

УДК 577. 17.049; 612.01.015.3
©Озтетик

ВЛИЯНИЕ ТАПСИГАРГИЦИНА НА ДВИЖЕНИЕ ИОНОВ Ca^{2+} В ПЕРМЕАЛИЗОВАННЫХ ДИГИТОНИНОМ КЛЕТКАХ L1210

Э. Озтетик

Кафедра биологии, Факультет наук, Университет Анадолу, Эксишехер, 26470,
Турция; тел.: +90 222 335 0580, extn. : 4730; факс: +90 222 320 4910;
эл. почта: eoztetik@anadolu.edu.tr

Исследовали влияние опухолевого промотора нефорболового типа тапсигаргидина (TGC), на движение Ca^{2+} в клетках лимфомы мыши L1210. Выход Ca^{2+} из интактных и пермеализованных дигитонином клеток оценивали при помощи Fura-2 and Fura-3. TGC, подобно тапсигаргину (TG), повышал уровень свободного внутриклеточного Ca^{2+} , способствуя мобилизации последнего из внутриклеточных депо. Кроме того, TGC дозо-зависимым способом (в диапазоне 0,16-16 нМ) тормозил рост клеток и арахидоновая кислота частично блокировала этот эффект.

Ключевые слова: кальций, внутриклеточный кальций, клетки мышечной лимфомы L1210, тапсигаргин, тапсигаргидин.

ВВЕДЕНИЕ. Регуляция внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) имеет важное значение для таких ключевых процессов, как оплодотворение, секреция, метаболический контроль, развитие и дифференцировка, апоптоз и др. Концентрация Ca^{2+} во внутриклеточных депо – эндоплазматическом ретикулуме (ER) и в саркоплазматическом ретикулуме (SR) мышц – а также $[\text{Ca}^{2+}]_i$ регулируются при помощи сети Ca^{2+} -каналов и насосов. SERCA – Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума – а также PMCA – Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран – осуществляют экспорт Ca^{2+} в просвет ER/SR или во внеклеточное пространство за счёт энергии АТФ [1]. При этом стехиометрия транспорта Ca^{2+} / АТФ составляет для SERCA - 2, а для PMCA – 1 [2, 3].

Различные химические соединения обладают способностью специфически ингибировать SERCA. Помимо циклопиазоновой кислоты (CPA) и 2,5-ди(терт-бутил)гидрохинона (DBHQ), список наиболее часто используемых ингибиторов SERCA также включает соединения “семейства тапсигаргинов”, проявляющих свойства сильных и селективных Ca^{2+} модуляторов. Препараты корня средиземноморского растения *Thapsia garganica* L. уже использовались для лечения различных расстройств, а в 1985 г. было показано, что они повышают уровень Ca^{2+} в цитозоле тромбоцитов [4].

Принятые сокращения: A23187 - кальциевый ионофор; BSA - бычий сывороточный альбумин; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - внутриклеточные концентрации свободного Ca^{2+} ; CPA - циклопиазоновая кислота; DBHQ - 2,5-ди(терт-бутил)-гидрохинон; DTT - дитиотреитол; ER - эндоплазматический ретикулум; Fluo-3 - не проникающий (через мембраны) индикатор Ca^{2+} ; Fura-2 - краситель, индикатор Ca^{2+} ; PMCA - транспортные Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран; SERCAs - Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума, SR - саркоплазматический ретикулум; ТХУ - трихлоруксусная кислота; TG - тапсигаргин; TGC - тапсигаргидин.

В настоящее время известно 16 природных веществ, обнаруженных в растениях рода *Thapsia* и объединенных в “семейство тапсигаргинов”. К ним относятся тапсигаргин (TG), тапсигаргидин (TGC), тапситрантагин, тапсивилозины (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K), трилоболоид, нортрилоболоид. Эти природные соединения можно разделить на 2 группы, различающиеся между собой по положению кислородного заместителя у C-2 (см. обзор [5]). В экспериментах на различных типах клеток TG повышал $[\text{Ca}^{2+}]_i$, индуцируя быстрое дозо-зависимое высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, которое не было связано с гидролизом фосфоинозитидов [6]. Данные Thastrup et al. [7], а также Caspersen и Treiman [8] свидетельствуют о том, что субнанолярные концентрации TG вызывают мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо, обусловленную высокоспецифичным ингибированием высвобождения SERCA-АТФаз.

В ряде работ движение внутриклеточного Ca^{2+} в интактных и пермеализованных клетках лимфомы мыши L1210 исследовали, используя ингибитор SERCA - TG [9, 10].

Целью настоящей работы было сравнительное изучение эффектов различных концентраций TGC и TG на захват Ca^{2+} интактными и пермеализованными дигитонином клетками L1210 и демонстрация того, что механизм действия этих соединений (сильное специфическое торможение SERCA-АТФазы) сходен. В данной работе для пермеализации клеток применяли дигитонин; его использование исключает появление возможных осложнений, возникающих при электропорации [11, 12].

МЕТОДИКА.

Материалы. Fluo-3 (пентаммониевая соль) (непроникающий через мембрану индикатор Ca^{2+}) приобретен у “Molecular Probes Inc.” (США). Креатинфосфат, креатинфосфокиназа, A23187, EGTA, BSA, арахидоновая кислота и Fura-2 AM (Ca^{2+} индикатор) получены от “Sigma Chemical Co.” (Великобритания); АТФ и DTT – от “BCL” (Великобритания); дигитонин – от “BDH” (Великобритания). Материалы для культивирования клеток были получены от “GIBCO” (Великобритания), флаконы для культивирования клеток – от “Becton Dickinson Labware” (Великобритания). Тапсигаргидин (TGC) и тапсигаргин (TG) приобретены у “LC Laboratories” (Великобритания).

Спектрофотометрические исследования проведены на флуориметре Shimadzu RF-5000 в одно- и двухволновом режиме регистрации высвобождения Ca^{2+} с использованием Fluo-3 и Fura-2 в экспериментах с пермеализованными и интактными клеткам соответственно. Минимальное время смешивания компонентов составляло 1 сек.

Методы.

Подготовка клеток L1210.

Условия культивирования. Клетки L1210 выращивали в культуральных флаконах (750 мл) в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) с добавлением 10% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл стрептомицина, 50 Ед/мл пенициллина и 2 мМ L-глутамином при 37°C в атмосфере воздуха с 10 % CO_2 в течение 5-6 дней до плотности $1,0 \times 10^6$ /мл, которую измеряли в электронном счётчике клеток Coulter (Model Z1 Dual Threshold).

Нагрузка клеток L1210 Ca^{2+} -индикатором Fura-2. Клетки, выращенные в описанных выше условиях, центрифугировали (1000 g, 5 мин) и затем ресуспендировали в растворе Кребса-Рингера (KR; 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,3 мМ MgCl_2 , 1,2 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ D-глюкоза, 20 мМ HEPES/КОН, pH 7,4, 1 мМ CaCl_2 и 1% (w/v) BSA). Клетки дважды промывали центрифугированием (1000 g, 5 мин) и ресуспендировали в 10 мл KR ($2,5 \times 10^7$ клеток/мл), содержащем 2 мкМ Fura-2 AM. После инкубации данной суспензии 30 мин при 37°C клетки дважды промывали центрифугированием (1000 g, 5 мин), суспендировали в 10 мл KR ($2,5 \times 10^7$ клеток/мл) и до измерения флуоресценции хранили при 30°C в стеклянном сосудике при перемешивании. Для измерения флуоресценции 1 мл

этой суспензии переносили в термостатированную стеклянную кювету флуориметра, снабженную мешалкой

Флуоресценцию Fura-2 измеряли на флуориметре Shimadzu RF-5000 в режиме двухволнового возбуждения (при 340 и 380 нм) и эмиссии при 500 нм. В конце эксперимента величины максимальной и минимальной флуоресценции определяли после пермеализации клеток дигитонином (40 мкг) (максимум), а затем 4 мМ EGTA (минимум). Величины $[Ca]_i$ рассчитывали, используя значения максимальной и минимальной флуоресценции, а также уравнение, приведённое Gryniewicz et al [13]:

$$[Ca]_i = K_d \beta ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)),$$

где K_d – константа диссоциации для Fura-2 - Ca^{2+} (224 нМ)

$$\beta = Fura-2 (380 \text{ нм}) / Ca-Fura-2 (380 \text{ нм}),$$

$$R = Cell (340 \text{ нм}) / Cell (380 \text{ нм}),$$

$$R_{min} = Fura-2 (340 \text{ нм}) / Fura-2 (380 \text{ нм}),$$

$$R_{max} = Ca-Fura-2 (340 \text{ нм}) / Ca-Fura-2 (380 \text{ нм})$$

Для измерения входа Mn^{2+} использовали тушение флуоресценции в изобестической точке [14]. Активность этого процесса оценивали по снижению интенсивности света, обусловленным индуцированным Mn^{2+} тушением флуоресценции Fura-2 (при добавлении 50 мкМ $MnCl_2$). Эту величину измеряли при возбуждении в изобестической длине волны (358 нм), что исключает влияние движения Ca^{2+} на этот процесс. Эмиссию измеряли при 500 нм.

Измерение захвата Ca^{2+} пермеализованными клетками L1210 при помощи Fluo-3.

Культивирование клеток. Для измерения движения Ca^{2+} клетки культивировали как описано выше, центрифугировали при 2000 g 5 мин при 20°C (используя настольную центрифугу) и дважды промывали в 25 мл 20 мМ Hepes/КОН буфера, содержащего 0,9% NaCl, pH 7,0. Конечный осадок клеток ресуспендировали в 1 мл буфера следующего состава: 100 мМ KCl, 20 мМ Hepes/КОН, pH 7,0, 5 мМ сукцинат (K^+ соль). Плотность клеток составила $2,5 \times 10^7$ клеток/мл.

Пермеализацию клеток осуществляли, добавляя 10 мкг дигитонина (в 1 мкл ДМСО) к клеткам, суспендированным в среде для определения (см. выше).

Захват Ca^{2+} исследовали в среде следующего состава: 100 мМ KCl, 20 мМ Hepes/КОН, pH 7,0, 5 мМ сукцинат (K^+ соль), 1 мМ DTT, 100 мкг/мл креатинфосфокиназы, 10 мМ креатинфосфат, 2 мМ $MgCl_2$, 0,7 мМ АТР, 1 мкМ Fluo-3 (пентааммониевая соль), 5 мкг/мл олигомицин. Объём среды определения – 1 мл, количество клеток (в 1 мл) - $2,5 \times 10^7$. Эксперименты проводили при 30°C. Креатинфосфокиназу, креатинфосфат, DTT и Fluo-3 добавляли к суспензии клеток до пермеализации. О высвобождении Ca^{2+} судили по флуоресценции Fluo-3. После нагрузки клеток до стационарного состояния инкубационную смесь переносили во флуориметр Shimadzu RF-5000, соединённый с IBM-совместимым компьютером. $[Ca]_i$ рассчитывали, используя следующее уравнение:

$$[Ca]_i = K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F),$$

где K_d – константа диссоциации Fluo-3- Ca^{2+} (184 нМ)

$$F = cell (530 \text{ нм})$$

$$F_{min} = Fluo-3 (530 \text{ нм})$$

$$F_{max} = Ca-Fluo-3 (530 \text{ нм})$$

Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 505 и 530 нм соответственно.

В ряде экспериментов проводили дополнительное забуферивание Ca^{2+} , добавляя в среду для захвата иона клетками 40 мкМ EGTA + 20 мкМ Ca^{2+} . В этих условиях наблюдали линейный флуоресцентный ответ на изменения концентрации на всем исследованном диапазоне использованных концентраций.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Индукцируемый TG захват Ca^{2+} пермеализованными дигитонином клетками лимфомы мыши L1210.

Влияние TGC на захват Ca^{2+} во внутриклеточные депо исследовали на клетках лимфомы мыши, пермеализованных дигитонином. Различные концентрации

ВЛИЯНИЕ ТАПСИГАРГИЦИНА НА ИОНЫ Ca^{2+} В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ

TGC добавляли перед дигитонином, а начальную скорость захвата внеклеточного Ca^{2+} во внутриклеточные депо измеряли после пермеализации клеток дигитонином. На рисунке 1 показано влияние различных концентраций TG и TGC на захват Ca^{2+} пермеализованными дигитонином клетками. Как и в случае изолированных микросом (E. Oztetik, неопубликованные данные), TG и TGC вызывали сходное концентрационно-зависимое ингибирование захвата Ca^{2+} пермеализованными клетками L1210.

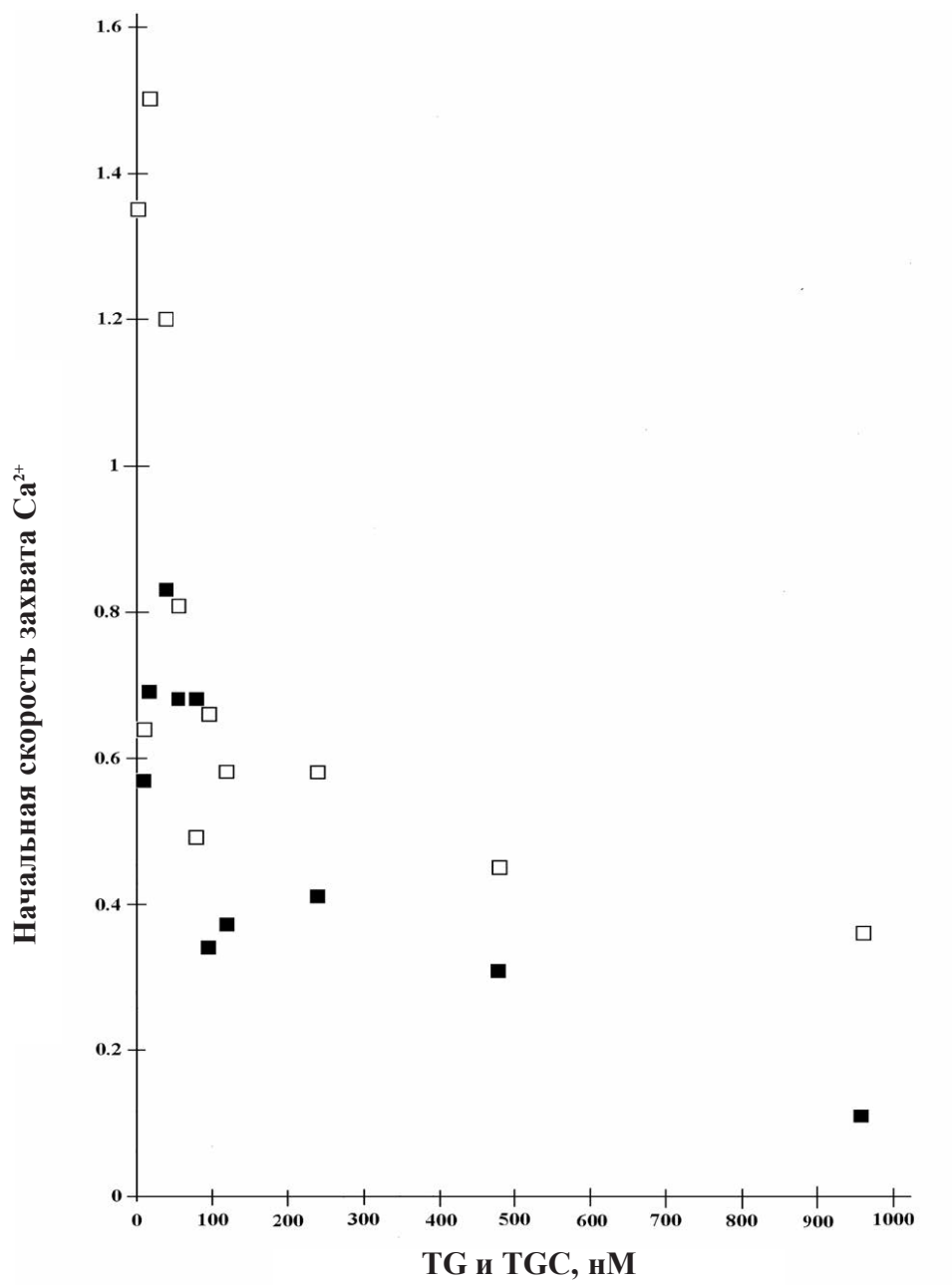


Рисунок 1.

Начальный захват Ca^{2+} пермеализованными дигитонином клетками L1210. Условия пермеализации клеток дигитонином описаны в разделе "Методика". Дигитонин добавляли в среду определения после TG или TGC. Диапазон использованных концентраций TG и TGC составил 0-919 и 0-960 нМ соответственно. Движение Ca^{2+} оценивали при помощи флуориметрии Fluo-3. На рисунке показана зависимость захвата Ca^{2+} от концентрации TG и TGC.

Начальная скорость захвата Ca^{2+} выражена в нмоль Ca^{2+} /мин/ 10^7 клеток.

Эксперименты проводили при 30°C (□; TGC, ■; TG).

Индукцируемое TGC увеличение свободного внутриклеточного Ca^{2+} .

Влияние TGC и TG и на $[Ca^{2+}]_i$ в нагруженных Fura-2 клетках L1210 исследовали в отсутствии (i) или в присутствии (ii) добавок внеклеточного Ca^{2+} (1 mM $CaCl_2$) (рис. 2). В обоих случаях добавление наномолярных концентраций TGC приводило к быстрому и дозо-зависимому увеличению $[Ca^{2+}]_i$.

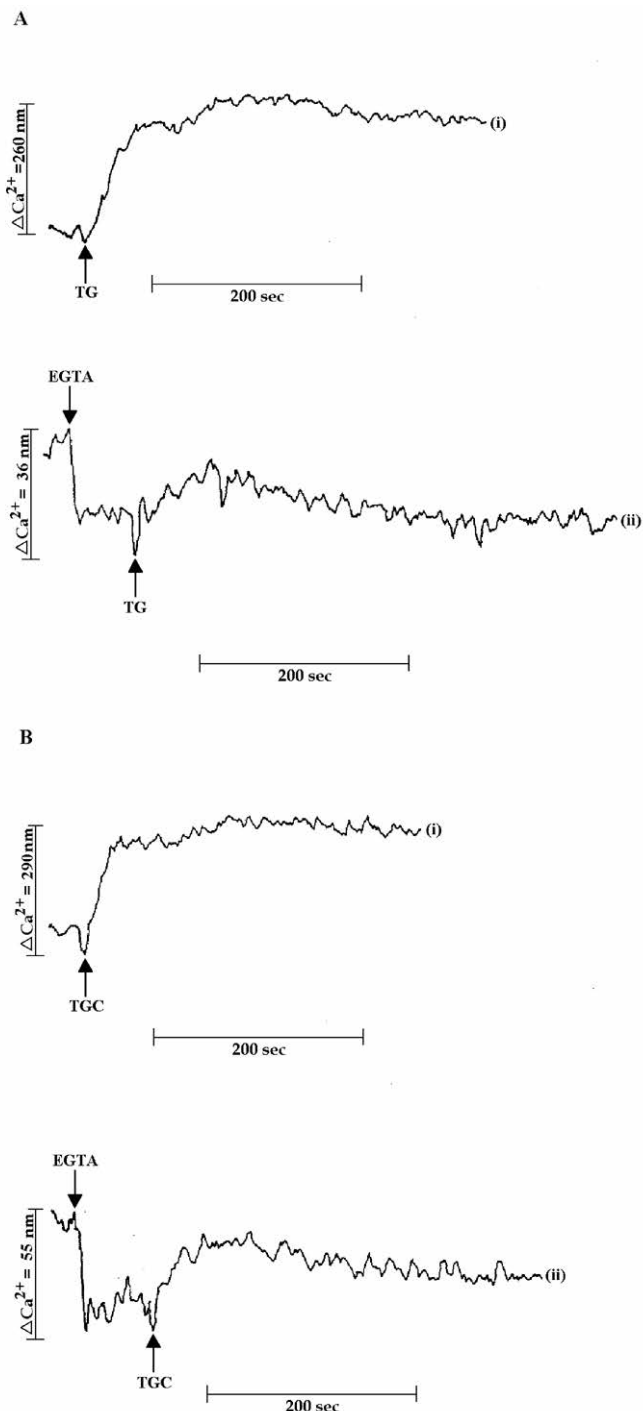


Рисунок 2.

Влияние тапсигаргина и тапсигаргина на $[Ca^{2+}]_i$ нагруженных Fura-2 клеток в присутствии и отсутствии внеклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Условия определения описаны в разделе "Методика".

$[Ca^{2+}]_i$ определяли по флуоресценции Fura-2 при добавлении тапсигаргина (TG; 45 нМ) и тапсигаргина (TGC; 48 нМ). Представлены средние из не менее, чем трех независимых экспериментов, которые проводили при 30°C.

ВЛИЯНИЕ ТАПСИГАРГИЦИНА НА ИОНЫ Ca^{2+} В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ

В присутствии внеклеточного Ca^{2+} добавление TGC к предварительно нагруженным Fura-2 клеткам L1210 приводило к устойчивому увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2, б), которое было схоже с аналогичным действием TG (рис. 2, а). Однако, в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} TGC (подобно TG) вызывал кратковременное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2, а,б). Эти различия в эффектах, наблюдаемые в присутствии и отсутствии (добавок) внеклеточного Ca^{2+} в среде, могут быть обусловлены быстрым выходом Ca^{2+} , индуцируемым TGC. Об этом может свидетельствовать тушение сигнала Fura-2 при использовании внеклеточного Mn^{2+} (рис. 3).

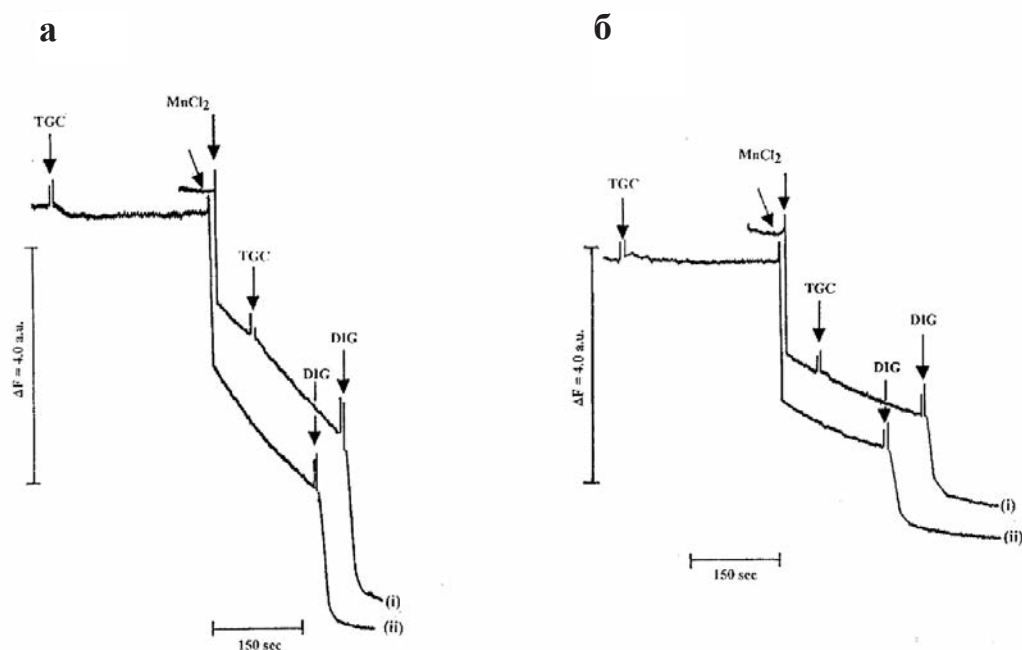


Рисунок 3.

Влияние TGC на вход Mn^{2+} в контрольные и обработанные TGC клетки лимфомы мыши L1210. Условия определения описаны в разделе "Методика". Флуоресценцию нагруженных Fura-2 клеток L1210 и инкубированных с или без добавок Ca^{2+} измеряли при 358 нм.

- (а) (i) - тушение флуоресцентного сигнала Fura-2 инициировали 50 мкМ Mn^{2+} , который добавляли на 30-й сек; стрелкой показан момент добавления 48 нМ TGC. Полное тушение флуоресцентного сигнала индуцировали добавлением дигитонина (DIG; 30 мкг/мл; показано стрелкой);
 (ii) - порядок добавления веществ изменен (со сравнением с (i)). Сначала (на 30-й сек) добавляли 48 нМ TGC, затем - 50 мкМ Mn^{2+} (показано стрелкой). Полное тушение флуоресцентного сигнала индуцировали добавлением дигитонина (DIG; 30 мкг/мл; показано стрелкой).
 (б) (i и ii) условия определения те же, что и в варианте (а) за исключением того, что клетки L1210 выращивали в среде DMEM с добавлением 16 нМ TGC. Представлены средние из не менее, чем трёх независимых экспериментов, которые проводили при 30°C.

Приведенные на рисунке 3а контрольные клетки культивировали как описано в разделе "Методика". В случае рисунка 3б среда содержала 16 нМ TGC и клетки L1210 культивировали в присутствии 16 нМ TGC в течение 5-6 дней.

В контрольных клетках добавление TGC после Mn^{2+} приводило к увеличению тушения флуоресценции Fura-2 (т.е. увеличению скорости входа Mn^{2+}) (рис 3а). В клетках, культивируемых в присутствии TGC, добавление последнего оказывало незначительный эффект на начальную скорость входа Mn^{2+} и TGC, добавленный после Mn^{2+} оказывал незначительный эффект на вход Mn^{2+} .

Для сравнения различий в скорости входа Mn^{2+} в контрольные и предобработанные TGC клетки (рис. 3а,б) были рассчитаны начальные скорости для 9 экспериментов. Их выражали в виде процента тушения (в минуту) флуоресценции общего внутриклеточного пула красителя (Δ флуоресценции

в конце быстрого тушения внеклеточного красителя в ответ на добавление Mn^{2+} , отнесенное к конечной точки доступного дигитонину тушения). Для каждой экспериментальной выборки рассчитывали отношение начальной скорости тушения Mn^{2+} в отсутствии и в присутствии TGC (отношение скоростей (ii)/(i), приведенных на рис 3а). Для контрольных клеток это отношение составило $1,73 \pm 0,1$, а для клеток, выращенных в присутствии 16 нМ TGC, это соотношение было $1,25 \pm 0,1$ (в обоих случаях $n=9$).

Для сравнения начальной скорости входа Mn^{2+} контрольных и обработанных TGC клеток (рис. 3а,б) также рассчитывали величины $\% \Delta / \text{мин}$. В контрольных клетках (i) начальная скорость составила $(0,09 - 3,64) \times 10^{-4} \% / \text{мин}$, а для клеток, выращенных в присутствии 16 нМ TGC эта величина была несколько выше - $(0,121 - 1,116) \times 10^{-3} \% / \text{мин}$ (в обоих случаях $n = 9$).

Влияние тапсигаргина на рост клеток лимфомы мыши L1210.

На рисунке 4 показаны данные о влиянии различных концентраций TGC на рост клеток L1210 в течение 10 дней. Для этого эксперимента были приготовлены четыре серии культуры клеток L1210 (каждая в трех повторах): нормальные клетки L1210 (контроль, 0 нМ TGC), клетки L1210, обработанные 16, 1,6 и 0,16 нМ TGC. Данные рисунка 4 свидетельствуют о том, что рост контрольных клеток достигал максимума на 10й день. Присутствие 16 нМ TGC вызывало сильное торможение роста клеток. Более низкие концентрации TGC (1,6 и 0,16 нМ) оказывали меньшее ингибирующее влияние на рост клеток. Это свидетельствует о том, что концентрации TGC, вызывающие ингибирование как захвата Ca^{2+} (рис. 1) во внутриклеточные депо, так высвобождение Ca^{2+} из них (рис. 2б; таблица), также ингибировали рост клеток.

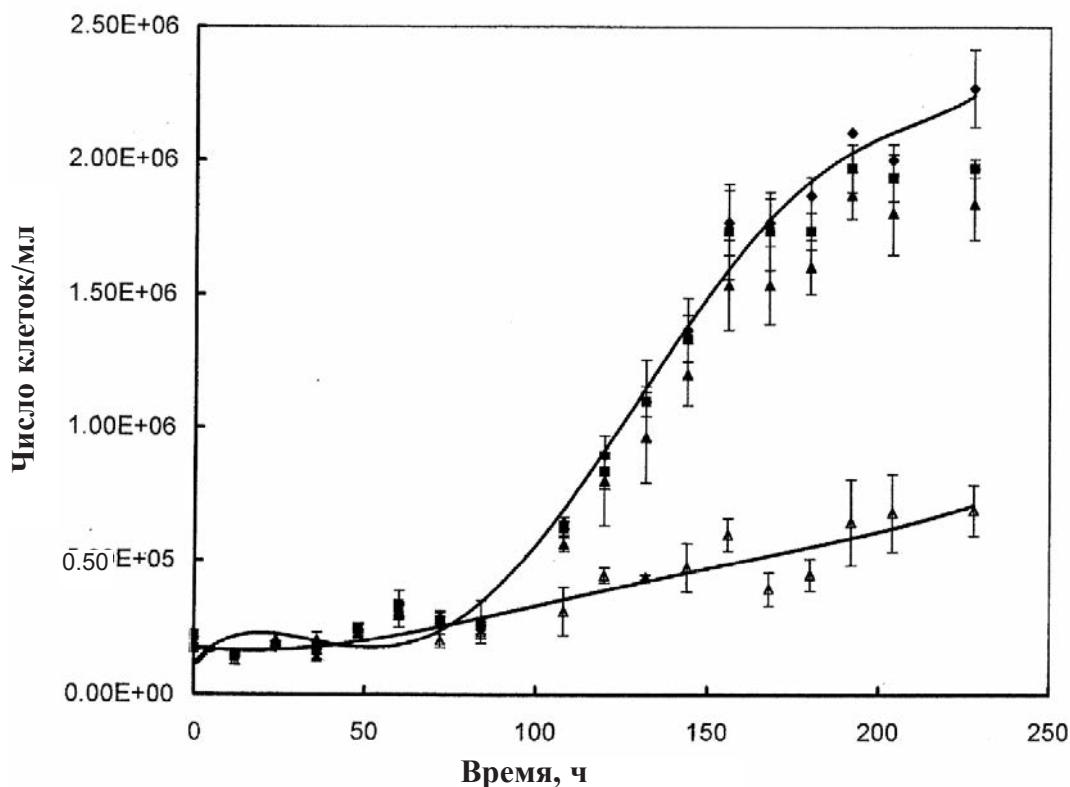


Рисунок 4.

Влияние различных концентраций на рост клеток L1210. Условия определения описаны в разделе "Методика". (♦) контрольные клетки L1210; (△) - 16 нМ TGC; (▲) - 1.6 нМ TGC; (■) - 0,16 нМ TGC. Эксперименты проводили в трех повторах. Клетки культивировали при 37°C на воздухе с содержанием 10% CO_2 в течение 10 дней. Для подсчета числа клеток в электронном счетчике клеток Coulter каждые 12 ч использовали аликвоты (0,5 мл). Для упрощения вида рисунка темной непрерывной линией показаны данные для только контрольных и обработанных 16 нМ TGC клеток.

ВЛИЯНИЕ ТАПСИГАРГИЦИНА НА ИОНЫ Ca^{2+} В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ

Таблица 1. Влияние тапсигаргина и тапсигаргидина на выход Ca^{2+} (%) из клеток L1210 (в присутствии и отсутствии внеклеточного Ca^{2+}) во внеклеточной среде.

Тапсигаргин (TG)	Выход Ca^{2+}, %	
нМ	+ Ca^{2+}	- Ca^{2+}
45	100	100
22,5	91 ± 2,0	60 ± 2,0
7,5	26 ± 2,7	42 ± 2,5
0	6 ± 1,6	18 ± 1,2
Тапсигаргидин (TGC)	Выход Ca^{2+}, %	
нМ	+ Ca^{2+}	- Ca^{2+}
48	100	100
24	88 ± 2,0	70 ± 1,7
8	31 ± 2,0	62 ± 2,5
0	6 ± 2,0	15 ± 1,0

Примечание. Рассчитанные значения высвобождения Ca^{2+} представлены в процентах по отношению к соответствующим значениям, полученным при максимальных концентрациях TG (45 нМ) и TGC (48 нМ) и принятых за 100%. Представлены средние величины ± стандартное отклонение.

На рисунке 5 приведены данные электронной микроскопии контрольных и обработанных TGC клеток лимфомы мыши L1210. Клетки выращивали в присутствии сверхвысокой (1,6 мкМ) концентрации TGC в течение 5-6 дней. Обработанным TGC клеткам был свойственен отличный от контроля паттерн гетерохроматина (темные пятна) в ядре (рис. 5а). На рисунке 5б гетерохроматин был более диспергирован по сравнению с контролем (рис. 5а) и характеризовался более периферическим распределением в ядре. В ряде случаев складывалось впечатление, что он ассоциирован с ядерной оболочкой клетки. Тонкая структура нуклеоплазмы была изменена (рис. 5б), были видны более крупные гранулы (по сравнению с рис 5а).

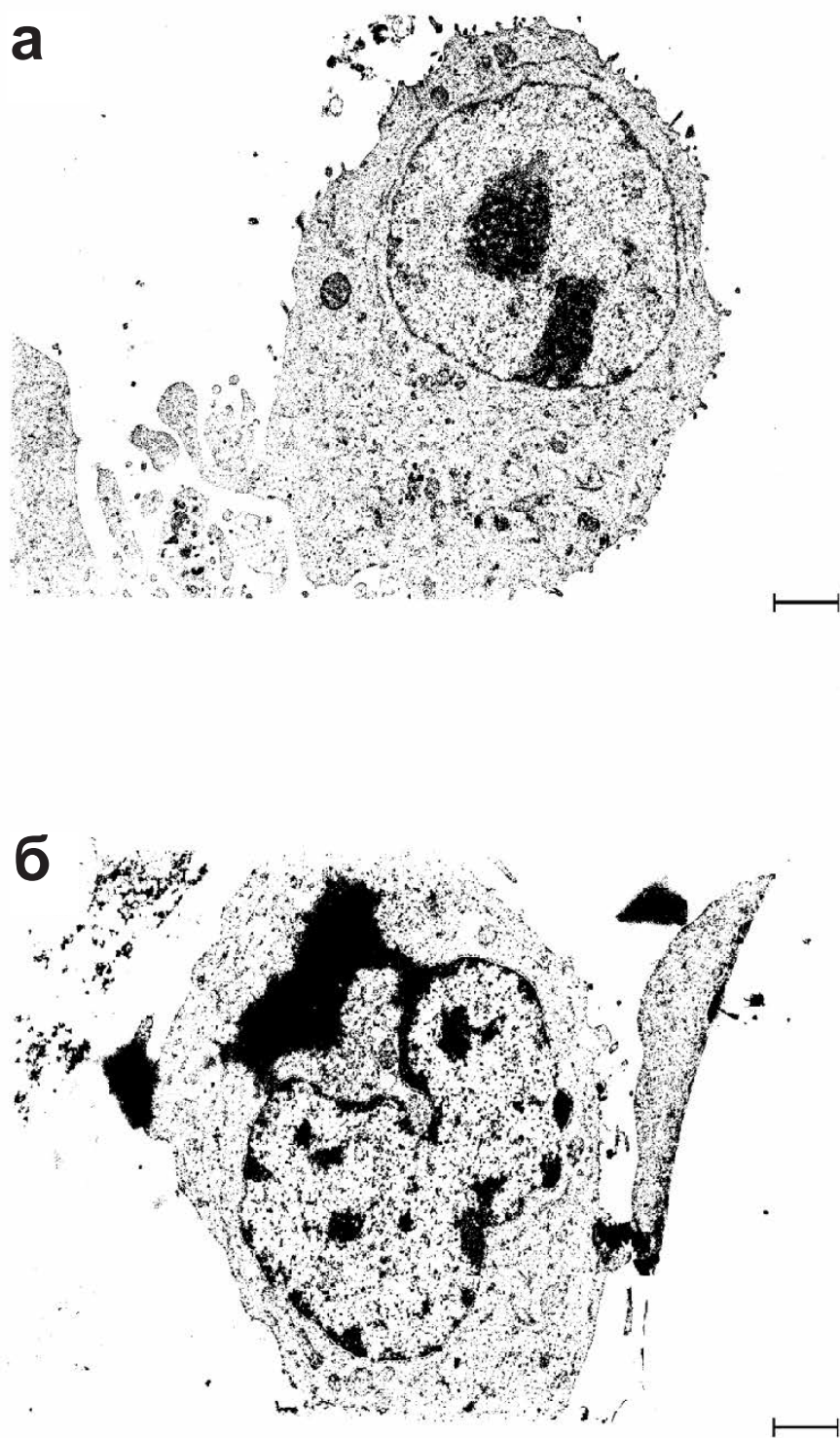


Рисунок 5.

Электронная микроскопия контрольных и обработанных в течение 5-6 дней TGC клеток L1210.

(а) Контрольные клетки лимфомы мыши L1210.

(б) Клетки лимфомы мыши L1210, обработанные 1,6 мкМ TGC. Масштабная метка соответствует 3 мкм.

ВЛИЯНИЕ ТАПСИГАРГИЦИНА НА ИОНЫ Ca^{2+} В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ

Индукцированное арахидоновой кислотой восстановление роста клеток, остановленного при истощении пула Ca^{2+} .

Short et al. [15], Waldron et al. [16], а также Graber et al. [17] показали, что арахидоновая кислота может восстанавливать рост клеток DDT1MF-2, обработанных TG. На рисунке 6 показано, что такое же восстановление роста может происходить и у клеток L1210, обработанных TGC. Клетки выращивали в присутствии сверхмаксимальной концентрации TGC (3,2 мкМ). Несмотря на то, что выбранная концентрация полностью блокировала рост клеток, после удаления TGC отмечалось некоторое восстановление роста клеток. В присутствии арахидоновой кислоты это увеличение было значительно выше (рис. 6). Контрольные клетки демонстрировали схожий рост с и без арахидоновой кислоты. Среди всех исследованных групп наименьший рост клеток был отмечен у клеток L1210, обработанных TGC (в отсутствие арахидоновой кислоты). Сама арахидоновая кислота оказывала незначительный эффект на рост контрольных клеток, однако при этом повышала рост обработанных TGC клеток до уровня контроля.

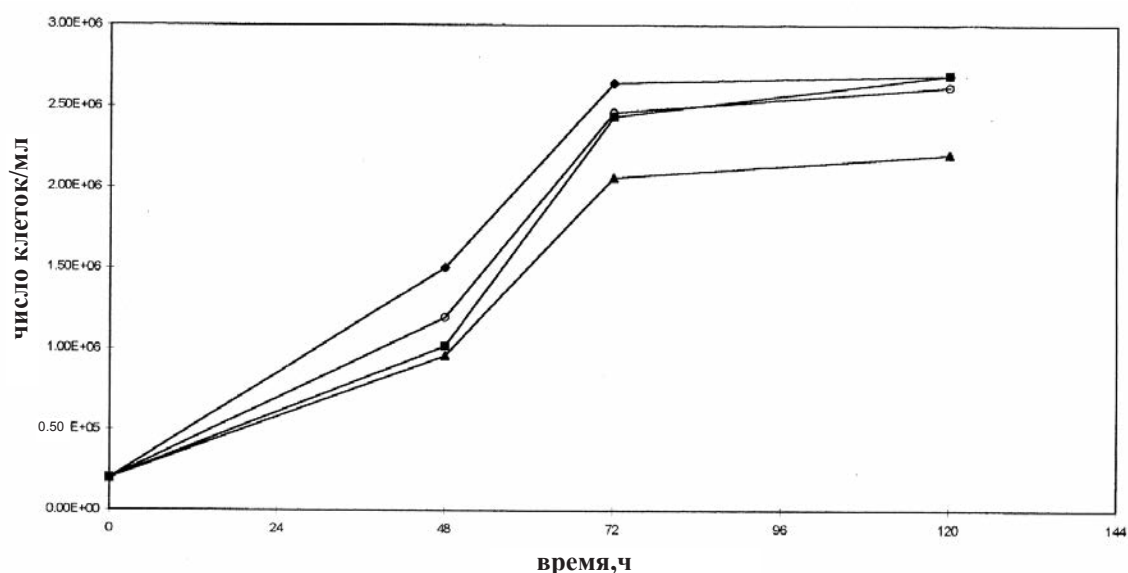


Рисунок 6.

Влияние арахидоновой кислоты на рост клеток L1210, обработанных TGC. Условия определения описаны в разделе "Методика". Клетки инкубировали с 3,2 мкМ TGC в среде DMEM в течение 3 ч при 37°C. После этого клетки трижды промывали средой DMEM, не содержащей TGC. После этого к (контрольным и обработанным TGC) клеткам добавляли 20 мкМ арахидоновую кислоту. Через определенные промежутки времени (48, 72 и 120 ч после завершения инкубации с TGC) клетки ресуспендировали пипеткой и переносили в электронный счетчик клеток Coulter. Подсчет клеток проводили в трех повторах; представлены типичные (по меньшей мере для трех экспериментов) результаты. (♦) - контрольные клетки; (■) - контрольные клетки + арахидоновая кислота (▲) - клетки, обработанные TGC; (○) - клетки, обработанные TGC и затем арахидоновой кислотой.

ОБСУЖДЕНИЕ.

С момента открытия в качестве ингибитора SERCA-АТФаз TG широко используется в исследованиях движения внутриклеточного Ca^{2+} . Помимо общих характеристик ответа клеточного Ca^{2+} на TG есть две важных особенности, которые позволяют рассматривать TG-индуцируемый Ca^{2+} ответ в качестве полезного исследовательского "инструмента":

(i) эффективность действия при очень низких (наномолярных) концентрациях; (ii) высокая ингибиторная специфичность на Ca^{2+} -АТФазы ER при отсутствии эффекта на другие Ca^{2+} -АТФазы (например, гепатоцитов и мембран эритроцитов) [7, 18]. В свете всего сказанного и с учетом структурного сходства между TG и TGC и их действия на микросомы (Е. Oztetik, неопубликованные данные) представляло интерес определить, может ли TGC: (i) использоваться в качестве зонда при изучении гомеостаза Ca^{2+} ; (ii) служить в качестве подходящего объекта в более детальных будущих исследованиях.

В данном исследовании были сопоставлены эффекты TGC и TG на клетки L1210. Полученные результаты показывают, что TG и TGC индуцируют быстрый выраженный ответ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нагруженных Fura-2 клетках и что обнаруженное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , по-видимому, обусловлено его мобилизацией из внутриклеточных депо. В условиях варьирования внеклеточным Ca^{2+} TG и TGC действовали сходным образом. В присутствии внеклеточного Ca^{2+} добавление TG или TGC к клеткам L1210, нагруженным Fura-2, приводило к длительному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} происходило кратковременное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$).

На следующем этапе работы была исследована скорость поглощения Mn^{2+} контрольными и обработанными TGC клетками L1210. Полученные данные показывают, что стимуляция скорости поступления Mn^{2+} в контрольных клетках ($1,73 \pm 0,1$ раза) была выше, чем в клетках в присутствии 16 нМ TGC ($1,25 \pm 0,1$).

Данные электронной микроскопии (рис. 5) свидетельствуют о том, что вызванные TGC изменения в клетках аналогичны таковым у клеток в ходе процесса программируемой клеточной смерти.

Результаты экспериментов, показанные на рисунке 1, демонстрируют сходство эффектов различных концентраций TG и TGC на захват Ca^{2+} ; 16 нМ TGC вызывал не только сильное ингибирование торможения этого процесса, но и полное ингибирование роста клеток (рис. 4). По данным рисунка 1, дальнейшее увеличение концентрации TGC до 1000 нМ вызывает дальнейшее увеличение ингибирования захвата Ca^{2+} . Поэтому в ряде экспериментов по изучению влияния TGC на рост клеток и их морфологию были использованы более высокие концентрации этого вещества. По аналогии с ранее полученными данными для TG, даже после экспонирования клеток к таким очень высоким концентрациям TGC отмечалось некоторое восстановление роста клеток после удаления этого вещества из сред культивирования. При этом в присутствии арахидоновой кислоты восстановление происходило гораздо эффективнее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В соответствие со структурным сходством между TGC и TG (а также их образовании в одном и том же зонтичном растении) результаты настоящего исследования свидетельствуют об идентичности действия этих веществ на интактные и пермеализованные дигитонином клетки лимфомы мыши L1210. При 0,16 и 1,6 нМ TGC ингибирование роста клеток было небольшим, достигая максимума при 16 нМ. Как и в случае действия TG на другие клетки, вызванное TGC ингибирование роста клеток L1210 обращалось (по крайней мере частично) арахидонатом.

Автор признателен профессору Alan P. Dawson за полезные советы и обсуждение данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carafoli E. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 1115-1122.
2. Niggli V., Adunyah E.S., Carafoli E. (1981) J. Biol. Chem., **256**, 8588-8592.
3. Carafoli E., Santella L., Branca, D. Brini M. (2001) Crit. Rev. Biochem. Mol., **36**, 107-260.

ВЛИЯНИЕ ТАПСИГАРГИЦИНА НА ИОНЫ Ca^{2+} В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ

4. Ali H., Christensen S.B., Foreman J.C., Pearce F.L., Piotrowski W., Thastrup O. (1985) Br. J. Pharmacol., **85**, 705–712.
5. Ley S.V., Antonello A., Balskus E.P., Booth D.T., Christensen S.B., Cleator E., Gold H., Hogenauer K., Hunger U., Myers R.M., Oliver S.F., Simic O., Smith M.D., Sohoel H., Woolford A.J.A. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 12073-12078.
6. Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B. Hanley M.R. (1989) Agents Actions, **27**, 17–23.
7. Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 2466-2470.
8. Caspersen C., Treiman M. (1995) FEBS Lett., **377**, 31-36.
9. Loomis-Husselbee J.W., Dawson A.P. (1993) Biochem. J., **289**, 861-866.
10. Dawson A.P., Rich G.T., Loomis-Husselbee J.W. (1995) Biochem. J., **310**, 371-374.
11. Cullen P.J., Irvine R.F., Drobak B.K., and Dawson A.P. (1989) Biochem. J., **259**, 931-933.
12. Loomis-Husselbee J.W., Cullen P.J., Irvine R.F., Dawson A.P. (1991) Biochem. J., **277**, 883-885.
13. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 3440-3450.
14. Sage S.O., Merritt J.E., Hallam T.J., Rink T.J. (1989) Biochem. J., **258**, 923-926.
15. Short A.D., Bian J., Ghosh T.K., Waldron R.T., Rybak S.L. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 4986-4990.
16. Waldron R.T., Short A.D., Meadows J.J., Ghosh T.K., Gill D.L. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 11927-11933.
17. Graber M.N., Alfonso A. Gill D.L. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 883-888.
18. Lytton J., Westlin M., Hanley, M.R. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 17067-17071.

Поступила 13. 03. 2008.

EFFECTS OF THAPSIGARGICIN ON Ca^{2+} MOVEMENTS IN L1210 CELLS PERMEABILIZED WITH DIGITONIN

E. Oztetik

Department of Biology, Science Faculty, Anadolu University, Eskisehir, 26470 Turkey;
tel.: +90 222 335 0580, extn. : 4730; fax: +90 222 320 4910; e-mail: eoztetik@anadolu.edu.tr

The effect of Thapsigargin (TGC), a non-phorbol ester type tumor promoter, on Ca^{2+} movements has been investigated using L1210 mouse lymphoma cells. Ca^{2+} release from intact and digitonin permeabilized cells was evaluated using Fura-2 and Fura-3. TGC like Thapsigargin (TG) has the ability to discharge the intracellular Ca^{2+} stores and to increase intracellular free Ca^{2+} concentrations. TGC in a concentration dependent manner (0.16-16 nM) also inhibited cell growth and this effect was at least partially reversed by arachidonate.

Key words: calcium, intracellular calcium, L1210 mouse lymphoma cells, thapsigargin, thapsigargin.