



УДК 576.31

В. В. СЕНЧУК, А. Т. ПИКУЛЕВ, Л. А. ЛАСТОВСКАЯ

СОСТОЯНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ И НИТРАТА НАТРИЯ

The study of actin polymerization state and SDS-electrophoretic pattern of cytoskeletal proteins from rat hepatocytes after gamma-radiation and sodium nitrate treatment showed the adaptive rearrangement of the cytoskeleton components induced by low doses of radiation and nitrate.

Изучение молекулярных механизмов повреждающего действия различных химических соединений и ионизирующего излучения на организм млекопитающих является актуальной задачей, поскольку позволяет выявить наиболее чувствительные к этим факторам элементы клетки и разработать пути направленной коррекции возникающих биохимических изменений. В решении этой проблемы важное значение имеет исследование первичных биохимических реакций клеток организма, подвергнутых воздействию различных физико-химических факторов внешней среды. В этом отношении значительный интерес представляет изучение структурно-функционального состояния компонентов цитоскелета, в значительной степени определяющего протекание различных клеточных процессов – деления, формообразования, рецепции, секреции и др. [1]. Установлено, что радикальное изменение агрегатного состояния и белкового состава цитоскелета является одной из наиболее ранних реакций клеток в ответ на экспозицию к разнообразным токсинам [2], канцерогенным ароматическим аминам [3], цитотоксическим лекарственным препаратам [4].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния нитрата натрия, гамма-облучения и их комбинированного воздействия на состояние глобулярного актина (Г-актина), фибриллярного актина (Ф-актина) и на белковый состав цитоскелета печени крыс в различные сроки после воздействия.

Материал и методика

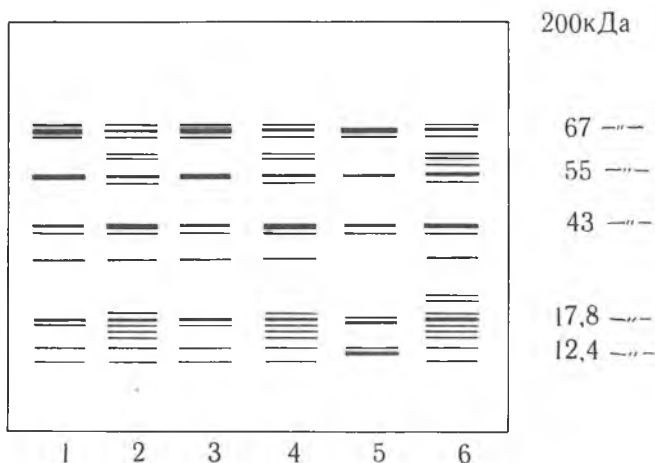
Эксперименты проведены на беспородных белых крысах массой 150–180 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Первую группу составили экспериментальные животные, подвергнутые однократному общему облучению гамма-лучами в дозе 0,5 Гр. Облучение проводили на установке ИГУР-1 (источник излучения Cs^{137} , мощность дозы 0,062 Гр/мин). Вторую группу животных подвергали общему однократному гамма-облучению в дозе 6,5 Гр. Третья группа животных получала ежедневно нитрат натрия в виде водного раствора в пороговой дозе 20 мг/кг в течение 35 дней. Суммарная доза составила 700 мг/кг. Четвертая группа животных получала однократно нитрат натрия в дозе 700 мг/кг. Животные пятой группы подвергались однократному облучению в дозе 0,5 Гр после хронического потребления нитрата натрия в дозе 700 мг/кг. Животных всех групп брали в опыт через 1, 3, 7 и 15 сут после воздействия. Выбор условий радиационного воздействия обусловлен тем, что использование ионизирующего облучения в большой дозе (6,5 Гр) и в относительно малой дозе (0,5 Гр) позволяет выявить

особенности специфических и неспецифических элементов, определяющих развитие молекулярно-биохимических механизмов биологического действия радиации.

Содержание Г-актина и Ф-актина измеряли в цитоплазматической фракции гепатоцитов по степени ингибирования активности панкреатической ДНКазы 1 [4, 5]. Функционально активные гепатоциты выделяли по методу Jacob T. S. и Bhargava P. M. [6]. Цитоскелет гепатоцитов получали лизисом клеток в растворе, содержащем 0,5 %-ный тритон X-100 [7]. Белковый состав цитоскелета гепатоцитов анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [8]. Белки в ПААГ окрашивали красителем кумасси R-250 [9]. Концентрацию белка определяли колориметрическим методом [10]. Экспериментальные данные обрабатывали статистически.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные о содержании различных форм актина в цитоплазматической фракции гепатоцитов при однократном введении нитрата натрия в дозе 700 мг/кг. Из них видно, что при такой постановке эксперимента нитрат натрия не вызывает достоверных изменений агрегатного состояния актина гепатоцитов в различные сроки после воздей-



Электрофоретический анализ в 15 %-ном ПААГ в присутствии ДСН белков цитоскелета гепатоцитов:

1—контроль; 2—7-е сут после хронического введения нитрата; 3—7-е сут после однократного введения нитрата; 4—7-е сут после облучения в дозе 0,5 Гр; 5—7-е сут после облучения в дозе 6,5 Гр; 6—7-е сут после облучения в дозе 0,5 Гр на фоне хронического введения нитрата. Маркеры молекулярной массы: тяжелые цепи миозина (200 кДа); бычий сывороточный альбумин (67 кДа); тубулин мозга быка (55 кДа); скелетно-мышечный актин (43 кДа); миоглобин (17,8 кДа); цитохром С (12,4 кДа)

ствия. Электрофоретический анализ белковых компонентов цитоскелета гепатоцитов показывает (рисунок), что однократное воздействие нитрата натрия не изменяет качественный состав белков цитоскелета. По-видимому, этот факт может быть обусловлен высокой скоростью выведения нитрата из организма [11] и, следовательно, возможное изменение структуры цитоскелета гепатоцитов в первые часы после поступления нитрата натрия в кровоток быстро нормализуется по мере его выведения из организма. В связи с этим было предпринято исследование состояния актинового цитоскелета гепатоцитов после продолжительного потребления нитрата натрия.

В табл. 2 показаны результаты измерения содержания Г-актина, Ф-актина и суммарного актина (Г-актин + Ф-актин) в цитоплазматической фракции гепатоцитов при хроническом введении нитрата натрия в дозе 700 мг/кг. Эти результаты показывают, что введение нитрата натрия не вызывает изменения суммарного содержания актина цитоплазматической фракции гепатоцитов по сравнению с гепатоцитами контрольных животных. Вместе с тем при хроническом потреблении нитрата натрия наблюдается прогрессирующее во времени значительное умень-

шение содержания мономерной формы актина и увеличение количества полимерного актина, что свидетельствует об активации процесса полимеризации глобулярного актина гепатоцитов. Наряду с этим в составе цитоскелета гепатоцитов выявляется накопление полипептидов, ассоциированных с микротрубочками и микрофиламентами, и уменьшение относительного содержания тубулина, основного белкового компонента микротрубочек (см. рисунок). В клетках Г-актин и Ф-актин находятся в состоянии динамического равновесия, которое чрезвычайно чувстви-

Таблица 1

Содержание различных форм актина в цитоплазматической фракции печени крыс при однократном введении нитрата натрия в дозе 700 мг/кг ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, $n = 5$)

Серии опытов	Содержание актина, мкг/мг белка		
	Г-актин + Ф-актин	Г-актин	Ф-актин
Контроль	66,5±0,8	34,1±0,8	32,4±0,6
1-е сут после воздействия	66,2±0,9	33,2±0,7	33,0±0,8
3-и сут —>—	64,8±1,2	32,1±1,1	32,7±1,0
7-е сут —>—	65,6±1,0	33,1±1,3	32,5±0,9
15-е сут —>—	64,9±0,9	32,8±1,0	32,1±1,2

Таблица 2

Содержание различных форм актина в цитоплазматической фракции печени крыс при хроническом введении нитрата натрия в дозе 700 мг/кг ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, $n = 5$)

Серии опытов	Содержание актина, мкг/мг белка		
	Г-актин + Ф-актин	Г-актин	Ф-актин
Контроль	66,5±0,8	34,1±0,8	32,4±0,6
1-е сут после воздействия	65,1±0,5	31,3±0,4*	33,8±0,4
3-и сут —>—	66,3±0,9	25,1±0,3*	41,2±0,9*
7-е сут —>—	65,3±0,8	18,1±0,7*	47,2±0,7*
15-е сут —>—	65,5±0,6	11,0±0,4*	54,5±1,6*

*—Здесь и в табл. 3—5 достоверные изменения при $p < 0,05$.

тельно к воздействию разнообразных раздражителей [2, 3, 4, 12]. Реакции полимеризации-деполимеризации актина в гепатоцитах контролируются специфическими гельзолин-подобными белками, относящимися к группе так называемых «кепирующих» белков, которые обладают способностью к высокоаффинному специфическому Са-зависимому связыванию с растущим концом актиновых филаментов, блокируя присоединение к нему мономеров актина [13]. По-видимому, обнаруженные нами количественные и качественные реакции цитоскелета гепатоцитов в условиях хронического потребления нитрата натрия определяются изменением активности «кепирующих» белков вследствие существенного перераспре-

деления ионов кальция между компартментами клетки, что является характерным элементом реакции клеток при действии разнообразных токсических факторов [14]. Вместе с тем переход значительного количества мономерного актина цитоплазмы в фибриллярное состояние может выступать в качестве одного из элементов неспецифической защитной реакции клеток к повреждающему действию нитрата натрия, так как повышение вязкости цитоплазмы и увеличение содержания Ф-актина в клетках является одной из составных частей неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы в ответ на различные физические и химические раздражители [12].

Таблица 3

Содержание различных форм актина в цитоплазматической фракции печени крыс при однократном облучении в дозе 0,5 Гр ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, $n = 5$)

Серии опытов	Содержание актина, мкг/мг белка		
	Г-актин + Ф-актин	Г-актин	Ф-актин
Контроль	67,5±0,8	35,7±0,8	31,8±0,4
1-е сут после воздействия	66,0±0,9	32,9±0,9	33,1±0,6
3-и сут →—	66,6±0,5	31,1±0,5*	35,5±0,7*
7-е сут →—	66,1±0,7	28,0±0,6*	38,1±1,0*
15-е сут →→—	65,9±1,1	22,6±0,9*	43,3±0,6*

Таблица 4

Содержание различных форм актина в цитоплазматической фракции печени крыс при однократном облучении в дозе 6,5 Гр ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, $n = 5$)

Серии опытов	Содержание актина, мкг/мг белка		
	Г-актин + Ф-актин	Г-актин	Ф-актин
Контроль	67,5±0,8	35,7±0,8	31,8±0,4
1-е сут после воздействия	66,2±1,1	42,8±0,9*	23,4±1,3*
3-и сут →—	63,8±1,2*	47,6±1,1*	16,2±0,9*
7-е сут →→—	64,1±0,9*	51,4±1,4*	12,7±1,1*

Сходные изменения в содержании различных форм актина и белкового состава цитоскелета гепатоцитов обнаружены и при однократном облучении в дозе 0,5 Гр (табл. 3, рисунок): при неизменном общем содержании актина выявляется прогрессирующая трансформация глобулярного актина в фибриллярный актин, сопровождающаяся уменьшением содержания тубулина и появлением группы ассоциированных с цитоскелетом полипептидов. Напротив, облучение животных в большой дозе приводит к выраженной деструкции цитоскелета гепатоцитов (табл. 4, рисунок). Наряду с достоверным уменьшением общего содержания актина в цитоскелетной фракции гепатоцитов на 3-е и 7-е сут после облучения обнаруживается значительное, нарастающее во времени после облучения, уменьшение содержания полимеризованного актина и накоп-

ление в гепатоцитах мономеров актина. При этом, согласно данным электрофоретического анализа, нарушается взаимодействие микрофиламентов и микротрубочек с актин- и тубулин-связывающими белками, в результате чего последние отделяются от цитоскелета гепатоцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что в ответ на облучение в относительно малой дозе развивается адаптивная реакция, одним из важнейших элементов которой является увеличение содержания фибриллярной формы актина в цитоплазматической фракции гепатоцитов. Гамма-облучение в дозе 6,5 Гр индуцирует разрушение цитоскелетных структур клеток печени, что, по-видимому, отражает развитие патологических процессов, возникающих в результате лучевого поражения.

В связи с тем, что в настоящее время особую актуальность приобрели исследования, направленные на выяснение характера молекулярно-биохимических изменений, возникающих при совместном действии ионизирующей радиации в относительно малой дозе и нитратов, обладающих выраженной токсичностью и способностью индуцировать генетические перестройки в клетках млекопитающих [15], нами было предпринято изучение агрегатного состояния актина в цитоплазме гепатоцитов при однократном облучении в дозе 0,5 Гр на фоне хронического введения нитрата натрия в дозе 700 мг/кг. Полученные результаты показывают (табл. 5), что и в этом случае сохраняется тенденция к возрастанию содержания Ф-актина и снижению содержания Г-актина при постоянном содержании общего пула актина. Накопление в гепатоцитах полимеризованного актина сопровождается ассоциацией с цитоскелетом группы полипептидов с молекулярными массами 17,4 кДа, 21,2–28,5 кДа, 53–67 кДа и уменьшением относительного содержания полимеризованной формы тубулина (см. рисунок). Однако изменение агрегатного состояния актина при совместном действии нитрата натрия и облучения характеризуется рядом особенностей по сравнению с эффектами каждого фактора в отдельности. Из данных табл. 5 видно, что в этом случае прогрессирующая после облучения на фоне введения нитрата натрия трансформация Г-актина в Ф-актин достигает максимума к 7-м сут после радиационного воздействия, а затем обнаруживается тенденция к восстановлению исходного структурного состояния актина. Сравнительный анализ динамики изменения агрегатного состояния актина в цитоплазматической фракции гепатоцитов при совместном воздействии нитрата

Таблица 5

Содержание различных форм актина в цитоплазматической фракции печени крыс при однократном облучении в дозе 0,5 Гр после хронического введения нитрата натрия в суммарной дозе 700 мг/кг ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, n = 5)

Серии опытов	Содержание актина, мкг/мг белка		
	Г-актин + Ф-актин	Г-актин	Ф-актин
Контроль	67,5±0,8	35,7±0,8	31,8±0,4
1-е сут после воздействия	66,8±0,6	28,7±0,8*	38,1±1,4*
3-и сут —>—	66,1±0,8	22,4±0,5*	43,7±0,9*
7-е сут —>—	65,6±0,7	18,5±0,6*	46,9±0,5*
15-е сут —>—	66,0±0,8	24,6±0,6*	41,4±1,1*

натрия и гамма-облучения (см. табл. 5), а также при действии каждого из указанных факторов в отдельности (см. табл. 2, 3) показывает, что перестройка citoархитектуры актина гепатоцитов достигает максимальных значений при хроническом введении нитрата натрия, а эффект совместного действия радиации и нитрата натрия весьма близок по

численным значениям содержания различных форм актина к эффекту, обнаруженному при хроническом введении нитрата, но превышает таковой в случае однократного облучения в дозе 0,5 Гр.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в результате общего однократного гамма-облучения в дозе 6,5 Гр в гепатоцитах экспериментальных животных запускаются деструктивные процессы, приводящие к разрушению компонентов цитоскелета. При хроническом введении нитрата натрия в дозе 700 мг/кг и облучении в дозе 0,5 Гр развивается однотипная адаптивная реакция гепатоцитов, выражающаяся в увеличении содержания полимерной формы актина в клетках печени и в накоплении в составе цитоскелета полипептидов, ассоциированных с микрофиламентами и микротрубочками. По-видимому, стимуляция реакции полимеризации актина в цитоплазматической фракции гепатоцитов при действии выше перечисленных факторов реализуется через изменение активности специфических актин-связывающих белков, регулирующих структурное состояние актиновых микрофиламентов. По нашему мнению, такая реакция цитоскелета гепатоцитов в ответ на хроническое действие нитрата натрия и гамма-облучения в относительно малой дозе имеет адаптивный характер. Защитный эффект полимерного актина может реализоваться за счет увеличения вязкости среды, фиксации и стабилизации мембранных структур клетки, а также иммобилизации в трехмерной сети актиновых микрофиламентов макромолекул клетки, наиболее чувствительных к повреждающему действию химических соединений и радиации. Вместе с тем облучение в относительно малой дозе на фоне введения нитрата натрия приводит к несколько иному изменению состояния актиновых микрофиламентов гепатоцитов, которое заключается в увеличении глубины адаптивной реакции актинового цитоскелета к облучению после хронического потребления нитрата натрия. Таким образом, в результате исследования цитоскелета гепатоцитов крыс при воздействии нитрата натрия и ионизирующего излучения выявлены некоторые особенности радиационно-биохимических изменений структурно-функционального состояния белковых компонентов цитоскелета.

Список литературы

1. Rollard T. D. // Journ. Cell Biol. 1981. P. 1565.
2. Соорег J. A. // Cell Biol. 1987. V. 105. N. 4. P. 1473.
3. Пикулев А. Т., Дашкевич И. Н., Ластовская Л. А., Сенчук В. В. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2: Хим. Биол. Геогр. 1992. N 3. С. 38.
4. Сенчук В. В., Пикулев А. Т., Дашкевич И. Н., // Докл. АН БССР. Т. 34. N 6. С. 564.
5. Blikstad I., Markey F., Carlsson L., Persson T., Lindberg U. // Cell. 1978. V. 15. N 5. P. 935.
6. Jacob T. S., Bhargava P. M. // Exp. Cell Res. 1962. V. 27. N3. P. 453.
7. Brown S., Levinson V., Spudich J. A. // Journ. Supramol. Struct. 1976. V. 5. N. 1. P. 119.
8. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. N 5259. P. 680.
9. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981.
10. Petersson G. L. // Meth. Enzym. 1983. V. 91. P. 95.
11. Цыганенко О. И., Набока М. В., Лапченко В. С., Цыпко М. И., Емченко М. Л. // Гигиена и санитария. 1989. N. 4. С. 55.
12. Браун А. Д., Моженок Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной активности. Л., 1987.
13. Верховский А. Б. // Структура и функции белков сократительных систем. Л., 1987. С. 71.
14. Orrenius S., McConkey D., Bellomo G., Nicotera P. // Trends Pharmacol. 1989. V. 10. N. 7. P. 281.
15. Мосез И. Б., Плотникова С. И., Сушко С. Н. // Тез. докл. Всесоюз. симп. «Объем и методы генотоксической оценки и побочных эффектов биологически активных веществ». Л., 1989. С. 67.