

УДК 577.245+612.112

Л. І. Остапченко, І. В. Михайлик, К. В. Прокопова

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Активність інтерферон-залежної 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоїдних клітинах щурів в умовах трансформованого середовища

Надійшла до редакції 26.10.06

Виявлено, що інтерферон-залежна 2',5'-олігоаденілат-синтетаза є чутливим показником функціонального стану імунокомпетентних клітин в умовах трансформованого середовища. Мікрогравітація та іонізуюче випромінювання спричиняють підвищення активності досліджуваного ферменту в лімфоцитах щурів, що може бути результатом запуску компенсаторних механізмів лімфоїдних клітин у відповідь на дію стресових факторів. Введення індукторів інтерферону дозволяє стимулювати 2',5'-олігоаденілат-синтетазу, що уможливило корекцію патологічних змін у клітинах та посилення адаптаційних реакцій імунної системи.

ВСТУП

Перебування у трансформованому середовищі спричиняє порушення важливих фізіологічних функцій в організмі людини. В першу чергу ураження зазнає імунна система, найчутливіша до будь-яких стресових факторів — іонізуючої радіації, змін температури, гравітації та ін. Проте біохімічні процеси, що протікають в імунокомпетентних клітинах при даних порушеннях імунної системи, на сьогодні залишаються мало вивченими. Тому дослідження цих механізмів є необхідним для пошуку засобів корекції функціонування імунної системи людини під час космічного польоту з профілактичними та терапевтичними цілями.

Зручною моделлю для вивчення впливу космічних факторів на імунну систему тваринного організму є лімфоцити [1, 8, 9]. Сьогодні експериментально доведено, що дія чинників космічного польоту призводить до змін у клітинних системах трансдукції сигналу [10]. Разом з тим залишається мало вивченою месенджерна систе-

ма інтерферону, що контролює такі важливі функції, як протівірусний та протипухлинний захист, імунну активацію тощо [15]. Тому цікавим є вивчення ключових компонентів каскаду інтерферону за умов впливу факторів трансформованого середовища — мікрогравітації та іонізуючого випромінювання, а також аналіз впливу на досліджувану систему біологічно активних речовин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У досліджах використовували білих нелінійних щурів обох статей масою 130 ± 10 г. Тварин піддавали горизонтальному клиностатуванню на клиностаті «Цикл-2» протягом 1, 2 та 3 год (модель *in vivo*) за методом [12]. Лімфоцити, виділені з тимусу щурів, клиностатували протягом 15, 30, 45 та 60 хв (модель *in vitro*). Іншу групу тварин опромінювали на установці РУМ-17 в дозах 0.25—1.0 Гр за умов: потужність дози — 17 сГр/хв, фільтри 0.5 мм Cu + 1 мм Al,

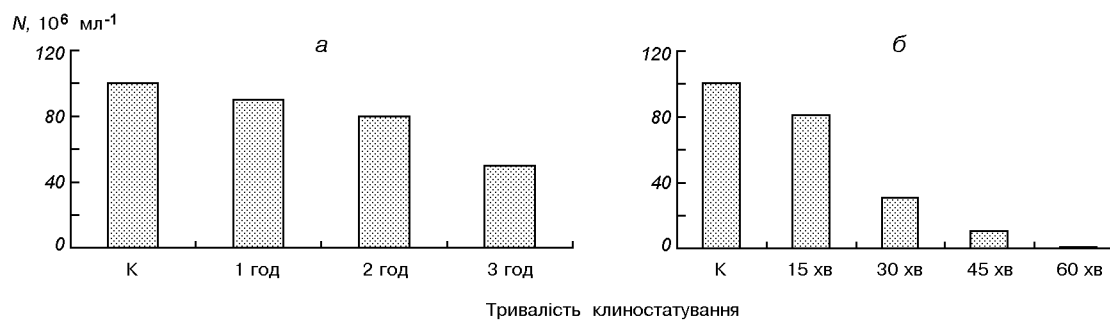


Рис. 1. Вплив тривалості клиностагування на виживання лімфоцитів тимусу щурів: а — *in vivo*, б — *in vitro*

напруга на трубіці 200 кВ, сила струму 5 мА, відстань до поверхні шкіри тварин — 50 см. Дослідження проводили через 12 год після опромінення, що є терміном найбільш виражених порушень основних ланок метаболізму лімфоїдних клітин [3]. Тимоцити із суспензії клітин тимусу виділяли за методом [5, 7]. Кількість клітин підраховували, використовуючи камеру Горяєва. Контроль числа лімфоїдних клітин, що загинули, проводили після фарбування суспензії клітин трипановим синім. Індукцію інтерферону здійснювали *in vitro* на моделі лімфоцитів тимусу контрольних та опромінених щурів з використанням препаратів «Циклоферон» («Полісан», Росія), полі(І)·полі(ІІ) («Sigma», США), галогенпохідних сполук серії «Тилорони» (експериментальні розробки Одеського ФХІ ім. О. В. Богатського) згідно з рекомендаціями [2, 6, 13, 14].

Активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази визначали спектрофотометричним методом і виражали в наномолях неорганічного пірофосфату за 1 хв на 1 мг білка [11]. Статистичну обробку результатів і побудову графіків проводили на ЕОМ із застосуванням стандартних пакетів прикладних програм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було проведено дослідження впливу факторів трансформованого середовища, зокрема мікрогравітації та іонізуючого випромінювання, на лімфоїдні клітини щурів.

На базі створених експериментальних систем було розроблено дві моделі: *in vitro* (коли лімфо-

цити, виділені з тимусу щурів, підлягали клиностагуванню протягом різних проміжків часу) та *in vivo* (коли щурів піддавали клиностагуванню, після чого виділяли з тимусу лімфоїдні клітини). Було виявлено, що за умов модельованої мікрогравітації із збільшенням часу впливу даного фактора відбувається поступове зниження кількості життєздатних лімфоїдних клітин тимусу. В умовах клиностагування щурів (*in vivo*) через 1 год кількість життєздатних тимоцитів зменшилась на 10 % (тут і далі рівень значимості $p = 0.05$), через 2 год — на 20 %, а через 3 год вона складала половину контрольного рівня (рис. 1, а). Дослідження на моделі *in vitro* показали більш істотне зменшення кількості живих клітин при менших термінах впливу (рис. 1, б). Через 15 хв кількість лімфоцитів знижувалась на 20 %, через 30 хв — на 70 %, через 45 хв становила лише 10 % контрольного рівня, а через 1 год спостерігалася практично повна загибель.

Таким чином, вплив модельованої мікрогравітації проявляється у виснаженні популяції імуннокомпетентних клітин тимусу щурів, що може відобразитися на стані імунної системи. Загибель клітин більш виражена при клиностагуванні клітин *in vitro* порівняно з дією мікрогравітації на цілісний організм *in vivo*, що можна пояснити високою чутливістю ізольованих лімфоцитів до зовнішніх впливів.

В якості другого стресового фактору було застосовано тотальне рентгенівське опромінення тварин у сублетальних дозах 0.25—1.0 Гр, яке, як відомо з наших попередніх досліджень, призводить до падіння функціональної активності лімфоїдних клітин [4]. Було виявлено, що при

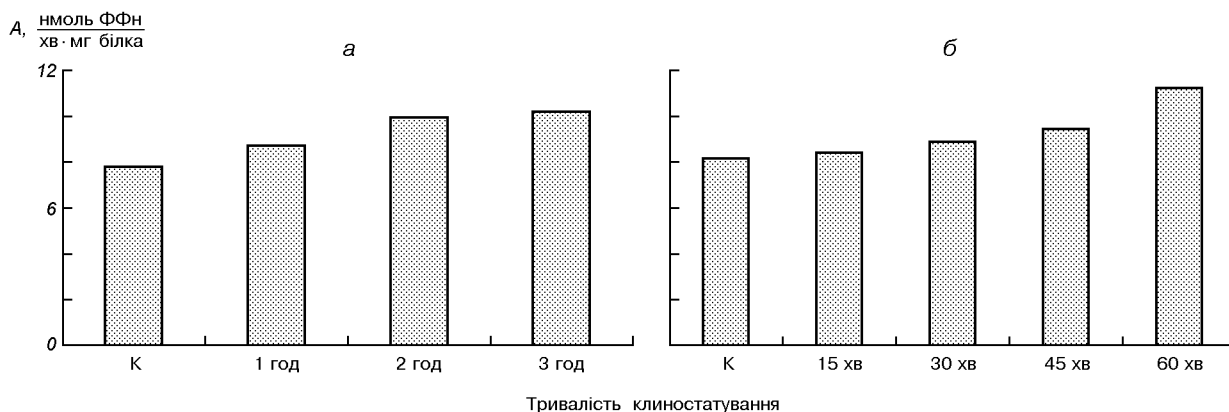


Рис. 2. Вплив кліностакування на активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази у лімфоцитах тимусу щурів: а — *in vivo*, б — *in vitro*

опроміненні щурів у дозі 0.5 Гр кількість тимоцитів зменшується, а при дозі 1.0 Гр це зниження їхньої кількості є найбільш вираженим. Ймовірно, це пов'язано з виникненням все глибших постпроменеви́х порушень із збільшенням дози опромінення.

Отже, ми встановили, що стресові фактори космічного польоту, такі як мікрогравітація та випромінювання, призводять до загибелі лімфоїдних клітин тварин. Слід передбачити можливість виникнення порушень у біохімічних процесах лімфоцитів при дії даних чинників. Сигнальна система 2',5'-олігоаденілату, індукована інтерфероном, є одним з ключових метаболічних шляхів, що визначають стан лімфоїдних клітин. Тому для з'ясування впливу стресових факторів космічного середовища на імунікомпетентні клітини тварин важливо не тільки дослідити функціонування цієї системи, а й провести пошук нових біологічно активних речовин на основі індукторів інтерферону, які могли б використовуватися з профілактичною та лікувальною метою, що дозволить скоригувати наслідки шкідливої дії на імунітет радіації та невагомості, а також підвищити стійкість організму до інших несприятливих факторів.

Нами була визначена активність ключового ферменту системи інтерферону — 2',5'-олігоаденілат-синтетази у лімфоїдних клітинах щурів під дією мікрогравітації та опромінення, на двох біологічних моделях *in vivo* та *in vitro*, а також на фоні введення різних індукторів інтерферону.

Показано, що вплив модельованої мікрогравітації призводить до зростання олігоаденілат-синтетазної активності в лімфоцитах тимусу щурів із збільшенням терміну дослідження у системах як *in vivo*, так і *in vitro*. При кліноставанні щурів (*in vivo*) активність ферменту збільшувалась через 1 год на 11 %, через 2 год — на 13 %, а через 3 год зростання було максимальним — 30 % (рис. 2, а). При кліноставанні ізольованих лімфоцитів *in vitro* досліджуваний показник також збільшується: через 15 хв приріст активності становив 3 %, через 30 хв — 9 %, через 45 хв активність зросла на 16 %, а через 1 год — на 38 % (рис. 2, б).

Можна припустити, що посилення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази під впливом мікрогравітації є адаптаційною реакцією лімфоїдних клітин на дію цього стресового фактору. Це корелює з даними про загибель лімфоцитів при кліноставанні: при зменшенні кількості клітин стимулюються біохімічні регуляторні системи, зокрема підвищується активність інтерферон-індукованого ферменту 2',5'-олігоаденілат-синтетази у клітинах, що зберегли свою функціональність.

Для з'ясування механізмів функціонування інтерферон-залежного каскаду в умовах космічного польоту ми також вивчали вплив іонізуючого випромінювання на активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази. В ході досліджень було виявлено підвищення активності ферменту в лімфоцитах тимусу щурів при опроміненні в усіх

обраних дозах. При дії радіації у дозі 0.25 Гр досліджуваний показник перевищував контроль у 2.4 рази, в дозі 0.5—1.0 Гр він був в п'ять разів більший (рис. 3).

Післяпроменеву активацію 2',5'-олігоаденілат-синтетази можна оцінити як виявлення компенсаторних механізмів імункомпетентних клітин на вплив радіації.

З метою з'ясування можливих шляхів корекції післяпроменевих змін функціонування інтерферон-залежної системи 2',5'-олігоаденілату було здійснено дослідження впливу радіації на вищезазначену систему на фоні застосування різних індукторів інтерферону (циклоферон, полі(І)·полі(С), тилорон-тригідроклорид 223 та тилорон-дигідроклорид 334) у моделі *in vitro*.

Вибір даних препаратів пов'язаний з тим, що усі вони володіють потужною інтерферогенною дією, проте діють за різними механізмами. Циклоферон — N-(1-дезоксиглюцитол-1-4)N-метиламоній-10-метилкарбоксилат акриданону

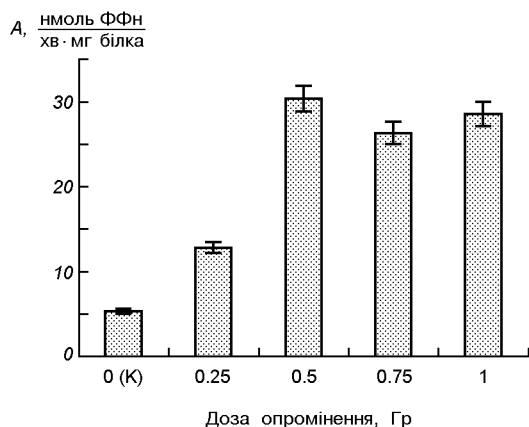


Рис. 3. Активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоцитах тимусу щурів після опромінення тварин у різних дозах

— низькомолекулярний індуктор інтерферону з широким спектром властивостей (протівірусна, імуномодуляторна, протизапальна дія). Препарат індукує високі рівні інтерферону- α на рівні транскрипції і не впливає на посттранскрипційні процеси. Нечутливість генів фактора некрозу пухлин та інтерлейкіну-2 до впливу циклоферону свідчить про селективність даного препарату [14]. Циклоферон широко використовується у клініці з метою корекції імунної системи при імунодефіцитах та аутоімунних станах, крім того цей препарат характеризується радіопротекторною дією, механізм якої поки що не з'ясований. Тилорон (2,7-біс[2-(диетиламіно)етокси]флуоренон-9) — індуктор інтерферону, що характеризується антивірусною, інтерферон-індукторною, імуномодуляторною, протипухлинною, протизапальною, радіопротекторною активністю та цілою низкою інших біологічно цінних властивостей [6]. Дію тилорону пов'язують з його здатністю взаємодіяти з нуклеїновими кислотами, подібно циклоферону, однак відсутність прямої кореляції між рівнем інтерферону та ступенем захисту свідчить про залучення інших механізмів, окрім індукції даного цитокіну. Серед аналогів аміксину найбільш ефективними є галоген-заміщені похідні, які і були нами використані у роботі (тилорон-дигідроклорид 334 та тилорон-тригідроклорид 223, синтезовані на базі Одеського ФХІ ім. А. В. Богатського). Препарат Полі(І)·полі(С) (синтетична двоспіральна РНК) характеризується здатністю індукувати синтез ендogenous інтерферону, а також виступає активатором 2',5'-олігоаденілат-синтетази [13]. У зв'язку з цим цікавим було розглянути вплив полі(І)·полі(С) на систему олігоаденілату в умовах дії променевого фактора.

Активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоцитах тимусу щурів за умов опромінення тварин та преінкубації клітин з індукторами інтерферону *in vitro* (нмоль ФФН/хв·мг білка), $M \pm m$, $n = 5$

Індуктор інтерферону	Дози опромінення тварин				
	Контроль	0.25 Гр	0.5 Гр	0.75 Гр	1.0 Гр
Без індуктора	5.37±0.26	12.85±0.64*	30.40±1.51*	26.37±1.31*	28.63±1.43*
Тилорон-тригідроклорид 223	19.15±0.95*	32.37±1.61*	44.69±2.23*	33.58±1.67*	23.61±1.18*
Тилорон-дигідроклорид 334	10.65±0.53*	33.63±1.68*	25.11±1.26	74.19±3.70*	53.59±2.67*
Полі(І)·полі(С)	17.42±0.87*	24.40±1.21*	61.52±3.07*	69.10±3.45*	28.26±1.42
Циклоферон	10.49±0.52*	28.80±1.44*	34.28±1.71*	61.51±3.07*	40.86±2.04*

* — $p < 0.05$ по відношенню до контролю

Преінкубація лімфоїдних клітин з вищезазначеними індукторами інтерферону *in vitro* спричиняла збільшення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази порівняно з її значеннями в клітинах, які не підлягали обробці досліджуваними речовинами (таблиця).

Оцінка приросту активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази під впливом індукторів, використовуваних при опроміненні, показала, що тилорон-334, полі(І)·полі(Ц) і циклоферон викликали найбільш виражене підвищення активності даного ферменту в тимоцитах при дозі 0.75 Гр. Тилорон-тригідрохлорид 223 виявився значно менш ефективним щодо стимуляції 2',5'-олігоаденілат-синтетази, а найбільший приріст активності ферменту виявлений при дозі 0.25 Гр. Виявлені відмінності можуть бути пов'язані з різними механізмами дії використаних індукторів інтерферону, у зв'язку з чим їхні властивості потребують подальшого детального дослідження.

Встановлений для розглянутих індукторів ефект істотного підвищення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоїдних клітинах при опроміненні тварин у вищих дозах має особливо важливе значення в контексті доцільності практичного застосування даних препаратів як радіозахисних засобів.

ВИСНОВКИ

Базуючись на отриманих даних, можна стверджувати, що активність інтерферон-залежного ферменту 2',5'-олігоаденілат-синтетази є чутливим показником функціонального стану імункомпетентних клітин в умовах трансформованого середовища (зокрема, мікрогравітації та іонізуючого випромінювання). Вплив модельованої мікрогравітації призводить до загибелі лімфоїдних клітин тимусу щурів; даний ефект посилюється із збільшенням тривалості дії фактору та є більш вираженим у системі *in vitro*, коли кліностатуванню підлягали ізольовані лімфоцити, порівняно з дією мікрогравітації на цілісний організм *in vivo*. Фактори трансформованого середовища — мікрогравітація та іонізуюче випромінювання — спричиняють підвищення активності інтерферон-індукованого ферменту 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоцитах тимусу

щурів, що інтенсифікується із збільшенням часу та дози стресового чинника. Спостережуване збільшення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази може бути результатом запуску компенсаторних механізмів лімфоїдних клітин у відповідь на дію стресових факторів, які реалізуються через систему трансдукції сигналу інтерферону. Введення біологічно активних речовин на базі індукторів інтерферону дозволяє стимулювати активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази, що уможливорює корекцію патологічних змін в клітинах та посилення компенсаторних реакцій імунної системи.

Отримані результати сприятимуть з'ясуванню молекулярних механізмів функціонування клітинних регуляторних систем, зокрема системи інтерферону, яка відповідає за нормальне функціонування імунної системи, під впливом чинників трансформованого середовища (наприклад, в умовах космічного польоту). Подальший науково-обґрунтований пошук та розробка біологічно активних препаратів на основі індукторів інтерферону дозволить створити ефективні засоби, які б могли застосовуватися з профілактичною та лікувальною метою під час перебування людини в космосі.

1. Гамалея Н. Ф., Шишко Е. Д., Горобец О. Б. Клеточная модель для изучения влияния измененной гравитации на циркадную ритмику человека // Космична наука і технологія.—2004.—10, № 5/6.—С. 204—207.
2. Ершов Ф. И., Глазулахова Э. Б. Индукторы интерферона — Новое поколение иммуномодуляторов // Вестник Российской Академии Наук.—1999.—№ 4.—С. 75—79.
3. Кучеренко Н. Е., Матышевская О. П., Остапченко Л. И. и др. Содержание циклических нуклеотидов, свободного Ca^{2+} и малонового диальдегида в лимфоцитах крыс при действии невысоких доз радиации // Радиобиология.—1991.—31, № 5.—С. 739—742.
4. Михайлик І. В., Прокопова К. В., Остапченко Л. І., Кучеренко М. Є. Вивчення інтерфероніндукованої системи 2',5'-олігоаденілату в лімфоїдних клітинах щурів за дії іонізуючого випромінювання // Укр. біохім. журн.—2004.—76, № 3.—С. 126—130.
5. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Иммунологическая функция тимуса // Успехи совр. биол.—1985.—97, № 1.—С. 36—37.
6. Шмельков Ю. А., Григорян С. С., Чижов Н. П. и др. Результаты клинического изучения амиксина // II Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». — М., 1995.—С. 193—194.
7. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest.—1968.—21.—

- P. 28—30.
8. Cogoli A. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system // *J. Leukoc. Biol.*—1993.—**44**, N 3.—P. 259—268.
 9. Cogoli A., Cogoli-Greuter M. Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in micro-gravity // *Adv. Space Biol. Med.*—1997.—**6**.—P. 33—79.
 10. Hashemi B. B., Penkala J. E., Venus C., et al. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and space flight // *FASEB J.*—1999.—**13**.—P. 2071—2082.
 11. Justensen J., Kjeldgaard N. O. Spectrophotometric pyrophosphate assay of 2',5'-oligoadenylate synthetase // *Anal. Biochem.*—1992.—**207**, N 1.—P. 90—93.
 12. Mishchenko L. T., Silayeva A. M., Boyko A. L. Effect of simulated microgravity on the virus-infected wheat plants // Abstracts 31-st Scientific Assembly of COSPAR (14—21 July, 1996). — The Univ. of Birmingham, England, 1996.—P. 385.
 13. Offermann M. K., Zimring J., Mellits K. H., Mathews M. B. Activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase and induction of vascular cell adhesion molecule-1 by poly(D).poly(C) in endothelial cells // *Eur. J. Biochem.*—1995.—**232**.—P. 28—36.
 14. Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Kovalenko A. L., et al. Inhibitory effect of synthetic interferon Cycloferone on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats // *Cancer. Lett.*—2000.—**148**, N 2.—P. 215—219.
 15. Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R. G., et al. How cells respond to interferons // *Annu. Rev. Biochem.*—1998.—**67**.—P. 2227—2264.

**ACTIVITY OF INTERFERON-DEPENDENT
2',5'-OLIGOADENYLATE SYNTHETASE IN RAT
LYMPHOID CELLS UNDER TRANSFORMED
ENVIRONMENT CONDITIONS**

L. I. Ostapchenko, I. V. Mikhailik, K. V. Prokopova

It is detected that interferon-dependent 2',5'-oligoadenylate synthetase is a sensitive index of immunocompetent cells functional state under transformed environment conditions. Microgravitation and ionising radiation induce increase of investigated enzyme activity in rat lymphocytes, which can be a result of lymphoid cells compensatory mechanisms starting in response to stress factors action. Administration of interferon inducers permits one to stimulate the 2',5'-oligoadenylate synthetase, which enables one to correct pathological changes in the cells and to intensify adaptative reactions of immune system.