

**СТАН КАСПАЗНОГО КАСКАДУ В КЛІТИНАХ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ
ЗА РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ**

Показано, що за радіаційно-індукованого апоптозу відбуваються характерні порушення в лімфоїдних клітинах селезінки, які призводять до запуску каспазного каскаду і залежать як від часу після тотального опромінення організму, так і від дози променевого ураження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лімфоцити селезінки, каспази, рентгенівське опромінення.

ВСТУП. Значного успіху в з'ясуванні біохімічних закономірностей програмованої клітинної загибелі було досягнуто завдяки встановленню того факту, що радіаційна загибель лімфоцитів, одних з найбільш чутливих клітин організму, є різновидністю апоптозу.

Ключовою ланкою у механізмі розвитку апоптозу вважають активацію каскаду цистеїнових протеїназ (каспаз), що призводить до протеолітичного розщеплення їх субстратів і, в кінцевому результаті, до активації ендонуклеаз та фрагментації ДНК.

З огляду на те, що основними шляхами запуску апоптозу є мембранні (рецепторно-опосередковані) та ядерні, центрально-інтегруючу роль у такому процесі складних взаємовідносин відводять мітохондріям [2]. Це пов'язано з тим, що саме ці органели клітини перш за все приймають, координують та виробляють адекватні відповіді, які спричиняють каскад реакцій запуску механізмів загибелі клітини. За умов апоптозу насамперед відбуваються деполяризація мембран, дискоординація електротранспортної системи та блокування синтезу АТФ, продукування активних форм кисню, утворення гігантських мітохондріальних пор, що призводить до набряку матриксу, порушення цілісності зовнішньої мембрани та вивільнення з міжмембранного простору в цитоплазму деяких апоптогенних білків мітохондрій [1, 2, 5]. Окрім того, внаслідок розривів ДНК та фізичної реструктуризації хроматину з ядра до мітохондрій може переміщуватись ядерна каспаза-2, яка також може

індукувати зміну неспецифічної проникності мітохондріальної мембрани та вихід із мембранного простору мітохондрій апоптичних факторів [10]. Результатом вивільнення з мембранного простору мітохондрій проапоптичних білків, таких, як цитохром c, AIF (апоптозіндукуючий фактор), інгібітори антиапоптичних регуляторних білків SMAC/Diablo та Omi/HtrA2, які потрапляють в цитоплазму, є запуск програми апоптозу клітин [1, 6].

Оскільки каспази відіграють вирішальну роль у розвитку радіаційно-індукованої програмованої клітинної загибелі такої високочутливої до опромінення популяції, якою є лімфоцити, метою роботи було дослідити активність ключових цистеїнових протеаз родини каспаз у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У досліджах використовували білих нелінійних щурів-самців масою 150–170 г. Опромінення здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 при дозах 1,0 та 7,78 Гр за умов: фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань – 50 см, напруга – 200 кВ, сила струму – 5 мА для 1,0 Гр та 10 мА для 7,78 Гр, потужність дози – 0,17 та 0,34 Гр/хв відповідно. Тварин декапітували через 30 хв та 3 год після дії іонізуючої радіації. Лімфоцити селезінки отримували за методом [7] в градієнті щільності Ficoll-Paque (густина – 1,077 г/см³). Активність цистеїнових протеїназ – каспаз 2, 3, 6, 8, 9 визначали за допомогою набору “Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit” (BioSource, USA). Екстинкцію проб визначали на спектрофотометричному рідері

фірми "Termo Labsystems MR" (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quieklink. Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали з використанням програми "Microsoft Excel". Про вірогідність результатів судили за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Експериментальним шляхом було встановлено, що через 30 хв після тотального одноразового опромінення тварин за доз 1,0 та 7,78 Гр підвищується активність індукторних каспаз 2, 8, 9 та ефекторних каспаз 3, 6 в клітинах селезінки, причому ця активація різна за величиною і залежить від дози ураження (рис. 1). Так, через 30 хв після опромінення тварин за дози 1,0 Гр активність ініціюючих каспаз 2, 8, 9 зростає на 20, 12 та 10 % відповідно порівняно з контрольними величинами. При опроміненні тварин за дози 7,78 Гр відбувається аналогічне збільшення активності зазначених каспаз, але з контрольними величинами цей рівень порівняно менш виражений.

Необхідно зазначити, що серед численних ендопептидаз найважливіше значення в апоптичному процесі має каспаза 3. Під час запуску каскадного механізму каспаза 3 активується іншими ініціюючими каспазами, латентними формами ефекторних каспаз та деякими некаспазними білками. Крім того, на важливість каспази 3 у протеолізі життєво важливих білків (ядерних та цитоплазматичних) вказує той факт, що після її активації клітина необоротно втрачає шляхи до виживання. Дійсно, нами показано, що у лімфоцитах селезінки

через 30 хв після дії радіації за дози 1,0 Гр спостерігається підвищення активності каспази 3 на 29 % порівняно з контрольним значенням, а при опроміненні піддослідних тварин за дози 7,78 Гр каспазна активність спленоцитів зростає на 18 % відносно контрольного показника.

Оскільки каспазам властива здатність в певній послідовності активувати одна одну, утворюючи своєрідний каскад, до того ж розгалужений, важливо, що, незалежно від сигналу запуску цього каскаду, його вузловою ланкою є саме каспаза 3. Вона активується каспазами 8 та 9 (ініціюючі ферменти) і, в свою чергу, активує каспазу 2 (зазначено вище) та каспазу 6 – на 24 % (1,0 Гр) і 9 % (7,78 Гр) порівняно з контрольним значенням.

Встановлене нами підвищення каспазної активності в спленоцитах щурів свідчить про те, що через 30 хв після опромінення тварин відбувається запуск каскадного механізму проапоптичної активності каспаз у клітинах лімфоцитів, що узгоджується з даними інших дослідників [11].

На відміну від загальної картини підвищення активності ініціюючих каспаз 2, 8, 9 та ефекторних каспаз 3, 6 у спленоцитах через 30 хв після опромінення тварин має місце їх значне пригнічення через 3 год (рис. 2). Так, через 3 год після дії променевого чинника за дози 1,0 Гр в спленоцитах активність ініціюючих каспаз 2, 8, 9 знижувалась на 51, 52 та 58 %, ефекторних каспаз 3, 6 – на 42 та 52 % відповідно порівняно з контролем. При підвищенні дози опромінення до 7,78 Гр у лімфоцитах се-

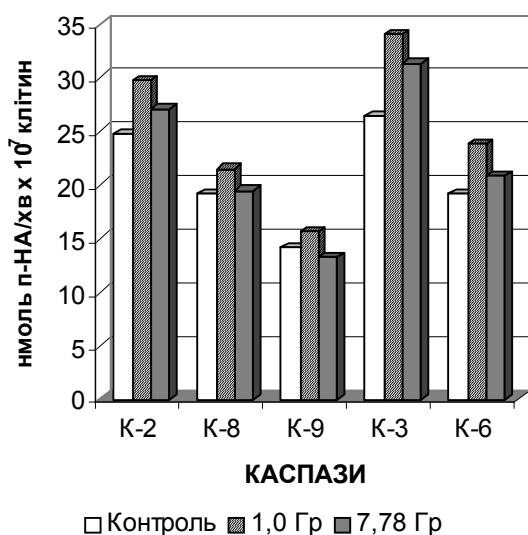


Рис. 1. Активність каспаз у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через 30 хв після опромінення. Достовірно відносно контролю: $p \leq 0,05$.

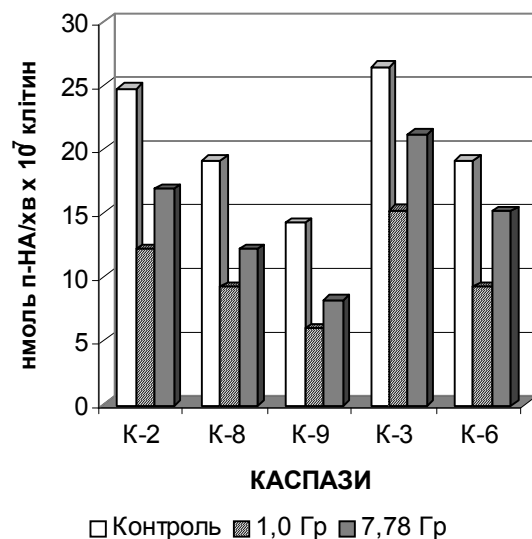


Рис. 2. Активність каспаз у спленоцитах щурів за дії іонізуючої радіації через 3 год після опромінення. Достовірно відносно контролю: $p \leq 0,05$.

лезінки виявлено аналогічне пригнічення активності ініціюючих каспаз 2, 8, 9 на 32, 36 та 42 %, ефекторних каспаз 3, 6 – на 20 та 21 % відповідно порівняно з контрольними показниками.

Така особливість в активності каспаз у селезінці за радіаційного ураження призводить, імовірно, до утворення широкого спектра структурно пошкоджених протеїнів (ензимів), що істотно впливають на перебіг каскадного механізму дії каспаз в спленоцитах, порушуючи динаміку та послідовність проходження окремих ферментативних етапів [12].

Отримані результати є підтвердженням того, що за високої радіаційної чутливості зрілих популяцій лімфоцитів селезінки та їх інтерфазної загибелі після впливу іонізуючого випромінювання відбувається швидкий розвиток лімфопенії [9]. Зокрема, дія іонізуючої радіації сприяє розвитку лімфоцитозу в

спленоцитах та пригніченню антигенозалежного лімфопоезу в них, про що свідчить інволюція білої пульпи селезінки. Руйнування лімфоцитів після опромінення відбувається як у лімфі та периферичній крові, так і в лімфоїдних органах – тимусі, лімфатичних вузлах, селезінці, глибина пошкоджень яких залежить як від дози опромінення, так і від часу дії променевого чинника [3, 4, 8, 9].

ВИСНОВОК. Тотальне одноразове опромінення тварин за доз 1,0 та 7,78 Гр через 30 хв і 3 год після рентгенівського випромінювання призводить до запуску каспазного каскаду, кінцевим ефектом якого є включення певних механізмів захисту або загибель імунокомпетентних клітин, і залежить як від часу після опромінення, так і від дози променевого ураження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барышников А. Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин. – М. : Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
2. Бра М. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели / М. Бра, Б. Квинан, С. А. Сузин // Биохимия. – 2005. – **70**, вып. 2. – С. 284–293.
3. Драган Л. П. Радіаційно-індуковані особливості каспазного каскаду в тимоцитах та спленоцитах щурів / Л. П. Драган // Зб. наук. праць “Сучасні інформаційні технології управління екологічною безпекою, природокористуванням, заходами в надзвичайних ситуаціях”. – Київ–Харків–АР Крим, 2011. – С. 375–385.
4. Драган Л. П. Участь протеїназ та системи полі-АДФ-рибозилування за радіаційно-індукованого апоптозу клітин тимуса та селезінки щурів: дис. ... канд. мед. наук / Л. П. Драган. – К., 2007. – 220 с.
5. Копнин Б. П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров / Б. П. Копнин. – М. : РОО “Мир науки и культуры”, 2002. – 366 с.
6. Протеолитические ферменты и апоптоз / К. Н. Веремеенко, В. Е. Досенко, В. С. Нагибин [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 6. – С. 10–24.
7. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow / A. Boyum // Scand. J.Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21**. – P. 28–30.
8. Dragan L. Structural biochemical assessment of the status of the nuclear apparatus of the rat spleen lymphoid cells under radiation treatment / L. Dragan, T. Andriichuk, L. Ostapchenko // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia. – 2010. – **XXIII**, № 2. – P. 203–206.
9. Focan C. Chronobiological Concepts Underlying the Chronotherapy of Human Lung Cancer / C. Focan // Chronobiol. Intern. – 2002. – **19**, № 1. – P. 253–274.
10. Gillespie D. A. The secret life of Histones / D. A. Gillespie, K. H. Vousden // Cell. – 2003. – **114**. – P. 655–661.
11. Involvement of ICE (Caspase) Family in γ -Radiation-Induced Apoptosis of Normal B Lymphocytes / E. Hallan, H. K. Blomhoff, E. B. Smeland, J. Lomo // J. Immunol. – 1997. – **46**. – P. 601–608.
12. Sendo F. Modulation of neutrophil apoptosis by psychological stress and glucocorticoid / F. Sendo // Int. J. Immunopharmacol. – 1997. – Sep., Abstract available.

СОСТОЯНИЕ КАСПАЗНОГО КАСКАДА В КЛЕТКАХ СЕЛЕЗЁНКИ КРЫС ПРИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОМ АПОПТОЗЕ

Резюме

Показано, что при радиационно-индуцированном апоптозе происходят характерные нарушения в лимфоидных клетках селезёнки, которые приводят к запуску каспазного каскада и зависят как от времени после тотального облучения организма, так и от дозы лучевого поражения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лимфоциты селезёнки, каспазы, рентгеновское облучение.

L. P. Drahan
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

STATE OF CASPASE CASCADE IN RAT SPLEEN CELLS AT RADIATION-INDUCED APOPTOSIS

Summary

It is shown that the radiation-induced apoptosis causes characteristic irregularities in the lymphoid spleen cells, which lead to the launch of caspase cascades and depend on the time after total body radiation and the dose of radiation injury.

KEY WORDS: spleen lymphocytes, caspase, X-radiation.

Отримано 05.10.11

Адреса для листування: Л. П. Драган, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна.