

УДК 581.17

Шамрай Е.А.
Черкашина О.В.

РЕАКЦИИ ОСМОРЕГУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Шамрай Елена Александровна,
магистрант

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: elenashamray@yandex.ru

Черкашина Ольга Владимировна

Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа,
ул. Некрасова, 8/9, г. Белгород 308007
E-mail: cherkashina-1977@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Изучены осморегуляторные реакции лимфоцитов здоровых людей в норме и под влиянием водного раствора фуллерена С₆₀. С помощью гипотонической модели (in vitro) показано влияние водного раствора С₆₀ на способность клеток сохранять свой объем. Установлено, что водный раствор фуллерена в концентрации 0,1 мг/мл обладает цитопротекторным свойством, защищая клетки от чрезмерного увеличения объема. Под действием фуллерена наблюдается смена двух последовательных фаз регуляторного увеличения и снижения объема лимфоцитов.

Ключевые слова: лимфоциты; фуллерен С₆₀; осморегуляция.

UDC 581.17

*Shamray E.A.
Cherkashina O.V.*

**REACTIONS OF
OSMOREGULATION OF
HUMANS' LYMPHOCYTES**

Shamray Elena Alexandrovna

Belgorod State National Research University,

85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: elenashamray@yandex.ru

Cherkashina Olga Vladimirovna

Belgorod St. Iosaph Regional Hospital 8/9 Nekrasov St., Belgorod, 308007, Russia

E-mail: cherkashina-1977@mail.ru

ABSTRACT

The authors study the reactions of osmoregulation of healthy humans' lymphocytes in normal conditions and under the influence of aqueous solution of pristine C60 fullerene (C60FAS). Using a hypotonic model (in vitro), the authors demonstrate the influence of C60FAS on the ability of cells to save their volume. It was established that C60FAS in concentration of 0.1 mg/ml has a cytoprotective property protecting cells from the excessive increase of volume. Under the influence of C60FAS, there is a change in two consecutive phases of the regulatory increase and decrease of lymphocytes volume.

Keywords: lymphocytes; fullerene C60; osmoregulation.

Функциональная активность лимфоцитов определяется механизмами сопряжения между транспортной системой и мембранным сенсором, реагирующим на изменение объема клетки [1]. Начальная реакция биомембран на колебания осмолярности среды проявляется в развитии локальных деформаций отдельных участков мембраны, что отражается на уровне ее осмотического напряжения. При этом для сохранения цитогомеостаза используется резерв мембраны, заложенный в ее складчатости [3], который может быть задействован в механизмах рецепториндуцированного эндоцитоза, а также фагоцитоза [2]. Особый интерес представляет изучение реакций осморегуляции лимфоцитов под влиянием физиологически активных соединений, например, водного раствора фуллерена C_{60} . Влияние фуллеренов и их производных на различные клетки и ткани организма широко изучаются в настоящее время в связи с перспективой применения в биологии, медицине, фармакологии, сельском хозяйстве. Эти углеродные соединения обладают рядом уникальных свойств, таких как низкая токсичность, липофильность, определяющая мембранотропные свойства, устойчивость в организме, электронодефицитность, антиоксидантное действие [10]. Все это способствует разработке лекарств на основе фуллеренов, использованию их для адресной доставки веществ в клетку [5]. Целью выполненного исследования было изучить реакции регуляции объема лимфоцитов человека в норме и под влиянием водного раствора фуллерена C_{60} .

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на венозной крови 50 здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет. Человеческую кровь получали путем венепункции с участием специализированно персонала областной клинической больницы им. Св. Иоасафа. Кровь собирали в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ. Лимфоциты из цельной крови выделяли путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин.

В работе использовали водный раствор немодифицированного фуллерена C_{60} в концентрации 0,1 мг/мл, физико-химические свойства которого охарактеризованы и представлены в ряде работ [5, 11]. Лимфоциты культивировали с добавлением среды RPMI-1640 (ПанЭко,

Россия) и раствора фуллерена C_{60} в соотношении суспензия:среда:раствор C_{60} - 1:1:1. Параллельно в качестве контроля ставили пробу лимфоцитов со средой RPMI-1640, в соотношении суспензия:среда - 1:1, но без добавления фуллеренов. Инкубацию осуществляли в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. По истечении времени инкубации пробы центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли. Формировали однослойные суспензионные препараты из каждой пробы, в которых через каждые 30 секунд в течение 10 минут, а затем дополнительно через каждые 15, 30 и 60 минут регистрировали изображения клеток с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест» (регистрационное удостоверение № 29/20010702/6102-04 от 16.02. 2004 г.). На полученных изображениях измеряли диаметр 100 клеток, используя значения которого вычисляли морфометрические индексы по общеизвестным формулам. Об осморегуляторных реакциях клеток судили по показателю использования ими запасов мембранного резерва. Рассчитывали потенциальный мембранный резерв для клеток, помещенных в изотоническую среду, как отношение площади поверхности клетки к ее объему. Для клеток в гипотонической среде рассчитывали относительный мембранный резерв как разницу между площадями поверхности клетки в гипо- и изотонической среде, отнесенной к объему клетки в изотонической среде. Интенсивность использования относительного мембранного резерва в системе клетка-ядро оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва, используемого клеткой от потенциального мембранного резерва, принимаемого за 100% [12].

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики. Достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В гипотонической среде под влиянием водного раствора фуллерена C_{60} объем и площадь поверхности лимфоцитов были снижены на протяжении всего времени инкубации (табл.).

Таблица

Объем и площадь поверхности лимфоцитов в гипотонической среде

Table

Volume and square of surface of lymphocytes in hypotonic medium

Время инкубации, мин	Контроль (пробы без фуллерена)		Опыт (пробы с фуллереном C ₆₀)	
	V, мкм ³	S, мкм ²	V, мкм ³	S, мкм ²
0	486,4 ± 32,2	288,1 ± 11,7	482,8 ± 37,7	282,6 ± 13,6
1	569,3 ± 47,3	315,3 ± 15,5	472,1 ± 32,5*	280,5 ± 12,4
2	561,4 ± 47,7	311,6 ± 15,7	559,3 ± 43,3	310,7 ± 15,5
3	654,8 ± 56,3	343,7 ± 18,0	527,4 ± 40,1*	298,9 ± 14,8*
4	665,4 ± 59,1	346,3 ± 18,7	517,3 ± 39,8*	294,9 ± 14,6 *
5	692,2 ± 63,1	353,9 ± 19,8	441,6 ± 29,6*	269,1 ± 11,4*
6	648,2 ± 58,1	339,2 ± 18,7	346,4 ± 20,2*	231,0 ± 8,5*
7	662,5 ± 56,9	345,7 ± 18,3	355,4 ± 18,0*	236,3 ± 7,9*
8	651,6 ± 50,5	343,5 ± 17,2	272,4 ± 14,3*	197,8 ± 6,7*
9	506,7 ± 34,7	293,2 ± 13,3	349,5 ± 21,5*	231,3 ± 9,2
10	452,3 ± 29,3	273,1 ± 11,7	316,5 ± 17,6*	217,7 ± 7,9*

*- Статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольной пробах по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Выраженные различия в изменении объема клеток наблюдали, начиная с 5 минуты и до конца инкубации. Так, объем клеток в гипотонической среде под влиянием фуллерена на 5-ой минуте был снижен на 36,2% ($p < 0,05$), 6-ой – на 46,5% ($p < 0,05$), 8-ой – на 58,2% ($p < 0,05$) и 10-ой – на 30% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. таблицу).

Площадь поверхности лимфоцитов под влиянием водного раствора фуллерена также была снижена на протяжении всего времени воздействия гипотонической нагрузки. Наиболее выраженное уменьшение площади поверхности лимфоцитов в опытных пробах наблюдали на 6-ой минуте на 31,8% ($p < 0,05$), 8-ой – на 42,4% ($p < 0,05$) и 10-ой минуте – на 20,2% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Регуляторное увеличение объема лимфоцитов в условиях гипотонической нагрузки сопровождалось максимальным использованием мембранного резерва. Это предусматривает использование клеткой запасов плазмалеммы, заложенных в ее складчатости, для сохранения жизнеспособности лимфоцитов и поддержания ими своего объ-

емного гомеостаза. В пробах с фуллереном максимум мембранного резерва 63-64% использован лимфоцитами на 2-3 минутах инкубации в гипотонической среде в течение развития первой фазы увеличения объема клетки, и 60% - при развитии второй фазы. В пробах без фуллерена 83,5% относительного мембранного резерва было использовано на 8 минуте инкубации.

Длительность фазы регуляторного сокращения объема лимфоцитов в опытной и контрольной пробах составила 120 секунд, однако под влиянием фуллерена C₆₀ она развивалась на 4 мин быстрее по сравнению с контролем.

Согласно полученным нами данным водный раствор фуллерена C₆₀ существенно изменяет функциональную активность лимфоцитов. Сокращается длительность фазы набухания клетки на 4 минуты и снижается использование ею относительного мембранного резерва в гипотонической среде в 1,4 раза. Не исключено, что это может быть связано с влиянием фуллерена на транспортные системы клеток, играющие главную роль в

осморегуляции [4]. Известно, что во время регуляторного увеличения объема лимфоцита происходит поступление K^+ вовнутрь клетки, в то время как при возвращении объема к исходным значениям поток K^+ направлен во внеклеточную среду [8]. Потеря K^+ лимфоцитами опосредуется увеличением уровня цитоплазматического Ca^{2+} , выход которого из внутриклеточных депо запускает сниженная осмолярность среды [7]. Повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} усиливает работу Ca^{2+} индуцированных K^+ -каналов (Гардош каналы), выкачивающих K^+ [6] и увеличивает Cl^- -проводимость клетки [9]. Изменение функциональной активности клеток, снижение использования ими мембранного резерва

может негативно сказываться на поддержании гомеостаза, а также функционировании лимфоцитов и иммунной системы здорового человека в целом.

Заключение

Таким образом, водный раствор фуллерена C_{60} влияет на осморегуляторные реакции лимфоцитов, вызывая развитие двух последовательно сменяющихся фаз регуляторного увеличения и сокращения объема в гипотонической среде, изменяя функциональную активность лимфоцитов. Водный раствор фуллерена C_{60} обладает цитопротекторным свойством, защищая клетки от чрезмерного увеличения объема в гипотонической среде.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Орлов С.Н., Новиков К.Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1996. Т. 82 (8-9). С. 1-15.
2. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Молекулярные механизмы адренергического контроля функций фагоцитирующих клеток // Успехи соврем. биол. 2004. Т. 124, №.4. С. 342-353.
3. Федорова М.З., Надеждин С.В., Головки С.И., Зубарева Е.А. Сравнительная оценка «мембранного резерва» клеток крови земноводных и млекопитающих // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 5. С. 419-422.
4. Anantharam A., Palmer L.G. Determination of epithelial Na^+ channel subunit stoichiometry from single-channel conductance // J. Gen. Physiol. 2007. V. 130. Pp. 55-70.
5. Assimi S., Tradjiki S., Donose B.C., Nguyen A.V., Millere J.D. Aggregation of fullerene $C_{60}(OH)_{24}$ nanoparticles as revealed using flow field-flow fractionation and atomic force microscopy // Langmuir. 2010. V. 26. Pp. 16063-16070.
6. Berkefeld H., Falker B., Schulte U. Ca^{2+} -activated K^+ channels: from protein complexes to function // Physiol. Rev. 2010. V. 90. Pp. 1437-1459.
7. Foskett J.K. The role of calcium in the control of volume regulatory transport pathways // Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. 1994. Pp. 259-277.
8. Grinstein S., Clarke C.A., Dupre A., Rothstein A. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes // J. of General Physiol. 1982. V. 80. Pp. 801-823.
9. Grinstein S., Smith J.D. Calcium-independent cell volume regulation in human lymphocytes // The J. of General physiology. 1990. V. 95. Pp. 97-120.
10. Kepley C.L., Dellinger A., Zhou Z.G., Norton S.K., Lenk R., Conrad D. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells // Nanomed-Nanotechnol. 2010. V. 6(4). Pp. 575-582.
11. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I.M. Structure of C_{60} fullerene in water: spectroscopic data // Carbon. 2004. V. 42 (5). Pp. 1203-1206.
12. Skorkina M.Yu. Use of plasmalemma reserve by lymphocytes for osmotic stress tests in vitro // Research of pharmaceutical, biological and chemical. 2014. V.5 (5). Pp. 1771-1773.

REFERENCES:

1. Orlov S.N., Novikov K.N. Regulation of Cells Volume: the Mechanisms, associated Cell reactions and Pathophysiological Influence // *Physiological Journal named after Sechenov I.M.* V. 82. (1996). Pp. 1-15.
2. Orlova H.G., Shirshov S.V. Advans. Molecular Mechanisms of Adrenergic Control over Phagocytizing Cells Functions // *Uspekhi Sovremennoy Biologii.* V. 124. (2004). Pp. 342-353.
3. Fedorova M.Z., Nadezhdin S.V., Golovko S.I., Zubareva E.A. J. The Comparative Value of the "Membrane Reserve" of Blood Cells in Amphibia and Mammals // *Zhurnal Evolutsionnoy Biokhimii I Phisiologii.* V. 43. (2007). Pp. 419-422.
4. Anantharam A., Palmer L.G. *J. Gen. Physiol.* V. 130. (2007). Pp. 55-70.
5. Assimi S., Tradjiki S., Donose B.C., Nguyen A.V., Millere J.D. *Langmuir.* V. 26. (2010). Pp.16063-16070.
6. Berkefeld H., Falker B., Schulte U. *Physiol. Rev.* V. 90. (2010): 1437-1459.
7. Foskett J.K. Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. 1994. Pp. 259-277.
8. Grinstein S., Clarke C.A., Dupre A., Rothstein A. *J. of General Physiol.* V. 80. (1982). Pp. 801-823.
9. Grinstein S., Smith J.D. *The J. of General physiology.* V. 95. (1990): 97-120.
10. Kepley C.L., Dellinger A., Zhou Z.G., Norton S.K., Lenk R., Conrad D. *Nanomed-Nanotechnol.* V. 6 (2010). Pp. 575-582.
11. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I.M. *Carbon.* V. 42. (2004). Pp. 1203-1206.
12. Skorkina M.Yu. Research of pharmaceutical, biological and chemical. V. 5. (2014). Pp. 1771-1773.