

**МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО
ИЗЛУЧЕНИЯ НА ГОМЕОСТАЗ В ТИМОЦИТАХ**
**THE MODIFICATION EFFECTS OF IONIZING RADIATION
ON THYMOCYTE HOMEOSTASIS**

В. И. Лягуский, Ю. Ю. Шиманская, И. В. Пухтеева, Н. В. Герасимович
V. Lyaguskiy, J. Shimanskaya, I. Puhteeva, N. Gerasimovich

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
liahuski@mail.ru
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В работе изучено модифицирующее влияние ионизирующего излучения на физико-химическое состояние плазматических мембран клеток тимуса и концентрацию ионов свободного внутриклеточного кальция. Установлено, что одной из мишеней действия ионизирующего излучения является плазматическая мембрана тимоцитов.

Отмечается изменение полярности, микровязкости аннулярного липида, полярности и микровязкости липидного бислоя, изменение степени тушения белковой флуоресценции. Все эти изменения, происходящие в мембране, свидетельствуют о модифицирующем влиянии ионизирующего излучения на мембрану тимоцитов, что в свою очередь ведет к нарушению передачи сигнала в клетке посредством вторичных посредников.

This work studied the modification effect of ionizing radiation on the physic and chemical state of plasmatic membranes of thymocyte. It has been establish that one of the targets of ionizing radiation is plasmatic membrane thymocytes.

There is a change in polarity, microviscosity of the annular lipid; polarity and microviscosity of the lipid bilayer; changes in the degree of quenching of protein fluorescence. All these changes occurring in the membrane indicate the modification effect of ionizing radiation on the membrane of thymocytes, which in turn leads to disruption of intracellular signal activity.

Ключевые слова: тимоциты, плазматическая мембрана, ионизирующее излучение, свободный цитоплазматический кальций, пирен, Fura-2/AM.

Keywords: thymocytes, plasmatic membrane, ionizing radiation, cytoplasmic calcium, pyrene, Fura-2/AM.

В процессе своей жизни человек подвергается воздействию ионизирующего излучения (ИИ) как от естественных (космическое облучение, радионуклиды, находящиеся в земной коре, воде, атмосфере), так и от искусственных (техногенных) источников излучения [3]. Наиболее радиочувствительными клетками в организме млекопитающих и человека являются клетки костного мозга, тимуса, селезенки, лимфатических узлов [2]. Особое место отводится изучению молекулярных механизмов интерфазной гибели радиочувствительных клеток организма, к которым относятся лимфоциты, образующие ряд различных популяций.

Поскольку показано, что состояние тимуса играет важную роль в клеточном иммунитете и отвечает за пострадиационную иммунодепрессию, актуальным представляет раскрытие механизмов действия ионизирующего излучения на данные клетки, что является одной из центральных проблем современной радиобиологии. В настоящее время доказано, что тимоциты реагируют на облучение путем изменения активности клеток, процессов дифференцировки, что в конечном итоге может сопровождаться их гибелью и угнетением функций иммунной системы организма.

Современные представления о биологических мембранах, строящиеся на основе полученного к настоящему времени большого фактического материала, указывают на многообразие форм их функциональной специализации как в пределах одной клетки, так и в клетках различных тканей. Анализируя значение различных структурных единиц мембран, определяющих ее функциональную активность, следует отметить тесную взаимосвязь и взаимовлияние липидного и белкового компонентов плазматической мембраны.

Биологическим мембранам отводится важная роль в поддержании в клетке гомеостаза внутриклеточного кальция. Установлено, что концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме клетки непостоянна и изменяется под действием внеклеточных сигналов. При этом увеличение концентрации кальция в клетке вызывается активацией Са-каналов в плазмалемме или во внутриклеточных мембранах. Каналы находятся в открытом состоянии до тех

пор, пока не прекратится активирующее воздействие или не произойдет «самоинактивация» канала. Благодаря высокому градиенту концентрации, Ca^{2+} из среды поступает в клетку, и уровень кальция во внутриклеточном пространстве увеличивается до 1–10 мкмоль/л. Это приводит к насыщению участков связывания Ca^{2+} на соответствующих цитоплазматических белках. Модифицируемые кальцием белки-регуляторы связываются с другими белками мишенями и активируют различные ферментные процессы. После прекращения действия внешнего сигнала системы Са-насосов понижают концентрацию кальция в цитоплазме до исходного уровня и подготавливают клетку к восприятию нового сигнала.

В связи с вышесказанным целью данной работы явилось изучение модифицирующего действия ионизирующего излучения на гомеостаз в клетках тимуса.

Объектом исследования выступали тимоциты контрольных и облученных крыс. Исследования проводились на нелинейных крысах-самцах 6-месячного возраста массой 170–220 г ($n = 30$). Облученные животные брались в опыт на 3-и и 10-е сутки после острого γ -облучения в дозе 1 Гр. Группа облученных животных имела соответствующий контроль. Контрольных крыс содержали в стандартных условиях вивария, но без источника облучения.

Выделение тимоцитов проводили по методу, как описано в работе [1]. При этом все операции осуществляли на холоду (при $t = 4^\circ\text{C}$). Для выделения клеток крыс декапитировали, извлекали тимус и промывали охлажденным до 10°C фосфатным буфером (PBS, pH 7,4).

Определение количества и жизнеспособности клеток проводили как в работе [1].

С помощью флуоресцентного зонда пирена (Molecular Probes, SIGMA) проводили исследование липидной фазы мембран. В данном случае анализировалась степень эксимеризации пирена, эффективность тушения пиреном триптофановой флуоресценции, полярность окружения зонда в приобелковом липиде и липидном бислое мембран [4]. Регистрацию спектров флуоресценции осуществляли на спектрофлуориметре SFL-2203 (Солар, РБ) при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм. Микровязкость липидного окружения пирена оценивали по отношению интенсивностей флуоресценции эксимерной и мономерной части спектра (J^2/J^M) при $\lambda_{\text{эм.}} = 475$ и 373 нм, соответственно. Микрополярность анализировали по отношению второго и первого вибрационных пиков (F^2/F^1) в спектре флуоресценции мономеров с $\lambda_{\text{эм.}} = 385$ и 373 нм при длинах волн возбуждения 337 и 286 нм. Состояние белковой компоненты мембран лимфоцитов оценивали по интенсивности флуоресценции мембранных триптофанилов в диапазоне 310–500 нм при $\lambda_{\text{возн.}} = 286$ нм.

Для измерения внутриклеточной концентрации ионов кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2/AM (Molecular Probes, SIGMA). Клетки отмывали в фосфатном буфере PBS (pH 7,4) и инкубировали с Fura-2 в течение 40 мин при 37°C [5], с последующей отмывкой в PBS (pH 7,4). Спектры флуоресценции записывали на флуориметре SFL-2203 (СОЛАР, РБ). Измерение спектров флуоресценции ($\lambda = 510$ нм) проводили при $\lambda_{\text{возб.}} = 340$ и 380 нм. При этом анализировали параметры флуоресценции, когда практически все молекулы зонда находились в связанном и в свободном от кальция состоянии. Для этого использовали Triton-X100 (0,5 % р-р) и избыток EGTA (10 ммоль/л). Анализ спектров флуоресценции для определения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ проводили как описано в [5] по формуле:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd \cdot \beta \cdot (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$$

Все полученные результаты были обработаны статистически и выражались в виде среднего значения и стандартной ошибки средней, а значимость различий в группах оценивали по t-критерию Стьюдента. При этом различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

При помощи флуоресцентного зонда пирена исследовалось физико-химическое состояние плазматической мембраны тимоцитов. При возбуждении молекул пирена часть его мономеров поднимается в полярные области мембраны, в то время как другие – эксимеризуются в зоне жирнокислотных цепей фосфолипидов. На этом основании из полученных спектров рассчитываются величины микровязкости и полярности липидного компонента мембран клеток тимуса.

В эксперименте было установлено, что наиболее выраженные эффекты действия радиации характерны для показателей микровязкости аннулярного липида и липидного бислоя. При этом на 3-и сутки после облучения происходит увеличение значения на 58 % по сравнению с контролем, а на 10-е сутки отмечается его снижение на 50 % (рис. 1).

Полученные данные указывают на то, что после острого облучения в дозе 1 Гр происходят фазные изменения физико-химических свойств мембран тимоцитов. При этом в наибольшей степени данный эффект был выражен в области аннулярных липидов.

На основании полученных результатов можно предположить, что установленное с помощью метода флуоресцентных зондов изменение физического состояния мембран тимоцитов и лимфоцитов периферической крови крыс уже в ранние сроки после однократного общего γ -облучения в указанных дозах в значительной степени обусловлено радиационной модификацией их липидного компонента. Это, в свою очередь может, быть связано с изменением антиоксидантных систем, которое наблюдается при облучении организмов.

В настоящее время известно, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) после действия ионизирующих излучений также сопровождается активацией ключевых ферментов липидного метаболизма, что, в свою очередь, может приводить к накоплению в мембране продуктов ПОЛ и лизофосфолипидов.

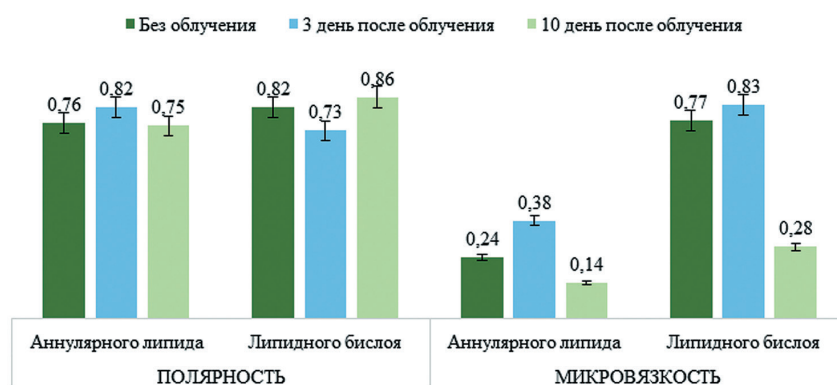


Рисунок 1 – Влияние γ -облучения на показатели полярности и микровязкости липидного компонента плазматических мембран тимоцитов (в отн. единицах)

Можно предположить, что установленные изменения физико-химического состояния липидного компонента мембран тимоцитов после острого облучения могут сказаться и на состоянии их белкового компонента. Показано, что конформационные перестройки мембранных белков, отмечаемые при радиационном воздействии, отражаются на спектральных характеристиках их триптофановых остатков. В связи со сказанным, было проведено исследование влияния облучения на степень тушения триптофановой флуоресценции мембранных белков пиреном (табл. 1). Установлено увеличение изучаемого показателя на 3-и сутки после облучения в 2,2 раза по отношению к контролю. При этом на 10-е сутки происходит снижение степени тушения белковой флуоресценции пиреном и приближение ее к контрольным значениям.

Таблица 1 – Влияние облучения на степень тушения триптофановой флуоресценции плазматических мембран тимоцитов

Условия	Степень тушения пиреном белковой флуоресценции, %
Без облучения	12,50±5,50
3 день после облучения	33,20±1,58*
10 день после облучения	15,50±4,50

Примечание: * – показатели значимы при $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.

Установленные радиационно-индуцированные изменения физико-химического состояния липидного и белкового компонента биологической мембраны могут быть одной из причин, приводящей к нарушению функционального состояния плазмалеммы и модификации концентрации свободного цитоплазматического кальция.

При анализе изменения концентрации свободного цитоплазматического кальция $[Ca^{2+}]_i$ не было установлено значимых отличий изучаемого показателя на 3-и и 10-е сутки после острого облучения в дозе 1 Гр по сравнению со значениями в клетках контрольных животных (табл. 2).

Рассмотренные данные позволяют предположить целый ряд взаимосвязанных причин поддержания концентрации цитоплазматического кальция. Первостепенная роль в регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза отводится состоянию плазматической мембраны, а также митохондриям и эндоплазматическому ретикулуму.

Хотя модификации ионного гомеостаза клеток считаются одним из факторов реализации радиационного воздействия, конкретные молекулярные механизмы, приводящие к изменениям в регуляции ионного транспорта, остаются пока во многом неясны. Можно предположить, что реорганизация липидного компонента мембран лежит в основе усиления перераспределения ионных потоков в клетках под действием ионизирующей радиации.

Таблица 2 – Влияние облучения в дозе 1 Гр на уровень внутриклеточного цитоплазматического кальция в тимоцитах, (нмоль/л)

Условия	Концентрация свободного цитоплазматического Ca^{2+} , нмоль/л
Без облучения	65,55±2,55
3-и сутки после облучения	63,85±0,35
10-е сутки после облучения	68,50±0,80

Согласно данным, полученным в ходе эксперимента, можно сделать выводы, что ионизирующее излучение оказывает модифицирующее влияние на плазматические мембраны клеток тимуса. Это выражается в изменении их физико-химических свойств, таких как полярность, микровязкость аннулярного липида и степени тушения белковой флуоресценции. Изменение данных параметров плазматической мембраны может привести к изменению передачи сигнала внутри клетки посредством вторичных мессенджеров.

Учитывая то, что наблюдаемые эффекты в ряде случаев при действии острого γ -облучения носили разнонаправленный характер, можно предположить, что установленные изменения вызваны опосредованным вторичным влиянием облучения в различные сроки пострadiационного периода на состояние основных Са-транспортных систем, участвующих в метаболизме внутриклеточного Са²⁺ в радиочувствительных клетках организма.

Важное значение в данной проблеме отводится комплексной оценке состояния Са²⁺-гомеостаза в клетках иммунной системы. Такой подход, позволяет составить схему вероятностной последовательности событий, приводящих к наблюдаемым нарушениям гомеостаза ионов Са²⁺ в радиочувствительных клетках при лучевом воздействии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wherry, E. J. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T-cell subsets / E. J. Wherry [et al.] // *Nature Immunology*. – № 4 – 2003. – P. 225–234.
2. Андрийчук, Т. Р. Влияние ионизирующей радиации на индукцию и реализацию запрограммированной клеточной гибели / Т. Р. Андрийчук, Н. Г. Ракша, С. Л. Луговая, С. Я. Мандрык, Л. И. Остапченко // *Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды. Меж. конф.* – Сыктывкар, 2014. – С. 11–14.
3. Корсаков, А. В. Многофакторное техногенное загрязнение окружающей среды как фактор риска формирования цитогенетических нарушений у населения / А. В. Корсаков // *Вестник Брянского государственного технического университета*. – 2014. – № 2. – С. 155–160.
4. Потапнев, М. П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М. П. Потапнев // *Иммунология* – № 4 – 2002. – с. 237–243.
5. Grynkiwicz, G. A New generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiwicz, M. Poenie, P. Y. Tsien // *J. Biological chemistry*.

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ОЗДОРОВИТЕЛЬНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ С ЦЕЛЬЮ НОРМАЛИЗАЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У ЖЕНЩИН

ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF THE APPLICATION OF HEALTH-IMPROVING PHYSICAL CULTURE WITH THE PURPOSE OF NORMALIZING THE EXCHANGE OF MATTER IN WOMEN

А. В. Лялюго¹, Я. В. Зубенко²

A. V. Lyalyugo¹, Y. V. Zubenko²

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь

²Витебский областной диагностический центр, г. Витебск, Республика Беларусь
pepy_rjaya@mail.ru

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus
Vitebsk Regional Diagnostic Center, Vitebsk, Republic of Belarus

Действие неблагоприятных факторов экологической среды оказывает с возрастом влияние на обмен веществ. Биохимические данные у женщин старше 40 лет и с избыточной массой тела являются объективными мотивационными признаками для занятий по оздоровительным системам. На изменение биохимических показателей обмена углеводов и липидов позитивно влияет шейпинг-система. Комплексное применение дозированных физических нагрузок в сочетании с коррекцией питания и отказом от вредных привычек может быть использовано для уменьшения негативного воздействия на здоровье человека негативных факторов окружающей среды.

The effect of adverse environmental factors with age affects the metabolism. Biochemical data in women older than 40 years and overweight are objective motivational signs for classes in wellness systems. The change in the biochemical parameters of carbohydrate and lipid metabolism is positively affected by the shaping system. Combined use of metered physical exertion in combination with nutrition correction and avoiding bad habits can be used to reduce the negative impact on human health of negative environmental factors.

Ключевые слова: шейпинг, холестерол, триацилглицеролы, глюкоза, липопротеиды, метаболизм.

Keywords: shaping, cholesterol, triacylglycerol, glucose, lipoproteins, metabolism.