

Л.П. Драган

Застосування рибоксину в корекції апоптотичних явищ у лімфоїдних тканинах радіаційно опромінених тварин

*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка***Ключові слова:** рибоксин, лімфоцити тимуса та селезінки, рентгенівське випромінювання.

Зважаючи на значну роль протеїназ і полі-(АДФ-рибозо)-полімерази (ПАРП), що певною мірою контролюють програмовану клітинну смерть (апоптоз), яка індукується іонізуючим випромінюванням, мета роботи полягала у дослідженні здатності рибоксину корегувати радіаційно індуковані зміни в активності протеїназ і полі-(АДФ-рибозо)-полімерази в лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів при їх опроміненні у дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр.

Применение рибоксина в коррекции апоптотических явлений в лимфоидных тканях радиационно облученных животных

Л.П. Драган

Ввиду значительной роли протеиназ и поли-(АДФ-рибозо)-полимераза (ПАРП), которые в определенной мере контролируют программируемую клеточную смерть (апоптоз), индуцируемую ионизирующим излучением, целью работы было исследование способности рибоксина коррелировать радиационно индуцированные изменения в активности протеиназ и поли-(АДФ-рибозо)-полимераза в лимфоидных клетках тимуса и селезенки крыс при их облучении в дозах 1,0 Гр и 7,78 Гр.

Ключевые слова: рибоксин, лимфоциты тимуса и селезенки, рентгеновское излучение.*Патология. – 2011. – Т.8., №2. – С. 96–98*

Riboxin application for correction of apoptotic phenomena in lymphoid tissues of radiation-exposed animals

L.P. Dragan

In view of the significant role of proteinases and poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP) which, to some extent, control programmed cell death (apoptosis) induced by ionizing radiation, the goal of the present work was to study the ability of riboxin to correct the radiation-induced alterations in proteinase and poly-(ADP-ribose)-polymerase activities in rat thymic and splenic lymphoid cells under radiation exposure in the range of doses 1.0 Gy and 7.78 Gy.

Key words: riboxin, thymus and spleen lymphocytes, x-radiation.*Pathologia. 2011; 8(2): 96–98*

Одним із найхарактерніших властивостей живої матерії є підтримання сталості будови і складу кожного зі ступенів її організації. Елементарні структурні одиниці життя на певному рівні організації – клітини, організми і популяції – це самоорганізуючі й самопідтримуючі системи. На рівні популяцій, багатоклітинних організмів і клітин ця властивість проявляється у формі відновлення від пошкоджень. Це така сама важлива властивість живого, як ріст, диференціювання, розмноження.

Для підтримування тканинного гомеостазу і видалення уражених клітин в організмі відбувається їх генетично запрограмоване саморуйнування й загибель (апоптоз). Процес апоптозу є результат балансу про- та протиапоптотичних факторів і характеризується багатоступеневістю на етапах життєдіяльності клітини, широко розповсюдженим за нормальних і патологічних процесів як у тварин, так і у людини [1].

Апоптоз з біохімічних позицій є активною формою клітинної загибелі, процес, за якого реалізується її генетична програма або за дії зовнішніх факторів (фізичних, хімічних тощо). Програмована клітинна смерть потребує значних витрат енергії та синтезу молекули *de novo*.

Апоптоз – поняття морфологічне, форма загибелі клітин проявляється у зменшенні її розміру, конденсації та фрагментації хроматину, ущільненні зовнішньої та

цитоплазматичної мембран без вивільнення внутрішньоклітинного вмісту в зовнішнє середовище. Не зважаючи на те, що фактор програмованості й активний характер загибелі є більш принциповим, ніж супутні йому морфологічні зміни, частіше використовують термін «апоптоз» [2].

Після отримання сигналу до апоптозу в клітині відбуваються дві послідовні події: перша – негайна – починається в мембрані із залученням рецепторів загибелі клітини, друга розвивається протягом кількох годин і полягає в активації каскаду внутрішньоклітинних протеаз – каспаз та деяких інших ефекторів, що й призводять до її знищення [2]. Хоча основними механізмами запуску апоптозу вважають мембранні (рецепторно-опосередковані) та ядерні, але центрально-інтегруючу роль у цьому процесі складних взаємовідносин належить мітохондріям [3]. Це пов'язано з тим, що саме ці органели клітини в першу чергу приймають, координують і виробляють адекватні відповіді, що спричинюють каскад реакцій запуску механізмів загибелі клітини. За умов апоптозу насамперед відбувається деполаризація мембран, дискоординація електрон-транспортної 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 (активатори каспаз, нуклеази, протеази) тощо [4].

Мета роботи

Дослідження здатності рибоксину корегувати радіаційно індуковані зрушення в активності протеїназ і полі-(АДФ-рибозо)-полімерази в лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів при їх опроміненні у дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр.

Матеріали і методи дослідження

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 150–170 г. Опромінення здійснювали на рентгенівській установці РУМ 17 в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр. Препарат рибоксин у вигляді 2% розчину вводили за 15 хв до опромінення внутрішньоочеревинно з розрахунку 150 мг препарату на 1 кг маси тварини. Тварин декапітували через 30 хвилин та 3 години після дії іонізуючої радіації. Отримані експериментальні дані оброблювали загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення

Одним із фізичних чинників, що викликають апоптоз, є іонізуюче випромінювання. Запуск апоптозу відбувається за дії рентгенівського, ультрафіолетового або γ -випромінювання. При цьому кінцевий результат – виживання або загибель клітини – залежить від інтенсивності фізичного впливу. Як правило, за низьких доз рентгенівського опромінення тварин активуються так звані стрес-реакції, що забезпечують виживання клітин. Середні та високі рівні опромінення активують програму саморуйнування клітини й призводять їх до апоптотичного стану [5].

Встановлено, що через 30 хв та 3 год після дії на організм тварин рентгенівського випромінювання в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр приводить до дозозалежного збільшення ступеня фрагментації хроматину за рахунок Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу та підвищення кількості одно- і дволанцюгових розривів ДНК у лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів. За цих умов, відповідно, підвищується активність ендогенних протеїназ, лізосомальних катепсинів і цистеїнових протеїназ родини каспаз, зокрема каспази-3. За дії іонізуючої радіації в лімфоїдних клітинах відбуваються також зміни активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази [6].

Одним із засобів корегування змін у біохімічних реакціях, викликаних іонізуючим випромінюванням організму, є хімічний захист. Як відомо, механізм дії багатьох речовин, що виявляють протирадіаційний ефект, пов'язаний як з дійсним захистом (наприклад, інактивацією окисних радикалів та інших агресивних агентів, що виникають у клітинах і тканинах за дії іонізуючого опромінення), так і з активацією біологічних процесів, що забезпечують підвищення радіорезистентності клітин, тканин і організму в цілому.

Керуючись даними наукової літератури, в якості корегуючого природного засобу застосовували рибоксин

(інозин – рибонуклеозид гіпоксантину). Він є проміжним метаболітом розпаду пуринів і пуринових нуклеотидів до сечової кислоти і в метаболічних шляхах використання та збереження пуринів. Як сполука, що здатна формувати клітинну радіорезистентність [7], рибоксин застосовується в радіобіологічних дослідженнях. У медичній практиці рибоксин застосовують при різних серцевих патологіях; як засіб, що запобігає синтезу нуклеотидів, має відношення до енергетичного статусу в різних тканинах.

Як відомо, генопротекторні властивості рибоксину полягають у сприянні зменшенню генерації пероксиду гідрогену та гідроксильних радикалів за дії рентгенівського випромінювання [8], впливає на сигнальну функцію активних форм оксигену в регуляторних системах відповіді клітин на пошкодуючі чинники [9], за умов введення рибоксину тваринам до опромінення спостерігаються радіаційно-індуковані зміни активності ферментів пуринового обміну [10].

Також є всі підстави стверджувати, що рибоксин виявляє антигіпоксичну дію. Так, показано, що рибоксин сприяє активації мітоген-активованого протеїнкіназного сигнального шляху, що створює умови для запобігання пошкоджень ДНК, викликаних гіпоксією [11] і, як наслідок, збільшення активності деяких ферментів репарації ДНК [9].

Участь рибоксину в активації репараційних процесів і, зокрема, репараційному відновленні структурної організації молекули ДНК, може бути пояснена його впливом на запобігання зменшенню внутрішньоклітинної концентрації АТФ [6]. Встановлено, що при опроміненні щурів низькими (1,0 Гр) та високими (7,78 Гр) дозами на фоні попередньо введенного рибоксину рівень АТФ в тимоцитах і спленоцитах значно збільшувався, порівняно з таким у тканинах опромінених тварин (без рибоксину). Це суттєвий факт, з огляду на поліпшення біоенергетичного статусу клітини в умовах радіаційно-індукованого апоптотичного процесу.

Отже, можна стверджувати, що активне втручання (опосередковане й/або безпосереднє) рибоксину в молекулярні механізми розвитку радіаційно індукованого апоптозу є безперечним. Подальші дослідження в цьому напрямку є нагальними, актуальними і перспективними.

Висновки

1. Сукупність отриманих результатів свідчить про значну радіочутливість процесів, пов'язаних зі збільшенням ступеня фрагментації хроматину за рахунок Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ендонуклеолізу та підвищення кількості одно- та дволанцюгових розривів ДНК в імунокомпетентних клітинах тимуса та селезінки при опроміненні тварин. За дії іонізуючої радіації в лімфоїдних клітинах відбуваються також зміни активності полі-(АДФ-рибозо)-полімерази.

2. Введення тваринам препарату рибоксину активує біоенергетичні процеси і сприяє нормалізації у досліджуваних клітинах активності цистеїнових протеїназ, полі-(АДФ-рибозо)-полімерази та зниженню рівня одно- та дволанцюгових розривів ДНК.

Література

1. *Белушкіна Н.Н.* Молекулярные основы апоптоза / Белушкіна Н.Н., Хасан Хамад Али, Северин С.Е. // Вопросы биол. мед. и фарм. химии. – 1998. – Т. 4. – С. 15–23.
2. *Робинсон М.В.* Апоптоз клеток иммунной системы / Робинсон М.В., Труфакин В.А. // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, №2. – С. 246–259.
3. *Бра М.* Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели / Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. // Биохимия. – 2005. – Т. 70, Вып. 2. – С. 284–293.
4. *Веремеенко К.Н.* Протеолитические ферменты и апоптоз / Веремеенко К.Н., Досенко В.Е., Нагибин В.С., Кизим А.И., Мойбенко А.А. // Український біохімічний журнал. – 2003. – Т. 75, №6. – С. 10–24.
5. *Мазурик В.К.* О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующих излучений на организм млекопитающих / Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, №1. – С. 89–96.
6. *Драган Л.П.* Участь протейназ та системи полі-АДФ-рибозилування за радіаційно-індукованого апоптозу клітин тимуса та селезінки шурів: автореф. дис. ... канд. біол. наук / Драган Л.П. – К., 2007. – 18 с.
7. *Вернигорова Л.А.* Химия, фармакология и механизм действия противолучевых средств / Вернигорова Л.А., Чертков К.С., Крылов К.П. – М., 1990. – С. 16–17.
8. *Гудков С.В.* Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения / Гудков С.В., Гудкова О.Ю., Штаркман И.Н., Гапеев А.Б., Чемерис Н.К., Брусков В.И. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46, №6. – С. 713–718.
9. *Мазурик В.К.* Роль регуляторных сетей ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов / Мазурик В.К. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45, №1. – С. 26–45.
10. *Андрийчук Т.Р.* Радиационно-идуцированные изменения активности ферментов пуринового обмена на фоне рибоксина / Андрийчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П. // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. – СПб., 2004. – С. 48–50.
11. *Hasko G.* Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine / Hasko G., Sitkovsky M.V., Szabo C. // TRENDS in Pharmacological Sciences. – 2004. – V. 25, №3. – P. 152–157.

Відомості про автора:

Драган Л.П., к. біол. н., мол. науковий співробітник Навчально-наукового хіміко-біологічного центру КНУ ім. Тараса Шевченка.

Адреса для листування:

Драган Людмила Петрівна. 02033, м. Київ, вул. Володимирська, 64. Тел.: (067) 739 32 74. E-mail: dragan_l@ukr.net

УДК 616-071+616.233+616.24

Л.С. Малофій, І.О. Михайлюк

Патоморфологія місцевої імунної системи сегментарних бронхів при хронічному обструктивному захворюванні легень

Івано-Франківський національний медичний університет

Ключові слова: імунна система сегментарних бронхів, хронічне обструктивне захворювання легень.

За даними спеціальної літератури, на перебіг і прогноз хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) значною мірою впливає стан імунної системи та окремих її факторів, однак існуючі роботи фрагментарні та потребують уточнення.

Мета роботи: оцінити принципи розподілу та кількісні показники імунокомпетентних клітин сегментарних бронхів хворих ХОЗЛ на різних стадіях захворювання для патогенетичного обґрунтування окремих аспектів розвитку хвороби.

Проведено комплексне імуногістохімічне дослідження місцевої імунної системи сегментарних бронхів 54 хворих на ХОЗЛ з використанням первинних моноклональних антитіл до CD3 – маркеру Т-лімфоцитів (клон SP7, Lab Vision), CD4 – маркеру Т-хелперів (клон 4B12, Lab Vision), CD8 – маркеру Т-супрессорів (клон SP16, Lab Vision), CD56 – маркеру NK-клітин та макрофагів (клон 2H7, Lab Vision), CD20 – маркеру В-лімфоцитів (клон L26, Lab Vision).

Встановлено кореляцію між рівнем експресії, стадією та клінічним перебігом хвороби. У фазі загострення ХОЗЛ виявлена активація Т-клітинної ланки (CD4+,

CD8+ – лімфоцитів), та NK – клітин на фоні зниження В-лімфоцитів. У фазі ремісії ХОЗЛ встановлена активація гуморального імунітету, представленого В-лімфоцитами (CD20+) на рівні зниження лімфоцитів з фенотипами CD3+ та CD4+. Відзначено зниження співвідношення CD4+/CD8+, що свідчить про різкий дисбаланс імунорегуляторного індексу при всіх стадіях ХОЗЛ, незалежно від фази перебігу хвороби.

Виявлені особливості експресії імунокомпетентних клітин і морфологічних змін у стінці сегментарних бронхів у хворих на ХОЗЛ свідчать про формування хронічного запального процесу на II стадії хвороби. Найбільша концентрація імунокомпетентних клітин (CD3+, CD4+ – лімфоцитів та NK-кілерів) у стінці сегментарних бронхів у хворих на ХОЗЛ спостерігається в ділянках гіперплазії, проліферації, плоскоклітинної метаплазії та дисплазії бронхіального епітелію.

Висновки: отримані дані дослідження принципів розподілу й особливостей експресії клітин місцевого імунітету сегментарних бронхів показали їх неоднозначну участь у формуванні патогенетичних аспектів прогресування та перебігу ХОЗЛ.