

4 Горькавая А.Ю. Показатели физиологического развития и адаптации сердечно-сосудистой системы студентов медуниверситета во Владивостоке / А.Ю. Горькавая, С.Н. Триголий, О.У. Кириллов // Гигиена и санитария. – 2009. - №1. – С. 58-60.

Тұжырым

Жоғары оқу орнында оқитын студент қыздардың денсаулық коэффициентінің және жүрек-тамыр, тыныс жүйелерінің, морфологиялық және функциялық көрсеткіштерінің өзгеруі пайда болады. Бұл өзгерістер жаңа ауданда өмір сүруімен және оқу үрдісінің өсу жүктемелеріне бейімделуі нәтижесінде пайда болады.

Summary

Process of adaptation to training in high school is accompanied by change of morphological and functional indicators of cardiovascular, respiratory systems, factor of health and is connected with duration and residing conditions in the given region and increase in intellectual loading.

Сабырбек Ж. Б.¹, Ким Ю.А.², Тулеуханов С.Т.¹, Даниленко М.П.³

АСЦИТТИ КАРЦИНОМДЫ ЭРЛИХ ЖАСУШАЛАРЫНДАҒЫ ЭКЗОЦИТОЗДЫ ЗЕРТТЕУДІҢ ӘДІСТЕМЕЛІК ТӘСІЛДЕРІ

¹әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ., Қазақстан;

²РҒА жасуша биофизикасы институты, Пушино қаласы, Ресей;

³Давид Бен-Гурион атындағы университет, Беер Шева қ., Израиль

Статьяда асцитті карциномды Эрлих жасушасындағы экзоцитоз процесін кальцилі сигнализация индукторларын пайдалана отырып тіркеу тәсілдерінің жаңа әдістемесі келтірілген.

Кіріспе

Экзоцитоз – биологиялық жүйелердегі молекулалық механизмі соңына дейін анықталмаған фундаментальді құбылыстардың бірі. Экзоцитоз механизмінің везикулярлық механизмі болжамы бойынша, бұл процесс барысында цитоплазмада секреторлы түйіршіктер ауысуы, олардың жасушалық мембраналардағы адгезиясы, сол мембраналармен кірігуі болады. Экзоцитоз кезеңінің айтарлықтай зерттелген кезеңі түйіршікті және плазмалық мембраналардың кірігіп, содан кейін түйіршіктер құрамының жасушадан тыс кеңістікке шығарылуы болып табылады.

Экзоцитоз барысында мембраналардың кірігу процесін зерттеу мақсатында асцитті карциномды Эрлих жасушасы (АКЭ) мен тышқандардың перитонеальді макрофагтарында экзоцитозды тіркеудің әдістемелік тәсілдеріне өңдеу жасалынды.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу объектілері АКЭ өрімделген жасушалары, ионды каналдар, сигналды трансдукция жүйелері және кірігу ақуыздары. Экзоцитозды зерттеуді екінші нысанмен салыстыру үшін иммунды жүйе жасушалары – тышқандардың перитонеальді макрофагтары алынды. АКЭ жасушалары 7 тәулік бойы тышқандардың жасушаларына егіліп алынды. Тышқандардың құрсақ қуысынан жасуша суспензиясын сорып алған соң оларды құрамы 20 мМ HEPES, рН 7,4 Хенкс ерітіндісімен екі қайтара жуып шықтық. Жасушалардың соңғы концентрациясы 10^7 кл/мл.

Жасушалардың инкубациялық ортасы АКЭ үшін Хенкс және Хепес (20 мМ) рН 7,4 және макрофагтар үшін фосфатты-тұзды (20 мМ) рН 7,4 сәйкес болып табылады.

Флуоресцентті өлшемді Perkin Elmer MPF – 44В спектрофлуориметрде 37⁰С температурасында және үнемі араластыра отырып жасалынды.

Флуоресцентті зонд ретінде акридинді қызғылт сарғыш (қозу толқынының ұзындығы = 490 нм, флуоресценция = 530 нм) пайдаланылды.

Экзоцитоздың индукторлары:

1 - жасушадан гистаминнің шығуына ықпал ететін [1], деңгейі арнайы әдіспен анықталған [2] 48/80 компоненті (Sigma, USA)

2 - A23187 ионофорлары және иономицин (Sigma, USA)

3 - температура болды.

Жасушалардың пішіні мен көлемінің экзоцитозға байланысты процестер нәтижесінде өзгеруі тік бұрышта жасуша суспензиясындағы жарықтың жайылуы бойынша тіркелді.

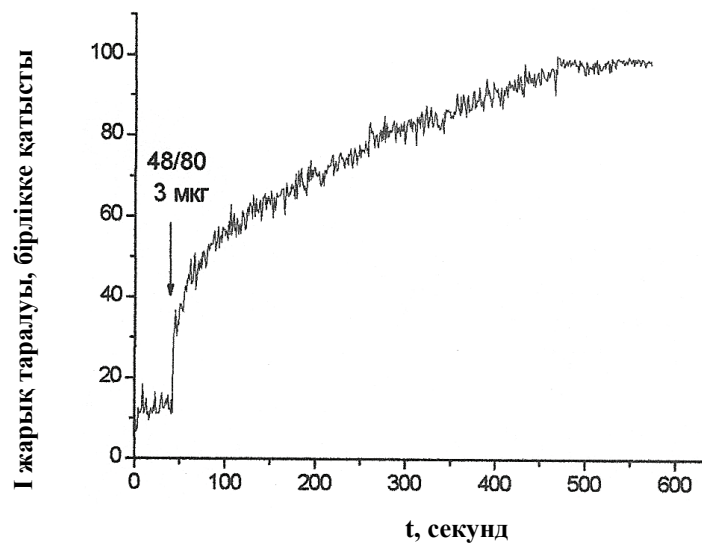
Экзоцитозды стимуляциялауға жасушаның жауабы LSM 510 Carl Zeiss Jena GERMANY конфокальді лазерлі сканирлеуші микроскопта бақыланып тіркелді.

Нәтижелер және талқылау

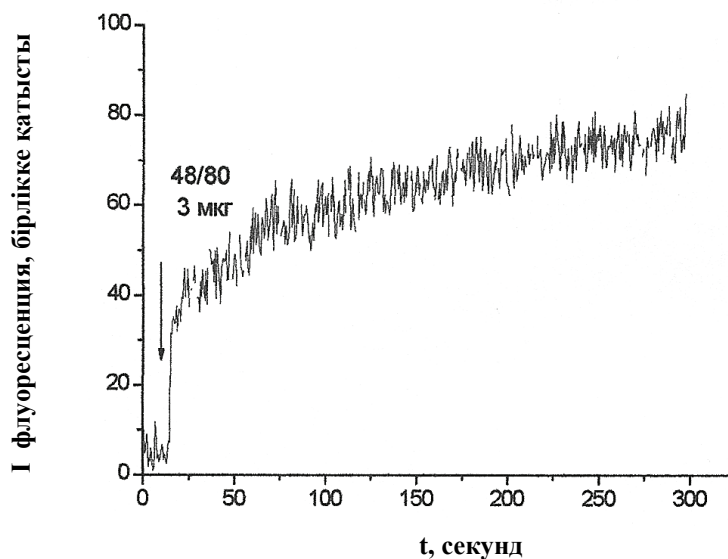
АКЭ жасушаларында экзоцитозды нақты уақытта тіркеудің үш тәсілі іріктеліп алынды. Олардың алғашқыларының негізінде жасушалық суспензиядағы жарық таралуын тіркеу кезіндегі экзоцитоз барысында

жасушалардың пішіндері мен көлемінің өзгеруі жатыр (сурет 1А). Суретте экзоцитоз индукторы 48/80 компонент [3] АКЭ жасушалары суспензиясындағы жарық таралуының олардың пішіні мен көлемінің өзгеруіне байланысты жылдам өтуі көрсетілген. Бірақ, бұл бір ғана параметр зерттеліп отырған процестің көрсеткіші бола алмайды, себебі мөлшерінің өзгерген түрдегі жасушаның жауабы жасуша ішінде болатын көптеген процестердің, соның ішінде экзоцитоздың, сигналды трансляция жүруінің нәтижесі болуы мүмкін.

Айтарлықтай нақтылау тәсіл ішкі рН ортаның секреторлы түйіршіктерінің басым бөлігі әлсіз қышқыл [4, 5], соның нәтижесінде негізгі флуоресцентті зондтар (мысалы, акридинді қызғылт сарғыш) осы түйіршіктер ішінде әлсіз жинақталады. Жасушалар ішіндегі флуоресценция қарқындылығы жоғары концентрация салдарынан әлсіреп қалады, одан басқа ол айтарлықтай гидрофильді бола бастайды және цитозольға шығу қабілетін жоғалтады. Экзоцитоз барысында бояғыш босатылып шығып хромофордың араласуынан флуоресценция қарқындылығы мен спектрі өзгеріп жасуша суспензиясындағы секреторлы процесті спектрофлуориметрде тіркеуге мүмкіндік береді (сурет 1Б). Бұл тәсіл синаптосомнан және изоляцияланған пресинаптикалық ұштарынан нейромедиаторлар мен нейроэкзоцитоздың босап шығуын зерттеу үшін салыстырмалы түрде жақында ғана пайдаланыла бастады [6-8].

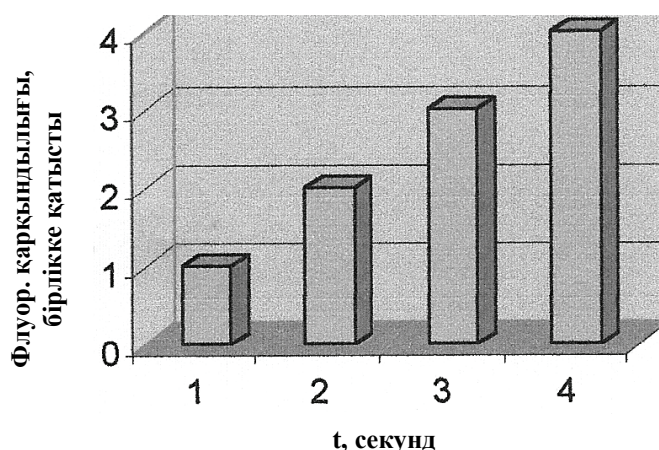


Сурет 1 А - АКЭ жасушалары суспензиясындағы 48/80 компонентін ендіру кезіндегі 620 нм толқын ұзындығында жарықтың таралуы қарқындылығының өзгеруі. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл.



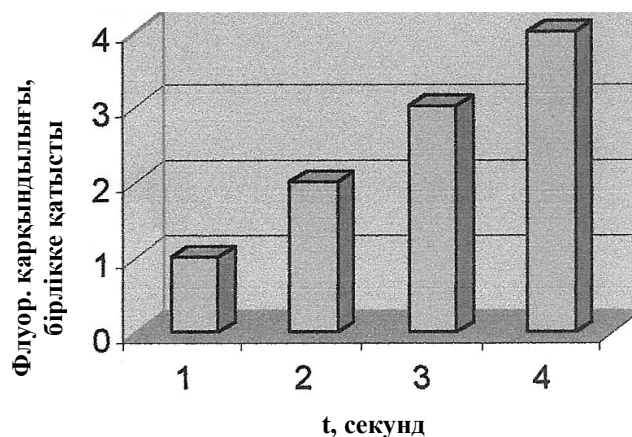
Сурет 1 В - 48/80 компонентін ендіруден кейінгі АКЭ жасушаларынан ағып шыққан акридинді қызғылт сарғыш флуоресценция қарқындылығының өзгеруі. Жасуша концентрациясы 10^7 / мл, $\lambda_{\text{возб.}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 530$ нм.

Экзоцитоз құбылысының стандартты әдістемесі бөлініп шығатын заттарды титрлеу анализіне, соның ішінде о-фталді альдегид пен гистаминнің анализіне негізделген [2]. Мұнда флуориметрде тіркеуге болатын боялған кешен пайда болады (сурет 1В).



Сурет 1 В - 48/80 компонентінің ықпалымен (5 мкг/мл) АКЭ жасушаларынан гистаминнің шығуы. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{фл.}} = 365$ нм. Индукторды енгізуден кейінгі сынамааларды іріктеу уақыты: 1 - 0 сек, 2 - 15 сек, 3 - 25 сек, 4 - 40 сек.

1 В суретінде көрсетілгендей 48/80 компоненті гистамин молекулаларының шығуына ықпал етіп жасушадағы экзоцитоз процесінің басталғандығының нәтижесі болып табылады. Жасушалардың инкубациялық ортасының температурасы экзоцитоздың индукторы бола алады (сурет 2).



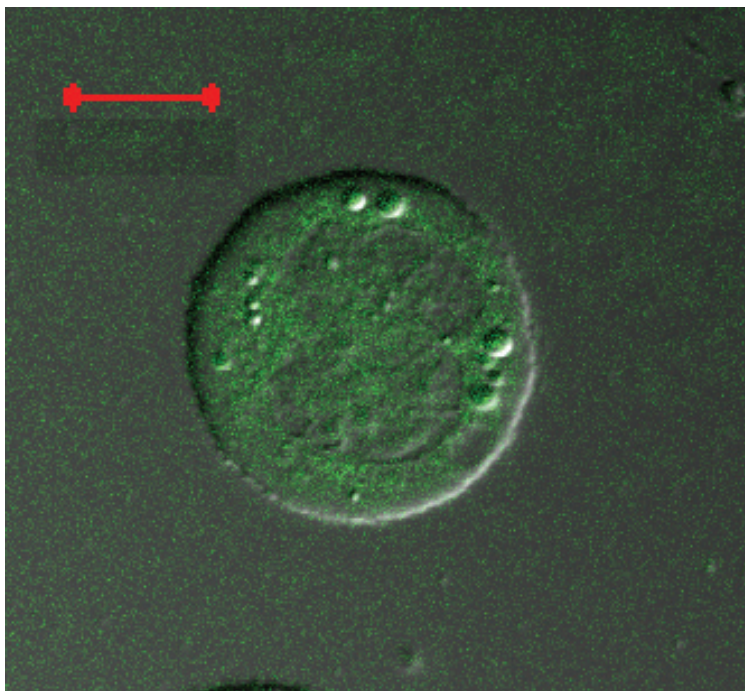
Сурет 2 - Температураның ықпалымен АКЭ жасушаларынан гистаминнің шығуы. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{фл.}} = 365$ нм. Сынама температурасы: 1 - 16 °С, 2 - 24 °С, 3 - 37 °С, 4 - 37 °С + 48/80 компоненті.

Гистаминнің шығуын өлшейтін сынаманы іріктеу, зерттеу параметріне сай жасушаның стационарлы жағдайына жеткен соң ғана жасалынды. Алдын-ала жасалынған флуориметрлік өлшемдер температура артуынан болған экзоцитозда жасушадан шыққан гистаминнің деңгейі стационарлы жағдайға 5 минут қалған соң жеткендігін көрсеткен. Сондықтан, барлық үш параметрлер – флуоресценцияның о-фталді альдегидпен қарқындылығының артуы (жасушадан шыққан гистамин молекулаларымен комплекс құрайды), жасушадан шығудың және жарық таралуы қарқындалығының нәтижесіндегі жасушадан тыс ортада акридинді қызғылт сарғыштың 48/80 компонентіне жауабы экзоцитоз процесін бейнелейді.

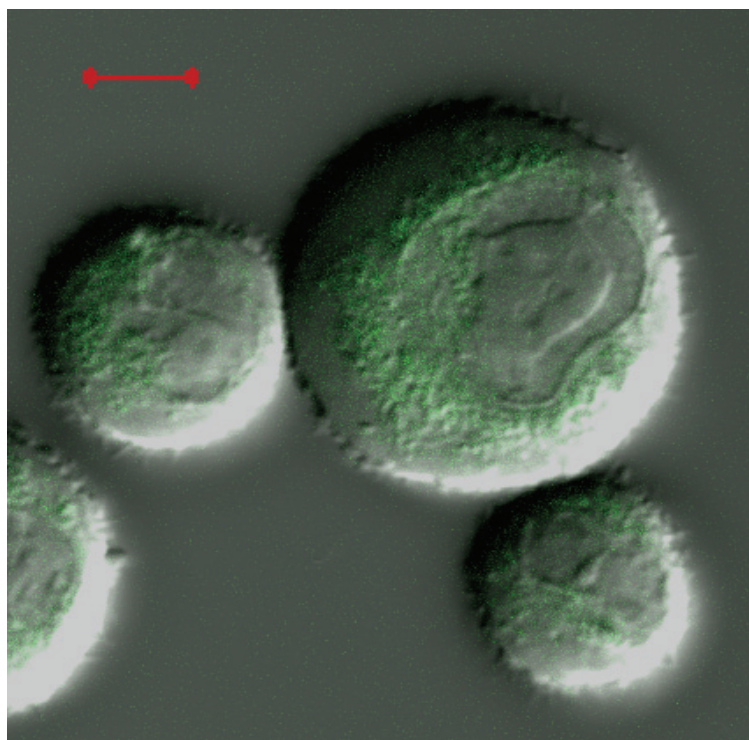
Экзоцитоз процесіне байланысты жасушаның жауабын акридинді қызғылт сарғышпен өңделген асцитті карциномды Эрлих жасушаларын [9], конфокальді сканирлеуші микроскоптың көмегімен көріп бақыладық (сурет 3 А, Б).

Жасушаларды 48/80 компонентімен өндегеннен кейін бірқатар түйіршіктердің (интергранулярлы) кірігуі байқалады, содан соң плазматикалық мембраналармен визикула түзетін дифузия процесі жүреді және жасушадан тыс кеңістікке бояғыш шығарылады. Жасуша ішіндегі заттардың таралуын зерттеу экзоцитоз процесінің соңғы кезеңінде кофокальді микроскоп көмегімен жүргізілді. Кофокальді микроскопия экзоцитоз процесінің тек бастапқы және соңғы этаптарын тіркеуге ғана мүмкіндік береді. Бұл құбылыстың динамикасын (цитоплазмада вакуольдердің пайда болу процесітерін қосқанда. Олардың кірігуін, жасуша шетіне қозғалуын және жасушадан тыс кеңістікке шығуын) люминисцентті микроскоп көмегімен бақыладық.

48/80 компонентінің әсері сигналды жүйенің G-ақуыздарын белсендіруге негізделген. 48/80 компонентімен белсендірілген экзоцитоз ферменттерді белсендіру медиаторы болып табылатын кальцидің кальмодулинмен байланыстырылуы сатысында үзіліп қалуы мүмкін. R24571 (кальмидазолиум) препараты оны ақуыздармен байланыстырады (сурет 4).

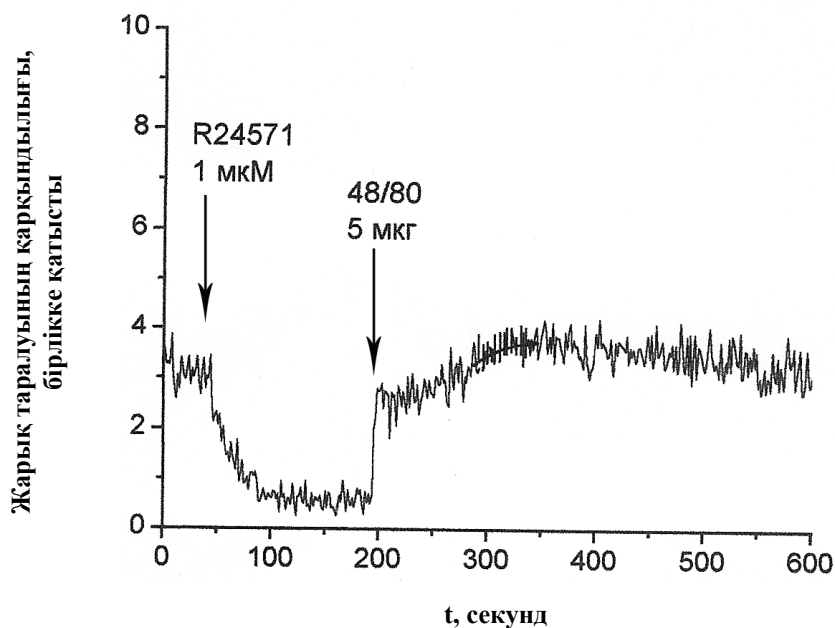


Сурет 3А - Акридинді қызғылт сарғышпен өңделген (2 мкМ) асцитті карциномды Эрлих жасушалары. $\lambda_{\text{қозу}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{сәулелену}} = 530$ нм. Конфокальді лазерлі микроскопия. Белгі 10 мкм.

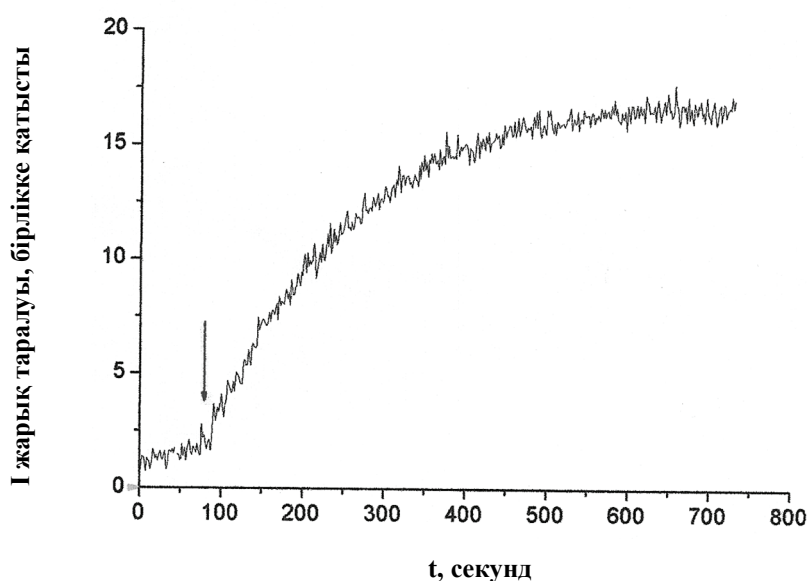


Сурет 3Б - Акридинді қызғылт сарғышпен (2 мкМ) және 48/80 компонентімен (3 мкг) өңделген асцитті карциномды Эрлих жасушалары. Конфокальді лазерлі микроскопия. Белгі 5 мкм.

Экзоцитоз индукторлары ретінде 48/80 компонентінен бөлек (сурет 1А, Б, В) және тағы да басқа іс-әрекеттері жасушаішілік кальцидің концентрациясының өзгеруіне байланысты спецификалық ионофорлар, мысалы А23187 және иономицин [2, 10, 11] пайдаланылды (сурет 5).



Сурет 4 - АКЭ жасушалары суспензиясындағы жарық таралу қарқындылығының 48/80 компоненті және R24571 препаратын кезектестіре ендірудегі өзгерістер. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{таралу}} = 620$ нм.

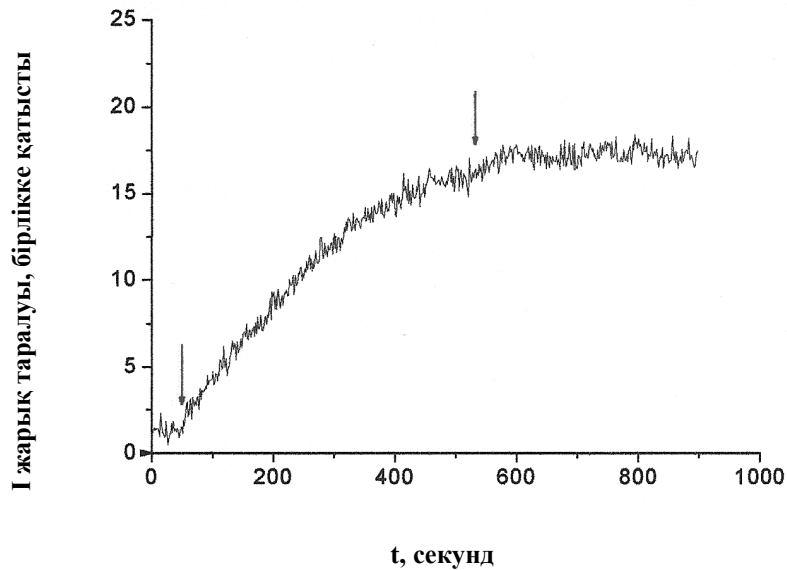


Сурет 5 - АКЭ жасушалары суспензиясындағы жарық таралу қарқындылығының экзоцитоздың кальцилі A23187 (0,2 мкМ) ионофорымен индукциясында өзгеруі. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{таралу}} = 620$ нм.

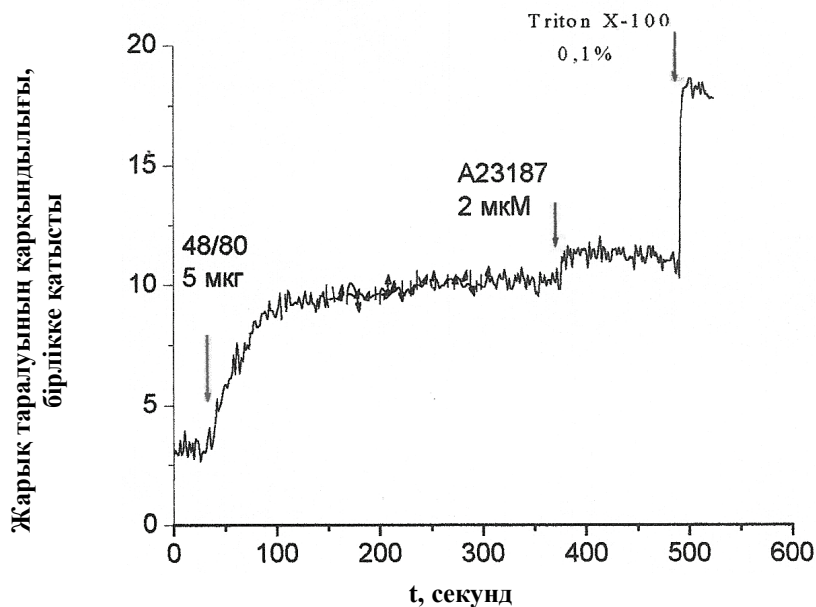
Иономицин мен ионофор A23187 Ca^{2+} ионына байланысты селективті, сондықтан да әр түрлі жүйелерде секрецияларды зерттеуде кең қолданылады.

Иономицин жасушадан гистаминнің концентрациялы-тәуелді босап шығуын туындатады [11]. A23187 ионоформен және иономицинмен индукцияланатын босап шығу цитотоксикалық емес және метаболикалық ингибиторлармен және ферментті ядролармен тежеледі. Ca^{2+} қорын мобилизациялауға негізделген (сурет 6).

7 суретте 48/80 компоненті және A23187 экзоцитозды қосу үшін Ca^{2+} әр түрлі шығу көздерін пайдаланады. A23187 сыртқы ортадан жасушаға кальцидің енуіне ықпал етеді, сол уақытта 48/80 компоненті иондардың жасушаішілік деподан фосфоинозитидті жолдардың белсенділігі арқылы шығуына ықпал жасайды.



Сурет 6. Экзоцитоз индукциясы барысындағы АКЭ жасушалары суспензиясындағы жарық таралуы қарқындылығының 48/80 компонентін (5 мкг/мл) және иономицинді (0,5 мкМ) кезектестіре ендіру кезіндегі өзгерістер. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{таралу}} = 620$ нм.



Сурет 7 - Экзоцитоз индукциясы барысындағы АКЭ жасушалары суспензиясындағы жарық таралуы қарқындылығының 48/80 компонентін (5 мкг/мл) және A23187 кезектестіре ендіру кезіндегі өзгерістер. Процесс біткен соң жасушалар Triton X-100 көмегімен жойылды. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{таралу}} = 620$ нм.

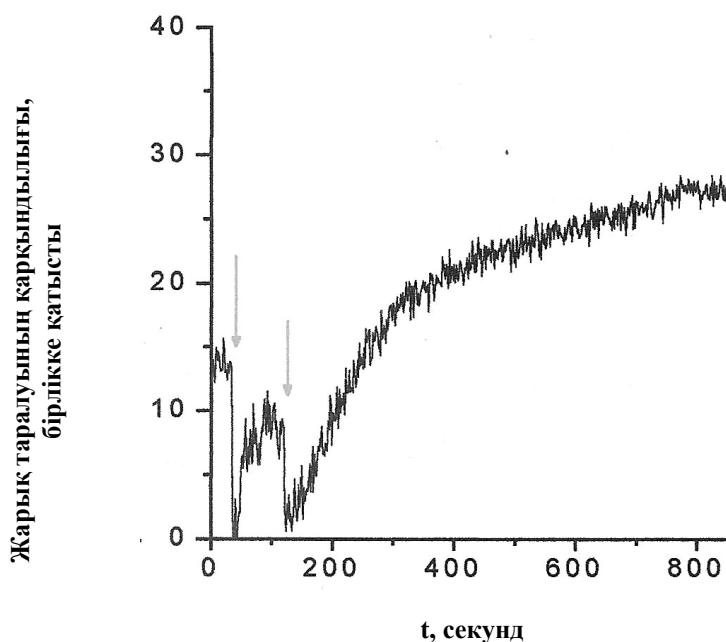
Бұл дигидропиридинді типті сезімтал кальцилі L-каналдар шамасын ингибидтейтін нифедипиннің әрекетімен расталады [10] (сурет 8).

АКЭ қолайлы және жақсы зерттелген жасуша моделі ретінде (жасуша ішілік сигналды жүйе мағынасында) пайдаланылды. Салыстыру үшін, көбінесе, эндо- және экзоцитоз процесі және мембраналардың кірігуі өзіне тән, тышқандардың перитонеальді макрофагтары алынды.

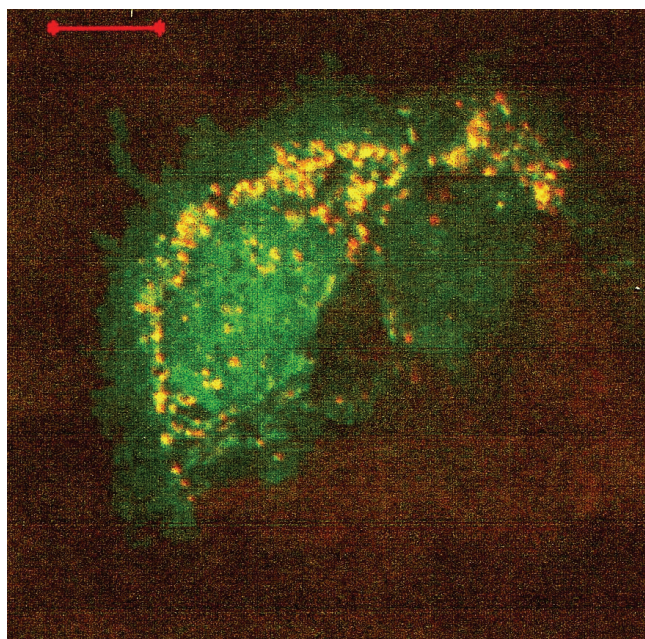
9 А, Б суреттерінде акридинді қызғылт сарғышпен өңделген тышқандардың перитонеальді макрофагтарының жасушаларының микрофотографиясы көрсетілген.

Акридинді қызғылт сарғыш мономерлерде жасыл түсті (эмиссия максимумы 520 нм) және олигомерлерде сары-қызғылт сарғыш (эмиссия максимумы 600 нм) болып флуоресцияланады. Жасыл түс болып жарқырауы экзоцитоз процесі барысында жасушадан бояғыштың шығуының нәтижесі болып табылады.

Қызғылт сарғыш-сары флуоресценция жасуша ішілік рН пен түйіршіктер қозғалысының қалпын сақтауға мүмкіндік береді.

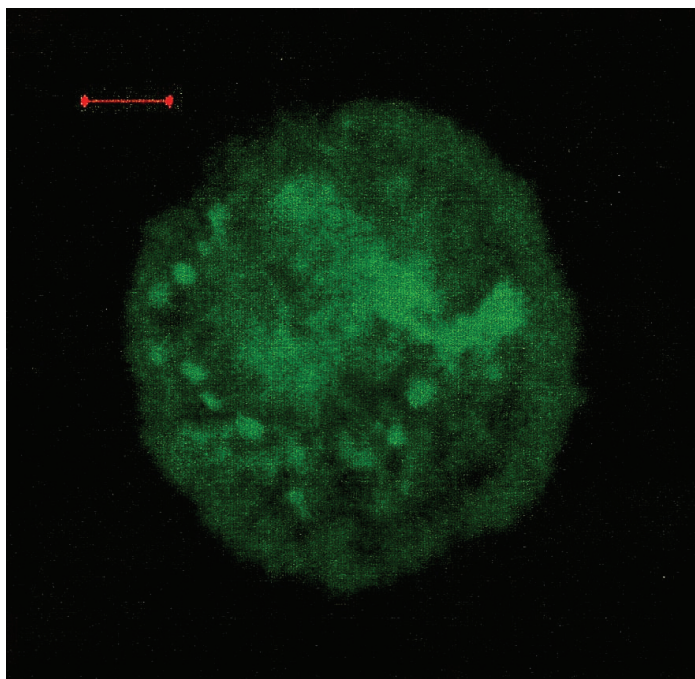


Сурет 8 - Экзоцитоз индукциясы барысындағы АКЭ жасушалары суспензиясындағы жарық таралуы қарқындылығының нифедипин (5 мкг/мл) және А23187 (1,2 мкМ) кезектестіре ендіру кезіндегі өзгерістер. Жасуша концентрациясы 10^7 /мл, $\lambda_{\text{таралу}} = 620$ нм.



Сурет 9 А - Акридинді қызғылт сарғышпен (2 мкМ) боялған перитонеальді макрофаг жасушалары. Бақылау, белгі – 10 мк.

Акридинді қызғылт сарғышты пайдалану секреторлы көпіршіктер мен плазматикалық мембраналармен кірігуі бола ма деген сұрақтың жауабын бере алмайды. Сондықтан да секреттелген өнімдерді титрлеуде титрат ретінде катионды липофильді флуоресцентті бояғыш ТМА-DPH жиі пайдаланылады [12-14]. Сулы суспензияда бұл бояғыш тек плазматикалық жасушалармен ғана байланысады. ТМА-DPH фракциясы тепе-теңдік жағдайындағы мембранада іске қосылуы соңғыларының концентрациясына пропорциональді. Экзоцитоз барысында жекелеген секреторлы түйіршіктердің және көптеген интертүйіршіктердің кірігуі болады. Ол сыртқы ортамен қарым-қатынас кезінде мембраналып беткейдің айтарлықтай үлкеюіне және соның нәтижесінде флуоресценция қарқындылығының өзгеруіне әкеліп соғады [13].



Сурет 9 В - Акридинді қызғылт сарғышпен (2 мкМ) боялған және 48/80 компонентімен (3мкг/мл) өңделген перитонеальді макрофаг жасушалары. Белгі – 5 мк.

Қорытынды

1. Асцитті карциномды Эрлих жасушаларындағы экзоцитоз процесін әр түрлі кальцилі сигнализация индукторларын пайдалана отырып тіркеу тәсілдерінің әдістемесі өңделді.
2. Кальцилі сигналды жүйенің кейбір ингибиторларының экзоцитоз процесіне әсері көрсетілді.

Әдебиеттер

- 1 Rothschild A.M. *Mechanisms of histamine release by compound 48/80* // *Br J Pharmacol*, 1970. – Vol. 38(1). – P. 253–262.
- 2 Parhurst A. Shore, Alan Burkhalter, Viktor H. Cohn // *Journal of Cell Biology*, 1959. - Vol. 127. - P. 182-186.
- 3 Yukishige Kawasaki, Takako Saitoh et all // *Biophysica Acta*, 1991. - Vol. 1067. - P. 71-80.
- 4 Anderson R.G.W., Orci, L. // *Journal of Cell Biology*, 1988. - Vol. 106. - P. 539-543.
- 5 Holz R.W. // *Annu. Rev. Physiol.*, 1986. - Vol. 48. - P. 175-189.
- 6 Zoccarto F., Cavalli L., Alexandre. // *J. Neurochem*, 1999. - Vol. 72. - P. 625-633.
- 7 Melnik V.I. Bikdulatova L.S., Bazyan A.S. // *Neurochem. Res.*, 2001. - Vol. 26. - P. 549-554.
- 8 Васим Т.В., Федорович С.В., Конев С.В. // *Биофизика*, 2003. - Vol. 48, 5. - P. 880-883.
- 9 Richard P. Haugland / *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 2002. - P. 269-278, 489-491.
- 10 *Biomol. Signal Transduction. Sixth Edition*. 1997.
- 11 Pearce F.L. // *Progress in Medicinal Chemistry*, 1982. - Vol. 19. - P. 60-101.
- 12 Johan W.M. Heemskerk, Marion A.H. Feijge et all. // *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993. - Vol. 1147. - P. 194-204.
- 13 Christian Bronner, Yves Landry et all. // *Biochemistry*, 1986. - Vol. 25. - P. 2149-2154.
- 14 Martial Kubina, Francois Lanza et all. // *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987. - Vol. 901. - P. 138-146.

Резюме

В статье приведены новые методические подходы регистрации процесса экзоцитоза в клетках асцитной карциномы Эрлиха с использованием индукторов кальциевой сигнализации.

Summary

In the paper, the new method of the registration approach of the exocytosis process in Ehrlich ascitic carcinomatous cancer cells is shown by means of calcium signalization inductor.