

УДК 616-097+616.24]-001.5

*М.І. Марущак, Л.А. Грищук, Н.І. Ярема*

*Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського*

## КАСПАЗНИЙ МЕХАНІЗМ АКТИВАЦІЇ АПОПТОЗУ В ПАТОГЕНЕЗІ НСІ-ІНДУКОВАНОГО ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Досліджено активність каспази-3 в крові і бронхоальвеолярному змиві експериментальних тварин у різні фази гострого ураження легень. Отримані результати вказують на те, що в міру прогресування гострого ураження легень у бронхоальвеолярному змиві зростає активність каспази-3, яка позитивно сильно корелює з кількістю нейтрофілів, що несуть мембранозв'язуючий рецептор ФНП типу 1.

**Ключові слова:** каспаза-3, рецептор фактора некрозу пухлин-α, бронхоальвеолярний змив, кров, гостре ураження легень.

Гостре ураження легень є однією з основних причин смерті пацієнтів у відділеннях інтенсивної терапії в усьому світі і виникає внаслідок прямого (пневмонії, аспірація) чи непрямого легеневого ураження при травмі або сепсисі [1]. Гостре ураження легень пов'язане з вираженим нейтрофільним альвеолітом, зміною легеневої проникності, що веде до ендотеліальної та епітеліальної дисфункцій [2]. Хоча знання про механізми розвитку і прогресування цього захворювання стали глибшими, обґрунтованішими, проте смертність і надалі залишається високою [3], що потребує подальшого дослідження даної проблеми.

Процес запрограмованої смерті клітин, або апоптоз, відіграє важливу регулюючу роль у збереженні багатьох біологічних процесів, зокрема запальної відповіді при гострому ураженні легень [4]. Два відомих шляхи апоптозу включають внутрішній, або мітохондріальний, з участю білків родини Bcl-2, цитохрому С і каспази-9 та зовнішній з активацією каспази-8 при зв'язуванні специфічного рецептора клітин Fas- і розчинних рецепторів фактора некрозу пухлини (ФНП) на поверхні клітини [5]. Каспази, або цистеїн-аспарагінові протеази, можна розглядати як критичні ефекторні молекули запрограмованої смерті клітин, при цьому каспаза-3 відіграє важливу роль у реалізації як мітохондріального, так і рецепторного шляху запуску апоптозу [6].

Метою дослідження було визначити активність каспази-3 в лейкоцитарно-лімфоцитарній фракції крові та гомогенаті легень у щурів за умови експериментального гострого ураження легень у динаміці та встановити взаємозв'язок між їх рівнем і кількістю клітин, що несуть мембранозв'язуючий рецептор ФНП типу 1.

**Матеріал і методи.** Досліди були проведені на 32 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях масою 200–220 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету. Утримання тварин і експерименти проводились у відповідності до «Положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [7]. Тварин розподілили на п'ять груп по шість особин у кожній: 1-ша група – контрольна; 2-га – 5-та групи – уражені хлоридною кислотою тривалістю відповідно 2, 6, 12 та 24 год.

Щурів анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральну сторону ший обробляли хлоргексидином і робили 0,5-сантиметровий серединний розріз для візуалізації трахеї. Тварин розміщували горизонтально під кутом 45°, інсуліновим шприцом вводили в трахею HCl, рН 1,2 в дозі 1,0 мл/кг

© М.І. Марущак, Л.А. Грищук, Н.І. Ярема, 2012

на вдиху. Тваринам контрольної групи вводили ізотонічний розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг.

Через 2, 6, 12 та 24 години проводили еутаназію щурів методом введення тіопенталу натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини, дотримуючись правил гуманного ставлення до тварин. Після забою тваринам розкривали грудну клітку і відділяли легенево-серцевий комплекс. Для дослідження використовували гепаринізовану цільну кров, гомогенат легень та бронхоальвеолярний змив. З легень бронхоальвеолярний змив отримували за стандартною методикою [8].

Для визначення каспази в супернатанті гомогенату легень і лейкоцитарно-лімфоцитарній фракції крові до 0,7 мл досліджуваної рідини додавали 0,25 мл буфера і 50 мкл 2 мМ ДЕВД-*n*-НА та інкубували протягом 2 год при 37 °С, визначали інтенсивність світлопоглинання при 405 нм, яке прямо пропорційне продукту гідролізу ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп *n*-нітроаніліду каспазою-3-*n*-нітроаніліну [9].

Кількість нейтрофілів бронхоальвеолярного змиву, що несуть мембранозв'язуючий рецептор ФНП типу 1 (TNF-R1), оцінювали методом проточної лазерної цитометрії на проточному цитометрі Epics XL («Beckman Coulter», США) з використанням мічених моноклональних антитіл до TNF-R1 (CD120a) («Nucult biotech», Нідерланди) [10].

Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-test у випадку параметричних і непараметричних методів Фішера, Манна-Уїтні. Величини представлені як Mean±SD, де Mean – середнє значення показника, SD – стандартна похибка,  $p < 0,05$ .

Кореляційний аналіз проводили між усіма досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (*r*) та його достовірність (*p*), що відповідним чином позначалося у таблицях (кореляційних матрицях). Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при  $p < 0,05$ .

**Результати.** Оскільки каспазу-3, яка розщеплює важливі для підтримання клітинного гомеостазу протеїни, вважають основною ефекторною молекулою у «виконавчій» стадії в багатьох моделях апоптозу, було логічно з'ясувати її активність під час апоптозу, індукованого гідрохлоридною кислотою при моделюванні гострого ураження легень. Дослідження активності каспази-3 вказало на те, що

при гострому ураженні легень у крові експериментальних тварин концентрація даної протеїнази практично не змінювалася порівняно з даними контролю і дослідних груп ( $p > 0,05$ ), табл. 1.

*Таблиця 1. Зміна концентрації каспази-3 в плазмі крові і гомогенаті легень у щурів при експериментальному гострому ураженні легень (n=6)*

Група тварин	Каспаза-3, (M±m) пмоль/мг білка	
	кров	бронхоальвеолярний змив
1-ша (контроль)	19,43±0,88	23,96±4,40
2-га	18,50±1,45*	35,78±2,54*
3-тя	16,65±1,64*#	45,42±2,72*#
4-та	15,98±1,41*#	56,17±3,42*#
5-та	16,23±1,36*#	72,27±4,71*#

*Примітка.* \* Різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами; # у порівнянні з ураженими тваринами.

Проведений аналіз отриманих результатів активності каспази-3 в гомогенаті легень показав, що дана цистеїнова протеїназа рівномірно зростала у всіх дослідних групах протягом моделювання гострого ураження легень, індукованого введенням гідрохлоридної кислоти ( $p < 0,001$ ). Так, через 2 години експерименту концентрація каспази-3 зросла на 49,33 % порівняно з контролем, через 6 годин на 26,94 % відносно даних 2-ї дослідної групи, через 12 годин на 23,67 % порівняно з 3-ю дослідною групою і через 24 години на 28,66 % порівняно з попередньою групою (табл. 1).

При порівнянні результатів каспазного шляху апоптозу виявлено, що, незважаючи на прогресивне зростання каспази-3 в гомогенаті легень, у плазмі крові активність цистеїнової протеїнази залишається практично незмінною (рис. 1). Це свідчить про відмінність реалізації програмованої смерті клітин, що може бути обумовлено, по-перше, різним рівнем проапоптогенних сигналів у крові й легенях, по-друге, різною кількістю клітин, що несуть на собі апоптогенні рецептори.

Відомо, що всі популяції лейкоцитів, які приймають участь у запальному процесі при

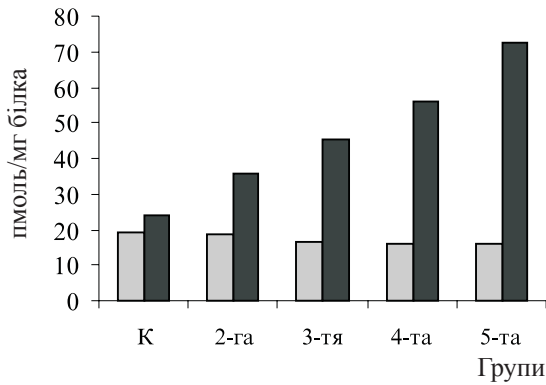


Рис. 1. Концентрація каспази-3 у плазмі крові (1) і гомогенаті легень (2) щурів при гострому ураженні легень. (К – контроль)

гострому ураженні легень, у тому числі і нейтрофіли, виділяють цитокіни, основною мішенню яких є ендотелій судин [11]. Сучасними дослідженнями доведено, що цитокіни, серед яких і ФНП- $\alpha$ , є сигнальними молекулами початку, розвитку і прогресування запальної відповіді на місцевому і системному рівнях. Слід зауважити, що біоактивність ФНП залежить від концентрації самого цитокіну, концентрації відповідних рецепторів на поверхні клітин-мішеней і від кількості циркулюючих антагоністів [12]. Тому було досліджено рецепторний механізм апоптозу шляхом встановлення кореляційних зв'язків з кількістю клітин, що несуть мембранозв'язуючий рецептор ФНП типу 1 (TNF-R1). Встановлено сильний позитивний кореляційний зв'язок між кількістю нейтрофілів з TNF-R1 та активністю каспази-3 в легенях у тварин всіх груп спостереження (табл. 2).

**Обговорення результатів.** Значне зростання активності каспази-3 може бути зумовлено втягненням мітохондріального шляху апоптозу, який пов'язаний з надходженням з середини клітини проапоптогенних сигналів, до яких відносяться активні форми кисню. Попередньо нами досліджено, що при гострому ураженні легень відмічається інтенсифікація процесів вільнорадикального перекисного окиснення, основним ініціатором якого є активні форми кисню [13]. Генерація кисневих радикалів стимулює апоптоз шляхом зниження потенціалу мембрани мітохондрій, що свідчить про відкриття пор і деполаризацію мембрани мітохондрій [14]. Потрібно зауважити, що утворенню пор сприяє каспаза-8, яка активується при взаємодії

Таблиця 2. Вірогідні кореляційні зв'язки між активністю каспази-3 та кількістю клітин, що несуть мембранозв'язуючий рецептор ФНП типу 1 при гострому ураженні легень

Дослідна група	Коефіцієнт кореляції $r_{xy}$	p
2-га	0,88	<0,01
3-тя	0,90	<0,001
4-та	0,95	<0,001
5-та	0,81	<0,01

ФНП- $\alpha$  з мембранозв'язуючими рецепторами цього інтерлейкіну. В результаті розвивається набряк мітохондріального матриксу, відбуваються розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани і вихід цитохрому C, AIF (apoptosis inducing factor), що активує каспазу-3, вторинного активатора каспаз мітохондріального походження, а також інших проапоптозних білків із міжмембранного простору в цитозоль (рис. 2).

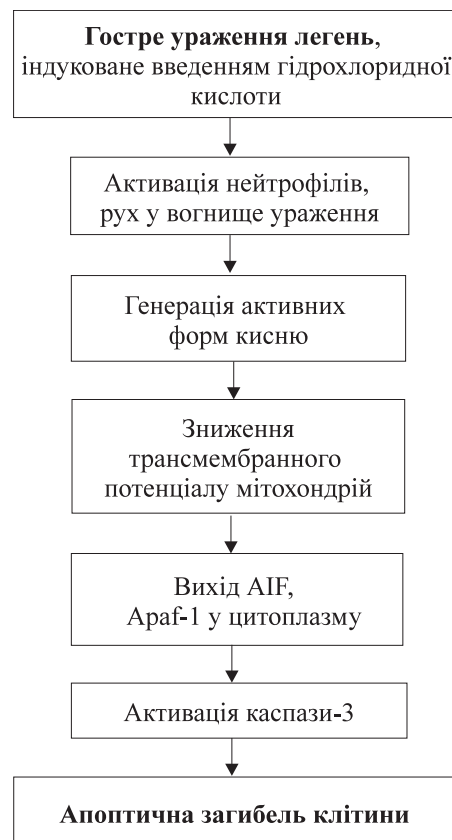


Рис. 2. Патогенетичне обґрунтування мітохондріального шляху апоптозу при гострому ураженні легень

Активність каспази-3 регулюється як зовнішніми, так і внутрішніми ФНП-рецептор-опосередкованими механізмами апоптозу. В даний час встановлено, що більшість цитотоксичних ефектів ФНП опосередковані TNF-R1 через його взаємодію з TRADD (зв'язаний з TNF-R1 домен смерті) [15]. Це підтверджується і нашими дослідженнями, які вказують на достовірне зростання активності каспази-3 в міру збільшення відсотка нейтрофілів, що несуть TNF-R1 при гострому ураженні легень, індукованому інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти.

#### Висновки

Зміна активності ефекторних компонентів каскаду каспаз, зокрема каспази-3, за умов гострого ураження легень, індукованого інтратрахеальним введенням гідрохлоридної

кислоти, призводить до реалізації загибелі нейтрофілів шляхом апоптозу. Одними з потенційних механізмів, відповідальними за активацію каспазного шляху, є надмірна генерація активних форм кисню та зростання кількості нейтрофілів, що несуть мембранозв'язуючий рецептор ФНП типу 1.

#### Перспективи подальших досліджень.

Для патогенетичного обґрунтування шляхів програмованої смерті клітини планується провести порівняльний аналіз кореляційних зв'язків між рівнем раннього апоптозу і показниками трансмембранного потенціалу мітохондрій, активних форм кисню та активності каспаз у крові та бронхоальвеолярному змиві у щурів для виявлення додаткових патогенетичних механізмів формування гострого ураження легень.

#### Список літератури

1. Ware L. B. The acute respiratory distress syndrome / L. B. Ware, M. A. Matthay // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 342. – P. 1334–1349.
2. Apoptosis and epithelial injury in the lungs / T. R. Martin, N. Hagimoto, M. Nakamura, G. Matute-Bello // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2005. – Vol. 2. – P. 214–220.
3. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group / M. A. Matthay, G. A. Zimmerman, C. Esmon [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2003. – Vol. 167. – P. 1027–1035.
4. Acute lung injury: apoptosis in effector and target cells of the upper and lower airway compartment / B. Roth Z'graggen, J. Tornic, B. Müller-Edenborn [et al.] // Clinical and Experimental Immunology. – 2010. – Vol. 161. – P. 324–331.
5. Ільїнська І. Ф. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді (аналітичний огляд) / І. Ф. Ільїнська // Лаб. діагностика. – 2002. – № 3. – С. 66–72.
6. Глумчер Ф. С. 1-й Український конгрес по вопросам антимикробной терапии: событие для отечественного здравоохранения / Ф. С. Глумчер, И. Г. Березняков, Г. К. Решедько // Здоров'я України. – 2007. – № 2/1. – С. 16–18.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg, 1986. – № 123. – 52 p.
8. Патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку гострого ураження легень / А. А. Гудима, М. І. Марущак, Г. Г. Габор, М. І. Куліцька // Буковинський медичний вісник. – 2011. – № 3. – С. 82–86.
9. Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia / M. Bonomini, S. Dottori, L. Amoroso [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2004. – Vol. 2 (8). – P. 1275–1281.
10. Часовских Н. Ю. Роль протеинкиназ JNK и p38 в регуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при окислительном стрессе / Н. Ю. Часовских // Бюл. сибирской медицины. – 2008. – № 3. – С. 38–43.
11. Пасечник А. В. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии / А. В. Пасечник, В. А. Фролов // Вестник РУДН, сер. Медицина – 2004. – Т. 25, № 1. – С. 103.
12. Mann D. L. Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart / D. L. Mann // Heart Fail. Rev. – 2001. – Vol. 6 (2). – P. 71–80.
13. Гришук Л. А. Динаміка перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в щурів за умов гострого ураження легень / Л. А. Гришук, М. І. Марущак // Туберкульоз, легеневої хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2011. – № 2 (05). – С. 16–20.

14. Мишуніна Т. М. Основні молекулярні механізми апоптозу та їх порушення при канцерогенезі щитоподібної залози (огляд літератури) / Т. М. Мишуніна, М. Д. Тронько // Журн. АМН України. – 2006. – Т. 12, № 4. – С. 611–633.

15. Mani Chopra. Acute lung injury: Apoptosis and signaling mechanisms / Mani Chopra, Jayne S. Reuben, Avadhesh C. Sharma // Experimental Biology and Medicine. – 2009. – Vol. 234. – P. 361–371.

**М.И. Марущак, Л.А. Грищук, Н.И. Ярема**

**КАСПАЗНЫЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ АПОПТОЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ НСИ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛЁГКИХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Исследована активность каспазы-3 в крови и бронхоальвеолярном смыве экспериментальных животных в различные фазы острого поражения лёгких. Полученные результаты указывают на то, что по мере прогрессирования острого поражения лёгких в бронхоальвеолярном смыве возрастает активность каспазы-3, которая положительно сильно коррелирует с количеством нейтрофилов, несущих мембраносвязывающий рецептор ФНО типа 1.

**Ключевые слова:** каспаза-3, рецептор фактора некроза опухолей- $\alpha$ , бронхоальвеолярный смыв, кровь, острое поражение лёгких.

**M.I. Marushchak, L.A. Hryshchuk, N.I. Yarema**

**CASPASE MECHANISM OF APOPTOSIS ACTIVATION IN THE PATHOGENESIS OF HCl-INDUCED EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY**

The activity of caspase-3 in blood and bronchoalveolar lavage of experimental animals in different phases of acute lung injury were examined. The results indicate that the progression of acute lung injury is increased the activity of caspase-3 in bronchoalveolar lavage, which is strongly positively correlated with the number of tumor necrosis factor receptor 1.

**Key words:** caspase-3, tumor necrosis factor, bronchoalveolar lavage, blood, acute lung injury.

*Поступила 26.03.12*