

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ*И.В. Пухтеева, Н.В. Герасимович, Н.В. Прокопенко*

УО «Международный экологический университет им. А.Д. Сахарова», ул. Долгобродская, 23, МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 220070, Минск, Беларусь, E-mail: puhteeva@mail.ru

Abstract. The object of the study was the thymocytes of rats. The physicochemical state of the plasmatic membranes was investigated by using the fluorescent probe pyren with the presence of different concentrations of dexamethasone. The measurement of cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ in thymocytes was carried out by using the fluorescent probe Fura-2/AM, of compartment calcium was carried out by using the fluorescent probe CTC in the same conditions.

It was found that the influence dexamethasone could lead to the modification of the physicochemical state of the plasmatic membranes. The increasing of the contents of intracellular Ca^{2+} concentration in thymocytes of rats took place. This increasing depended on time of the influence of dexamethasone.

Изучение молекулярного механизма действия глюкокортикоидных гормонов является актуальным, так как они широко используются в медицине для лечения ряда заболеваний. Однако их применение в отдельных случаях приводит к нежелательным побочным эффектам. В то же время синтез модифицированных узкоспециализированных препаратов требует знания того, какие участки стероидной молекулы и каким образом обуславливают гормональную функцию стероидных соединений.

С другой стороны, в случае нарушения компенсаторно-восстановительных и адаптационных систем организма при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды происходит гибель иммунокомпетентных клеток. Одной из возможных причин клеточной гибели является действие глюкокортикоидов при развитии стрессовой реакции. Это объясняется способностью ГК, с одной стороны, непосредственно влиять на функции иммунокомпетентных клеток, а, с другой - сложностью и множественностью механизмов действия кортикостероидных гормонов [1]. Однако механизм запуска и реализация глюкокортикоид-индуцированного апоптоза остается во многом неясен. Предполагается, что молекулярные аспекты глюкокортикоид-зависимого апоптоза клеток иммунной системы тесно связаны с изменением гомеостаза внутриклеточного цитоплазматического кальция. При этом действие глюкокортикоидов на клетки-мишени связывают со взаимодействием гормонов со специфическими мембранными и внутриклеточными рецепторами с последующей передачей сигнала в ядро клетки, где происходит активация экспрессии некоторых генов, в том числе и участвующих в регуляции кальциевого гомеостаза [2].

В связи с вышеуказанным, целью данной работы явилось изучение влияния синтетического аналога глюкокортикоидных гормонов дексаметазона на гомеостаз ионов кальция в тимоцитах крыс.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на тимоцитах крыс. Тимоциты выделяли как описано в работе [3]. Для изучения влияния глюкокортикоидных гормонов на тимоциты был выбран синтетический аналог дексаметазон. Дексаметазон в концентрации 1 мкмоль/л добавляли к суспензии тимоцитов (10^6 клеток/мл), находящихся в фосфатном буфере (pH 7,4) и инкубировали течение 60-120 минут (37°C).

Концентрацию ионов кальция в цитоплазме $[Ca^{2+}]_i$ тимоцитов определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura-2/AM (Sigma, США) [4]. Содержание ионов мембрано-связанного кальция, депонированного в митохондриях и ЭПР, оценивали по флуоресценции зонда хлортетрациклина (ХТЦ) (Sigma, США) [5]. С помощью флуоресцентного зонда пирен (Fluka, США) проводили анализ физико-химических характеристик плазматических мембран тимоцитов. Внедрение зонда осуществляли как описано в работе [6]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре SFL-1211 (Solar, Беларусь).

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2003. Результаты экспериментов выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки средней, а достоверность различий в группах оценивали по t-критерию Стьюдента. При этом различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [7].

Результаты и обсуждение. Согласно современным представлениям, ионы кальция могут рассматриваться в качестве одного из универсальных посредников во множестве биохимических процессов [8]. В работе с помощью флуоресцентного зонда Fura-2/AM обнаружено, что прединкубация в течение 1 часа суспензии тимоцитов с дексаметазоном (1 мкмоль/л) приводила к увеличению концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток приблизительно в 2 раза. Сходная зависимость отмечалась и в случае увеличения времени взаимодействия суспензии исследуемых клеток с дексаметазоном до 120 минут – повышение концентрации свободного ионизированного кальция 2,4 раза.

Можно предположить, что молекулярные механизмы, обеспечивающие изменение гомеостаза внутриклеточного кальция, в присутствии глюкокортикоидов в определенной степени связаны с активацией некоторых генов, в частности, генов, кодирующих рецепторы IP_3 (инозитолтрифосфата), которые в свою очередь способны регулировать состояние IP_3 -зависимых кальциевых каналов. Вышеуказанные события, вероятно, и способствуют увеличению содержания ионов кальция в цитоплазме клеток иммунной системы под действием глюкокортикоидных гормонов.

Для оценки влияния дексаметазона на распределение ионов кальция во внутриклеточных кальциевых депо тимоцитов был выбран кальций-хелатирующий флуоресцентный зонд ХТЦ, образующий флуоресцирующий комплекс Са-ХТЦ-мембрана. При этом было показано, что прединкубация тимоцитов с дексаметазоном в течение 60 минут приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции ХТЦ почти на 35%, а в течение 120 минут – к уменьшению количества мембраносвязанного кальция почти в 2 раза. Это, по-видимому, обусловлено активацией фосфолипазы С через рецепторы плазмалеммы, накоплением инозитолтрифосфата и последующим выходом кальция из его внутриклеточных депо.

В настоящее время ионы Ca^{2+} относят к основным регуляторам клеточного метаболизма и одновременно предполагают, что при летальных повреждениях клеток ионы Ca^{2+} могут выступать в роли цитотоксического агента через механизм несбалансированного внутриклеточного накопления Ca^{2+} [9]. Критериями нарушения внутриклеточного гомеостаза кальция являются модификация мембранной проницаемости для Ca^{2+} , изменение концентраций Ca^{2+} в цитоплазме и избыточное накопление Ca^{2+} во внутриклеточных пулах секвестрирования данного иона (митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме) и т.д. При этом повышение внутриклеточной концентрации кальция в цитоплазме, видимо, является только пусковым механизмом Ca^{2+} -опосредуемой гибели клеток, т.к. рост концентрации кальция в цитоплазме может быть связан с высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных пулов. Избыточное накопление Ca^{2+} в клетках в результате несбалансированного поступления его через плазматическую мембрану рассматривается в ряде работ в качестве основной причины Ca^{2+} -опосредуемой гибели клеток. Можно предположить, что изменение содержания мембраносвязанного кальция, вызванное на начальном этапе действия дексаметазона, в наших экспериментах обусловлено увеличением входа кальция в клетку за счет модификации структурно-функционального состояния мембран тимоцитов, а также перераспределением ионов кальция между внутриклеточными компартментами [8,9].

При исследовании физико-химического состояния плазматических мембран тимоцитов с помощью флуоресцентного зонда пирена установлено, что синтетический аналог глюкокортикоидных гормонов дексаметазон в концентрации 1 мкмоль/л через 60 минут инкубации в суспензии клеток вызывал изменение всех исследуемых показателей мембран тимоцитов крыс. Так, показатель полярности аннулярных липидов увеличил-

ся примерно на 20% по отношению к контролю. Показатели микровязкости аннулярного липида и липидной фазы увеличились по сравнению с контролем в 1, 7 и 1,5 раза соответственно. Степень тушения белковой флуоресценции в тимоцитах после 60 минут инкубации с дексаметазоном увеличивалась более чем на 30% по отношению к контролю. При увеличении времени инкубации тимоцитов с дексаметазоном до 120 минут наблюдалась аналогичная тенденция: повышение показателей полярности аннулярного липида и липидной фазы мембран на 22% и 30% соответственно. Исключение в этом случае составляет значение микровязкости аннулярного липида – отмечено его увеличение на 18% по отношению к контролю. Степень тушения белковой флуоресценции при этом была выше контрольных значений на 40%.

Таким образом, синтетический аналог глюкокортикоидных гормонов дексаметазон вызывает модификацию гомеостаза ионов внутриклеточного цитоплазматического кальция. Это может быть обусловлено изменением структурно-функционального состояния плазматических мембран клеток в результате взаимодействия гормона с мембранными компонентами. При этом отмечается перераспределение данного катиона между внутриклеточными компартментами и цитоплазмой клеток иммунной системы.

Литература

1. **Сергеев, П.В.** Роль мембранотропных эффектов глюкокортикоидов в реализации их фармакологической активности / Сергеев П.В. Духанин А.С. // Бюл. exper. биол.— 2002. — Т.134. — №9. — С.245–253.
2. **Орбак, З.** Резистентность к глюкокортикоидам / Орбак З. // Биохимия. — 2006. — Т.71. — вып.10. — С.1328–1337
3. **Хант, С.** Лимфоциты. Методы. / Хант, С. Мейсон — М.: Мир, 1990. — 283с.
4. **Gryniewicz, G.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Gryniewicz [et al.] // J. of Biological chemistry. — 1985. — Vol. 260 — № 6. — P. 3440–3450.
5. **Oliver, A.E.** Effects of temperature on calcium-sensitive fluorescent probes / Oliver A.E. [et al.] // Biophysical J. — 2000. — V.78. — P. 2116–2126.
6. **Векшин, Н.Л.** К вопросу об измерении вязкости модельных и биологических мембран по люминесценции пирена / Н.Л. Векшин // Биол. науки. —1987. — № 11. — С. 59. —66.
7. **Рокицкий, П.Ф.** Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. — Минск: Вышэйшая школа, 1973. — 320 с.
8. **Гребинык, Д.М.** Кальциевый гомеостаз в тимоцитах при апоптозе II. Аккумуляция Ca^{2+} митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом // Гребинык Д.М. [и др.] // Укр. біохім.журн — 2005. — т.77. — №2. — С.76–81.
9. **Авдонин, П.В.** Рецепторы и внутриклеточный кальций. / Авдонин П.В., Ткачук В.А. — М.: Наука, 1994. — 288с.