензимів. Особливо важливим є рівень  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі для утворення асоціації білків цитоскелету з білками плазматичної мембрани та взаємодії різних елементів цитоскелету. Поверхнева структура клітин регулюється динамічними взаємодіями між білками цитоскелету та мембраною [8]. Координована агрегація рецепторів відбувається, як правило, у вигляді кластерів, кепів або петчів, що забезпечується їх асоціацією з філаментами клітини [15, 21].

За фізіологічних умов взаємодія мікрофіламентів, мікротрубочок з мембранними білками знаходиться в динамічній рівновазі, що забезпечує утворення невеликих кластерів та петчів, які вважаються більш впорядкованою формою кластерів [6]. Петчі рецепторів, поряд з пусковим сигналом для активації T- та B-клітин, регулювання кількості антитіл, несуть додаткову інформацію для клітини, яка надходить до неї шляхом ендцитозу комплексів ліганд-рецептор [9], кепи використовуються для припинення надходження надлишкового сигналу у клітину шляхом викиду комплексів ліганд-рецептор у зовнішнє середовище, або утилізації в лізосомах.

Відповідно до наших результатів, спостерігались односпрямовані зміни в бік пригнічення утворення переважно петчів та кепів при блокуванні надходження кальцію у клітину верапамі-

лом та фенігідіном та при зв'язуванні зовнішньоклітинного кальцію за допомогою ЕДТА. Це свідчить, що збереження фізіологічної концентрації кальцію у позаклітинному просторі та нормальне функціонування транспортних систем для іонів є суттєвими для більш віддалених за часом етапів формування групвань рецепторів. Зв'язування внутрішньоклітинного кальцію ВАРТА пригнічувало утворення не тільки петчів та кепів, але й початкових угруповань – мембранних кластерів, що є важливим для подальших процесів поляризації клітини. Цілковита необхідність підтримання внутрішньоклітинної концентрації кальцію підтверджується стимуляцією утворення кластерів та кепів поверхневих імунoglobulinових рецепторів та антигенних детермінант лімфоцитів при дії іонофору A23187.

В цілому результати роботи свідчать, що на початкових етапах активації імункомпетентних клітин підтримка кальцієвого гомеостазу забезпечує повноцінну експресію поверхневих мембранних рецепторів та адекватне перегруповання у площині мембрани і тим самим підтримує високий рівень функціональної активності лімфоцитів.

### Література

1. Джишамбаев Э.Д. Применение антагонистов кальция при нарушениях ритма сердца / Э.Д. Джишамбаев // Кардиология.- 1987.- Т.27, № 5.- С. 109-116. 217
2. Добронравов В.А. Блокаторы кальциевых каналов в нефропротекции / В.А. Добронравов, О.В. Царькова // Нефрология.- 2004.- Т. 8, № 1.- С. 7-21.
3. Иммунология: / [под ред. У. Пола: пер. с англ.]- М.: Мир, 1987-1988.- Т.1.- С. 414-469.
4. Лабораторные методы исследования в клинике / [справочник] / [под ред. В.В. Меншикова]. - М.: Медицина, 1987, - 368 с.: ил.
5. Лимфоциты: Методы: / [под ред. Дж. Клауса: пер. с англ.]. - М.: Мир, 1990. - 393 с., ил..
6. Молекулярная биология клетки / [пер. с англ.] / Б. Албертс, Д. Брейт, Дж. Льюис и др. - М.: Мир, 1999.- Т. 1-5.- 296 с.
7. Руководство по иммунофармакологии: / [под ред. М.М.Дейла, Дж.К. Формена: пер. с англ.]- М.: Медицина, 1998.- 332 с.
8. Семенов А.В. Элементы цитоскелета и патогенез аллергических реакций. 1.Элементы цитоскелета и их функции (обзор литературы) / А.В. Семенов // Клин. лаб. диагностика. - 2002.- № 11.- С. 3-11.
9. Семенов А.В. Элементы цитоскелета и патогенез аллергических реакций. 2.Цитоскелет и его участие в патогенезе аллергических реакций (обзор литературы) / А.В. Семенов //Клин. лаб. диагностика. - 2003.- № 2.- С. 3-8.
10. Современные проблемы ревматологии / [науч. обзор] / [Под ред. В.А.Насоновой].- М., 1974. - 154 с.
11. Хайтов Р.М. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы. 4. Внутриклеточные сигнальные пути при апоптозе / Р.М. Хайтов, В.М. Манько, А.А. Ярилин //Успехи современной биологии. - 2006. - Т. 126. - № 1. - С. 3-9.
12. Чекман И.С. Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии /И.С. Чекман, О.А. Пелешук, О.А. Пятак и др. / [под ред. И.С. Чекмана, А.П. Пелешука, О.А. Пятака]. - К.: Здоров'я, 1986. - 736 с.
13. Kay J.E. Mechanisms of T lymphocyte activation / J.E. Kay //Immunol. Lett.- 1991.- Vol. 29 (1-2). - С.51-54.
14. Cahalan M.D., Wulff H., Chandy K.G. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. / M.D. Cahalan, H. Wulff, K.G. Chandy //J. Clin. Immunol. - 2001.- Vol. 21, № 4.- P. 235-252.
15. Evans S.S. Dynamic association of L-selectin with the lymphocyte cytoskeletal matrix / S.S. Evans, D.M. Schleider, L.A. Bowman et al. //J. Immunol.- 1999.- Vol. 162.- P. 3615-3624.
16. Kuno M., Gardner Ph. Ion channels activated by inositol 1,4,5-triphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes / M. Kuno, Ph. Gardner //Nature. - 1987. - Vol. 326 (6110). - P. 301-304.
17. Lewis R.S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes / R.S. Lewis //Annu. Rev. Immunol. - 2001.- Vol. 19. - P. 497-521.

18. Nishimoto Y. Protein synthesis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cells / Y. Nishimoto, Y. Onishi, Y. Sato, H. Kizaki //Bull. Tokyo dent. Coll.- 1997.- Vol. 38 (2). - P. 133-138.
19. Pasini F.L. Adenosine inhibits polymorphonuclear leukocyte in vitro activation: a possible role as an endogenous calcium entry blocker / F.L. Pasini, P.L. Capocchi, A. Orrico et al. //J. Immunopharmacol.- 1985.- Vol. 7 (2).- P. 203-215.
20. Quintana A. Calcium-dependent activation of T-lymphocytes / A. Quintana, D. Griesemer, E.C. Schwarz, M. Hoth //Pflugers Arch. - 2005.- Vol. 450 (1). - P. 1-12
21. Sedwick C.E. TCR, LFA-1 and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization / C.E. Sedwick, M.M. Morgan, L. Jusino et al. // J. Immunol.- 1999.- Vol. 162.- P. 1367-1375.

### **Реферат**

#### **РОЛЬ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛИМФОЦИТОВ**

Веснина Л.Э.

Ключевые слова: кальцийзависимые механизмы, лимфоциты, рецепторы, экспрессия.

Проведено изучение роли кальцийзависимых механизмов в регуляции экспрессии поверхностных мембранных иммуноглобулинов А, М, G и антигенных детерминант лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD23, CD72, HLA-DR и их перегруппировок в плоскости мембраны с помощью реакции прямой и непрямой иммунофлуоресценции. Показано, что независимо от механизма подавления поступления кальция в клетку - блокады мембранных каналов с помощью верапамила и фенигидина, связывания вне- и внутриклеточного кальция ЭДТА и БАПТА соответственно, происходят однонаправленные изменения, характеризующиеся снижением экспрессии и подвижности в плоскости мембраны поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов и антигенных детерминант лимфоцитов. Сделан вывод, что сохранение физиологической концентрации кальция во внеклеточном пространстве и нормальное функционирование транспортных систем для ионов являются существенными для более отдаленных по времени этапов формирования группировок рецепторов в виде преимущественно пэтчей и кэпов, а поддержание внутрицитозольной концентрации кальция - для формирования начальных группировок - мембранных кластеров. Результаты работы свидетельствуют, что на начальных этапах активации иммунокомпетентных клеток поддержка кальциевого гомеостаза обеспечивает полноценную экспрессию поверхностных мембранных рецепторов и адекватную перегруппировку в плоскости мембраны и тем самым поддерживает высокий уровень функциональной активности лимфоцитов.

### **Summary**

#### **THE ROLE OF CALCIUM-DEPENDENT MECHANISMS IN THE REGULATION OF SURFACE MEMBRANE RECEPTORS EXPRESSION OF LYMPHOCYTES**

Vesnina L.E.

Keywords: calcium-dependent mechanisms, lymphocytes, receptors, expression

The role of calcium-dependent mechanisms in the regulation of surface membrane immunoglobulin A, M, G expression and antigenic determinants of lymphocytes CD3, CD4, CD8, CD23, CD72, HLA-DR and their rearrangements on the membrane surface by the direct and indirect immunofluorescence reactions were studied. It was shown that irrespective of the suppression mechanism of calcium flux into the cell - the blockade of membrane channels by verapamil and fenigidin, binding of out- and intracellular calcium by EDTA and BAPTA, respectively, unidirectional changes were observed characterized by reduced expression and mobility of the immunoglobulin receptors and antigenic determinants on the membrane surface of lymphocytes. It was concluded that the maintenance of the physiological calcium concentration in the extracellular space and normal functioning of the ion transport systems were essential for more remote stages of the receptor groups forming mainly in the form of the patches and caps, while maintenance of the intracellular calcium concentration was significant for forming the initial groups – the membrane clusters. The results of the research indicated that at the initial stage of the immune cells activation the maintenance of calcium homeostasis provided a complete expression of the surface membrane receptors and adequate regrouping on the membrane, thereby maintaining a high level of the functional activity of lymphocytes.