

## Влияние интерферона- $\alpha/\beta$ на транспорт и связывание ионов $\text{Ca}^{2+}$ в тимоцитах мыши

Е. В. Долгая, О. М. Рожманова, Л. Н. Стельмах,  
А. В. Миранский, Ю. Й. Кудрявец<sup>1</sup>

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины  
Ул. Богомольца, 4, Киев, 01024, Украина

<sup>1</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины  
Ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

*Для понимания роли ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции иммунного ответа исследовали влияние мышечного интерферона (ИФН)- $\alpha/\beta$  на транспорт и связывание  $\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах мыши. С помощью изотопных методов показано, что вход  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоциты достигал стационарного значения через 5 мин после начала воздействия ИФН и превышал уровень поглощения  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  контрольными клетками в среднем в 5 раз. В это же время количество связанного с поверхностью тимоцитов  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  уменьшалось в 2 раза по сравнению с контролем. В течение последующих 30 мин в активированных ИФН тимоцитах наблюдалось увеличение связывания  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  до контрольного уровня. Транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах зависел от концентрации ИФН в инкубационной среде. Максимальное поглощение  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  наблюдалось при концентрации ИФН 600 МЕ/мл. Блокатор потенциалуправляемых кальциевых каналов верапамил (30 мкМ), внесенный в инкубационную среду за 20 мин до ИФН, значительно уменьшал транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Деполаризация мембраны, обусловленная повышением  $[\text{K}^+]_0$  в 10 раз по сравнению с контролем (до 25 мМ), также снижала поток  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоциты. Полученные данные позволяют предположить, что поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в тимоциты под влиянием ИФН осуществляется через потенциалуправляемые кальциевые каналы.*

**Введение.** Интерфероны (ИФН) обладают широким спектром биологической активности. В частности, они регулируют иммунный ответ, выполняя роль первого сигнала при активации лимфоцитов. Связывание ИФН со специфическим рецептором на плазматической мембране запускает множество трансмембранных и внутриклеточных процессов, которые в конечном итоге приводят к активации клеток [1—3]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , выступая в качестве вторичного посредника, играют центральную роль в управлении этими событиями. Индуцированный интерферонами- $\alpha$ , - $\beta$ , и - $\gamma$  транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  исследован многими авторами в различных типах нормальных и трансформированных клеток [4—6]. Установлено, что повышение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в первые секунды после воздействия ИФН на клетку является необходимым усло-

вием перехода лимфоцитов в активированное состояние [2, 5]. В связи с этим значительный интерес представляет изучение механизмов транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в лимфоциты при воздействии на них ИФН.

Показано, что ИФН увеличивает абсолютную величину поверхностного заряда лимфоцитов [7]. Вследствие этого может изменяться концентрация связанных с плазматической мембраной ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Сведения о влиянии ИФН на связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с плазматической мембраной лимфоцитов отсутствуют. Исследование этого эффекта важно для понимания роли ИФН в регуляции потенциалуправляемых трансмембранных механизмов и мембраносвязанных ферментов.

Для выяснения роли ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции иммунного ответа в настоящей работе исследовали влияние мышечного ИФН- $\alpha/\beta$  на транспорт и связывание ионов  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах мыши.

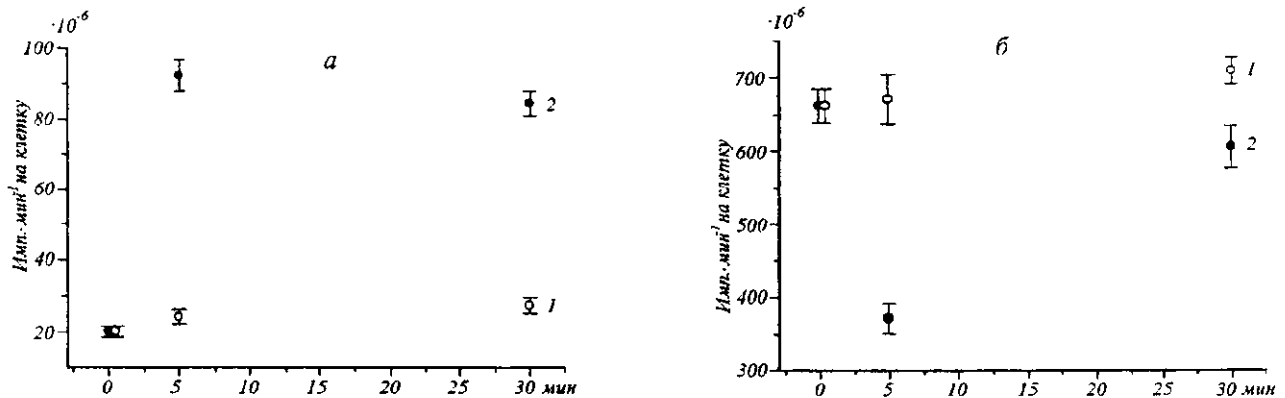


Рис. 1. Влияние мышинового ИФН- $\alpha/\beta$  на кинетику входа (а) и связывания (б) ионов кальция в тимоцитах мышцы: 1 — контроль; 2 — после воздействия ИФН (300 МЕ/мл)

**Материалы и методы.** Мышиный ИФН- $\alpha/\beta$  получали из Института патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины. Исходный раствор верапамила в спирте (100 мкМ, «Sigma», США) готовили непосредственно перед экспериментом и защищали от света.

**Выделение тимоцитов.** Тимоциты выделяли из ткани тимуса мышей восьминедельного возраста линии СВА и очищали центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина [8]. Клетки дважды отмывали сбалансированным солевым буфером (мМ): NaCl — 140, KCl — 2,5, CaCl<sub>2</sub> — 2,0, MgCl<sub>2</sub> — 1,0, трис-HCl — 10,0 (pH 7,4), глюкоза — 5,0 с помощью двукратного центрифугирования (10 мин, 400 g). Целостность плазматической мембраны исследуемых тимоцитов определяли по отсутствию окрашивания клеток трипановым синим. Во всех случаях количество тимоцитов с неповрежденной мембраной составляло не менее 90 %.

**Радиоизотопные измерения.** Тимоциты (10<sup>7</sup> клеток в 1 мл) инкубировали в сбалансированном солевом растворе, содержащем 10 мкКи/мл <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> («Amersham», Великобритания) и ИФН- $\alpha/\beta$  (100—3000 ЕД/мл) при температуре 37 °С. Через определенные интервалы времени несвязавшийся <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> отделяли методом гель-фильтрации. Для этого суспензию тимоцитов (100 мкл) пропускали через колонки (0,5 × 1,5 см) с СМ-сефадексом G-25, уравновешенные буфером (2,5 мМ KCl, 10,0 мМ трис-HCl (pH 7,4), 280 мМ глюкоза), и смывали с колонки 0,8 мл того же буфера. Элюат собирали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью ЖС-130 (5 мл).

Радиоактивность определяли на  $\beta$ -счетчике Ра-сбета («ЛКВ», Швеция). Для вытеснения ассоциированных с плазматической мембраной тимоцитов ионов <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> использовали LaCl<sub>3</sub> (0,1 мМ). Связывание <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> с плазматической мембраной определяли по разности счета в пробах с La<sup>3+</sup> и без него.

**Результаты и обсуждение.** В активированных ИФН- $\alpha/\beta$  тимоцитах наблюдался быстрый вход <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>. Этот вход достигал стационарного уровня через 5 мин после начала воздействия ИФН и превышал уровень поглощения <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> контрольными (неактивированными ИФН) клетками в среднем в 5 раз (рис. 1, а). В это же время количество связанного с плазматической мембраной <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> уменьшалось в 2 раза. В течение последующих 30 мин наблюдалось восстановление связывания <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> в активированных ИФН тимоцитах до контрольного уровня (рис. 1, б).

Транспорт <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> в тимоциты зависел от концентрации ИФН в инкубационной среде. Максимальное поглощение <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> наблюдалось при концентрации ИФН 600 МЕ/мл (рис. 2).

Блокатор потенциалуправляемых кальциевых каналов верапамил (30 мкМ), внесенный в инкубационную среду за 20 мин до ИФН, снижал вход <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> в тимоциты на 30—40 % (рис. 3, а). В присутствии верапамила ИФН- $\alpha/\beta$  практически не оказывал влияния на связывание <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> с плазматической мембраной.

При деполяризации мембраны, вызванной повышением концентрации ионов K<sup>+</sup> в инкубационной среде от 2,5 мМ (контроль) до 25 мМ, поток <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> в тимоциты уменьшался (рис. 3, б). Тоничность раствора при изменении [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> поддерживали

постоянной, соответственно изменяя концентрацию NaCl.

В наших экспериментах наблюдалась видовая специфичность ИФН — ИФН- $\alpha$  2b человека не изменял транспорта  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах мыши.

Как показали наши исследования, связывание мышинового ИФН- $\alpha/\beta$  с рецептором на поверхности тимоцитов индуцировало быстрый дозозависимый вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клеток. Деполаризация мембраны, вызванная повышением концентрации ионов калия в инкубационной среде, уменьшала его. Эти данные свидетельствуют о том, что вход  $\text{Ca}^{2+}$  в активированные ИФН тимоциты является потенциалозависимым звеном в процессе перехода этих клеток из  $G_0$ - в  $G_1$ -фазу клеточного цикла и может регулироваться изменениями мембранного потенциала.

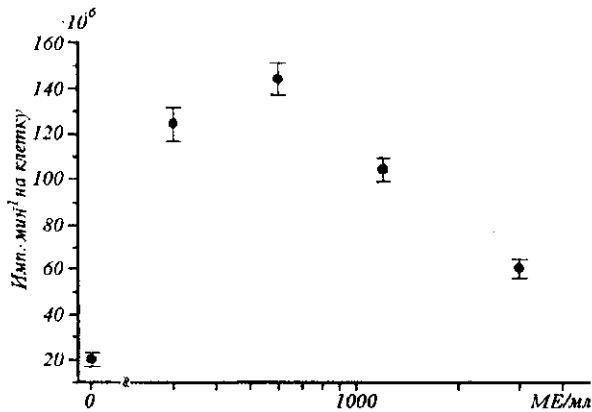


Рис. 2. Влияние различных концентраций мышинового ИФН- $\alpha/\beta$  на транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах мыши

Блокатор потенциалуправляемых кальциевых каналов верапамил также подавлял индуцированный ИФН транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Это позволяет предположить, что поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в тимоциты осуществляется через потенциалуправляемые кальциевые каналы. Сопоставляя результаты наших исследований с данными других авторов следует отметить, что активацию потенциалуправляемых кальциевых каналов при воздействии ИФН наблюдали в клетках линий RPMI 4788 [9], U937 [10] и CaKi-1 [11].

На протяжении первых 30 мин связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с плазматической мембраной тимоцитов, стимулированных ИФН, было меньше, чем в контрольных клетках. Функциональная роль ассоциированного с поверхностью плазматической мембраны кальция неизвестна. Однако можно предположить, что уменьшение связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с поверхностью клетки изменяет ее поверхностный заряд. Поскольку величина последнего эффективно модулирует функционирование потенциалозависимых транспортных механизмов [12] и мембраносвязанных ферментов [13], необходимо дальнейшее исследование связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с поверхностью тимоцитов под влиянием ИФН. Полученные в настоящей работе данные позволяют сделать вывод о том, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  играют важную роль на ранней стадии активации тимоцитов ИФН- $\alpha/\beta$ .

Работа поддержана Государственным Фондом Фундаментальных Исследований Украины (грант 5.4/321).

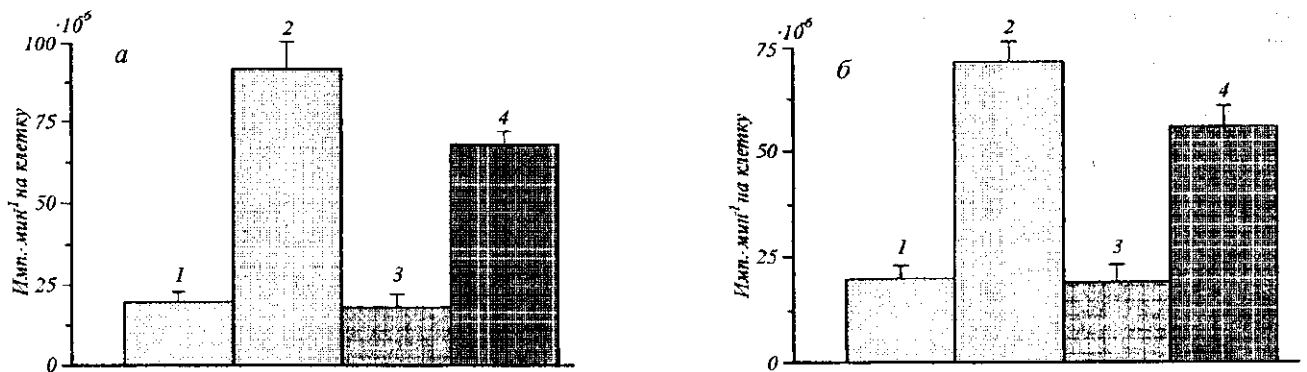


Рис. 3. Влияние верапамила (а) и повышения концентрации ионов калия в инкубационной среде (б) на индуцированный мышинным ИФН- $\alpha/\beta$  транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах мыши (а: 1 — контроль; 2 — ИФН (300 МЕ/мл); 3 — верапамил (30 мкМ); 4 — ИФН + верапамил; б: 1 — контроль (2,5 мМ КСl); 2 — ИФН (300 МЕ/мл); 3 — 25 мМ КСl; 4 — ИФН + 25 мМ КСl)

О. В. Долгая, О. М. Рожманова, Л. М. Стельмах,  
А. В. Миранский, Ю. Й. Кудрявец

Вплив інтерферону- $\alpha/\beta$  на транспорт та зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у тимоцитах миші

Резюме

Для розуміння ролі іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у регулюванні імунної відповіді вивчали вплив мишиного інтерферону (ІФН)- $\alpha/\beta$  на транспорт та зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  у тимоцитах миші. За допомогою ізотопних методів було показано, що вхід  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  у тимоцити досягав стаціонарного рівня через 5 хв від початку дії ІФН, п'ятиразово перевищуючи рівень поглинання  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  контрольними клітинами. Тим часом кількість зв'язаного  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  з поверхню тимоцитів зменшувалася вдвічі. Протягом наступних 30 хв спостерігалось відновлення зв'язування  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в активованих ІФН тимоцитах до контрольного рівня. Транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  у тимоцитах залежав від концентрації ІФН в інкубаційному середовищі. Максимальне поглинання  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  спостерігалось при концентрації ІФН 600 МО/мл. Блокатор потенціалокерованих кальцієвих каналів верапаміл (30 мкМ), доданий до інкубаційного середовища за 20 хв до внесення ІФН, значно зменшував транспорт  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Деполаризація мембрани, зумовлена підвищенням  $[\text{K}^+]_0$  у 10 разів порівняно з контролем (до 25 мМ), також зменшувала потік  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  у тимоцити. Отримані дані дозволяють зробити припущення, що надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у тимоцити під впливом ІФН здійснюється через потенціалокеровані кальцієві канали.

E. V. Dolgaya, O. M. Rozhmanova, L. N. Stelmakh,  
A. V. Miransky, Yu. I. Kudryavets

Effects of interferon- $\alpha/\beta$  on  $\text{Ca}^{2+}$  influx and binding in murine thymocytes

Summary

In order to determine the role of calcium in interferon (IFN)-induced immunomodulation, we investigated calcium transport and binding induced by murine IFN- $\alpha/\beta$  in murine thymocytes. By radiometric method, it was found that a rapid, more than 5-fold, increase in  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx developed and reached a plateau within 10 min. At the same time the amount of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  associated with the cell surface half decreased. During next 30 min the recovery of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  binding to control level in IFN-induced lymphocytes occurred.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in thymocytes was dose-dependent. The maximal increase in calcium influx was observed at the IFN concentration of 600 IU/ml. Pretreatment of thymocytes with a calcium channel blocker, verapamil, at the doses about 30  $\mu\text{M}$  for 20 min before IFN application significantly decreased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx. Depolarization of thymocytes up to 25 mM by increasing the extracellular  $\text{K}^+$  concentration resulted in complete inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Our data indicate that in murine thymocytes IFN-induced calcium influx occurred via voltage-operated calcium channels.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Смородинцев А. А., Иовлев В. И., Степанов А. Н. Интерферон // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1987 (Вирусология; Т. 13).
2. Эшмен Р. Ф. Активация лимфоцитов // Иммунология / Под ред. У. Пола.—М.: Мир, 1987.—Т. 1.—С. 414—469.
3. De Maeyer-Guignard J., De Maeyer E. Immunomodulation by interferons: recent developments // Interferon.—1985.—6.—Р. 69—91.
4. Singh V. K., Maheshwari R. K., Krisima G., Friedman R. M. Effects of interferon on calcium // The 2-5 A molecular and clinical aspects of the interferon-regulated pathway.—New York: Alan Liss. Inc., 1985.—Р. 351—356.
5. Martino G., Brambilla E., Filippi M., Martinelli V., Colombo B., Rodegher M., Comi G., Grimaldi L. M. Interferon-gamma activated calcium influx in peripheral blood lymphocytes from patients with primary and secondary progressive multiple sclerosis // J. Neurosurg. Psychiatry.—1996.—61, N 5.—Р. 515—517.
6. Aas V., Larsen K., Iversen J. G. IFN-gamma induces calcium transient and increases the capacitance calcium entry in human neutrophils // J. Interferon Cytokine Res.—1998.—18, N 3.—Р. 197—205.
7. Knight E., Korant Jr., Korant B. D. A cell surface alteration in mouse L cells induced by interferon // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1977.—74, N 2.—Р. 707—713.
8. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // J. Scand. Clin. Lab. Invest.—1968.—99, N 1.—Р. 77—80.
9. Iwagaki H., Fuchimoto S., Miyake V., Aoki H., Orita K. Interferon-gamma activates voltage-gated calcium channel in RPMI 4788 cells // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1988.—153, N 3.—Р. 1276—1281.
10. Klein J. D., McLeish K. R., Sonnenfeld G., Dean W. L. Potential mechanism of cytosolic calcium modulation in interferon-gamma treated U937 cells // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1987.—145, N 3.—Р. 1295—1300.
11. Hansen A. B., Bouchelouche P. N., Lillevang S. T., Andersen C. B. Interferon-gamma increases cellular calcium ion concentration and inositol 1,4,5-triphosphate formation in human renal carcinoma cells: relation to ICAM-1 antigen expression // Br. J. Cancer.—1994.—69, N 2.—Р. 291—298.
12. Костюк П. Г. Кальций и клеточная возбудимость.—М.: Наука, 1986.—С. 5—26.
13. Russell A. J., Fersht F. R. Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge // Nature.—1987.—328, N 6130.—Р. 496—500.

УДК 577.352:612.017

Поступила в редакцию 22.06.99