

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

ПАСТУХ Віктор Миколайович

МЕТАБОЛІЗМ АРАХІДОНОВОЇ КИСЛОТИ  
В ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИНАХ  
ЩУРІВ ПРИ РЕНТГЕНІВСЬКОМУ ОПРОМІНЕННІ

03.00.04—біохімія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ—1994

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00801564 (O)

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, **Дружина М. О.**;

доктор біологічних наук **Тугай В. А.**

Провідна організація:

Київський державний медичний університет ім. О. О. Богомольця

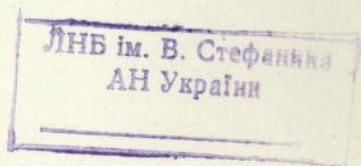
Захист відбудеться *«16» травня* 1994 р. о *«14»* год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна АН України (252030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці інституту.

Автореферат розіслано *«12» квітня* 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

**О. В. Кірсенко**



## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним з основних ефектів радіації на організм у невисоких дозах є порушення імунної системи і загибель лімфоцитів в стадії інтерфази. Особливістю лімфоцитів є те, що це єдині з клітин імунної системи, які гинуть протягом перших діб при променевої дії в дозах нижче 1,0 Гр (Жербин, 1989, Ярилин, 1988, Hendry, 1988). Першочергова роль у розвитку метаболічних процесів відводиться регуляторним системам, які забезпечують взаємодію між зовнішньою мембраною і внутрішньоклітинними процесами.

Однією з регуляторних систем, які беруть участь у трансформації мембранного сигналу і подальшому його посиленні, є ферментна система каскадного перетворення арахідонової кислоти з утворенням біологічно-активних метаболітів - лейкотрієнів та простагландинів. Функціонування цієї системи, зокрема, активність і властивості 5-ліпоксигенази в лімфоїдних клітинах вивчені не достатньо. Показана лише здатність тимоцитів синтезувати простагландини  $E_2$  та  $F_2\alpha$  (Mc Cormack, 1991) та В- і Т-лімфоцитів людини - лейкотрієн  $B_4$  і гідроксиейкозатетраєнові кислоти (Odlander, 1988, Schulam, 1990). Завдяки широкому спектру біохімічної дії ейкозаноїдів, їх ролі як посередників між процесами в мембранах та ядрі, вони розглядаються як тригер-ефектори у формуванні відповіді клітин на опромінення (Будницкая, 1986, Романцев, 1986, Паносян, 1987). Однак дані про зміну їх синтезу і спектру в різних популяціях лімфоцитів після опромінення нечисельні, а уявлення про можливу роль у розвитку радіаційного ураження суперечні. З одного боку вони розглядаються як токсичні для клітини метаболіти (Будницкая, 1986, Романцев, 1986), з іншого - як сполуки які можуть знижувати оксигенацію тканин (Паносян, 1987, 1990).

Оксигеназні реакції перетворення арахідонової кислоти, у ході яких синтезуються ейкозаноїди, пов'язані також з процесами вільнорадикального окислення і ферментативними реакціями перекисного окислення ліпідів. Недостатньо вивчена у цьому плані глутатіон-залежна система та її водорозчинні компоненти, які відіграють важливу роль у регуляції цитоплазматичних процесів і синтезі лейкотрієнів та простагландинів (Buckley, 1991, Huweler, 1991).

Принциповим для з'ясування подій, які ведуть до загибелі

лімфоцитів в стадії інтерфази є визначення послідовності біохімічних перетворень, починаючи з впливу опромінення на мембранному рівні. Показано, що у ранній період після опромінення у дозах 0,5 і 1,0 Гр спостерігається зниження чисельності лімфоїдних клітин, посилення гідролізу фосфоліпідів, підвищення активності фосфоліпази  $A_2$  і вивільнення арахідонової кислоти (Кучеренко, 1991, Слатвинская, 1992, Сировець, 1992). Вивчення шляхів подальшого перетворення арахідонату в умовах опромінення є важливим етапом у дослідженні біохімічних механізмів розвитку променевих реакцій лімфоїдних клітин.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідити метаболізм арахідонової кислоти, а також деякі компоненти антиокислювальної системи, які можуть бути пов'язані з утворенням ейкозаноїдів в різних за радіочутливістю лімфоїдних клітин - лімфоцитів селезінки та тимоцитів у ранній період після опромінення у дозах 0,5 і 1 Гр. Відповідно до поставленої мети були визначені наступні задачі:

1. Дослідити антиокислювальну активність та стан глутатіон-залежних компонентів антиокислювальної системи (вміст окисленого та відновленого глутатіону, активність глутатіонтрансферази) після опромінення тварин у дозах 0,5 і 1,0 Гр.

2. Вивчити активність та властивості 5-ліпоксигенази в без'ядерному супернатанті лімфоцитів селезінки та тимусу.

3. Дослідити вплив кальцієвого іонофора А 23187 та мітогенів на синтез ейкозаноїдів в лімфоцитах селезінки.

4. Вивчити активність 5-ліпоксигенази та вміст продуктів ліпоксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти в лімфоцитах селезінки та тимоцитах в нормі та після опромінення.

5. Дослідити активність простагландинсинтетази та вміст продуктів циклооксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти в лімфоїдних клітинах після опромінення.

Наукова новизна роботи. В роботі вперше показана наявність в лімфоцитах селезінки та тимоцитах 5-ліпоксигеназної активності, досліджені оптимальні умови її проявлення. Встановлений вміст простагландинів  $E_2$  і  $F_2\alpha$  та лейкотрієнів  $B_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$  і  $E_4$  і 15-гідроксіейкозатетраєнової кислоти в лімфоїдних клітинах. Показано, що вміст продуктів циклооксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти після преінкубації лімфоцитів селезінки з кальцієвим іонофором А 23187 не змінюється, а вміст продуктів лі-

поксигеназного шляху - підвищується.

Вперше проведене дослідження антиокислювальної активності. її глутатіон-залежних компонентів та метаболізму арахідонової кислоти у ранній період після опромінення в малих дозах у різних за радіочутливістю лімфоїдних клітинах. Показана кореляція у ранній активації 5-ліпоксигенази та підвищенні вмісту первинних продуктів ліпоксигеназної реакції - гідроксиейкозатетраєнових кислот (НЕТЕ) та лейкотрієну  $B_4$ . Виявлене підвищення вмісту відновленого глутатіону, активності глутатіонтрансферази та вмісту лейкотрієну  $C_4$  у часі при розвитку променевого ураження клітин.

У досліджуваній період після опромінення не виявлені зміни в сумарному вмісті простагландинів  $E_2$  та  $F_2\alpha$  як в лімфоцитах селезінки, так і в тимоцитах.

Теоретична і практична значимість роботи. Одержані дані розширюють уявлення про біохімічні механізми активації клітин в нормі та розвиток ранніх клітинних реакцій після опромінення в малих дозах. В результаті порівняльного дослідження циклоокси- та ліпоксигеназних реакцій виявлені окремі ланки каскадного перетворення арахідонової кислоти, які чутливі до дії радіації. Результати досліджень сприяють ідентифікації серед метаболітів арахідонової кислоти можливих медіаторів розвитку променевого ураження і дозволяють рекомендувати способи корекції, в основі яких лежить пригнічення окремих реакцій синтезу лейкотрієнів.

Дані про можливі механізми підтримання окислювально-антиоксидантної рівноваги та розвиток ферментативного окислення ліпідів в лімфоїдних клітинах після опромінення важливі для пошуку науково-обґрунтованих засобів радіопрофілактики та радіотерапії.

Апробація роботи. Результати роботи були викладені на Всесоюзній науковій конференції "Імунний статус людини і радіація" (Гомель, 1991); на VII конференції по спектроскопії біополімерів (Харків, 1991); на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992); на університетській конференції професорсько-викладацького складу (1993); на радіобіологічному з'їзді (Київ, 1993); на міжнародній конференції "Навколишнє середовище і здоров'я" (Чернівці, 1993); на засіданні кафедри біохімії Київського університету.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 7 робіт.

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 244 робіт. Дисертація викладена на 147 стор., має у своєму складі 13 рисунків та 14 таблиць.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар різної статі вагов 130-150 г. 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.

Тимус і селезінку перетирали через 4 шари нейлонової сітки у середовище 199. Фракцію лімфоцитів селезінки отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Raque (густина 1,077) за методом (Boyum, 1968). Субклітинні фракції лімфоїдних клітин (мембранну та цитозольну) отримували методом диференційного центрифугування без'ядерного супернатанту лімфоцитів в 25 mM трис-HCl буфері, рН 7,4 протягом 1 год при 100000 g. Як ферментний препарат 5-ліпоксигенази та глутатіонтрансферази використовували супернатант 18000 g, одержаний при центрифугуванні без'ядерного супернатанта 20 хв. Визначення білка проводили за методом (Lowry, 1951).

Клітини ( $2 \cdot 10^7$  кл/мл) інкубували протягом різних проміжків часу з мітогенами (Sigma): конканавалін А (Кона), фітогемаглютинін (ФГА), ліпосахарид *E. coli* (ЛПС) у концентрації 0,5 мкг/мл, чи кальцієвим інофором А 23187 у концентрації 0,5 мкМ.

Антиокислювальну активність (АОА) оцінювали по окисленню 2,6-дихлорфеноліндофенол натрію (Семенсв, 1985).

Вміст відновленого (GSH) та окисленого (GSSG) глутатіону визначали з використанням 0-фталієвого альдегіду за методом (Mitsun, 1976) на спектрофлуориметрі "Shimadzu RF-510" (Японія), довжина хвилі збудження 350 нм і емісії - 420 нм.

Активність глутатіонтрансферази визначали за методом (Nabig, 1974) на двопробеновому спектрофотометрі "Specord M40" (НДР) чи SP-8-500 "PYE UNICAM" (Великобританія) з термостатуючим приладом "Thermocell". Як субстрат використовували 1-хлор-2,4-динітробензол.

Активність 5-ліпоксигенази (5-ЛО) визначали на спектрофотометрі "Specord M-40" за зміню оптичної густини середовища при

234 нм, зв'язаною виключно з утворенням гідроперекисного продукту (Бутович, 1989). Як субстрат використовували розчин солюбілізованої лубролом РХ лінолевої кислоти.

Вміст 15-НЕТЬ досліджували за допомогою радіоімунного набору фірми "Advanced Magnetic Inc.". Вміст лейкотрієнів  $B_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$  і  $E_4$  та простагландинів  $E_2$  і  $F_2\alpha$  визначали за допомогою радіоімунних наборів фірми "Amersham".

Активність циклооксигенази оцінювали по включенню  $^{14}C$ -арахідонату в простагландини  $E_2$  та  $F_2\alpha$  (Гелинг, 1990). Хроматографічне розділення ейкозаноїдів проводили в системі розчинників такого складу - етилацетат:ізооктан:оцтова кислота:вода (110:50:20:100) в одному напрямку (Jakschik, 1982). Кількісний вміст ейкозаноїдів оцінювали по радіоактивності плям. Радіоактивність вимірювали на рідинно-сцинтиляційному лічильнику "Delta-300" (США). Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили на IBM PC EX з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток первинних реакцій променевого ураження клітин значною мірою залежить від порушення рівноваги між реакціями вільно-радикального окислення ліпідів та активністю антиоксидантних систем. Всі антиокислювальні компоненти утворюють ендogenousний фонд радіорезистентності, про стан якого можна судити, зокрема, по величині антиокислювальної активності.

В післяпроменевий період зміни рівня АОА залежали від дози, часу після опромінення і виду клітин. Через 6-12 год після опромінення тварин у дозі 0,5 Гр АОА тимоцитів і лімфоцитів селезінки достовірно не змінювалася.

Однак, через 12 год після опромінення у дозі 1,0 Гр спостерігались зміни у рівні АОА лімфоцитів селезінки та тимусу, які свідчать про зрушення окислювально-антиоксидантної рівноваги у клітинах (Табл. 1).

В тимоцитах, де рівень АОА у контролі вищий порівняно з лімфоцитами селезінки, спостерігали підвищення антиокислювальної активності, а в лімфоцитах селезінки - її пригнічення.

Одним з компонентів антиоксидантної системи лімфоїдних клітин, яким відводиться важлива роль в регуляції процесів ПОЛ у цитоплазмі і в синтезі ліпоксигеназних похідних арахідонової кисло-

ти (AK) є система глутатіону.

Встановлено, що вміст GSH у післяпроменевий період збільшувався в лімфоїдних клітинах, у більшій мірі через 12 год після дії радіації (Табл.2). В лімфоцитах селезінки у цей період відмічене також підвищення вмісту окисленої форми глутатіону, хоча і менше за величиною. Таке накопичення GSSG може розглядатися як індикатор окислювального стресу. З іншого боку підвищення вмісту GSH свідчить про розвиток адаптивної відповіді лімфоїдних клітин.

Таблиця 1.

Антиокислювальна активність лімфоцитів селезінки та тимоцитів щурів після опромінення ( $M \pm m; n 3+18$ ).

Доза, Гр	Термін після опромінення, год	Константа пригнічення окислення субстрата, $k, *10^{-3}$ л/мг*хв	
		Лімфоцити селезінки	Тимоцити
Контроль		0,751 $\pm$ 0,048	1,376 $\pm$ 0,107
1,0	12	0,533 $\pm$ 0,111*	1,824 $\pm$ 0,271

\* - різниця з контролем вірогідна ( $p < 0,05$ )

Таблиця 2.

Вміст окисленого та відновленого глутатіону в лімфоїдних клітинах після опромінення (мкг/мг білка) ( $M \pm m; n 6$ ).

СТАН	Лімфоцити селезінки		Тимоцити	
	GSSG	GSH	GSSG	GSH
Контроль	0,283 $\pm$ 0,018	2,375 $\pm$ 0,187	0,128 $\pm$ 0,072	1,051 $\pm$ 0,101
6 год	0,290 $\pm$ 0,026	3,431 $\pm$ 0,572*	0,139 $\pm$ 0,015	1,342 $\pm$ 0,265
0,5 Гр				
12 год	0,413 $\pm$ 0,029*	4,663 $\pm$ 0,607*	0,234 $\pm$ 0,034*	2,054 $\pm$ 0,257*
6 год	0,298 $\pm$ 0,017	3,484 $\pm$ 0,326*	0,162 $\pm$ 0,036	1,793 $\pm$ 0,286*
1,0 Гр				
12 год	0,548 $\pm$ 0,059*	6,032 $\pm$ 0,346*	0,206 $\pm$ 0,019	1,907 $\pm$ 0,156*

\* - різниця з контролем вірогідна ( $p < 0,05$ )

Ефект відновленого глутатіону реалізується шляхом його участі у функціонуванні глутатіонтрансферази. Глутатіонтрансферазна активність була однаковою в клітинах обох популяцій. У післяпроме-

невий період вона збільшувалась у більшій мірі в лімфоцитах селезінки, порівняно з тимоцитами (Рис. 1). Підвищення активності ферменту після опромінення може бути пов'язаним з підвищенням вмісту GSH в лімфоїдних клітинах.

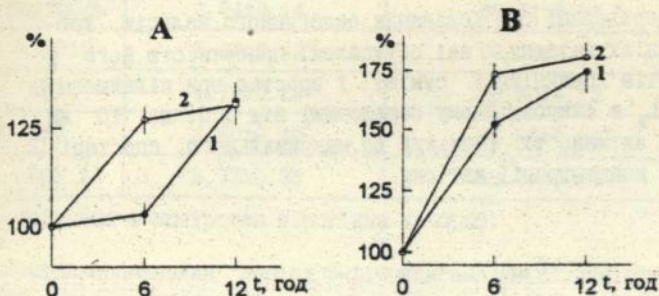


Рис. 1. Глутатіонтрансферазна активність тимоцитів (А) та лімфоцитів селезінки (В) та після опромінення тварин у дозі 0,5 (1) і 1,0 Гр (2).

По осі ординат % глутатіонтрансферазної активності.

Таким чином, виявлена активація досліджених компонентів глутатіон-залежної антиокислювальної системи свідчить про інтенсифікацію вільнорадикального окислення ліпідів в лімфоїдних клітинах.

Серед ферментних систем, які регулюють ПОЛ, важливе значення має 5-ліпоксигеназа. У ході реакцій, які каталізує фермент, має місце "перехоплення" активних форм кисню, з утворенням НЕТЕ і лейкотрієнів.

Максимальний рівень 5-ліпоксигеназної активності спостерігали в супернатанті 18000 г як в тимоцитах, так і в лімфоцитах селезінки. В мембранній фракції 100000 г активність ферменту не спостерігалась, а у цитозольній фракції 100000 г вона була на 20-30% нижчою, ніж в супернатанті 18000 г, що вказує на необхідність присутності мембранного компоненту для проявлення оптимальної активності (Rouzer, 1985).

Активність 5-ЛО була максимальною при концентрації субстрату

$2-2,5 \cdot 10^{-4}$  М, рН оптимум ферменту знаходився в області 6,4. Температурний оптимум протікання ліпоксигеназної реакції - в області  $35^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C}$ . Активність ферменту була вищою в лімфоцитах селезінки порівняно з тимоцитами за різних умов проведення реакції.

Активність ферменту пригнічувалась на 65 і 80% в присутності у інкубаційному середовищі 2 мМ EDTA і на 85 і 94% в присутності 2 мМ EGTA в лімфоцитах селезінки і тимоцитах відповідно.

При вивченні залежності ферментативної активності в лімфоцитах селезінки від концентрації кальцію показано, що активність реєструється в середовищі без додавання екзогенного кальцію, тобто при концентраціях катіону, які обумовлені присутністю його в складі компонентів реакційної суміші і зростає при підвищенні концентрації  $\text{CaCl}_2$  в інкубаційному середовищі від 0,01 до 10 мМ (Рис.2). Рівень активності, близький до максимального, спостерігався при 0,1 мМ концентрації катіону.

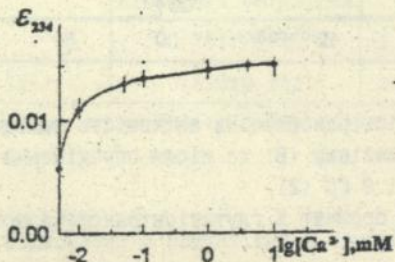


Рис.2. Залежність 5-ліпоксигеназної активності лімфоцитів селезінки від концентрації кальцію.

Ще одним підтвердженням залежності 5-ЛО реакції в інтактних клітинах від іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є досліди з А 23187. Преінкубація лімфоцитів селезінки з кальцієвим іонофором призводила до підвищення початкової швидкості ліпоксигеназної реакції і рівня максимального накопичення продукту. Активуючий ефект А 23187 був приблизно однаковий порівняно з ФГА і ЛПС (Табл.3). Одержані дані вказують на можливу роль 5-ЛО у проведенні активаційного сигналу з зовнішньої мембрани клітин, опосередковано через взаємодію з  $\text{Ca}^{2+}$ .

Таблиця 3.

Кінетичні характеристики 5-ліпоксигеназної реакції лімфоцитів селезінки щурів в нормі і при інкубації клітин з мітогенами та кальцієвим іонофором А 23187 (M±m; n 6+12)

СТАНОВИЩЕ	Початкова швидкість реакції, нмоль ЛК/хв*мг білка	Максимальне накопичення продукту, нмоль ЛК/мг білка
Контроль	3,04±0,14	68,71±3,61
+ А 23187	5,07±0,12*	99,00±8,50*
+ ФГА	4,72±0,29*	90,60±6,12*
+ ЛПС	4,80±0,40*	84,66±5,04*
+ Кон А	3,73±0,38	83,00±3,55*

\* - різниця з контролем вірогідна (p<0,05)

У післяпроменевий період 5-ліпоксигеназна активність в лімфоїдних клітинах підвищується. Ці зміни мають різний характер у клітинах різних органів. В лімфоцитах селезінки підвищення 5-ліпоксигеназної активності спостерігається у ранній період - через 6 год після опромінення тварин як у дозі 0,5, так і 1,0 Гр (Рис. 3, В). Максимальна активність ферменту спостерігається через 12 год після опромінення у дозі 0,5 Гр і через 6 год - у дозі 1,0 Гр. Через 24 год після опромінення у дозі 1,0 Гр активність ферменту пригнічується.

Активність ферменту в тимоцитах значно підвищується лише через 24 год після дії радіації як у дозі 0,5, так і 1,0 Гр (Рис. 3, А).

Підвищення 5-ліпоксигеназної активності в лімфоцитах селезінки відбувається у той же період часу, коли спостерігається активація фосфоліпази А<sub>2</sub> і звільнення арахідонової кислоти з мембранних фосфоліпідів (Слатвінська, 1991). В тимоцитах, однак, підвищення рівня вивільненого арахідонату через 12 год після опромінення не супроводжується значною активацією 5-ЛО. Можна припустити, що підвищення ліпоксигеназної активності у післяпроменевий період слід пояснювати, враховуючи не лише вивільнення арахідонової кислоти як субстрату перетворення, але і інші процеси, зокрема, накопичення активних радикалів у клітинах в ході реакцій ПОЛ.

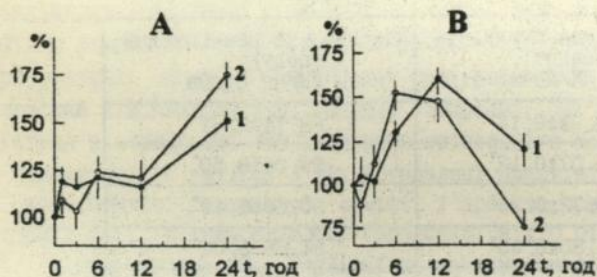


Рис. 3. 5-ліпоксигеназна активність тимоцитів (А) і лімфоцитів селезінки (В) після опромінення тварин у дозах 0,5 (1) та 1,0 Гр (2).

По осі ординат % ліпоксигеназної активності.

Особливого дослідження потребує варіант, коли субстратом ЛО є арахідонова кислота. Спектр утворюваних при її ліпоксигеназному перетворенні проміжних сполук - гідроксиейкозатетраєнових кислот (НЕТЕ) і лейкотрієнів (ЛТ) може визначати метаболічний стан клітини при дії різних факторів, у тому числі і радіації у невисоких дозах. Метаболіти АК, які утворюються по ліпоксигеназному шляху розділяються на дві групи: швидкореагуючі - Н(Р)ЕТЕ, ЛТ<sub>4</sub> і ЛТВ<sub>4</sub> та повільнореагуючі - ЛТС<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>.

В найбільшій мірі після опромінення в лімфоцитах селезінки змінюється рівень НЕТЕ (Табл.4). Через 12 год після опромінення у дозі 0,5 Гр вміст ендogenous 15-НЕТЕ зростає в 3,7 рази порівняно з контролем. При підвищенні дози опромінення до 1,0 Гр спостерігалось підвищення вмісту 15-НЕТЕ через 6 год і зниження порівняно з контролем - через 12 год. 15-НЕТЕ - одна з загальної кількості гідроксиейкозатетраєнових кислот, які утворюються з АК. Тому оцінювали також загальну НЕТЕ-синтезуючу активність при інкубації лімфоцитів селезінки з <sup>14</sup>С-арахідонатом (Табл.4). Хоча рівень коливань синтезованого НЕТЕ в лімфоцитах селезінки після опромінення нижчий, ніж 15-НЕТЕ, направленість змін в обох випадках однакова.

Аналогічно вмісту НЕТЕ у післяпроменевий період в лімфоцитах селезінки змінюється і рівень ЛТВ<sub>4</sub> - він поступово зростає після опромінення тварин у дозі 0,5 Гр. а його максимальний рівень (у 3,8 рази більший порівняно з контролем) відмічений через 6 год після опромінення у дозі 1,0 Гр (Табл.5). Зміни вмісту НЕТЕ та ЛТВ<sub>4</sub> в лімфоцитах селезінки корелюють у часі і за величиною між собою та зі зміною активності 5-ЛО у досліджуваній період.

Таблиця 4.

Вміст 15-НЕТЕ і НЕТЕ-синтезуюча активність в лімфоцитах селезінки опромінених тварин (M±m, n 3+9).

Доза опромінення, Гр	Термін після опромінення, год	15-НЕТЕ, пг/10 <sup>7</sup> кл	Включення мітки в <sup>14</sup> C-НЕТЕ за 2 хв, %
Контроль		62,17±2,68	10,17±1,68
0.5	6	70,13±3,47	11,13±2,47
	12	233,67±27,32*	14,84±2,21*
1.0	6	153,84±28,21*	14,67±1,32*
	12	49,07±5,85	3,18±1,85*

\* - різниця з контролем вірогідна (p<0,05)

Таблиця 5.

Вміст лейкотрієнів В<sub>4</sub> і С<sub>4</sub> в лімфоїдних клітинах після опромінення (M±m, n 5+8).

СТАН	Лімфоцити селезінки		Тимоцити		
	ЛТВ <sub>4</sub>	ЛТС <sub>4</sub>	ЛТВ <sub>4</sub>	ЛТС <sub>4</sub>	
Контроль	19,35±2,24	47,81±11,52	7,32±0,84	20,01±2,82	
0.5 Гр	6 год	30,69±4,93*	57,67±3,05	8,72±2,41	31,07±2,75*
	12 год	50,14±7,30*	84,04±14,26*	9,86±1,81	40,03±2,51*
1.0 Гр	6 год	73,02±12,50*	66,21±6,32	13,12±1,93*	35,33±3,38*
	12 год	39,25±7,57*	90,03±5,85*	12,32±1,60*	47,83±5,31*

\* - різниця з контролем вірогідна (p<0,05)

Вміст ЛТВ<sub>4</sub> в тимоцитах у 2,7 рази нижчий порівняно з лімфо-

цитами селезінки і змінюється у післяпроменевий період в меншій мірі (Табл. 5). Однак після дії радіації у дозі 1,0 Гр також спостерігається його підвищення - у 1,7 рази порівняно з контролем.

Одержані дані про раннє підвищення після дії радіації метаболітів ліпоксигеназного перетворення АК, при утворенні яких утилізується кисень, можна пояснити як адаптивні, направлені на зниження кисневого ефекту, що дозволяє підтримувати на стаціонарному рівні антиокислювальну активність клітин. Однак утворення у надмірних кількостях таких метаболітів арахідонової кислоти як НЕТЕ і ЛТВ<sub>4</sub> може викликати блокування ферменту їх синтезу - ліпоксигенази (Jakschik, 1982), і сприяти зрушенню окислювально-антиоксидантної рівноваги. Саме такі зміни (зниження АОА і активності 5-ЛО) спостерігаються в лімфоцитах селезінки через 12-24 год після опромінення у дозі 1,0 Гр.

Вміст ЛТС<sub>4</sub> в лімфоцитах селезінки у контролі також був вищий порівняно з тимоцитами (Табл. 5). Однак його зміни у післяпроменевий період були однаковими в клітинах обох органів - поступове зростання незалежно від дози опромінення. Таке підвищення вмісту ЛТС<sub>4</sub> пов'язане, на нашу думку, зі зростанням вмісту в лімфоїдних клітинах ендogenous глутатіону та активацією глутатіонтрансферази, так як саме за їх участю ЛТА<sub>4</sub> перетворюється в ЛТС<sub>4</sub>.

Слід відмітити, що загальний вміст досліджуваних ЛТ в лімфоцитах селезінки вищий, ніж в тимоцитах. З розвитком променевого ураження їх кількість підвищується, змінюється також співвідношення між різними групами лейкотрієнів. Після опромінення у дозі 0,5 Гр і на ранньому етапі після дії у дозі 1,0 Гр збільшення відбувається за рахунок приросту НЕТЕ та ЛТВ<sub>4</sub>, а доля ЛТС<sub>4</sub> у їх загальному спектрі при цьому зменшується. Через 12 год після дії у дозі 1,0 Гр спостерігається зворотня картина - вміст НЕТЕ та ЛТВ<sub>4</sub> знижений, а ЛТС<sub>4</sub> - підвищений.

Привертає увагу той факт, що наростання вмісту ЛТС<sub>4</sub> спостерігається одночасно з розвитком радіаційного ураження і загибеллю лімфоїдних клітин, що дає підставу розглядати цей повільнореагуючий лейкотрієн як один з можливих радіотоксинів. З іншого боку, активація глутатіонтрансферази і підвищений синтез ЛТС<sub>4</sub> можливо сприяють нейтралізації пошкоджуючої дії продуктів вільнорадикального окислення.

Альтернативним шляхом ферментативного окислення АК є її циклізація з утворенням лабільних ендоперекисів, які перетворюються

в більш стабільні простагландини (ПГ) за участю циклооксигенази.

Вміст ПГЕ<sub>2</sub> і F<sub>2</sub>α в тимоцитах опромінених тварин залишався на рівні контролю, тоді як в лімфоцитах селезінки рівень ПГЕ<sub>2</sub> та F<sub>2</sub>α змінювався через 6 год після опромінення. Ці зміни є різнонаправленими - вміст ПГF<sub>2</sub>α знижувався, а ПГЕ<sub>2</sub> підвищувався (Табл.6), що призводить до підвищення співвідношення ПГЕ<sub>2</sub>/ПГF<sub>2</sub>α. Можливо, в післяпроменевиї період різнонаправлено змінюється активність ПГF<sub>2</sub>α-ендопероксидредуктази і ПГЕ<sub>2</sub>-ендопероксидізомерази. В той же час у сукупності кількість простагландинів E<sub>2</sub> та F<sub>2</sub>α достовірно не змінюється.

Таблиця 6.

Вміст простагландинів в лімфоцитах селезінки (M±m, n 3+6).

Доза опромінення, Гр	Термін після опромінення, год	Вміст простагландинів (пг/10 <sup>7</sup> кл)	
		ПГЕ <sub>2</sub>	ПГF <sub>2</sub> α
Контроль		165,00±27,89	494,73±25,47.
0.5	6	257,25±16,58*	384,53±32,71*
	12	174,09±21,09	455,57±21,19
1.0	6	341,00±12,19*	315,93±67,84*
	12	239,25±52,96	353,11±23,47*

\* - різниця з контролем вірогідна (p<0,05)

При вивченні простагландинсинтезної активності в лімфоцитах селезінки показано (Рис.4) що зміни синтезу простагландинів F<sub>2</sub>α та E<sub>2</sub> з <sup>14</sup>C-арахідонату корелюють зі зміною їх вмісту через 6 год після опромінення.

Таким чином, в досліджуваній період після опромінення в лімфоїдних клітинах спостерігається виражена активація одного з шляхів перетворення арахідонової кислоти - ліпоксигеназного.

Щоб виявити, якою мірою процеси синтезу досліджуваних метаболітів АК залежать від концентрації внутрішньоклітинного кальцію, вивчали їх вміст в лімфоцитах селезінки після преінкубації клітин з 0,5 мкМ А 23187 у інкубаційному середовищі, що містило 1 мМ СаСL<sub>2</sub>. Показано, що преінкубація з кальцієвим іонофором призводить до підвищення вмісту 15-НЕТЕ та ЛТВ<sub>4</sub> (Табл.7). Вміст ПГЕ<sub>2</sub> та F<sub>2</sub>α при цьому не змінювався порівняно з контролем. Вибіркова активація ліпоксигеназного шляху перетворення арахідонової кис-

лоти може бути пов'язана зі зміною концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в лімфоцитах селезінки у ранній післяпроменевиий період (Ручко, 1992).

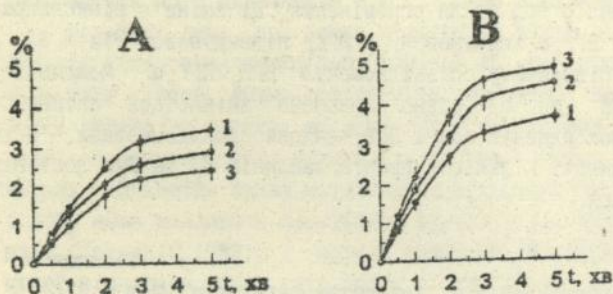


Рис. 4. Включення  $^{14}\text{C}$  з  $^{14}\text{C}$ -арахідонової кислоти в  $\text{PGF}_2\alpha$  (А) та  $\text{PGE}_2$  (В) в лімфоцитах селезінки в нормі (1) і через 6 год після опромінення у дозі 0,5 (2) та 1,0 Гр (3). По осі ординат % включення мітки  $^{14}\text{C}$  в простагландини.

Таблиця 7.

Вміст продуктів (пг/10<sup>7</sup> кл) циклоокси- та ліпоксигеназного перетворення арахідонової кислоти в лімфоцитах селезінки при інкубації клітин з кальцієвим іонофором А 23187 ( $M \pm m$  n 6+12).

СТАН	15-НЕТЕ	ЛТВ <sub>4</sub>	ПГЕ <sub>2</sub>	ПГФ <sub>2</sub> α
Контроль	62,17±2,68	19,35±2,24	165,00±27,89	494,73±25,47
+ А 23187	149,67±12,50*	30,00±5,81*	212,66±35,13	476,30±15,62

\* - різниця з контролем вірогідна ( $p < 0,05$ )

Активация ліпоксигеназної реакції в клітинах після опромінення може також залежати від стану інших регуляторних систем та вмісту інших метаболітів. Це, зокрема, антиокислювальна активність, активність глутатіонтрансферази, вміст глутатіону. Оскільки рівень даних компонентів в лімфоцитах селезінки та тимоцитах у нормі відрізняється, то цим, до деякої міри, може бути обумовлена різниця у радіочутливості досліджуваних клітин.

На основі одержаних даних можна заключити, що після опромінення тварин у дозах 0,5 і 1,0 Гр метаболізм арахідонової кислоти в лімфоїдних клітинах змінюється у напрямку ітенсифікації ліпоксигеназних реакцій. При цьому підвищується вміст НЕТЕ та лейкотрієнів в клітинах, у динаміці розвитку паталогії змінюється їх спектр. Нестабільні продукти ліпоксигеназного перетворення арахідонової кислоти можуть бути медіаторами розвитку променевого ураження.

### ВИСНОВКИ

1. У ранній період після опромінення у дозі 1,0 Гр в лімфоцитах селезінки та тимусу спостерігається підвищення антиокислювальної активності та вмісту відновленого глутатіону в тимоцитах та зниження антиокислювальної активності і підвищення окисленого глутатіону в лімфоцитах селезінки. Глутатіонтрансферазна активність в лімфоцитах обох органів підвищується.

2. Цитозоль 18000 g лімфоїдних клітин проявляє 5-ліпоксигеназну активність. 5-ліпоксигеназа лімфоцитів селезінки може приймати участь у проведенні активаційного сигналу, оскільки після преінкубації клітин з кальцієвим іонофором А 23187 та мітогенами ЛПС і ФГА активність ферменту підвищується.

3. Встановлене раннє підвищення 5-ЛО активності лімфоцитів селезінки у післяпроменевий період. Спостерігається кореляція у підвищенні в часі після опромінення активності 5-ліпоксигенази та вмісту її первинних продуктів 15-НЕТЕ і ЛТВ<sub>4</sub>. Підвищення 5-ліпоксигеназної активності та вмісту ЛТВ<sub>4</sub> в тимоцитах спостерігається у більш віддалений термін після опромінення порівняно з лімфоцитами селезінки.

4. Загальний вміст продуктів ліпоксигеназного перетворення арахідонової кислоти протягом досліджуваного періоду підвищений - після опромінення у дозі 0,5 Гр за рахунок приросту НЕТЕ та ЛТВ<sub>4</sub>, після опромінення у дозі 1,0 Гр - за рахунок ЛТС<sub>4</sub>.

5. Процеси перетворення арахідонової кислоти по циклооксита ліпоксигеназному шляхам в лімфоцитах селезінки характеризуються різною чутливістю до дії іонів кальцію. Преінкубація лімфоцитів селезінки з кальцієвим іонофором А 23187 призводить до підвищення вмісту в клітинах 15-НЕТЕ та ЛТВ<sub>4</sub>. Вміст ПГЕ<sub>2</sub> та ПГФ<sub>2</sub>α при цьому не змінюється.

6. Перетворення арахідонової кислоти в лімфоїдних клітинах в ранній післяпроменевий період проходить в основному по ліпоксигеназному шляху.

### СПИСОК РОБІТ, НАДРУКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Слатвинская Е. А., Пастух В. Н., Матышевская О. П., Кучеренко Н. Е. Активность фосфолипазы  $A_2$ , отщепляющей арахидонат, и 5-липоксигеназы в лимфоцитах селезенки облученных крыс // Иммуный статус человека и радиация. Всес. научн. конф. / Гомель, сент. 1991 г. /: Сб. тез. - М., 1991. - С. 53.
2. Пастух В. Н., Марченков Ф. С., Матышевская О. П., Кучеренко Н. Е. Спектрофотометрическое определение активности 5-липоксигеназы лимфоцитов крыс // VII конференция по спектроскопии биополимеров / Харьков, октябрь 1991 г. /: Сб. тез. - Х., 1991. - С. 184-185.
3. Пастух В. Н., Марченков Ф. С. Активність 5-ліпоксигенази в лімфоцитах селезінки опромієних щурів // VI Укр. біох. з'їзд / Київ, трав. 1992 р. /: Сб. тез. - К., 1992. - С. 168.
4. Пастух В. М., Матишевська О. П., Кучеренко М. Є. Вивчення умов протікання 5-ліпоксигеназної реакції в лімфоцитах селезінки щурів // Доп. АН України - 1993. - № - С. 131-134.
5. Пастух В. М., Матишевська О. П., Кучеренко М. Є. 5-ліпоксигеназна активність лімфоцитів селезінки та тимусу щурів // Вісник КУ - 1993. - № - С. 23-26.
6. Пастух В. Н., Матышевская О. П., Пархомец Т. И., Марченков Ф. С. Некоторые показатели активности антиокислительной системы глутатиона и оксигеназного превращения арахидоновой кислоты в лимфоцитах селезенки крыс после рентгеновского облучения // II Радиобиологический съезд / Киев, сент. 1993 г. /: Сб. тез. - Пушкино, 1993. - С. 774.
7. Пастух В. М., Матишевська О. П., Пархомец Т. І., Кучеренко М. Є. Вміст продуктів ліпоксигеназного перетворення арахідонової кислоти в лімфоцитах селезінки після рентгенівського опромінення // Міжнародна наук. конферен. "Навколишнє середовище і здоров'я" / Чернівці, лист. 1993 р. /: Сб. тез. - Ч., 1993. - С. 100.

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

*Ласиш*

Подписано к печати 8. 04. 94 г.  
Формат 60×84/16 Бумага офсетная  
Усл. печ. лист 1,0. Тираж 100 Зак. 1127  
Типография АВСУ.

462198

AB 29.682