

Regulatorna vloga Ca^{2+} ionov pri sproščanju mediatorjev vnetja iz mastocitov

The regulatory role of Ca^{2+} ions in the secretion of inflammatory mediators from mast cells

Ilonka Ferjan

Povzetek: Mastociti so celice vezivnega tkiva, ki imajo ključno vlogo pri vnetju in alergijskih reakcijah. Po imunološki ali neimunološki stimulaciji sproščajo številne posrednike (mediatorje) vnetja. Sproščanje mediatorjev je v veliki meri odvisno od koncentracije prostih Ca^{2+} ionov v celici. Po aktivaciji mastocita se prosta koncentracija Ca^{2+} v celici močno zveča, kar vpliva na sproščanje vnetnih mediatorjev iz mastocitov. Spremembe proste koncentracije Ca^{2+} v celici so odvisne od aktivnosti nekaterih ionskih izmenjevalnih sistemov v mastocitu; Na^+/Ca^{2+} -izmenjevalca, Na^+/K^+ - ATPaze ter Ca^{2+} -ATPaze. Aktivnost teh izmenjevalcev je odvisna od koncentracije zunajceličnih in znotrajceličnih Ca^{2+} ionov. Številne zdravilne učinkovine in endogene spojine vplivajo na koncentracijo zunajceličnih in znotrajceličnih Ca^{2+} ionov ter na aktivnost ionskih izmenjevalnih mehanizmov mastocita. Kombinirano delovanje izmenjevalnih mehanizmov mastocita lahko pripomore pri spremenjenem sproščanju mediatorjev med vnetno ali alergijsko reakcijo.

Ključne besede: mastociti, Ca^{2+} ioni, ionski izmenjevalni mehanizmi mastocitov, sproščanje mediatorjev vnetja

Abstract: Mast cells play a central role in inflammatory and allergic reactions. In response to immunologic or non-immunologic stimuli they release a variety of inflammatory mediators. The secretion of the mediators is strongly dependent on the concentration of the cytosolic calcium. Immunologic or nonimmunologic stimulation of mast cells increases intracellular concentration of free Ca^{2+} and thus influences on the mediators release from mast cells. The changes of intracellular free Ca^{2+} depend on the activity of Na^+/Ca^{2+} - exchanger, Na^+/K^+ - ATPase and Ca^{2+} -ATPase of mast cell. Several drugs and endogenic compounds can modify the concentration of intracellular free Ca^{2+} ions by influencing the activity of the exchange mechanisms of mast cell. Combined actions of these exchange mechanisms serve to change mediators release from mast cells in inflammatory or allergic reactions.

Key words: mast cells, Ca^{2+} ions, ionic exchangers of mast cells, secretion of inflammatory mediators

1 Uvod

Mastociti (tkivni bazofilci) so celice vezivnega tkiva, ki imajo ključno vlogo pri procesu vnetja in pri alergičnih reakcijah (1,2). Plazmina membrana mastocitov vsebuje specifične membranske receptorje, ki imajo visoko afiniteto za vezavo imunoglobulina IgE (3,4). Povezava dveh molekul IgE z antigenom povzroči imunološko aktivacijo celice. Na membrani mastocita so pa poleg receptorjev za vezavo IgE protiteles prisotni tudi številni drugi receptorji za vezavo endogenih in eksogenih spojin, ki lahko povzročijo neimunološko sproščanje mediatorjev vnetja (5,6,7). Med neimunološke sproščevalce sodijo bazični sproščevalci; mono-, di- in poliamini (spojina 48/80) ter peptidi, kalcijeve ionofore, lektini (concanavalin A) in citokini (interlevkini) ter rastni dejavniki (živčni rastni dejavnik – NGF).

Po aktivaciji mastocitov z različnimi imunološkimi (kompleks antigena in dveh IgE protiteles) ali neimunološkimi (številne endogene ali eksogene spojine) stimulusi sproščajo mastociti številne kemijske posrednike (mediatorje) vnetja. Mediatorje vnetja delimo v dve skupini. V prvo skupino štejemo tiste spojine, ki so ves čas shranjene v zrnih celic (histamin, serotonin, eozinofilni kemotaktični faktor, nevtrofilni kemotaktični faktor, lizosomski encimi) in se iz njih sprostijo po aktivaciji celice z ustreznim stimulusom. Drugo skupino mediatorjev vnetja pa sestavljajo spojine, ki nastajajo v mastocitu med procesom vnetja in se nato tudi sproščajo iz mastocita. Mednje sodijo: arahidonska kislina, prostaglandini, prostaciklini, citokini (interlevkini), rastni dejavniki (živčni rastni dejavnik).

Pri procesu sproščanja mediatorjev vnetja imajo pomembno vlogo kalcijevi ioni. Sproščevalce mediatorjev vnetja lahko razdelimo na tiste, ki potrebujejo za svoje delovanje zunajcelične kalcijeve ione (Ca^{2+}) in tiste, ki niso povsem odvisni od zunajceličnih kalcijevih ionov, njihovo delovanje pa zavisi od znotrajcelične koncentracije prostih kalcijevih ionov (Ca^{2+}). V prvo skupino sproščevalcev prištevamo imunološke sproščevalce, lektine, ionofore, citokine (interlevkine) in rastne dejavnike (živčni rastni dejavnik). V drugo skupino sproščevalcev pa sodijo neimunološki polibazični sproščevalci – poliamini (spojina 48/80) in peptidi.

2 Mehanizem sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocita

Vezava sproščevalca na membrano mastocita preko aktivacije proteina G aktivira encime (fosfolipazo C, proteinsko kinazo C) v membrani mastocita, ki imajo pomembno vlogo pri mehanizmu sekrecije vnetnih mediatorjev iz mastocita (4,10).

Aktivacija fosfolipaze C povzroči razgradnjo fosfatidilinizitola (8,11). Pri tem nastanejo naslednji metabolični produkti: diacilglicerol (DAG), fosfatidilna kislina in inozitol trifosfat (IP_3). IP_3 sproži odprtje kalcijevih kanalov v plazemski membrani in s tem vdor Ca^{2+} v citoplazmo mastocita in dvig koncentracije prostih Ca^{2+} v citoplazmi. IP_3 povzroči tudi sprostitvev Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikuluma (ER) v citoplazmo in tudi na ta način zveča koncentracijo prostih Ca^{2+} v mastocitu. DG aktivira proteinsko kinazo C, ki omogoča fosforilacijo proteinov. To ima pomembno vlogo pri delovanju mikrotubulov in mikrofilamentov in tako tudi pri premikanju granul z mediatorji vnetja k plazmini membrani, kar omogoča kasnejše zlitje membrane granul z plazmino membrano mastocita in proces eksocitoze.

Osnovni stimulus za sproščanje mediatorjev vnetja iz aktiviranih mastocitov je povečana koncentracija znotrajceličnih prostih Ca^{2+} (12). Kratkotrajnemu zvečanju znotrajceličnih prostih Ca^{2+} sledi odstranitev Ca^{2+} iz citoplazme v celične zaloge (membranske zaloge za Ca^{2+} , endoplazmatski retikulum) ali v izvencelično tekočino (13,14). Pri uravnavanju proste koncentracije Ca^{2+} v celici imajo pomembno vlogo specifični na membrano vezani proteini ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - izmenjevalni sistem, Ca^{2+} - ATPaza ter Na^+/K^+ - ATPaza), ki skrbijo za transport Na^+ , K^+ in Ca^{2+} v citoplazmo celice in iz nje (15). Omenjeni transportni proteini uravnavajo znotrajcelično koncentracijo prostih Ca^{2+} pri številnih evkariotskih celicah.

3 Transportni proteini, ki skrbijo za uravnavanje koncentracije Ca^{2+} v celicah.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - izmenjevalni sistem.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - izmenjevalec je reverzibilni transportni protein, ki omogoča izmenjavo treh Na^+ skozi celično membrano za en Ca^{2+} (16,17). V fizioloških razmerah $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - izmenjevalec transportira Na^+ iz zunajceličnega prostora, kjer je njihova koncentracija večja v citoplazmo, kjer je koncentracija Na^+ manjša. Transport Na^+ v smeri nižjih koncentracij daje izmenjevalcu gonilno moč za transport Ca^{2+} v

smeri proti koncentracijskemu gradientu, torej ven iz celice. Če se spremeni smer koncentracijskega gradienta za Na^+ , izmenjevalec deluje v obratni smeri in transportira Na^+ iz celice in Ca^{2+} v celico. Smer delovanja izmenjevalnega sistema je torej odvisna od koncentracije Na^+ in Ca^{2+} v celici in v mediju, kjer se celica nahaja.

Na^+/K^+ - ATPaza.

Na^+/K^+ - ATPaza je transmembranski encim, ki je odgovoren za aktivni transport Na^+ iz celice in K^+ v celico (18). Na ta način se vzdržuje membranski potencial celice. Transport Na^+ in K^+ pri tem poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta. Zato je za ta proces črpanja ionov potrebna energija, ki se tvori pri hidrolizi ATP molekul.

Če se aktivnost Na^+/K^+ - ATPaze zmanjša, se koncentracija Na^+ v celici zveča. Zvečana koncentracija znotrajceličnih Na^+ aktivira $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - izmenjevalec in povzroči zamenjavo znotrajceličnih Na^+ za zunajcelične Ca^{2+} . Kot posledica tega se zveča znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , kar ima lahko za posledico aktivacijo številnih celičnih encimov in različnih celičnih procesov.

Ca^{2+} - ATPaza.

Ca^{2+} -ATPaza je encim, ki se nahaja na plazmini membrani celice, kot tudi v celici na membrani endoplazmatskega retikuluma. Ca^{2+} -ATPaza skrbi za aktivni transport Ca^{2+} iz citoplazme v celične zaloge (celična membrana, endoplazmatski retikulum, mitohondriji), kot tudi iz celice v zunajcelično tekočino. Pri tem potujejo Ca^{2+} proti koncentracijskemu gradientu za Ca^{2+} . Ker Ca^{2+} -ATPaza omogoča prehod Ca^{2+} v smeri od nižje koncentracije k višji koncentraciji, je zato potrebna energija, ki se sprošča pri hidrolizi ATP molekul (19). Gre torej za energetsko odvisen aktivni proces.

4 Pomen Ca^{2+} pri procesu sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocita

V mastocitu je v stanju mirovanja koncentracija prostih Ca^{2+} zelo nizka (100 nmol/L) (21). Po aktivaciji mastocitov z imunološkim ali z neimunološkim sproščevalcem pride v mastocitu do kratkotrajnega zvečanja koncentracije prostih Ca^{2+} v celici (12,20), kar povzroči sproščanje številnih mediatorjev vnetja. Večja koncentracija znotrajceličnih Ca^{2+} vpliva na številne celične funkcije, kot so fosforilacija specifičnih proteinov, aktivacija celičnih encimov in aktivacija mikrofilamentov, ki potiskajo zrnca z mediatorji vnetja k celični membrani. Sledi proces zlitja membrane zrnca s plazmino membrano in sprostitvev mediatorjev vnetja iz zrnca v zunajcelični prostor.

Večina kalcija v mastocitih (>99%) je vezanega na proteine v citoplazmi celice ali shranjenega v celičnih zalogah (13,14,22). Največja zaloga Ca^{2+} v mastocitih je endoplazmatski retikulum (ER). Na membrani ER se nahajajo receptorji za IP_3 , ki nastane po aktivaciji celice s sproščevalcem vnetja. Vezava IP_3 na receptorje na plazmino membrano celice ali na ER v celici sproži odprtje kalcijevih kanalov v membrani ER ter plazemski membrani in s tem dvig koncentracije prostih Ca^{2+} v citoplazmi, kar vodi v sproščanje vnetnih mediatorjev.

5 Vzdrževanje nizke koncentracije prostih Ca^{2+} pri neaktiviranih mastocitih

Po vsaki aktivaciji mastocita s sproščevalcem, kateri sledi zvečanje intracelularne proste koncentracije Ca^{2+} , se mora koncentracija prostih Ca^{2+} v celici hitro znižati. Pri tem je pomemben transport Ca^{2+} iz citoplazme celice v endoplazmatski retikulum oziroma v zunajcelično tekočino. Tako se vzpostavi ponovno nizka koncentracija prostih Ca^{2+} v celici. Pri tem imajo podobno, kot pri številnih drugih celicah tudi pri mastocitu pomembno vlogo specifični na membrano vezani proteini (Ca^{2+} -ATPaza, Na^+/K^+ - ATPaza in Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalni sistem), s pomočjo katerih se Ca^{2+} odstrani iz citoplazme (15).

Ca^{2+} - ATPaza.

Ca^{2+} -ATPaza omogoča aktivni transport Ca^{2+} iz citoplazme mastocita in tako znižuje koncentracijo prostih Ca^{2+} v celici (20). V mastocitih sta dve vrsti Ca^{2+} -ATPaze. Prva vrsta se nahaja na citoplazmatski membrani mastocita, druga vrsta pa na membrani endoplazmatskega retikuluma (12). Tako prehaja Ca^{2+} iz citoplazme v celične zaloge (celična membrana, endoplazmatski retikulum, mitohondriji), kot tudi iz celice v zunajcelično tekočino (19).

Na^+/K^+ - ATPaza in Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalni sistem

V stanju mirovanja mastocita ima pomembno vlogo koncentracija Na^+ v mastocitu (15 mM) in v zunajcelični tekočini (134 mM) v kateri se mastocit nahaja. Na^+/K^+ - ATPaza omogoča aktivni transport Na^+ iz celice in K^+ v celico in tako vzdržuje visoko koncentracijo Na^+ v izvencelici tekočini. Ca^{2+} iz citoplazme mastocita se zato lahko zamenjajo z Na^+ iz medija s pomočjo Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalnim sistemom, ki se nahaja na plazmini membrani mastocita (18, 19). Na ta način se lahko koncentracija Ca^{2+} v citoplazmi močno zniža.

6 Mehanizmi, ki so vpleteni pri spremembi intracelularne koncentracije prostih kalcijevih ionov v mastocitu po delovanju različnih spojin.

Številne endogene spojine in zdravilne učinkovine lahko vplivajo na spremembo znotrajcelične proste koncentracije Ca^{2+} .

Intracelularna koncentracija prostih Ca^{2+} se lahko zveča kot posledica:

- 1) vstopa Ca^{2+} iz zunajcelične tekočine v celico (23,24).
Tako delujejo številni imunološki in neimunološki sproščevalci vnetnih mediatorjev (17,25).
- 2) sprostitve Ca^{2+} iz znotrajceličnih vezavnih mest (9).
Številne bazične spojine (peptidi in spojina 48/80) lahko preko zanje specifičnih vezavnih mest aktivirajo encim fosfolipazo C. IP_3 , ki pri tem nastaja povzroči zvečanje znotrajcelične proste koncentracije Ca^{2+} , kar sproži proces sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocitov.
- 3) inhibicije privzema Ca^{2+} v intracelularne zaloge (22).
Privzem Ca^{2+} v zaloge poteka s pomočjo transportnih proteinov

Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalnega sistema in Ca^{2+} -ATPaze. Lipofilne zdravilne učinkovine (antipsihotiki in antidepresivi) v večjih koncentracijah lahko inhibitorno vplivajo na omenjene transportne sisteme in na ta način zavro privzem Ca^{2+} v njihove zaloge. Tako se zveča koncentracija prostih Ca^{2+} v celici, posledica česar je lahko sproščanje vnetnih mediatorjev iz mastocitov (26,27). V eksperimentalne namene se za inhibicijo Ca^{2+} -ATPaze uporablja tapsigargin (22).

- 4) inhibicije encima Na^+/K^+ - ATPaze.

Če se aktivnost Na^+/K^+ - ATPaze zmanjša, to povzroči kopičenje Na^+ v mastocitu (18,19). S pomočjo Na^+/Ca^{2+} - izmenjevalnega sistema se nato Na^+ iz citoplazme izmenjuje s Ca^{2+} iz zunajcelične tekočine ali iz celičnih zalog, kar zveča znotrajcelično koncentracijo prostih Ca^{2+} in to je stimulus za sproščanje vnetnih mediatorjev.

Med zdravili, ki se uporabljajo kot inhibitorji Na^+/K^+ - ATPaze so poznani kardiotionični glikozidi. Kardiotionični glikozidi preko inhibitornega učinka na Na^+/K^+ - ATPazo lahko potencirajo proces sproščanja mediatorjev vnetja, ki ga povzroči tako imunološka, kot neimunološka aktivacija mastocitov (19).

Po drugi strani pa nekatere zdravilne učinkovine (antipsihotiki ali antidepresivi) lahko zaradi svoje velike lipofilnosti inhibirajo sproščanje Ca^{2+} iz znotrajceličnih vezavnih mest. Zato se koncentracija prostih Ca^{2+} v citoplazmi mastocita po imunološki ali neimunološki stimulaciji ne more ustrezno zvečati, da bi prišlo do sprostitve mediatorjev vnetja iz mastocita. Na ta način lahko zgoraj omenjene spojine zavrejo proces sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocitov (26,27).

7 Sklep

Sprememba proste koncentracije Ca^{2+} v mastocitu ima pomembno vlogo pri sproščanju mediatorjev vnetja. Številne endogene spojine kot tudi zdravilne učinkovine lahko na različne načine preko spremembe proste koncentracije Ca^{2+} v celici vplivajo na proces sproščanja mediatorjev vnetja iz mastocita in na ta način potencirajo ali inhibirajo vnetni odgovor organizma.

8 Literatura

1. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 2000;96(13):4028-38.
2. Kimata M, Inagaki N, Kato T, Miura T, Serizawa I, Nagai H. Roles of mitogen-activated protein kinase pathways for mediator release from human cultured mast cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60(4):589-94.
3. Tedeschi A, Lorini M, Gibelli S, Mladonna A. Effects of protein kinase C and phospholipase C inhibitors on IgE-dependent basophil histamine release. *Inflammation Research* 2000;49:480-5.
4. Windmiller DA, Backer JM. Distinct Phosphoinositide 3-kinases mediated mast cell degranulation in response to G-protein-coupled versus FcepsilonRI receptors. *J Biol Chem* 2003;278(14):11874-8.
5. Hanson DA, Ziegler SF. Regulation of ionomycin-mediated granule release from rat basophil leukemia cells. *Mol Immunol* 2002;38(16-18):1329-35.
6. Sheffer I, Taube Z, Medalia O, Sagi-Eisenberg R. Basic secretagogues activate protein tyrosine phosphorylation and release of arachidonic acid in mast cells via a novel protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1998;28:3468-78.
7. Seebeck J, Westerberger K, Elgeti T, Ziegler A, Schitze S. The exocytotic signaling induced by nerve growth factor in the presence of lyso-

- phosphatidylserine in rat peritoneal mast cells involves a type D phospholipase. *Regulatory peptides* 2001;102:93-99.
8. Ferjan I, Čarman-Kržan M, Erjavec F. Comparison of histamine and serotonin release from rat peritoneal mast cells induced
 9. Shefler I, Sagi-Eisenberg R. Gi-mediated activation of the syk kinase by the receptor mimetic basic secretagogues of mast cells: role in mediating arachidonic acid/metabolites release. *J Immunol* 2001;167(1):475-81.
 10. Ferjan I, Čarman-Kržan M. Differential effect of interleukin-3, stem cell factor and nerve growth factor on histamine and serotonin release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2000;49:S15-S16.
 11. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 2004;22:563-98.
 12. Dorval V, Dufour M, Leclerc P. Role of protein tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca^{2+} store depletion during human sperm acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 2003;9:125-31.
 13. Alfonso A, Botana MA, Vieytes MR, Louzao MC, Botana LM. Effect of signal transduction pathways on the action of thapsigargin on rat mast cells. *Biochemical Pharmacology* 1994;47:1813-20.
 14. Inesi G, Wade R, Rogers T. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump: Inhibition by thapsigargin and enhancement by adenovirus-mediated gene transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;853:195-206.
 15. Rumpel E, Pilatus U, Mayer A, Pecht I. Na^+ and Ca^{2+} gradients across the membrane modulate the secretory response of mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:351-3.
 16. Alfonso A, Lago J, Botana MA, Vietes MR, Botana LM. Characterization of Na^+Ca^{2+} exchanger on rat mast cells. *Cellular Physiol Biochem* 1999;9:53-71.
 17. Praetorius HA, Friis UG, Praetorius J, Johansen T. Evidence for a Na^+Ca^{2+} exchange mechanism in rat peritoneal mast cells. *Pflügers Arch* 1998;437:86-93.
 18. Lago J, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. Ouabain induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by protein phosphorylation and intracellular pH. *Cellular Signaling* 2001;13:515-24.
 19. Knudsen T. The Na^+K^+ -pump in rat peritoneal mast cells: some aspects of regulation of activity and cellular function. *Danish Medical Bulletin* 1995;42:441-53.
 20. Alfonso A, Cabado AG, Vietes MR, Botana LM. Calcium-pH crosstalks in rat mast cells: cytosolic alkalization, but not intracellular calcium release, is a sufficient signal for degranulation. *Br J Pharmacol* 2000;130:1809-16.
 21. Inesi G, Wade R, Rogers T. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump: Inhibition by thapsigargin and enhancement by adenovirus-mediated gene transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;853:195-206.
 22. Huber M, Huges MR, Krystal G. Thapsigargin-induced degranulation of mast cells is dependent on transient activation of phosphatidylinositol-3 kinase. *J Immunol* 2000;165:124-33.
 23. Micera A, Puxeddu I, Aloe I, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:369-74.
 24. Štempelj M, Čarman-Kržan M, Ferjan I. Regulatory role of extracellular Na^+ and Ca^{2+} ions in nerve growth factor induced histamine secretion from rat mast cells. *Inflamm Res* 2003;52:74-8.
 25. Štempelj M and Ferjan I. Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2005;54:344-349
 26. Ferjan I and Erjavec F. Effect of Ca^{2+} ions on the inhibition of histamine and serotonin secretion caused by phenothiazines. *Fundamental and clinical pharmacology* 1999;13 (Suppl 1):145.
 27. Ferjan I, Erjavec F. Changes in histamine and serotonin secretion from rat mast cells caused by antidepressants. *Inflamm Res* 1996;45:141-4.