

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В.ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

СИРОВЕЦЬ ТЕТЯНА ОЛЕКСІЇВНА

ДОСЛІДЖЕННЯ ФОСФОІНОЗИТИДСПЕЦИФІЧНОЇ ФОСФОЛІПАЗИ С
В ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИНАХ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ-1992

Робота виконана в лабораторії фізико-хімічної
біології кафедри біохімії біологічного факультету
Київського університету ім. Тараса Шевченка

Науковий керівник - чл.-кор. АН України,
доктор біологічних наук,
професор М.Є. Кучеренко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
проф. Серкіз Я.І.

доктор біологічних наук
Тугай В.А.

Провідна організація: Український державний медичний
університет ім. О.О. Богомольця

Захист відбудеться "15" лютого 1993 р о "16" год на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01
в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна АН України
/252601, м.Київ-30, вул. Леонтовича, 9/

Автореферат розісланий "14" січня 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Кирсенко

О.В.Кирсенко

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00825766 (Y)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН УРСР

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. В наш час загально визнана фундаментальна роль біологічних мембран у забезпеченні цілісності клітини і регуляції обміну речовин, енергії, інформації. Головну роль у цих процесах відіграє ліпідний матрикс, котрий складається в значній мірі з фосфоліпідів. Останні, як відомо, є джерелом біологічно активних речовин.

Досягнення останніх років в галузі вивчення ліпідів мембран висувать на передній план наукових досліджень проблему метаболізму фосфоінозитидів. Безпосередня участь фосфоінозитидів в процесах клітинної активації, продукції медіаторів імунної відповіді визначає важливе значення їх обміну в стабілізації імунних реакцій організму (Утешев, 1991, Nelet et al, 1987). Функціонування фосфоінозитидної системи тісно пов'язане зі структурною організацією мембран, пошкодження якої під дією радіації може бути причиною порушення нормального функціонування клітин та їх інтерфазної загибелі (Ейдус, 1989).

Безпосередньою мішенню сигнал-залежного гідролізу поліфосфоінозитидів є фосфатидилінозитолбіфосфат (ФІФ₂). Гідроліз якого здійснюється високоспецифічним ферментом - фосфоліпазою С (ФЛС, КФ 3.1.4.10, монофосфатидилінозитфосфогідролаза). Фосфоліпаза С гідролізує ФІФ₂ з утворенням вторинних месенджерів: інозитолтрифосфату (ІФ₃) і діацилгліцеролу, які змінюють концентрацію цитозольного Са²⁺ в певних напрямках хід метаболічних процесів в клітині (Утешев, 1991; Berridge 1987). ФЛС, таким чином, функціонально пов'язана з механізмами, які регулюють метаболічні процеси в лімфодних тканинах.

Останнім часом стає особливо актуальним вивчення біологічної дії іонізуючого випромінювання. Змінам, що відбуваються в імунній системі, як особливо чутливій, належить особлива роль у розвитку патогенезу променевого ураження. До цього часу остаточно не визначена природа фізико-хімічних процесів, що призводять до біохімічних і морфологічних змін лімфодних клітин і подалі до розвитку імунодефіциту і імунодепресії (Ярмоненко, 1984). Дози опромінення, під впливом яких спостерігається ураження імунокомпетентних клітин порівняно невисокі - до 1 Гр

(0,026 Кл/кг) (Бородкевич, 1989; Ярилін, 1988; Норре, 1989). У наш час вважається загально визнаним, що іонізуюче випромінювання в цих дозах діє переважно на ті процеси, що піддаються регулюванню, модифікуючи внутрішньоклітинні процеси управління ними (Ейдус, 1989; Ярилін, 1988). Таким чином, дія іонізуючого випромінювання трансформується в біологічно-важливий сигнал, який може мати місце в нормальних умовах. Цілком можливо, що однією з таких систем регуляції є фосфатидилінозитольний цикл.

В літературі практично відсутні дані про вплив іонізуючого випромінювання на активність фосфоліпази С і метаболізм фосфоінозитидів в лімфоїдних клітинах.

У зв'язку з зазначеним вище, вивчення активності фосфоліпази С лімфоцитів, а також метаболізму фосфоінозитидів в динаміці променевого ураження може відіграти важливу роль у з'ясуванні шляхів формування пострадіаційних порушень метаболізму, що можуть призвести до зміни функціональної активності лімфоїдних клітин.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи стало вивчення впливу рентгенівського опромінення в дозі 0,5 і 1,0 Гр на функціонування Ca^{2+} -залежної поліфосфоінозитидної системи лімфоцитів тимусу і селезінки щурів. Для досягнення цієї мети необхідно було розв'язати такі завдання:

1. Вивчити включення ^{32}P в пул фосфоінозитидів лімфоцитів тимусу і селезінки щурів в нормі і через 6,12 годин після опромінення тварин в дозі 0,5 і 1,0 Гр.

2. Вивчити субклітинний розподіл активності і властивості фосфоліпази С лімфоцитів тимусу і селезінки щурів в нормі.

3. Провести порівняльне дослідження активності і властивостей фосфоліпази С лімфоцитів тимусу і селезінки щурів в нормі і в пострадіаційний період (після опромінення в дозі 0,5 і 1,0 Гр).

4. Вивчити динаміку надходження Ca^{2+} в лімфоцити тимусу і селезінки щурів в нормі і після опромінення.

5. Визначити рівень утворення інозитолфосфатів-продуктів гідролізу поліфосфоінозитидів фосфоліпазою С, в лімфоцитах селезінки і тимусу в нормі і через 1,3,6,12 г після опромінення в дозі 0,5 і 1,0 Гр.

Наукова новизна роботи. Вперше проведено порівняльне вивчення властивостей фосфоліпази С в цитозольній і мембранній фракціях лімфоцитів селезінки і тимусу. Отримані дані дозволяють припусти-

ти про наявність в цитозольній фракції лімфоцитів тимусу і селезінки двох форм фосфоліпази С. Фермент лімфоцитів селезінки проявляє більшу активність у порівнянні з ферментом тимоцитів.

Встановлено, що в лімфоцитах тимусу і селезінки щурів, опромінених в дозах 0,5 та 1,0 Гр, відбуваються порушення метаболізму фосфоліпідів і в значній мірі фосфоінозитидів, що відображається у зміні включення ^{32}P у їх склад. Вперше встановлено, що зміни метаболізму фосфоінозитидів лімфоїдних клітин опроміненних щурів в значній мірі обумовлені змінами активності фосфоліпази С. Вперше показано, що рентгенівське опромінювання щурів викликає підвищення активності фосфоліпази С лімфоцитів тимусу і селезінки вже в перші години після опромінення. Підвищення активності ФЛС призводить до зростання утворення інозитолфосфатів і в тому числі ІФЗ. Ці зміни передують у часі зростанню початкової швидкості надходження кальцію і його вмісту в лімфоцитах селезінки. Через 12, 24 години після опромінення активність фосфоліпази С пригнічується, що призводить до зменшення утворення ІФЗ.

Виявлено, що зміни метаболізму фосфоінозитидів, що відбуваються внаслідок опромінення, в лімфоцитах селезінки мають більш виявлений характер порівняно з тимоцитами.

Показано, що зміни в фосфоінозитидній сигнальній системі можуть бути спільною ланкою у реалізації дії митогенів і опромінювання на лімфоїдні клітини.

Теоретична і практична значимість роботи. Отримані результати сприяють більш повному розумінню біохімічних механізмів розвитку променевого ураження організму. Виявлені ланки метаболізму фосфоінозитидів в лімфоїдних клітинах, які чутливі до дії іонізуючого випромінювання. Отримані дані доповнюють існуючі положення про неоднакову дію різних доз опромінювання, та про наявність спільних механізмів у процесах активації лімфоїдних клітин та реалізації променевого ураження. На основі визначених молекулярних механізмів порушення функціонування фосфоінозитидної системи можна здійснити розробку мір ціленаправленого впливу на ці зміни для їх корекції. Результати дослідження можуть бути корисними під час розробки нових радіопротективних та радіотерапевтичних засобів. Заходи по пригніченню активності фосфоліпази С і зниженню проникності мембрани лімфоцитів для Ca^{2+} можуть сприяти нормалізації функціонування імунокомпетентних клітин і сприяти зменшенню їх

ураження після випромінювання. Зміни метаболізму фосфоінзитидів можуть бути основою для розробки тестів для оцінки дії іонізуючого опромінення.

Апробація роботи. Результати роботи були викладені на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), Всесоюзній науковій конференції "Імунний статус людини і радіація" (Гомель, 1991), на університетській конференції професорсько - викладацького складу, на засіданні кафедри біохімії Київського університету.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 4 роботи.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури, що складається з 234 робіт. Дисертація викладена на 152 стор. має у своєму складі 14 рисунків та 9 таблиць.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар різної статі вагою 130-150г. Тварин опромінювали на установці РУМ-17 в дозах 0,013 і 0,026 Кл/кг (що відповідає поглинутій дозі 0,5 і 1,0 Гр) за умов: потужність дози в повітрі 24,5 сГр/хв, фільтри 0,5 мм (Al+Cu), напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, відстань до поверхні шкіри тварин - 50 см.

Тварин декапітували і добували тимус і селезінку. Фракцію лімфоцитів селезінки отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Raque (густина 1,077) за методом (Boyum, 1968). Субклітинні фракції лімфоїдних клітин отримували методом диференційного центрифугування без'ядерного супернатанту лімфоцитів в 25 мМ трис-НСl буфері, рН 7,4 при 100000 g і використовували як ферментний препарат фосфоліпази С.

Клітини ($2 \cdot 10^7$ кл/мл) інкубували на протязі різних проміжків часу з такими мітогенами (Sigma): конканавалін А (Кон А), фітогемаглютинін (ФГА), ліпосахарид E. coli (ЛПС) у концентрації 0,5 мкг/мл, чи кальцієвим іноформом A12387 у концентрації 0,5 мкМ.

Надходження $[45\text{-Ca}]_i$ визначали за методом (Авдонін, 1985; Kale, 1987). Суспензію лімфоцитів ($0,5 \cdot 10^7$ кл) інкубували при 30°C в середовищі 199, що містило 1 мкКі $[45\text{-Ca}]\text{-CaCl}_2$. Реакцію зупиняли швидкою фільтрацією проб через фільтри "Синпор" N6 0,9% NaCl з

1mM EGTA (pH 7,0). Для визначення неспецифічного зв'язування кальцію суспензію лімфоцитів наносили на фільтри одразу ж після додавання $[^{45}\text{-Ca}]_i$.

Включення $^{32}\text{-P}$ в фосфоліпиди лімфоїдних клітин вивчали в середовищі 199, що містило 8-10мкКі $[^{32}\text{-P}]\text{-H}_3\text{PO}_4$ (Boop, 1985). Екстракцію фосфоліпідів проводили за методом (Прохорова, 1982), фосфоінозитидів- (Dawson, 1965). Фосфоліпиди розділяли хроматографією в тонкому шарі на пластинах Silufol (Хемапол) за методом (Шталь, 1975) у системі хлороформ:метанол: 25% аміак (68:28:4). Ідентифікацію проводили в парах йоду за допомогою стандартів вітчизняного виробництва. Фосфоінозитиди розділяли в тонкому шарі сілікагелю RH 40/5 (Хемапол), що містив 1% оксалату калію, в системі хлороформ: метанол: уксусна кислота: вода (40:7:22:5) за методом (Müller, 1986) і ідентифікували з врахуванням R_f стандартів-свідків (Шрагин, 1988).

Визначення активності ФЛС в лімфоцитах щурів проводили за методом (Carter, 1987). Середовище інкубації (0,5 мл) містило 50 мМ трис-НСІ (pH 7,2-8,0) або трис-ацетат (pH 4,5-6,5), 0,1-2,0 мМ CaCl_2 . Як субстрат використовували фосфатидил-[2- ^3H]-інозитол (ФІ, Amersham) (19,9 Кі/ммоль, 20 000 срм на пробу) з неміченим ФІ у концентрації 37 нМ. Реакцію розпочинали додаванням 10 мкг ферментного препарату ФЛС, зупиняли додаванням 1,8 мл суміші хлороформ:метанол: НСІ (100:200:0,3). Про активність ферменту судили за радіоактивністю водорозчинних метаболітів.

Лімфоцити, преінкубовані з $[^{32}\text{-P}]\text{-H}_3\text{PO}_4$, використовували для визначення утворення інозитолфосфатів. До осаду відмитих від залишків мітки клітин додавали 1 мл середовища 199, що містило 10 мМ LiCl для пригнічення фосфатаз, і інкубували 5 хв при 37° С. Інозитолфосфати екстрагували за методом (Carter, 1987) і розділяли аніонообменною хроматографією на колонках Particil 10 SAX (Amersham) з врахуванням рекомендацій фірми-розроблювача. Розділення проводили в три стадії: 2 мл 0,2 М KH_2PO_4 проводили елюцію інозитолфосфату, 2 мл 0,4 М KH_2PO_4 - інозитолмонофосфату і 2 мл 0,8 М KH_2PO_4 -інозитолтрифосфату (Sigiya, 1987).

Підрахунок радіоактивності проводили на рідинно-сцинтиляційному лічильнику "Delta" (США). Статистичну обробку результатів проводили на ПЕВМ "Іскра-226" (СРСР) з використанням стандартного пакету прикладних програм на мові "Basic" (Брандт, 1987).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

Один з показників метаболізму фосфоліпідів і в тому числі фосфоінозитидів - включення в їх склад радіоактивного ортофосфату. Рівень включення мітки дозволяє визначити інтенсивність біосинтетичних процесів навіть у тому випадку, коли вміст фосфоліпідів не змінюється внаслідок активного розпаду фосфоліпідів, що відбувається паралельно синтезу (Taylor, 1984).

Відомо, що протягом 6 г після опромінювання тварин в дозах, що не перевищують 1 Гр, не спостерігається статистично вірогідної зміни чисельності лімфоїдних клітин тимусу і селезінки. Проте у цей час відбуваються різноманітні порушення метаболічних процесів в даних клітинах (Кучеренко, 1991). Виходячи з цього ми дослідили включення ^{32}P ортофосфату в фосфоліпідні лімфоїдних клітин щурів через 6 г після опромінення тварин в дозах 0,5 і 1,0 Гр (рис. 1).

Час, на протязі якого встановлюється максимальний рівень включення ^{32}P в фосфоліпідні тимусу - 2 г, лімфоцитів селезінки - 30 хв. Максимальний рівень включення ^{32}P в фосфоліпідні тимусу приблизно у 2 рази вищий ніж у лімфоцити селезінки.

Нами не відмічено різниці у включенні ^{32}P в фосфоліпідні тимоцитів щурів, опроміненіх в дозі 0,5 Гр у порівнянні з контролем. Включення мітки в фосфоліпідні лімфоцитів селезінки щурів, опроміненіх у цій дозі, проходило з уповільненням, проте максимальне включення мітки дорівнювало включенню її в контролі. При опроміненні тварин в дозі 1,0 Гр включення ^{32}P в фосфоліпідні лімфоцитів тимусу і особливо селезінки було більш повільним і максимальне включення мітки складало приблизно 70% від контролю. Через 12 г після впливу, зміни були відповідними тим, що спостерігалися через 6 г після опромінювання.

При вивченні включення ^{32}P у фракцію фосфатидилінозитол+фосфатидилсерин (ФІ+ФС) було виявлено, що в лімфоцитах селезінки та тимоцитах тварин опроміненіх в дозі 0,5 Гр спостерігається збільшення порівняного включення ^{32}P по відношенню до включення в інші фракції фосфоліпідів. Зміни включення ^{32}P у фракцію ФІ+ФС можуть бути обумовлені змінами метаболізму фосфатидилінозитолу і поліфосфоінозитидів (Теппермен, 1989).

Через 6 г після опромінення тварин в дозі 0,5 Гр (рис. 2) ми спостерігали значне збільшення включення ^{32}P в фосфоінозитиди

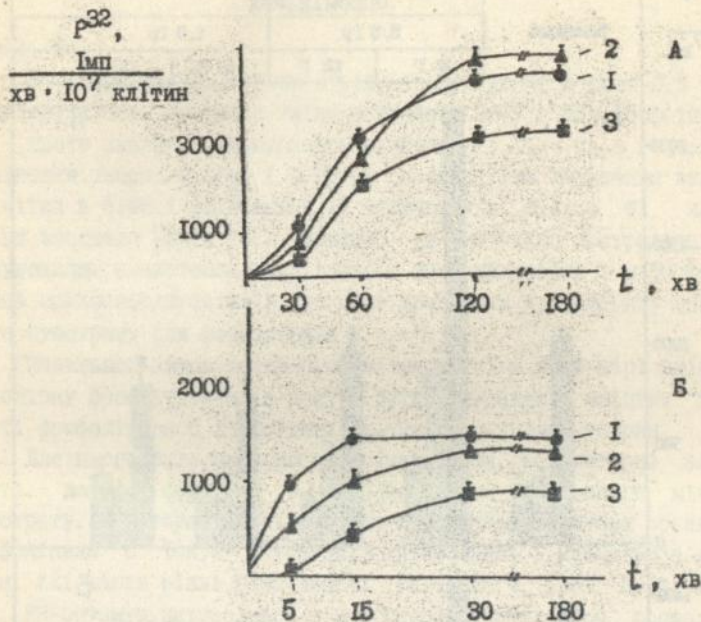


Рис. 1. Динаміка включення ^{32}P в фосфоліпіди лімфоцитів тимусу /А/ і селезінки /Б/ опромінених щурів: 1 - контроль, 2 - 0,5 Гр, 3 - 1,0 Гр.

і особливо в ФІФ2 тимоцитів. Це свідчить про активний синтез даних фосфоліпідів і про активність кіназ, що фосфорилують ФІ і фосфатидилмонофосфат (ФІФ) з утворенням ФІФ2 (Taylor, 1984). Через 12 годин після опромінення включення мітки в фосфоінозитиди знижується, що можна пояснити зменшенням їх синтезу або збільшенням гідролізу, який може відбуватися під дією фосфоліпази С (Taylor, 1984). При опроміненні тварин в дозі 1,0 Гр ми не спостерігали фази збільшення включення мітки в фосфоінозитиди: вже через 6 г після опромінення відбувається зниження включення ^{32}P в ФІФ2, яке зберігається через 12 годин.

Під час інкубації лімфоцитів тимусу з Кон А. спостерігається збільшення включення ^{32}P в ФІФ2 і значне зменшення мітки у

$\frac{P^{32}}{x \cdot 10^7 \text{ кд}}$

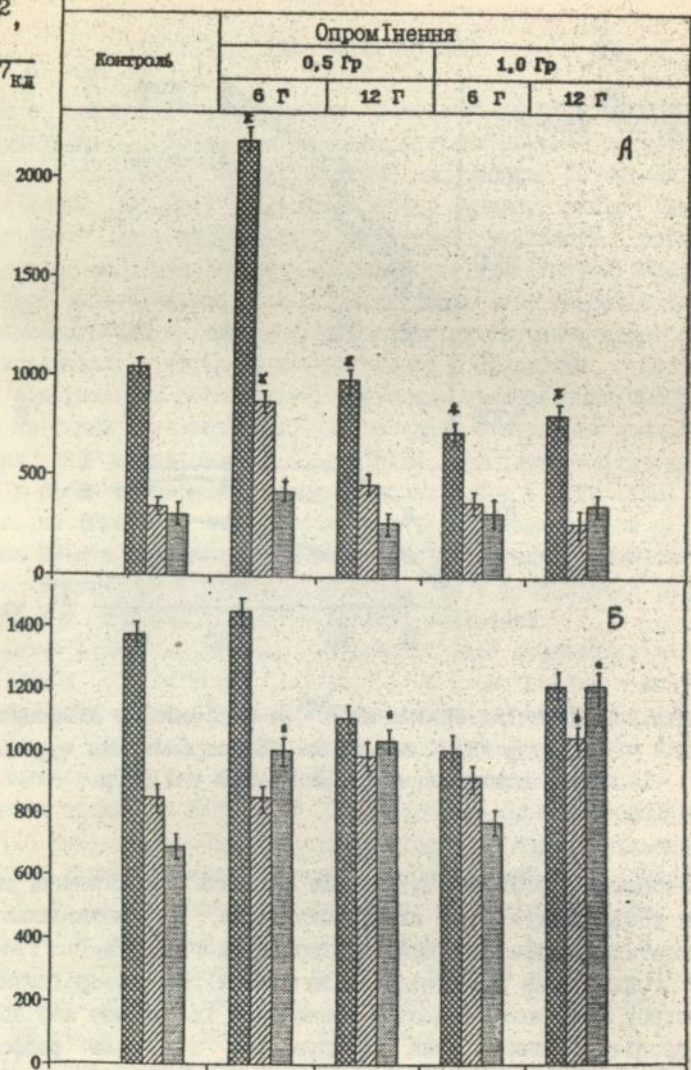





Рис. 2. Включення P^{32} в фосфоїнозитиди лімфоцитів тимусу /А/ і селезінки /Б/ щурів після опром'янення:

-  - фосфатидилінозитолбіфосфат,
-  - фосфатидилмонофосфат,
-  - фосфатидилінозитол, * $p < 0,05$.

складі ФІ.

В лімфоцитах селезінки щурів, опромінених в дозі 0,5 Гр, не спостерігалось суттєвої зміни включення ^{32}P в поліфосфоінозитиди, проте значно збільшувалось включення в ФІ. На 6 г після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр ми спостерігали зменшення включення мітки в ФІФ2 і збільшення її включення в ФІФ і ФІ, яке ще більш зростало через 12 г. Можливо, це викликано пострадіаційними порушеннями в системах послідовного фосфорилування і дефосфорилування поліфосфоінозитидів, що може призвести до дефіциту ендогенного субстрату для фосфоліпази С.

Подальшою нашою метою було встановити, в якій мірі зміни метаболізму фосфоінозитидів можуть бути викликані змінами активності фосфоліпази С лімфоїдних клітин опромінених тварин.

Для цього було вивчено каталітичні, та регуляторні властивості даного ферменту з використанням ендогенного міченого субстрату. З літератури відомо, що в клітинах багатьох організмів фосфоліпаза С існує у вигляді цитозольної і мембранозв'язаної форм, які мають різні властивості (Baldassare, 1989; Behl, 1988).

pH-оптимум цитозольної і мембранозв'язаної форм фосфоліпази С зсунутий в область кислих pH (рис.3). Активність цитозольної і мембранозв'язаної форм фосфоліпази С лімфоцитів селезінки при всіх значеннях pH була вища порівняно з ферментом тимоцитів. Для цитозольної форми фосфоліпази С лімфоцитів тимусу і селезінки була показана наявність широкого оптимума pH: від 5,0 до 6,5. Мембранозв'язані форми фермента мали оптимум pH при 6,0-6,5.

Показано, що активність цитозольного і мембранозв'язаного ферменту лімфоцитів селезінки зростала, досягаючи максимуму за 75 мкмоль, а фосфоліпази тимоцитів - за 150 мкмоль ФІ (рис.4.). Кінетичні параметри даних кривих суттєвих відмін не мали.

Для активації фосфоліпази необхідна наявність іонів кальцію (Kaever, 1985). Активність ферменту визначали при різних концентраціях хелатуючого агенту (EGTA), без додавання в середовище інкубації іонів Ca і при зростанні концентрації кальцію від 0,1 до 2,0 мМ (рис.5). При додаванні EGTA спостерігалось пригнічення активності фосфоліпази С. Цитозольна форма ферменту клітин, що досліджуються, виявляла два оптимуми активності: у відсутності в середовищі інкубації екзогенного кальцію і при мілімолярних концентраціях кальцію. Наявність широкого оптимума pH-залежності і

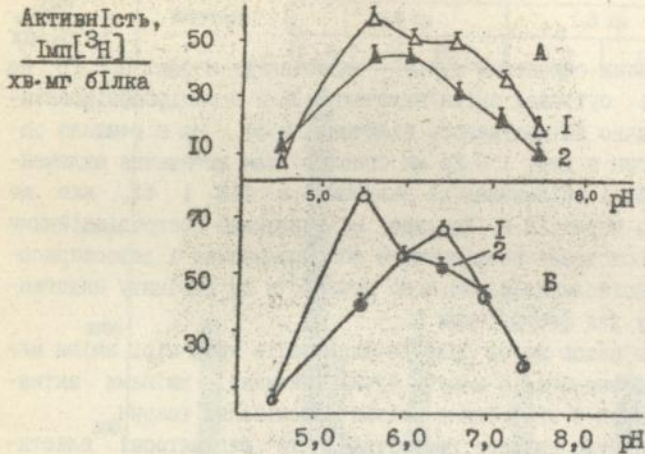


Рис. 3. Залежність активності фосфоліпази С лімфоцитів тимусу /А/ і селезінки /Б/ від рН: 1 - цитозольна ФЛС, 2 - мембранозв'язана ФЛС.

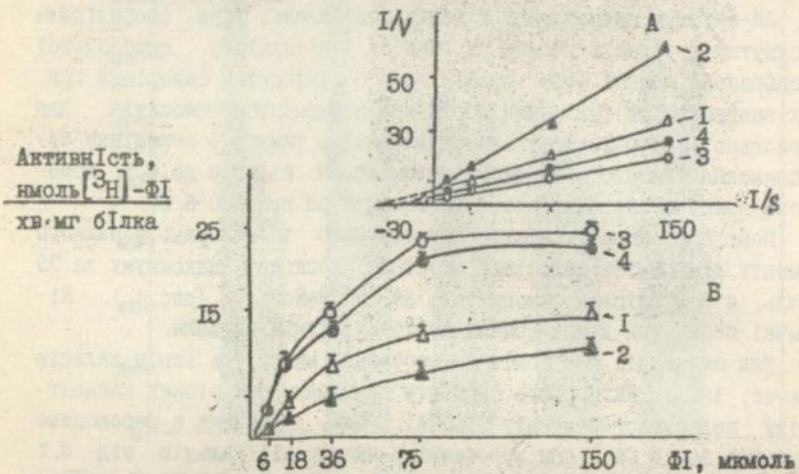


Рис. 4. Залежність активності фосфоліпази С лімфоцитів щурів від концентрації субстрату /Б/ /рН 6,5; 0,5 мМ CaCl_2 /: 1 - лімфоцити тимусу, цитозольна форма ФЛС; 2 - лімфоцити тимусу, мембранозв'язана форма ФЛС; 3 - лімфоцити селезінки, цитозольна форма ФЛС; 4 - лімфоцити селезінки, мембранозв'язана форма ФЛС.

двох оптимумів Са-залежності дозволяє припустити про наявність в цитозольній фракції лімфоїдних клітин більш ніж однієї форми ферменту.

Мембранозв'язана форма фосфоліпази С тимоцитів і лімфоцитів селезінки мала один максимум активності - в області мілімолярних концентрацій Са. Проте значна активність спостерігалась у середовищі інкубації без додавання екзогенного кальцію.

За оптимальних умов приблизно 80-85% активності фосфоліпази С визначалося в цитозольній фракції клітин і лише 15-20% активності було зв'язано з мембранами.

Активність цитозольної форми ферменту була досліджена в динаміці після опромінення тварин (рис. 6.). Активність фосфоліпази С лімфоцитів селезінки була підвищена вже в перші години після опромінення і досягала максимального значення через 3 години. Через 12-24 г після опромінення спостерігалось пригнічення активності ферменту. Активація ферменту лімфоцитів селезінки тварин, що опромінені в більшій дозі, мала більш виразний характер.

Аналогічні коливання активності фосфоліпази С ми спостерігали в лімфоцитах тимусу. Активація ферменту при опроміненні в дозі 1,0 Гр наставала дещо раніше (через 3 г) і була більш виразною, ніж при опроміненні в дозі 0,5 Гр, а пригнічення активності фосфоліпази С через 12 г після опромінення в дозі 1,0 Гр було більш значним.

Таким чином, фосфоліпаза С виявляє ранню радіочутливість, зростання активності ферменту лімфоцитів селезінки в пост-радіаційний період більш значне і відбувається раніше у порівнянні з ферментом тимоцитів.

Преінкубація лімфоцитів тимусу з Кон А і лімфоцитів селезінки з ФГА та ЛПС викликала активацію фосфоліпази С.

Активність ферменту у відсутності в середовищі інкубації екзогенного кальцію в лімфоцитах тимусу і селезінки була підвищена через 6, 12 г після опромінення. Цитозольна фосфоліпаза С лімфоцитів тимусу, що активується $0,5 \text{ мМ Ca}^{2+}$, також проявляла підвищену активність через 6, 12 г після опромінення. Зміни активності фосфоліпази С, що активується $0,5 \text{ мМ Ca}^{2+}$, в цитозолі лімфоцитів селезінки мали зовсім протилежний характер: пригнічення активності спостерігалось вже через 6 г після опромінення і значно посилювалось через 12 г.

З даних наведених вище можна зробити висновок, що ак-

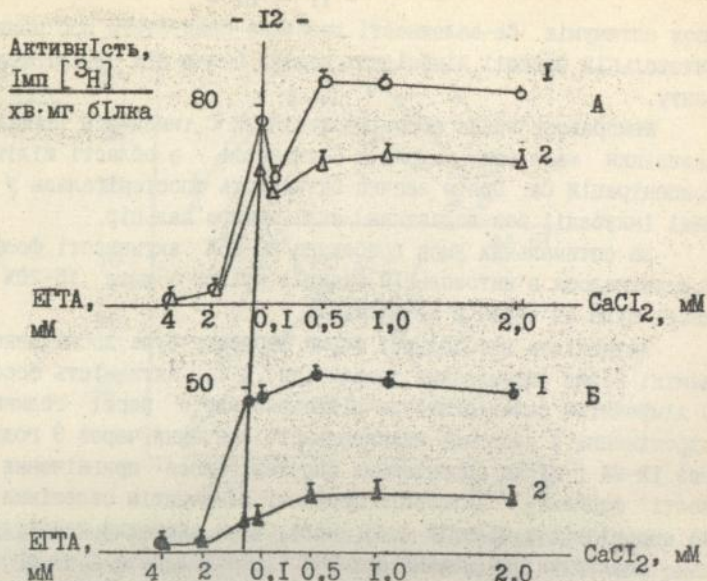


Рис. 5. Залежність активності цитозольної /А/ та мембранозв'язаної /Б/ форми фосфоліпази С лімфоцитів щурів від концентрації кальцію /рН 5,5/: 1 - лімфоцити селезінки, 2 - лімфоцити тимусу.

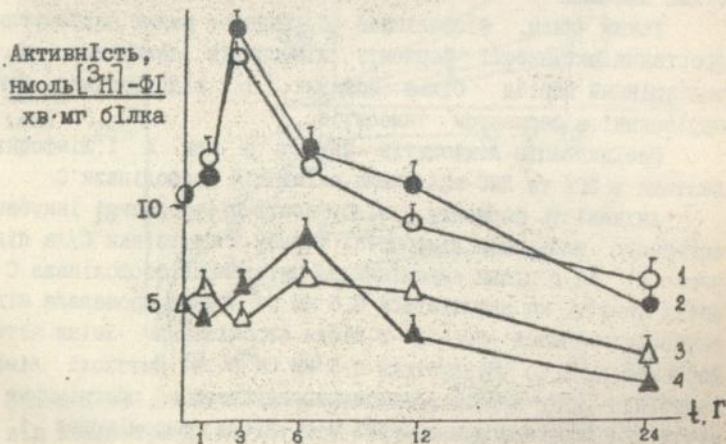


Рис. 6. Активність цитозольної форми фосфоліпази С лімфоцитів опромінених щурів: 1 - лімфоцити тимусу, доза 0,5 Гр; 2 - лімфоцити тимусу, доза 1,0 Гр; 3 - лімфоцити селезінки, доза 0,5 Гр; 4 - лімфоцити селезінки, доза 1,0 Гр.

Таблиця 1.

Активність цитозольної і мембранозв'язаної форм фосфоліпази С щурів в постпроміневий період (M=m, n=5-8).

Тип клітини.	Активність ФЛС (пмоль [³ H]-ІФ/ хв х мг. білка)			
форма ФЛС.	без добавок		що активується	
	екзогенного Са		мілімолярною (0,5) концентрацією Са	
доза	час після опромінення (Г)			
опромінення (Гр)	6	12	6	12
Лімфоцити тимусу				
цитозольна				
контроль	5247±461		1246±459	
0.5	6025±130	3821±243*	1445±134	2299±351*
1.0	7551±279*	3039±439*	1256±192	1413±205
мембранозв'язана				
контроль	2557±112		738± 92	
0.5	3216±283	5219±471*	470± 42	974± 31
1.0	4868±373*	4758±274*	532± 89	1760±109*
Лімфоцити селезінки				
цитозольна				
контроль	5960±381		4619±491	
0.5	8470±401*	7521±739*	3509±481	900±122*
1.0	10585±885*	7872±635*	1484±142*	1160±233*
мембранозв'язана				
контроль	6345±426		5692±379	
0.5	7531±477	8937±671*	4581±632	285± 55*
1.0	9192±842*	7812±848*	3620±344*	3327±691*

* p<0,05

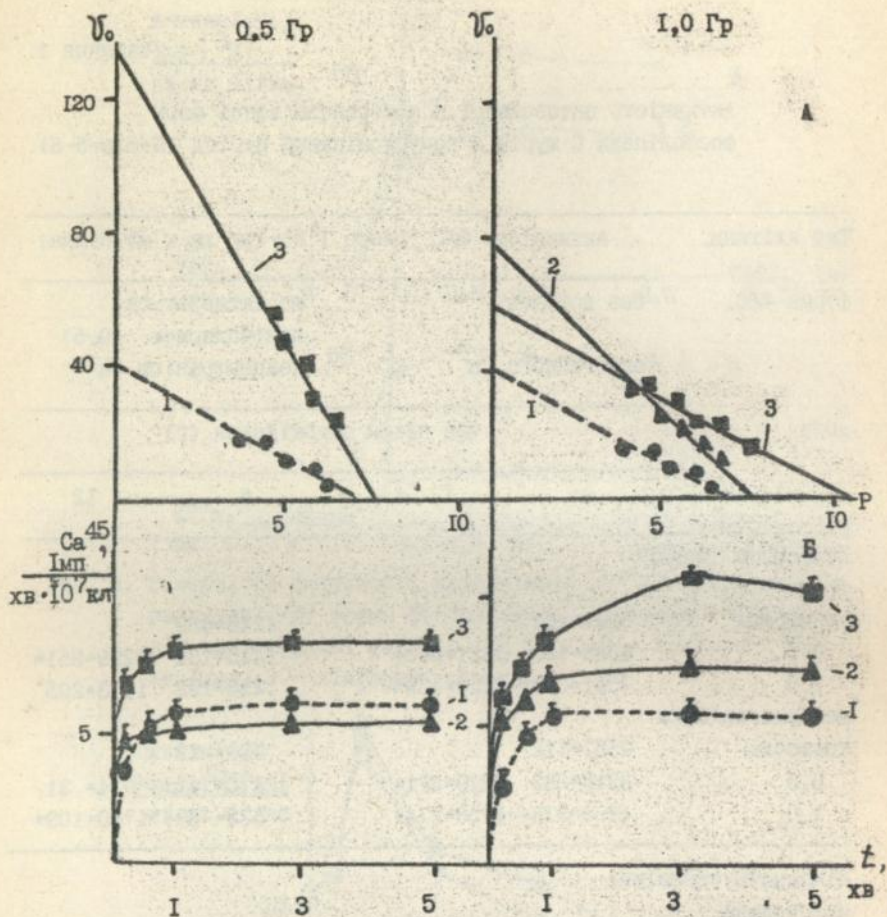


Рис. 7. Вхід Ca^{45} в лімфоцити селезінки щурів, опромінених в дозі 0,5 та 1,0 Гр : 1 - контроль, 2 - 6 годин, 3 - 12 годин після впливу /В/.
Перетворені криві входу мітки в координатах $U\%$ від Р /А/.

тивність фосфоліпази С лімфоцитів селезінки значною мірою залежить від концентрації кальцію, як вільного цитозольного, так і зв'язаного з мембранними поліфосфоінозитами. Як показано в лабораторії раніше, в лімфоцитах селезінки щурів опромінених в дозі 0,5 та 1,0 Гр спостерігається підвищення внутрішньоклітинного кальцію (Ручко, 1991).

У той же час, на зміну концентрації внутрішньоклітинного кальцію шляхом його мобілізації із внутрішньоклітинних депо, а також зміну проникності клітинних мембран для іона може впливати продукт діяльності фосфоліпази С - інозитолтрифосфат (Chow, 1990; Putney, 1990).

Зручним методом для визначення проникності мембран для кальцію є вивчення входу ^{45}Ca в клітини. В тимоцитах опромінених тварин не спостерігалось зміни входу ^{45}Ca у порівнянні з контролем (рис.7.). В лімфоцитах селезінки щурів через 12 г після опромінення в дозі 0,5 Гр спостерігалось значне підвищення початкової швидкості надходження ^{45}Ca . Збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію в лімфоцитах селезінки щурів у цей період можна частково пояснити збільшенням проникності клітинних мембран для даного іону.

При опроміненні тварин в дозі 1,0 Гр рівень максимального вмісту ^{45}Ca підвищується вже через 6 г після впливу і має найбільше значення через 12 г. Але при опроміненні в цій дозі не було відмічено суттєвого збільшення початкової швидкості надходження ^{45}Ca в лімфоцити селезінки через 12 г після впливу. Можливо це пояснюється порушенням у цей період часу після опромінення цілісності клітинних мембран лімфоцитів селезінки.

Таким чином, активація фосфоліпази С лімфоцитів селезінки передувала у часі підвищенню концентрації внутрішньоклітинного кальцію і зміні проникності для іону клітинних мембран. Виходячи з того, що ІФЗ впливає на зміну концентрації внутрішньоклітинного кальцію і є також показником активності фосфоліпази С, що гідролізує ендогенний субстрат в клітині (Taylor, 1984), ми вивчили утворення інозитолфосфатів в лімфоїдних клітинах щурів за нормальних умов і при опроміненні.

Через 1 г після опромінення тварин в дозі 0,5 Гр відбувається незначне збільшення утворення ІФЗ в тимоцитах, яке нормалізується через 3 години після опромінення. Максимальне

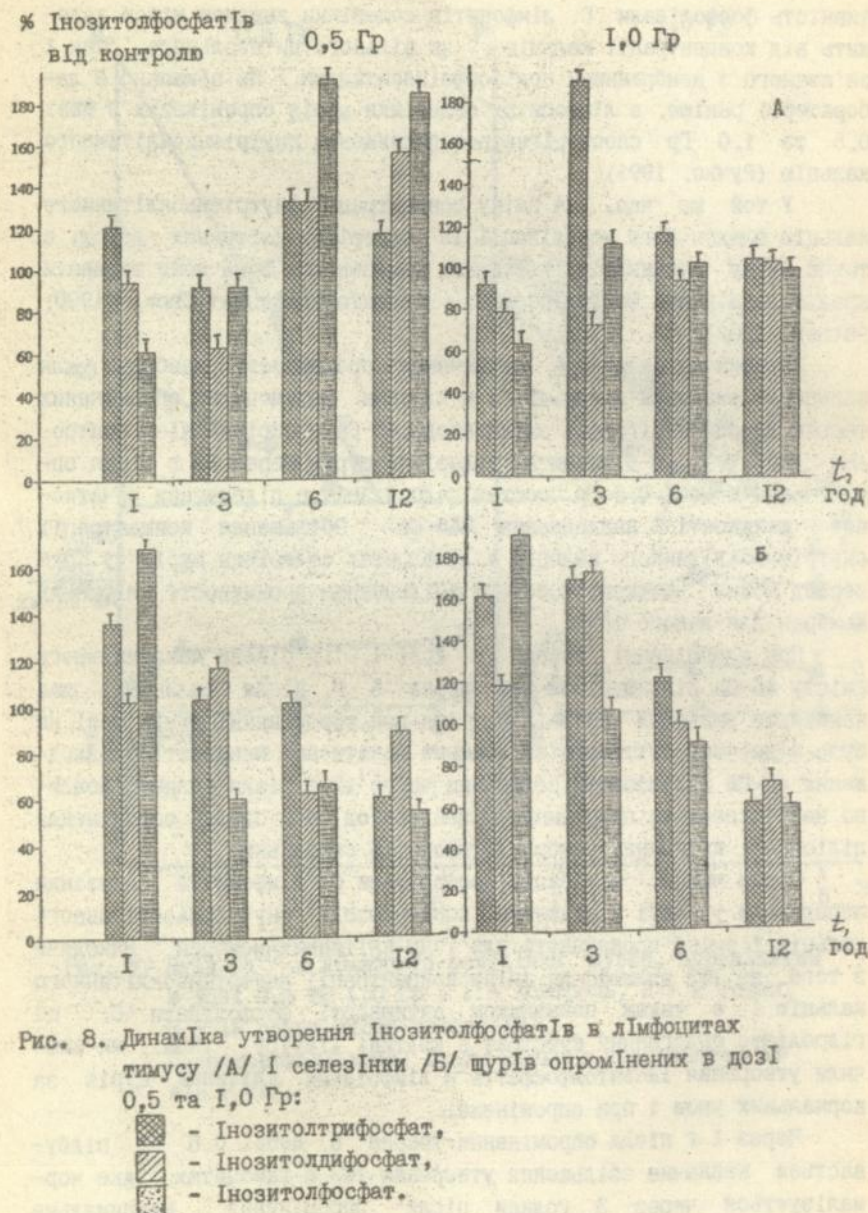


Рис. 8. Динаміка утворення Інозитолфосфатів в лімфоцитах тимусу /А/ і селезінки /Б/ щурів опромінених в дозі 0,5 та 1,0 Гр:

- ▣ - Інозитолтрифосфат,
- ▨ - Інозитолдифосфат,
- ▩ - Інозитолфосфат.

Інозитолфосфати,
% від контролю

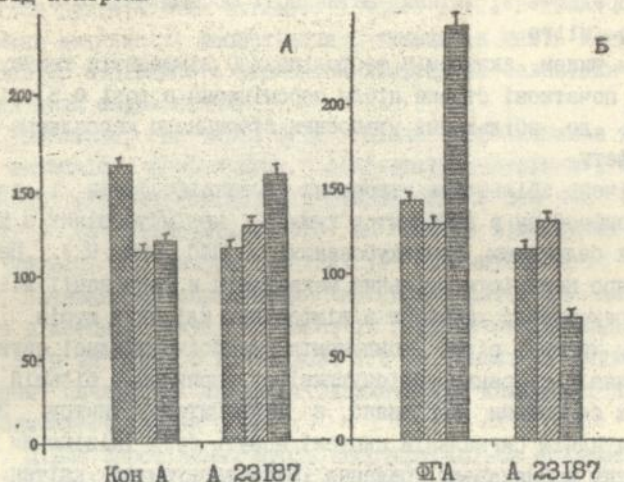





Рис. 9. Утворення Інозитолфосфатів в лімфоїдних клітинах тимусу /А/ і селезінки /Б/ щурів при преінкубації клітин з митогенами:

-  - Інозитолтрифосфат,
-  - Інозитолдифосфат,
-  - Інозитолфосфат.

зростання утворення ІФЗ спостерігається через 6 г після впливу (рис. 8.). Через 12 г утворення ІФЗ знижувалось, проте перевищувало контроль. Аналогічні зміни в утворенні ІФЗ ми спостерігали при опроміненні тварин у дозі 1,0 Гр. Рівень утвореного ІФЗ був підвищений протягом 3-6 г після опромінення і нормалізувався через 12 г.

В лімфоцитах селезінки підвищення утворення ІФЗ спостерігається через 2 г після опромінення. Через 3, 6 г після опромінення в дозі 0,5 Гр утворення ІФЗ відповідає контролю, а через 12 г зменшене на 40%. Аналогічні зміни відбуваються і в клітинах тварин, що опромінені в дозі 1,0 Гр. Проте підвищене утворення інозитолфосфатів триває довше (1-6 г) і більш яскраво виявлене.

Зміни вмісту інозитолфосфатів в лімфоцитах тимусу і селезінки корелюють зі змінами активності фосфоліпази С в модельній системі *in vitro*.

Таким чином, активація фосфоліпази С лімфоцитів тимусу і селезінки в початкові строки після опромінення в дозі 0,5 і 1,0 Гр призводить до збільшення утворення вторинного месенджера інозитолтрифосфату.

Відмічено збільшення утворення інозитолфосфатів і особливо інозитолтрифосфату в лімфоцитах тимусу, преінкубованих з Кон А і лімфоцитах селезінки, преінкубованих з ЛПС (рис.9.). Це може свідчити про наявність спільних механізмів в реалізації дії мітогенів і променевого ураження в лімфоїдних клітинах щурів.

Таким чином, різні компоненти фосфоінозитидної сигнальної системи виявляють ранню радіочутливість, причому в більшій мірі в лімфоцитах селезінки порівняно з лімфоцитами тимусу. Зміни в фосфоінозитидній сигнальній системі можуть бути ініціюючим фактором розвитку променевого ураження імунокомпетентних клітин.

ВИСНОВКИ

1. Тотальне опромінювання щурів в дозі 1,0 Гр викликає зменшення включення 32-Р в фосфоліпиди лімфоцитів тимусу і селезінки через 6 і 12 г після впливу. Опромінення в дозі 0,5 Гр не змінює максимальне включення 32-Р в фосфоліпиди, проте викликає перерозподіл мітки серед найважливіших груп фосфоліпідів у напрямку збільшення включення у фракцію фосфатидилінозитол і фосфатидилсерин.

2. При опроміненні щурів в дозі 0,5 та 1,0 Гр збільшується включення 32-Р в фосфатидилінозитол лімфоцитів селезінки. В лімфоцитах тимусу через 6 г після опромінення тварин в дозі 0,5 Гр спостерігається збільшення включення 32-Р в фосфоінозитиди і зниження вмісту 32-Р у складі фосфатидилінозитолбіфосфату при підвищенні дози до 1 Гр.

3. 80-85% активності ферменту присутня в цитозольній формі. Для цитозольної форми фосфоліпази С лімфоцитів тимусу і селезінки характерна наявність широкого оптимума рН-залежності і двох оптимумів Са-залежності.

4. Активність фосфоліпази С лімфоцитів селезінки підвищена напротязі 3 год після опромінення, лімфоцитів тимусу - на протязі

3-6 годин після впливу. Підвищення активності фосфоліпази С змінюється пригніченням активності через 12,24 г після опромінення. Зміни активності фосфоліпази С тимоцитів мають менш виявлений характер порівняно з ферментом лімфоцитів селезінки і залежать від дози опромінення.

5. Показано, що через 6,12 г після опромінення в дозі 0,5 і 1,0 Гр активність фосфоліпази С лімфоцитів селезінки і тимусу при відсутності екзогенного кальцію підвищена. У цей час активність ферменту, що активується 0,5 мМ CaCl_2 в лімфоцитах селезінки пригнічується, а в лімфоцитах тимусу - підвищується.

6. Показано, що опромінення не призводить до зміни входу $^{45}\text{-Ca}$ в лімфоцити тимусу. Через 12 г після опромінення тварин в дозі 0,5 Гр та через 6 г - в дозі 1,0 Гр спостерігається значне зростання початкової швидкості надходження кальцію і його вмісту в лімфоцитах селезінки.

7. Після опромінення шурів спостерігається збільшення утворення інозитолтрифосфату в лімфоцитах селезінки через 1,3 г, в лімфоцитах тимусу - через 3,6 г після впливу.

8. Показано, що зміни, які відбуваються в лімфоїдних клітинах при преінкубації їх з Кон А, ЛПС викликають активацію фосфоліпази С і зростання утворення інозитолфосфатів аналогічно змінам, що мають місце в клітинах в початкові строки після дії опромінення.

9. Фосфоінозитидна сигнальна система лімфоїдних клітин шурів виявляє ранню радіочутливість, причому в більшій мірі в лімфоцитах селезінки порівняно з лімфоцитами тимусу. Зміни в фосфоінозитидній сигнальній системі лімфоїдних клітин можуть бути ініціюючим фактором розвитку променевого ураження даного типу клітин.

2402631

СПИСОК РОБІТ,
НАДРУКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сировець Т.О., Пархомец Т.І., Кучеренко М.С. Властивості фосфоліпази С в лімфоцитах селезінки щурів // Доп. АН України. - 1992. - № 4. - С. 132-136.
2. Пархомец Т.І., Сировець Т.А., Кучеренко Н.Е. Активность фосфолипазы С тимоцитов в условиях воздействия невысоких доз рентгеновского облучения // Иммуный статус человека и радиация. Всес. научн. конф. / Гомель, сент. 1991 г. /: Сб. тез. - М., 1991. - С. 51.
3. Сировець Т.О., Пархомец Т.І., Кучеренко М.С. Властивості фосфоліпази С в імунокомпетентних клітинах щурів у нормі та в умовах дії невеликих доз іонізуючого опромінення // УІ Укр. біох. з'їзд / Київ, трав. 1992 р. /: Сб. тез. - К., 1992. - С. 178.
4. Сировець Т.О., Пархомец Т.І., Кучеренко М.С. Властивості фосфоліпази С в тимоцитах щурів // Вісник Київського університету. - 1992. - № 2. - С. 25-27.



470631

AB 26.702

AB 26.702