

## УДК 577.1

*В. С. Мартынюк, Р. Ш. Х. Абу Хадда*

### РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ МОРФИНА И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

В ранних исследованиях было показано, что тучные клетки в условиях *in vitro* в ответ на действие переменного магнитного поля (ПеМП) реагируют повышением дегрануляции [1]. Установлено, что порог чувствительности тучных клеток к ПеМП лежит в диапазоне фоновых уровней – 20-50 нТл. Одновременно с этим, показано, что фармакологический препарат хромогликат натрия, используемый в качестве ингибитора дегрануляции, не проявляет своих биологических свойств при обработке суспензии тучных ПеМП частотой 8 Гц [2]. Это указывает на то, что первичные механизмы биологического действия ПеМП и хромогликата натрия имеют разную природу, однако они реализуются на уровне структурно-функциональной организации биологических мембран.

Морфин является активатором дегрануляции тучных клеток, а молекулярно-клеточные механизмы биологического действия данного вещества принципиально отличаются от хромогликата. В связи с этим целью данной работы явилось исследование активирующего влияния кальция и морфина на тучные клетки при одновременном воздействии ПеМП.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали суспензию перитонеальных тучных клеток 6-ти месячных белых беспородных крыс. Животных декапитировали, после чего быстро проводили смывание тучных клеток из перитонеальной полости 10 мл теплой (37<sup>0</sup>С) физиологической средой, состоящей из физиологического раствора и хлорида кальция в концентрации 1 мМ/л. Контрольные и опытные образцы суспензии тучных клеток инкубировали в течение часа при 37<sup>0</sup>С, после чего проводили определение уровня дегрануляции тучных клеток.

Количественная оценка степени дегрануляции тучных клеток производилась по методу С.И.Шпак и В.А.Проценко (1987) [6] через час после инкубации тучных клеток с активаторами и начала магнитно-полевого воздействия.

Переменное магнитное поле создавали с помощью колец Гельмгольца. Источником тока служил генератор переменного тока Г6-28. Контроль индукции создаваемого поля осуществляли с помощью микротесламетра Г-79. Опытные образцы, помещенные в пластиковые пробирки объемом 2 мл, подвергали воздействию КНЧ ПеМП частотой 8 Гц 25 мкТл в течение 1 часа. В качестве контроля использовали образцы суспензии тучных клеток, которые находились в

**РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ МОРФИНА  
И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

---

той же лаборатории при фоновых уровнях ПемП, характерных для данной лаборатории 20-40 нТл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами вариационной статистики.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В настоящее время известно, что процессу дегрануляции тучных клеток предшествует активация фосфолипазы С с образованием 1,2-диацилглицеролов (1,2-ДАГ) и  $IP_3$ , которые активируют протеинкиназу С и мобилизуют внутриклеточные ионы кальция, соответственно. Увеличение содержания свободного цитозольного  $Ca^{2+}$  осуществляется из двух источников - за счет его выделения внутрицитоплазматическими структурами и путем усиленного переноса из внеклеточной среды через внешнюю клеточную мембрану. Поэтому можно ожидать, что в экспериментах *in vitro* наличие ионов кальция в инкубационной среде будет повышать чувствительность и реактивность тучных клеток на действие разнообразных факторов, в том числе и на действие ПемП. В связи с этим для более детального изучения влияния ионов кальция на реакцию тучных клеток на действие ПемП частотой 8 Гц индукцией 25 мкТл проведены исследования зависимости уровня дегрануляции от концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в инкубационной среде в диапазоне 0,2 - 1000 мк/л. Параллельно с этим для сравнения проводили исследования реакции тучных клеток в инкубационных средах без присутствия ионов кальция.

Как видно из рисунка 1, действие ПемП на уровень дегрануляции значительно более выражен у тучных клеток, в инкубационной среде которых присутствуют ионы кальция.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что в результате воздействия низкочастотного магнитного поля повышается проницаемость ионов  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану. Дополнительная  $Ca^{2+}$ -зависимая активация фосфолипаз должна приводить к расщеплению мембранных фосфолипидов с образованием лизофосфолипидов, которые, подобно 1,2-ДАГ обладают фузогенными свойствами и облегчают слияние мембраны секреторных гранул с внешней клеточной мембраной, что в конечном итоге ускоряет процесс дегрануляции.

Как видно из рисунка 1 стимулирующее действие ПемП на дегрануляцию тучных клеток, инкубируемых в физиологическом растворе, надежно воспроизводится. Присутствие ионов  $Ca^{2+}$  в инкубационной среде оказывает стимулирующее действие, которое характеризуется ярко выраженной концентрационной зависимостью. Хорошо видно, что в исследуемом концентрационном диапазоне с повышением концентрации ионов  $Ca^{2+}$  уровень спонтанной дегрануляции повышается. Такое поведение тучных клеток хорошо соответствует современным представлениям о регуляторной роли ионов  $Ca^{2+}$  и является еще одним доказательством важной роли данных ионов в регуляции секреции гранул тучными клетками.

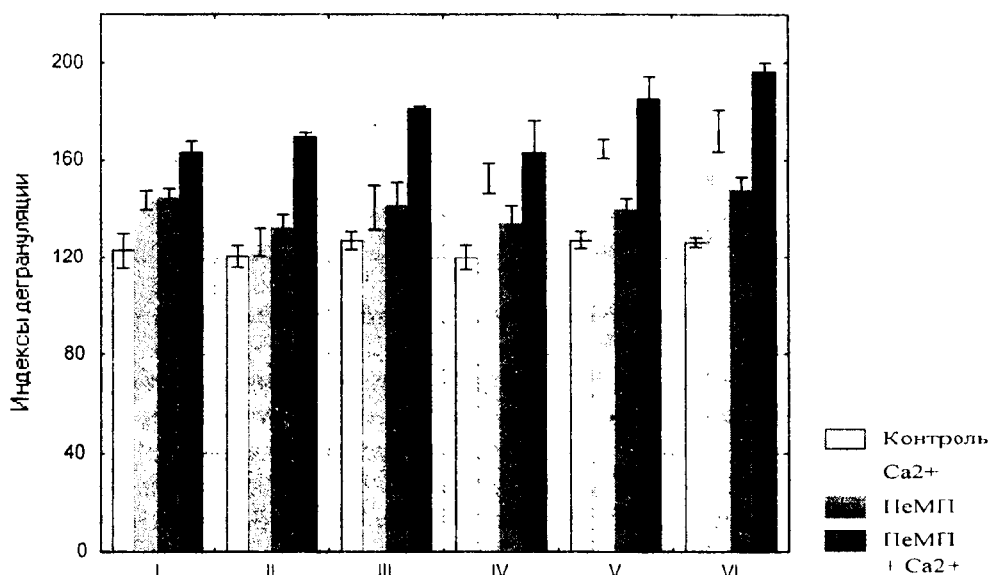


Рис. 1 Индексы дегрануляции тучных клеток после их 1-часовой инкубации *in vitro* в физрастворе, в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  разной концентрации, а также при воздействии ПеМП 8 Гц 25 мкТл.

Обозначения к рисунку:

Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной среде мкМ/л: I-0.2; II-0.5; III - 1.0; IV – 200; V - 500; VI - 1000.

Экспериментальные группы образцов: Контроль – контроль, физраствор;  $\text{Ca}^{2+}$  - контроль, присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в среде; ПеМП – воздействие магнитным полем, физиологический раствор; ПеМП+ $\text{Ca}^{2+}$  – воздействие магнитным полем, присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в среде

Сравнение результатов стимулирующего действия ПеМП и ионов кальция показывает, что влияние ПеМП частотой 8 Гц 25 мкТл на дегрануляцию тучных клеток, инкубируемых в физиологическом растворе, эквивалентно добавлению ионов кальция в инкубационную среду в концентрации около 0.5-1 мкМ/л. Данный факт позволяет предположить, что в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной среде дегрануляция тучных клеток осуществляется за счет внутриклеточных резервов  $\text{Ca}^{2+}$ , локализованных в эндоплазматической сети и митохондриях. Воздействие ПеМП стимулирует дополнительный выход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму из внутриклеточных депо, которое по своей величине является эквивалентом величине спонтанно проникающего  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды через цитоплазматическую мембрану, когда концентрация данного иона во внешней среде составляет около 0.5-1 мМ/л. Дальнейшие исследования данного вопроса, вероятно, позволят перейти от качественного и полуколичественного описания биологических эффектов ПеМП концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной среде в образцах, не подвергающихся

**РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ МОРФИНА  
И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

воздействию магнитного поля, уровень спонтанной дегрануляции увеличивается, тогда как стимулирующий эффект ПеМП по отношению к данному контролю несколько понижается. Это хорошо видно на рисунке 2. Учитывая сложность биологических объектов, а также нелинейный характер ответных реакций, можно предположить, что диапазон концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 – 1.0 мкМ/л является неким концентрационным «окном», в котором эффективность действия ПеМП для тучных клеток является максимальной.

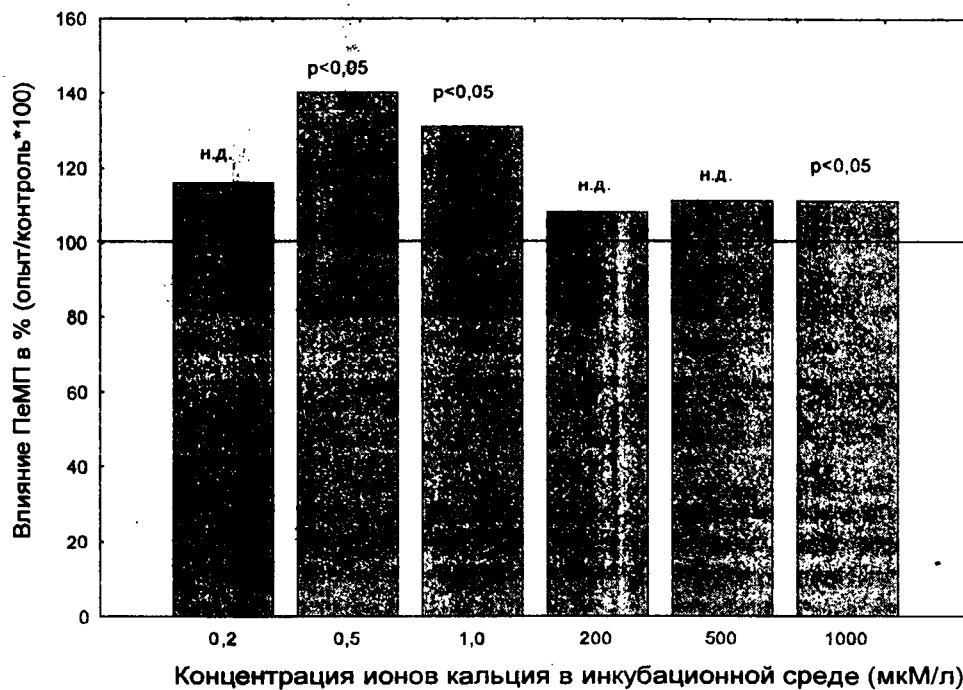


Рис. 2. Зависимость влияния ПеМП 8 Гц 25 мкТл на дегрануляцию тучных клеток от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной среде (в % по отношению к контрольным образцам, инкубируемым в тех же условиях в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ ). Время инкубации и одновременной экспозиции в ПеМП – 1 час. 100% соответствует значениям дегрануляции в контрольных образцах.

Таким образом полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективность действия ПеМП на тучные клетки в условиях *in vitro* зависит от концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в межклеточном пространстве. Эта зависимость носит немонотонный характер с максимумом в области 0.5 – 1.0 мкМ/л.

Как известно, морфин, связываясь с рецепторами на поверхности клеток, приводит к повышению содержания цАМФ и снижению содержания в цитоплазме цАМФ. цАМФ в тучных клетках играет роль «сдерживающего фактора», ингибируя процесс дегрануляции. Таким, образом морфин, снижая эффективность цАМФ-зависимого контроля дегрануляции, стимулирует активность цГМФ и  $\text{Ca}^{2+}$ -

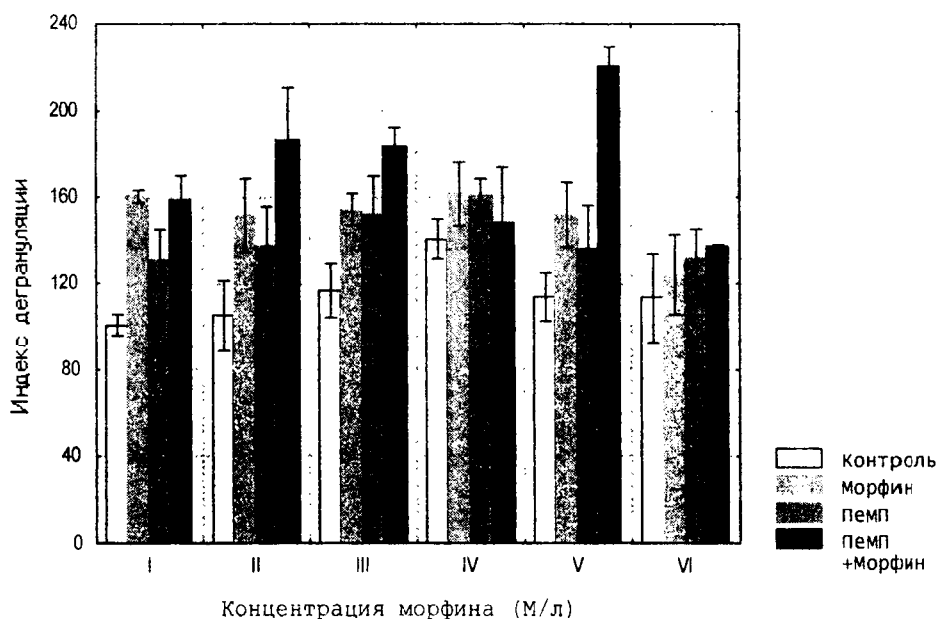


Рис. 3. Индексы дегрануляции тучных клеток после их 1-часовой инкубации *in vitro* в физрастворе в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$  М/л и активатора дегрануляции – морфина разной концентрации, а также при воздействии ПеМП 8 Гц 25 мкТл.

Обозначения к рисунку:

Концентрация морфина в инкубационной среде М/л: I –  $10^{-9}$ ; II –  $10^{-8}$ ;  
III –  $10^{-7}$ ; IV –  $10^{-6}$ ; V –  $10^{-5}$ ; VI –  $10^{-4}$ .

Экспериментальные группы образцов:

Контроль – контроль, физраствор+ $Ca^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$  М/л;

Морфин - контроль, физраствор+ $Ca^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$  М/л; присутствие морфина в среде;

ПеМП – воздействие магнитным полем, физраствор+ $Ca^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$  М/л,

ПеМП+Морфин – воздействие магнитным полем, физраствор+ $Ca^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$  М/л; присутствие морфина в среде.

На рисунке 3 представлены результаты исследования активности тучных клеток в присутствии морфина разных концентраций в условиях магнитно-полевой обработки. Обращает внимание тот факт, что в исследуемом концентрационном диапазоне активирующее действие морфина реализуется уже при очень низких его концентрациях и мало изменяется при дальнейшем повышении концентрации.

Анализ результатов влияния ПеМП на тучные клетки, инкубируемые в присутствии активатора дегрануляции – морфина, показывает, что повышение

**РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ МОРФИНА  
И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

разных концентрациях ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Возможно это связано с тем, что данная серия экспериментов с морфином проводилась в физиологическом растворе, содержащем ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации близкой к физиологической  $10^{-3}$  М/л. Как видно из результатов (рис. 2) эффективность ПеМП по отношению к тучным клеткам в условиях, когда концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в среде близка к физиологической, несколько ниже. Тем не менее, здесь также можно говорить о «концентрационных окнах», в диапазоне которых имеет место более выраженная реакция на ПеМП, чем в других диапазонах концентраций активатора дегрануляции тучных клеток – морфина (рис. 4).

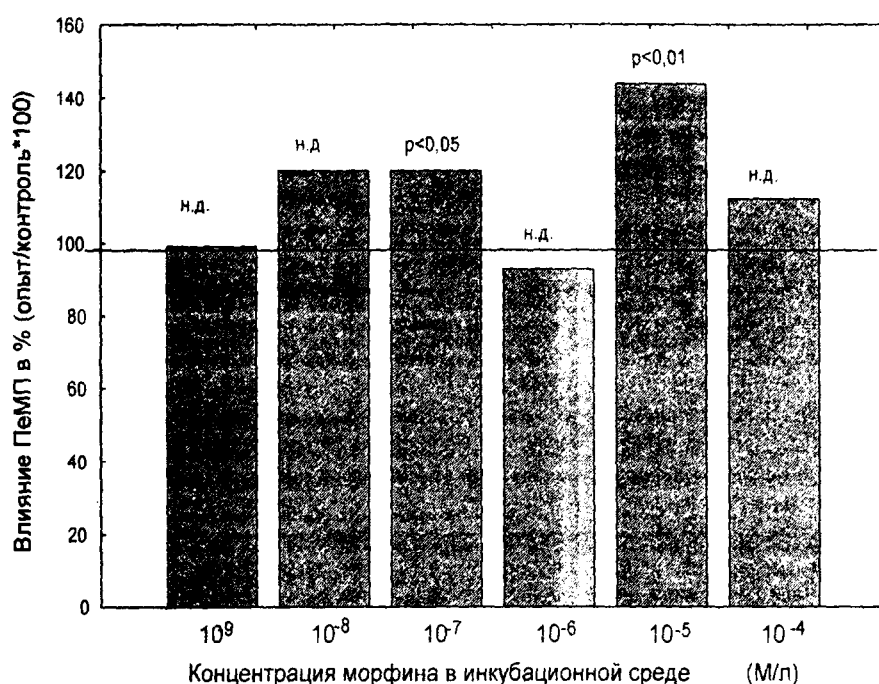


Рис. 4. Зависимость влияния ПеМП 8 Гц 25 мкТл на дегрануляцию тучных клеток от концентрации активатора дегрануляции - морфина в инкубационной среде (в % по отношению к контрольным образцам, инкубируемых в тех же условиях). Время инкубации и одновременной экспозиции в ПеМП – 1 час. 100% соответствует значениям дегрануляции в контрольных образцах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективность действия ПеМП на тучные клетки зависит от концентрации активатора дегрануляции - морфина. Эта зависимость носит немонотонный характер с максимумами в области  $10^{-7}$  и  $10^{-5}$  М/л.

### **ВЫВОДЫ**

1. Реакция тучных клеток на ПеМП в условиях *in vitro* зависит от концентрации ионов кальция в межклеточной среде. Концентрационная зависимость реактивности

тучных клеток на действие ПеМП в диапазоне концентраций ионов кальция  $0 - 10^{-3}$  М/л имеет немонотонный характер с максимумом  $0.5 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-6}$  М/л.

2. В исследуемом концентрационном диапазоне ( $10^{-9} - 10^{-4}$  М/л) активирующее действие морфина реализуется уже при очень низких его концентрациях и мало изменяется при дальнейшем повышении концентрации. В условиях *in vitro* эффективность действия ПеМП на тучные клетки зависит от концентрации активатора дегрануляции - морфина. Эта зависимость носит немонотонный характер с максимумом в области  $10^{-7}$  и  $10^{-5}$  М/л.

### Список литературы

1. Абу Хадда Р.Ш.Х., Мартынюк В.С. Реакция тучных клеток на действие переменных магнитных полей в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2001. – Т. 14. - № 2. – С. 3-7.
2. Абу Хадда Р.Ш.Х., Мартынюк В.С., Ибрагимова Н.Д. Реакция тучных клеток на действие хромогликата натрия и переменного магнитного поля в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2001. – Т. 14. - № 3. – С. 117-120.

*Поступила в редакцию 08.09.2002 г.*