

## ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЛАЗЕРНОМ ОБЛУЧЕНИИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

*О.Г. Бондаренко, Т.Г. Кравченко, Г.К. Попов*  
*Челябинский государственный институт лазерной хирургии,*  
*г. Челябинск*

Приводятся данные об особенностях включения внутриклеточной сигнализации в эозинофилах периферической крови в ответ на низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Лазерное воздействие активирует Са-каналы и повышает концентрацию Са<sup>2+</sup> в цитоплазме. Это в свою очередь включает в каскад реакций систему инозитол-1,4,5'-трифосфата. Изменения концентрации Са<sup>2+</sup> в нуклеоплазме активирует протенинкиназу С, фосфорилирующую ламины внутренней мембраны ядра. Результатирующим событием является деконденсация хроматина в ядре эозинофила. Само же ядро трансформируется из билобарного в овоидное.

*Ключевые слова:* низкоинтенсивное лазерное излучение, эозинофилы, нейтрофилы, дегрануляция, деконденсация.

**Введение.** Внедрение лазеров в медицинскую практику породило множество проблем, разрешение которых могло бы обосновать правомерность использования лазерной энергии в терапевтических целях. Основной проблемой явилась необходимость изучения взаимодействия лазерного луча с биологическими тканями. Без знания основных механизмов этого взаимодействия на клеточном и молекулярном уровнях невозможно внедрение в медицинскую практику любого способа лазерного облучения с лечебной целью.

В настоящем исследовании представлены данные о характере ответа периферических лейкоцитарных клеток при действии низкоинтенсивного лазерного излучения. Подобный подход к выяснению характера взаимодействия «лазерный луч – изолированная клетка» в условиях *in vitro* позволяет выявить общность и различия в сигнализирующих путях в ответ на действие НИЛИ в различных типах гемопоэтических клеток.

**Материалы и методы.** В работе использовались эозинофилы периферической крови (ЭПК) и сегментоядерные нейтрофилы (СЯН). Донорами образцов крови были здоровые люди и больные с выраженной эозинофилией. Выделение ЭПК и СЯН осуществлялось методом центрифугирования на непрерывном градиенте плотности фиколлаурографина (1,115; 1,096; 1,078 г/мл). После этого из отдельных слоев с помощью микропипетки забиралось 10 мкл взвеси клеток и переносилось на предметное стекло, расположенное над водяной баней при температуре + 37° С. Выделенная взвесь клеток облучалась способом медленного сканирования. По окончании процедуры облучения готовились мазки стандартным лабораторным спосо-

бом, которые в последующем фиксировались и окрашивались азур-эозином по романовскому-гимзе. Контролем служили мазки взвеси клеток крови, не подвергшихся лазерному облучению.

В качестве источника лазерного излучения использовался лазерный излучатель аппарата «Улей 2 км», который располагался перпендикулярно на расстоянии 5 мм, площадь «светового пятна» составляла 21 мм<sup>2</sup>. В этом эксперименте использовали лазерный терапевтический аппарат «Улей 2 км», длиной волны 0,89 мкм, работающий в инфракрасном диапазоне и в импульсном режиме. Использовалась мощность 25 мВт, экспозиция 8 мин.

Зимография проводилась на гелевой пленке (1 % раствор агарозы (icn) на кальциевом буфере (20 mm CaCl<sub>2</sub>; 150 mm NaCl; 50 mm tris-Cl, Ph 7,4) с добавлением 0,2 % желатина). Пленку помещали в чашку Петри, куда при помощи автоматической пипетки наносили взвесь клеток по 10 мкл. Чашку Петри закрывали и помещали в термостат при температуре 37° С на 16 ч. Фиксация полученных зимограмм осуществлялась в 20 %-ной уксусной кислоте в течение 30 мин, окрашивание геля производилось соомасси brilliant blue r-250 (40 % метилового спирта, 7 % уксусной кислоты, 15 % изопропанола, 0,1 % соомасси brilliant blue). Затем проводилась отмывка окрашенного геля в 7 %-ной уксусной кислоте. После отмывки гель сканировался в стандартных условиях в проходящем свете, и на сканированных изображениях определяли яркость области лизиса с помощью программы анализа изображений «imagescope m».

С целью изучения механизма дегрануляции под воздействием НИЛИ применялся раствор ве-

рапамила ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  м). Для этого к выделенной взвеси добавляли 2 мкл раствора верапамила, после чего через 2 мин действовали НИЛИ.

**Результаты исследования.** В исследовании использовались эозинофилы и сегментоядерные нейтрофилы, выделенные из крови в непрерывном градиенте плотности фикола-урографина. Полученные популяции эозинофилов и СЯН подвергались лазерному облучению методом медленного сканирования.

Воздействие НИЛИ на сегментированные нейтрофилы не вызвало морфологической перестройки этих клеток (табл. 1). Но при этом СЯН сохраняли способность к дегрануляции. Последнее было подтверждено методом прямой зимографии. Так, облученные СЯН повышали протеолитическую желатиназную активность, что наблюдалось в виде увеличенной зоны просветления вокруг помещенных на предметное стекло нейтрофильных лейкоцитов. Яркость пятна лизиса СЯН без облучения составила 205 (195; 210) усл. ед., после облучения 216 (216; 216) усл. ед. Различия между группами явились достоверными, коэффициент Манна–Уитни составил  $p = 0,0306$ . При этом все количественные характеристики СЯН оставались без изменения в сравнении с исходной морфологической картиной этой популяции лейкоцитов.

В ЭПК после воздействия НИЛИ отмечено увеличение площади, периметра, диаметра, оптического пропускания, снижение средней и интегральной оптических плотностей (табл. 2), связан-

ное с наблюдающейся выраженной дегрануляцией этих форменных элементов. При проведении зимографии яркость пятна лизиса ЭПК без облучения составила 235 (216; 245) усл. ед., после облучения 247,5 (229; 253) усл. ед. Различия между группами явились достоверными, коэффициент Манна–Уитни составил  $p = 0,0292$ . Кроме того, в облученных ЭПК констатировалась трансформация ядра клетки. А именно, ядро из билобарного становилось овальным, лишалось сегментации, обычно наблюдаемое у эозинофилов. Это значительно меняло ядерно-цитоплазматическое соотношение и повышало прозрачность клетки в целом. Выявленный эффект отменялся при облучении ЭПК после предварительной обработки эозинофилов блокатором кальциевых каналов – верапамилем (табл. 2).

**Обсуждение результатов.** Эозинофилы и сегментоядерные нейтрофилы периферической крови в условиях *in vitro* однотипно отвечают на НИЛИ в виде дегрануляции. Вместе с тем, дегрануляция ЭПК одновременно сопровождается изменением формы ядра. Двубарное ядро трансформируется в овалоподобное. СЯН при действии НИЛИ сохраняют способность к экзоцитозу гранул, но трансформации ядра в этих клетках не наблюдается. Эти различия в ответах эозинофилов и нейтрофилов на НИЛИ позволяют предположить наличие различных путей сигнализации при лазерном воздействии на процесс экзоцитоза и ремодуляцию ядерного хроматина.

Таблица 1

Сравнение влияния НИЛИ ( $\lambda = 0,89$  мкм, общая энергия 12 Дж) на нейтрофилы

Параметры ядра	Интактные клетки	25 мВт, 8 мин
Площадь, мкм <sup>2</sup>	153,24 ± 4,34	156,38 ± 3,86
Периметр, мкм	72,64 ± 1,99	73,09 ± 2,08
Диаметр, мкм	13,94 ± 0,20	13,99 ± 0,32
Оптическое пропускание, усл. ед.	61,06 ± 2,02	64,11 ± 2,87
Средняя оптическая плотность, усл. ед.	56,00 ± 1,03	55,54 ± 1,66
Интегральная оптическая плотность, усл. ед.	8570,50 ± 221,34	8337,41 ± 260,39

Таблица 2

Сравнение влияния НИЛИ ( $\lambda = 0,89$  мкм, общая энергия 12 Дж) на ЭПК без фармакологического влияния, и ЭПК, обработанные раствором верапамила

Параметры	Интактные клетки	25 мВт, 8 мин	25 мВт, 8 мин + В
Площадь, мкм <sup>2</sup>	471,09 ± 20,39	577,41 ± 19,20*	476,52 ± 23,52
Периметр, мкм	88,55 ± 3,22	109,62 ± 3,25*	88,89 ± 3,78
Диаметр, мкм	24,73 ± 0,50	28,44 ± 0,41*	25,01 ± 0,38
Оптическое пропускание, усл. ед.	112,78 ± 3,66	129,81 ± 4,04*	115,22 ± 4,85
Средняя оптическая плотность, усл. ед.	18,05 ± 0,51	13,14 ± 0,31*	18,03 ± 0,62
Интегральная оптическая плотность, усл. ед.	8003,45 ± 325,76	6029,11 ± 258,84*	7895,32 ± 330,25

Примечание. \* – различие с интактными клетками достоверно,  $p < 0,05$ ; В – обозначение предварительной обработки ЭПК раствором верапамила.

Прежде всего, об общем ответе исследуемых лейкоцитов на лазерное излучение, процессе дегрануляции. В данном случае констатируется, что процесс дегрануляции является кальцийзависимым. Дегрануляция наблюдается только при лазерной активации кальциевых каналов. Так предварительная обработка исследуемых лейкоцитов верапамилом отменяет дегрануляцию в ответ на НИЛИ [6]. Становится понятным, что при действии НИЛИ на клетку повышение концентрации кальция в цитоплазме является решающим звеном в организации процесса экзоцитоза гранул [3]. В исследованиях последних лет принят постулат, что регулируемая дегрануляция в ответ на действие гормонов, биологически активных веществ является кальцийзависимым процессом [1]. Конкретно кайма вокруг гранул в виде коатомеров (Co I и Co II) и других дополнительных низкомолекулярных белков, проходящие через цис- и транс-отделы комплекса Гольджи и слияние с цитоплазматической мембраной – все это процессы, требующие участия кальция. Наше заключение об индуцированном действии НИЛИ на процесс дегрануляции подтверждает ранее высказанное Т.И. Кару [2] положение о каскадности реакции в живой клетке при лазерном воздействии.

Подобный механизм включения сигнальных путей также объясняется при развитии хроматин-деконденсирующего феномена в эозинофилах при действии НИЛИ. Повышение концентрации кальция в цитоплазме после лазерного облучения ЭПК вызывает активацию инозитольного каскада. В частности, поступающий извне кальций активирует фосфолипазу С, которая образует из 4,5-инозитолбифосфата два активных мессенджера – 1,4,5'-инозитолтрифосфат и диацилглицерол [4]. Инозитолтрифосфат является активным вторичным мессенджером, участвующим в динамике изменений концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и нуклеоплазме [8]. Это подтверждается наличием рецепторов в эндоплазматическом ретикулуме, внешней и внутренней мембранах ядра [5]. Авторы при выделении внешней и внутренней мембран ядра различными морфологическими методами показали, что внутренняя мембрана ядра содержит инозитолтрифосфат. При культивировании изолированных ядер гепатоцитов добавление инозитолтрифосфата в течение нескольких секунд усиливало транспорт изотопа  $^{45}Ca^{2+}$ . Следует подчеркнуть, что инозитолтрифосфат не только триггирует выход  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума, но и движение  $Ca^{2+}$  между цитоплазмой и нуклеоплазмой.

При повышении концентрации  $Ca^{2+}$  в нуклеоплазме активируется ядерная протеинкиназа [9], которая в свою очередь фосфорилирует ядерные ламины, выстилающие внутреннюю мембрану ядра. Ядерные ламины представлены филаментами промежуточного типа и играют большую роль в образовании формы ядра и структуры ядерного

хроматина [7]. Это свойство объясняется тем, что ламины при посредничестве с низкомолекулярными белками присоединены к гетерохроматину. Так, ламина-В-рецептор с одной стороны соединен с ламинной В, а с другой – с гетерохроматинным белком. Последний имеет непосредственную связь с гетерохроматином. В этой связи становится понятным разрыв связующего комплекса с хроматином при фосфорилировании ламин протеинкиназой С, так как фосфорилирование ламин меняет их свойства. Ламины, например, полностью растворяются в период митотического цикла. В условиях нашего эксперимента фосфорилирование ламин сопровождается ослаблением их свойств – поддерживать связь с гетерохроматином посредством взаимодействия с вспомогательными низкомолекулярными белками. Эти изменения в функции ламин проявляются в феномене деконденсации хроматина при действии НИЛИ на клетку.

**Заключение.** Таким образом, низкоинтенсивное лазерное облучение эозинофилов следует рассматривать как каскад взаимосвязанных реакций различных компартментов, начиная с цитоплазматической мембраны, а именно, встроенных в мембрану кальциевых каналов. Активация последних сопровождается повышением концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. Являясь мультифункциональным вторичным мессенджером, кальций активирует многие сигнализирующие системы клетки посредством активации фосфолипазы С. Это, прежде всего, инозитолтрифосфат и диацилглицерол. Повышение инозитолтрифосфата в цитоплазме сопровождается его взаимодействием с рецепторами инозитолтрифосфата в сакроплазматическом ретикулуме и мембране ядра. Результатом этого взаимодействия является повышение свободного кальция в нуклеоплазме. Свободный кальций активирует ядерную протеинкиназу С, которая фосфорилирует ламины внутренней мембраны и изменяет их способность связываться с гетерохроматином посредством разобщения ламин с низкомолекулярными белками типа ламин-В-рецептор и гетерохроматинным белком. Эта ситуация приводит к деконденсации хроматина. Ядерный хроматин становится гомогенным, без выделения территорий эу- и гетерохроматина. Однако гомогенный хроматин остается четко окружен ядерной оболочкой.

## Литература

1. Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки: рук. для врачей / М. Фаллер, Д. Шилдс; пер. с англ. И.Б. Збарского. – М.: БИНОМ – Пресс, 2003. – 272 с.
2. Кару, Т.И. Первичные и вторичные клеточные механизмы лазерной терапии / Т.И. Кару // Низкоинтенсивная лазерная терапия, 2000. – С. 71–94.
3. Москвин, С.В. Термодинамическая модель механизмов терапевтического действия низко-

интенсивного лазерного излучения (НИЛИ) / С.В. Москвин // *Лазерная медицина*. – 2010. – Т. 14. – Вып. 1. – С. 48–52.

4. *Inositol lipids and calcium signaling* / M.J. Berridge // *M.J. Proc. R. Soc. London (Biol)*. – 1988. – Vol. 234. – P. 359–378.

5. Hunibert, J.P. *Inositol 1,4,5'-triphosphate receptor is located to the in near nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5'-triphosphate* / J.P. Hunibert // *Amer. Soc. Biochemistry and molecular biology*. – 1996. – Vol. 271, № 7. – P. 478–485.

6. Palade, G. *Intracellular aspects of the process of protein synthesis (Nobel lecture)* / G. Palade // *Science*. – 1975. – Vol. 189. – P. 347.

7. Dechat, T. *Nuclear lamin: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin genes and development* / T. Dechat // *Genes and development*. – 2008. – Vol. 22. – P. 832–853.

8. Berridge, M.J. *Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol* / M.J. Berridge // *Biochem. J.* – 1983. – Vol. 212. – P. 849–858.

9. Matter, N. *Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorilation Ca release by inositol 1,4,5'-triphosphate from isolated rat liver nuclei* / N. Matter, M.-F. Ritz, S. Treyermuth // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 1. – P. 732–736.

**Поступила в редакцию 1 июня 2011 г.**