



Влияние блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа на активность нейтрофилов

А.А. Чиркин*, Е.И. Коваленко**, В.М. Ершик***

*Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

**Белорусский государственный университет

***Учреждение образования «Витебский государственный медицинский университет»

Для терапии воспалительных заболеваний представляют интерес вещества, способные предотвращать длительную непрерывную активацию нейтрофилов за счет повышенного уровня ионов Ca^{2+} внутри клеток. Такие вещества не должны препятствовать кратковременному увеличению внутриклеточной концентрации кальция. Целью работы было изучение влияния ионов лантана (La^{3+}) и препаратов, содержащих эти ионы, на активность нейтрофилов. Установлено, что антагонисты Ca^{2+} ингибируют генерацию нейтрофилами АФК 1) при активации клеток в процессе адгезии, 2) действию хемоаттрактанта fMLP, 3) действию индуктора фагоцитоза латекса и 4) при действии активатора протеинкиназы С РМА. Действие этих веществ не может быть объяснено только влиянием на уровень внутриклеточного кальция. Влияние комплексонатов лантана с ЭДТА или оксиэтилендифосфоновой кислоты на генерацию клетками АФК было более слабым, чем действие нитрата лантана при равном содержании ионов La^{3+} в препаратах. Это может свидетельствовать о более медленном высвобождении ионов La^{3+} из комплексонатов. Установлено, что в концентрации до 0,1 мМ нитрат не оказывает значительного влияния на активность нейтрофилов. Комплексоны оксиэтилендифосфоновой кислоты, ЭДТА и лимонная кислота без ионов лантана приводят к существенному снижению способности нейтрофилов генерировать АФК.

Ключевые слова: кальциевые каналы, блокаторы кальциевых каналов, соли лантана, активные метаболиты кислоты, нейтрофилы.

Effect of Ca^{2+} channels L-type blockers on neutrophil activity

A.A. Chirkin*, E.I. Kovalenko**, V.M. Ershik***

*Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

**Belarusian State University

***Educational establishment «Vitebsk State Medical University»

For the treatment of inflammatory diseases substances capable of preventing long-term continuous activation of neutrophils due to elevated levels of Ca^{2+} ions within cells are of concern. Such substances should not interfere with short-term increase in intracellular calcium concentration. The goal was to study the effect of lanthanum ions (La^{3+}) and preparations containing these ions on the activity of neutrophils. It was found out that Ca^{2+} antagonists inhibit the generation of ROS by neutrophils 1) while activation of cells during adhesion process, 2) the action of chemoattractants fMLP, 3) the effect of inducer of phagocytosis of latex and 4) under the action of protein kinase C activator PMA. The affect of these substances can not be explained only by the influence on the level of intracellular calcium. Effect of lanthanum complexones EDTA or oxyetilendiphosphon acid to generate the ROS cells was weaker than the effect of lanthanum nitrate with equal content of La^{3+} ions in the preparations. This may indicate a slower release of ions from the La^{3+} complexones. It was found out that a concentration of 0,1 mM nitrate have no significant effect on the activity of neutrophils. Oxyetilendiphosphon chelating acid, EDTA and citric acid without lanthanum ions lead to a significant decrease in the ability of neutrophils to generate ROS.

Key words: calcium channels, calcium channel blockers, lanthanum salt, active oxygen metabolites, neutrophils.

Ионы Ca^{2+} поступают внутрь клеток и депонируются во внутриклеточных депо с участием различных типов Ca^{2+} -каналов. В плазматической мембране присутствуют депо-

управляемые каналы, потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (VGCC) L-типа (символ L обозначает long-lasting, т.е. долгоживущие) и рецептор-управляемые каналы, при открытии кото-

рых возникает поток Ca^{2+} из внеклеточной среды в клетку. Известно, что переход нейтрофилов из пассивного состояния в активное сопряжен с транзиторным повышением уровня Ca^{2+} в цитозоле. Активация в нейтрофилах ферментов НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы (МПО), фосфолипазы A_2 , цикло- и липоксигеназ, реорганизация элементов цитоскелета являются Ca^{2+} -зависимыми. Кратковременный, до десятков секунд скачок концентрации Ca^{2+} в нейтрофилах может обеспечивать «прайминг» – подготовку клеток к последующей более длительной и интенсивной активации, способствовать экспрессии и активации антиоксидантных и других защитных ферментов в нейтрофилах, устранять апоптоз, обеспечивать более длительное существование клеток. При продолжительном поддержании концентрации Ca^{2+} в нейтрофилах на повышенном уровне наблюдается длительная активация этих клеток, происходит накопление активных форм кислорода (АФК) и повреждений белков, ДНК, липидов, нарушаются функции и целостность мембран клеток, во внеклеточное пространство высвобождаются провоспалительные медиаторы, гидролитические ферменты, АФК. Нейтрофилы погибают сами и повреждают окружающие клетки, ткани организма, промотируют развитие хронического воспаления и возникновение очагов некроза [1]. Ионы Ca^{2+} участвуют в механизме уничтожения патогенов нейтрофилами, который заключается в способности активированных клеток «выбрасывать» сетевидные образования, в которых задерживаются, нейтрализуются, а затем и погибают микроорганизмы. Такие структуры получили название нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). Элементы цитоскелета, кальциевые каналы, энергетический обмен и мембрана нейтрофилов вовлечены в процесс формирования НВЛ. Количество погибающих в ловушках бактерий сопоставимо с количеством микроорганизмов, уничтожаемых нейтрофилом при жизни [2–3]. Для терапии воспалительных заболеваний представляют интерес вещества, способные предотвращать длительную непрерывную активацию нейтрофилов и повышенный уровень ионов Ca^{2+} , но не препятствующие кратковременному увеличению внутриклеточной концентрации кальция. Целью работы было изучение влияния ионов лантана (La^{3+}) и препаратов, содержащих эти ионы, на активность нейтрофилов.

Материал и методы. В работе использованы декстран-500, фиколл-400, 30% раствор

H_2O_2 , люминол, fMLP, пероксидаза хрена («Sigma», США); урографин («Schering AG», Германия); гепарин, латекс («Белмедпрепараты», Беларусь), NaCl , KCl , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaHCO_3 , глюкоза («Анализ-Х», Беларусь).

Выделение нейтрофилов из периферической крови доноров. Нейтрофилы изолировали из крови здоровых доноров разделением в градиенте плотности фиколл-урографина по методу Бейума в нашей модификации. Консервированную с гепарином кровь перемешивали из расчета 5:1 с 7% раствором декстрана-500 в 0,15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин для седиментации эритроцитов при комнатной температуре. В пробирки наливали по 2 мл фиколл-урографина (собственного приготовления, плотность 1,077 г/см³), на который осторожно наслаивали по 9 мл содержащей лейкоциты плазмы, полученной в результате оседания эритроцитов, и центрифугировали в течение 30 мин при 400 g для разделения лейкоцитов по плотности. После центрифугирования всю надосадочную жидкость удаляли, осадок, содержащий фракцию гранулоцитов, очищали от оставшихся эритроцитов, проводя гипотонический лизис в дистиллированной воде в течение 20 с. Осмотичность восстанавливали добавлением 0,3 моль/л NaCl . Затем клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л NaCl , центрифугируя в течение 10 мин при 400 g. Полученную фракцию гранулоцитов суспензировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (СБСР) при pH 7,4. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96%.

Определение $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле фагоцитов методом флуориметрии с использованием зонда fura-2 (PE3)-AM. В суспензию фагоцитов (20 млн клеток/мл) добавляли Fura PE3-AM в концентрации 2–5 мкМ и инкубировали 30–45 мин при температуре 22–37°C для дезтерифицирования и достижения равновесного распределения между связанной и свободной формами молекул зонда внутри клетки. Нагруженные зондом клетки осаждали центрифугированием при 1500 оборотов/мин в течение 7 мин. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли буферный солевой раствор и равномерно перемешивали. Суспензию клеток разделяли на отдельные пробы с содержанием клеток 1–2 млн/мл, добавляли в них антагонисты кальция и CaCl_2 . В кварцевую кювету помещали суспензию клеток из определенной пробы, добавляли магнит для перемешивания,

помещали в кюветное отделение люминометр СОЛАР и регистрировали кинетические зависимости интенсивности флуоресценции $F_{\lambda_1}(t)$ и $F_{\lambda_2}(t)$ на длине волны 510 нм в двух каналах, соответствующих возбуждению на длинах волн $\lambda_1=340$ нм и $\lambda_1=380$ нм. Измерения проводили при температуре 37°C. Через 1–2 минуты вносили в кювету стимулятор (РМА, fMLP) и проводили регистрацию изменений, вызванных активацией клеток и повышением уровня $[Ca^{2+}]$ в цитозоле в течение 5–30 минут. В конце измерения для определения F_{max} и F_{min} , соответствующих максимальному насыщению зонда Ca^{2+} и отсутствию Ca^{2+} , добавляли в кювету 0,1% Triton X-100 (F_{max}), затем хелатирующий агент EDTA в концентрации 5–8 мМ (F_{min} для $\lambda_1=340$ нм и $\lambda_1=380$ нм). Для построения кинетических зависимостей концентрации $[Ca^{2+}]$ проводили расчеты согласно формуле:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot F_{380min} / F_{380max} \cdot (R(t) - R_{min}) / (R_{max} - R(t)),$$

где $R(t) = F_{340}(t) / F_{380}(t)$, $K_d = 250$ нМ.

Регистрация генерации активных метаболитов кислорода. Изолированные фагоциты, суспензированные в буферном солевом растворе, инкубировали в присутствии антагонистов кальция при температуре 37°C в течение 15 минут. Далее суспензию клеток (1–2 млн клеток) помещали в кювету, добавляли люминол и с помощью хемилюминометра регистрировали кинетические зависимости интенсивности генерации АФК клетками при их активации в ходе адгезии на дно кюветы. Затем добавляли стимуляторы активности нейтрофилов – хемоаттрак-

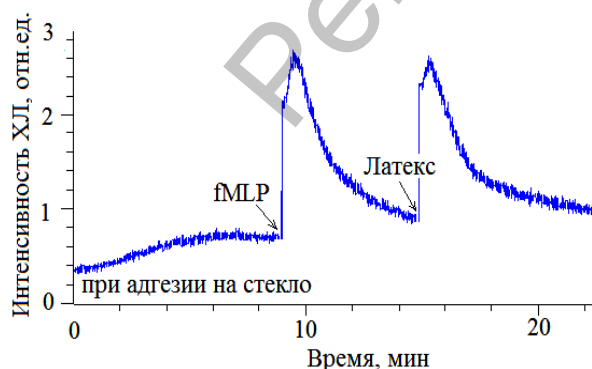


Рис. 1. Регистрация образования активных метаболитов кислорода хемилюминесцентным методом.

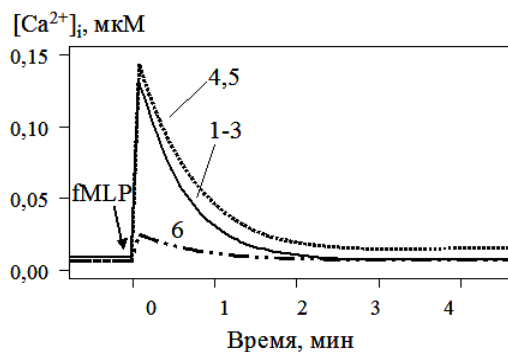
тант fMLP, индуктор фагоцитоза латекс, РМА (форболовый эфир) и регистрировали соответствующие кинетические зависимости интенсивности генерации АФК (рис. 1).

Результаты и их обсуждение. В работе изучено влияние блокаторов Ca^{2+} каналов L-типа – нифедипина, верапамила и ионов La^{3+} – на способность нейтрофилов генерировать АФК при различных типах активирующих воздействий и на повышение при этом концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле.

На рис. 2 показано изменение уровня Ca^{2+} в цитозоле при активации нейтрофилов с помощью fMLP. Установлено, что в отсутствие ингибиторов наблюдается быстрый кратковременный подъем концентрации ионов кальция внутри клетки $[Ca^{2+}]_i$, который значительно подавляется в присутствии нифедипина, но не верапамила и нитрата лантана и не зависит от присутствия или отсутствия во внеклеточной среде ионов Ca^{2+} .

На рис. 3 показано изменение уровня цитозольного $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах при действии на клетки форболового эфира РМА. Выявлено, что РМА вызывает медленное увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле нейтрофилов, которое ингибируется при добавлении нифедипина, верапамила, ионов La^{3+} .

На рис. 4–7 показано влияние антагонистов Ca^{2+} на способность нейтрофилов генерировать АФК при их стимуляции в ходе адгезии на стекло, при добавлении индуктора хемотаксиса fMLP, индуктора фагоцитоза латекса, активатора протеинкиназы С РМА.



1, 4 – без ингибиторов; 2, 3 – 10 мкМ $La(NO_3)_3$; 5 – 20 мкМ верапамил; 6 – 20 мкМ нифедипин

Рис. 2. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ в клетках, активированных fMLP в отсутствие (1, 2) и присутствии (3–6) 0,5 мМ Ca^{2+} в среде.

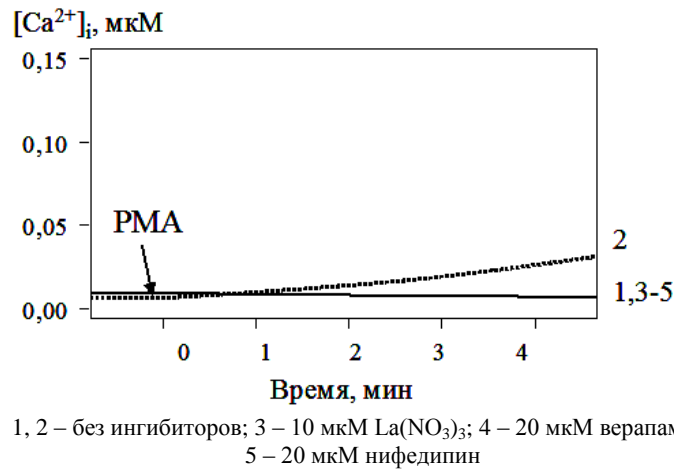


Рис. 3. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках, активированных РМА в отсутствие (1) и присутствии (2–5) $0,5 \text{ мМ Ca}^{2+}$ в среде.

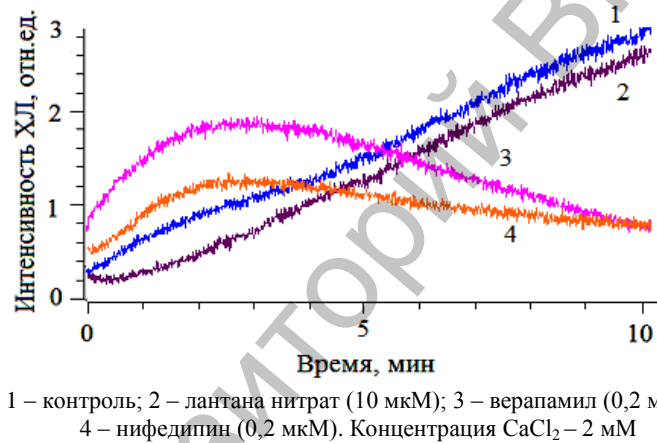


Рис. 4. Влияние ингибиторов L-каналов на генерацию АФК нейтрофилами при адгезии клеток к стеклу.

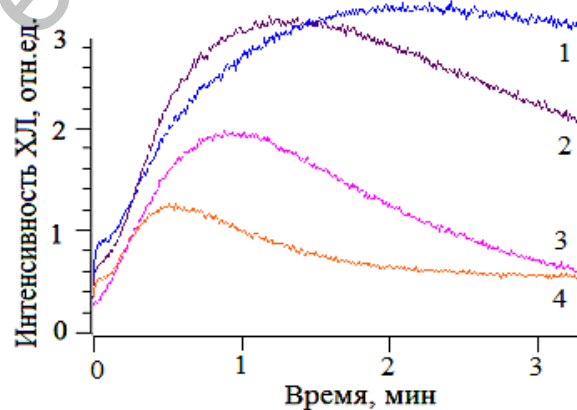
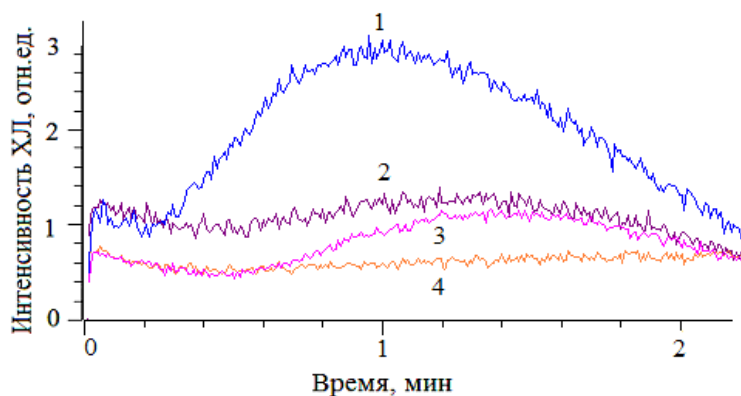
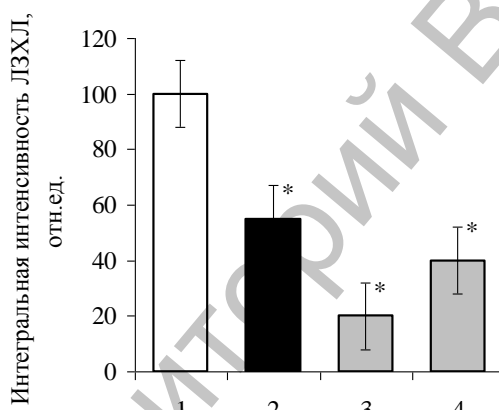


Рис. 5. Влияние ингибиторов L-каналов на генерацию АФК нейтрофилами при стимуляции клеток fMLP.



1 – контроль; 2 – лантана нитрат (10 мкМ); 3 – верапамил (0,2 мкМ);
4 – нифедипин (0,2 мкМ). Концентрация CaCl_2 – 2 мМ

Рис. 6. Влияние ингибиторов L-каналов на генерацию АФК нейтрофилами при стимуляции клеток латексом.



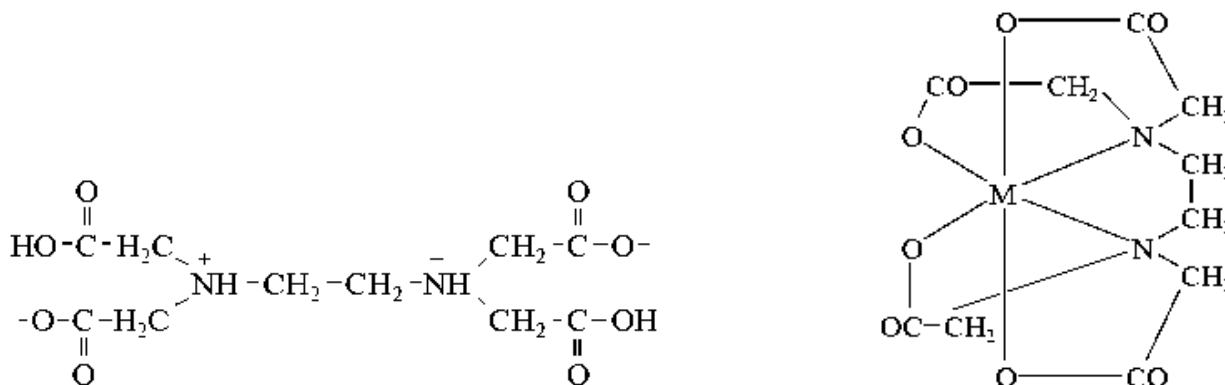
1 – контроль; 2 – лантана нитрат (10 мкМ); 3 – верапамил (0,2 мкМ);
4 – нифедипин (0,2 мкМ). Концентрация CaCl_2 – 2 мМ

Рис. 7. Влияние ингибиторов L-каналов на генерацию АФК нейтрофилами при стимуляции клеток латексом.

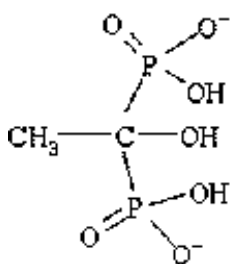
Обнаружено, что при всех типах стимулирующих воздействий антагонисты Ca^{2+} приводят к снижению выхода АФК. Нитрат лантана (в концентрации 10 мкМ) действует более слабо и более медленно, чем нифедипин и верапамил (в концентрации 0,2 мкМ). Полученные данные свидетельствуют об ингибирующем действии антагонистов Ca^{2+} на генерацию нейтрофилами АФК при различных типах стимулирующих воздействий, причем действие этих веществ не может быть объяснено только влиянием на уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

При проведении клинических испытаний антагонистов кальция было установлено, что в ряде случаев применение этих препаратов со-

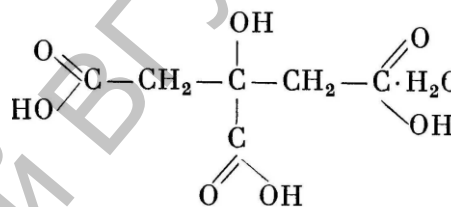
провождается серьезными побочными эффектами, развитие которых более вероятно при резком нарастании в крови концентрации лекарственного вещества. В связи с этим разрабатываются новые лекарственные формы с замедленным высвобождением лекарственного вещества, обуславливающим пролонгированность действия. В нашей стране разрабатываются пролонгированные формы препаратов, содержащих ионы лантана. Эти вещества представляют собой комплексонаты, приготовленные на основе таких комплексонов, как этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), оксиэтилендифосфоновая кислота (ОЭДФ), а также лимонная кислота (рис. 8).



этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и формируемый ею комплексонат

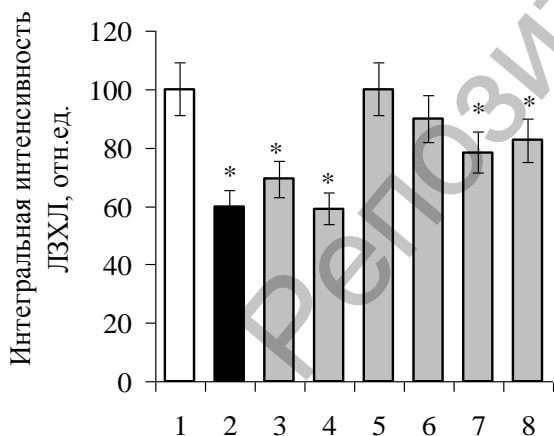


оксиэтилендифосфовая кислота (ОЭДФ)



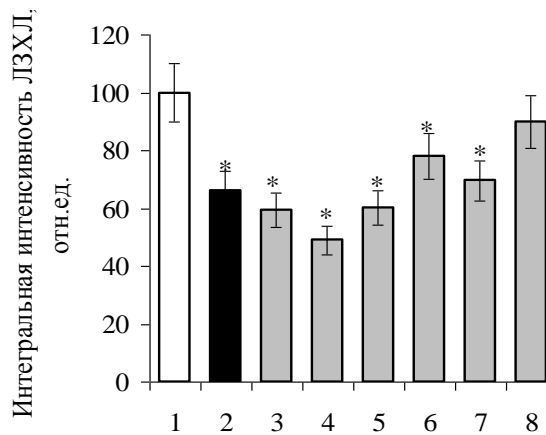
лимонная кислота

Рис. 8. Комплексоны, использованные для приготовления комплексонатов с La^{3+} .



1 – контроль; 2 – лантана нитрат; 3 – лимонная кислота; 4 – лантана цитрат; 5 – ЭДТА; 6 – комплексонат лантана и ЭДТА № 1; 7 – комплексонат лантана и ЭДТА № 2; 8 – комплексонат лантана и ОЭДФ.
Концентрация препаратов – 0,1 мМ.
Концентрация $CaCl_2$ – 2 мМ

Рис. 9. Влияние комплексонов и комплексонатов лантана на генерацию АФК нейтрофилами при адгезии клеток к стеклу.



1 – контроль; 2 – лантана нитрат; 3 – лимонная кислота; 4 – лантана цитрат; 5 – ЭДТА; 6 – комплексонат лантана и ЭДТА № 1; 7 – комплексонат лантана и ЭДТА № 2; 8 – комплексонат лантана и ОЭДФ.
Концентрация препаратов – 0,1 мМ.
Концентрация $CaCl_2$ – 2 мМ

Рис. 10. Влияние комплексонов и комплексонатов лантана на генерацию АФК нейтрофилами при стимуляции клеток fMLP.

Следует отметить, что все использованные в работе комплексоны способны образовывать комплексы как с ионами лантана, так и кальция (и с другими катионами), однако константы ассоциации/диссоциации, характеризующие прочность комплексов, различаются. Наиболее прочные комплексы образует с катионами ОЭДФ, в 2–3 раза менее прочные – ЭДТА и еще в 2 раза менее прочные – лимонная кислота. Комплексы с трехвалентными катионами (как La^{3+}) у всех комплексонов более прочные, чем с двухвалентными (Ca^{2+}), различия могут достигать нескольких порядков. Для ОЭДФ также характерно образование сложных ассоциатов полимерного типа. Выявлено, что биологическая активность комплексонов и комплексоноватов в ряде случаев не коррелирует с прочностью комплексообразования. Таким образом, невозможно проведение отбора препаратов на основе лишь их характеристик прочности комплексообразования, и необходимы экспериментальные исследования эффективности действия этих препаратов.

Нами изучено влияние комплексоноватов La^{3+} с ЭДТА (2 методики приготовления), ОЭДФ и цитрата лантана на генерацию АФК нейтрофилами при адгезии клеток и действии fMLP (рис. 9–10).

Выявлено, что действие комплексоноватов лантана с ЭДТА или ОЭДФ на генерацию клетками АФК более слабое, чем действие нитрата лантана при равном содержании ионов La^{3+} в препаратах, что может свидетельствовать о более замедленном высвобождении ионов La^{3+} из комплексоноватов. Установлено, что в использованных концентрациях нитрат не оказывает значительного влияния на активность нейтро-

филов, тогда как комплексоны и особенно лимонная кислота и без ионов лантана приводят к существенному понижению способности нейтрофилов генерировать АФК.

Заключение. Антагонисты Ca^{2+} ингибируют генерацию нейтрофилами АФК при активации клеток в процессе адгезии, действии хемоаттрактанта fMLP, индуктора фагоцитоза латекса и активатора протеинкиназы С РМА. Действие этих веществ не может быть объяснено только влиянием на уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Действие комплексоноватов лантана с ЭДТА или ОЭДФ на генерацию клетками АФК более слабое, чем действие нитрата лантана при равном содержании ионов La^{3+} в препаратах, что может свидетельствовать о более замедленном высвобождении ионов La^{3+} из комплексоноватов. Установлено, что в концентрации до 0,1 мМ нитрат не оказывает значительного влияния на активность нейтрофилов, тогда как комплексоны ОЭДФ и ЭДТА и особенно лимонная кислота и без ионов лантана приводят к существенному понижению способности нейтрофилов генерировать АФК.

Работа поддержана грантом БРФФИ (договор № Б11ВТ-007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко, Е.И. Влияние препаратов лантана на активность нейтрофилов / Е.И. Коваленко [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы междунар. науч. конф. – Минск: БГУ, 2012. – Ч. 1. – С. 302–304.
2. Долгушин, И.И. Нейтрофильные ловушки / И.И. Долгушин [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2(11), № 2–3. – С. 127.
3. Долгушин, И.И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина. – М.: Издательство РАМН, 2009. – 208 с.

*Поступила в редакцию 10.07.2012. Принята в печать 22.10.2012
Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.*