

## Молекулярні особливості апоптозу лімфоцитів тимуса при дії малих доз гамма-опромінення

Мотуляк А.П.<sup>1</sup>, Левицький В.А.<sup>1</sup>,

Толоконнікова Н.М.<sup>1</sup>, Tkach-Motulyak O.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Івано-Франківськ, Івано-Франківський державний медичний університет, Україна

<sup>2</sup> London, King College of Medicine, London University, UK

Досліджували тимус 170 ювенільних мишей-самців радіочутливої лінії BALB/c. У віці 6-7 діб після народження тварини були опромінені в дозі 0,05 і 0,2Гр. Матеріал від тварин експериментальних груп забирали через 6 годин, 24 години, 3,5,7 і 10 діб після опромінення. Для гістологічного дослідження відібраний матеріал фіксували в нейтралізованому по Ліллі 10 % розчині формаліну. Зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксилином та еозином, азуром А, азур-П-еозином, толуїдиновим синім. З метою візуалізації апоптозу лімфоцитів шляхом виявлення експресії гену, що кодує синтез протеїну p53 та виявлення експресії антигену Fas(Apo-1/CD95) ми застосували такі імуногістохімічні методи дослідження: 1) непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії гену, що кодує синтез протеїну p53; 2) непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії антигену Fas(Apo-1/CD95). Використовували первинні антитіла до антигену p53, первинні і вторинні Kit-моноклональні антитіла до антигену рецепторів Fas(Apo-1/CD95) фірми-виробника DakoCytomation (Denmark-USA). Розповсюдженість та інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом в балах (0-3): а) розповсюдженість: 0 – немає забарвлення; 1 – менше 10% позитивно забарвлених клітин; 2 – більше 10% і менше 50% позитивно забарвлених клітин; 3 – гомогенне забарвлення більше 50% клітин; б) інтенсивність реакції: 0 – реакція відсутня; 1 – слабка реакція; 2 – помірна реакція; 3 – виразна реакція. Результати проведеного дослідження свідчать про низьку і нерівномірну експресію антигену білка p53 в ядрах лімфоцитів кіркової речовини тимуса мишей після опромінення в дозі 0,05Гр впродовж усіх термінів спостереження. Водночас у зонах локалізації епітеліоретикулоцитів кори, а також у мозковій речовині тимуса зазначена реакція була взагалі від'ємною. У тимусі мишей після опромінення в дозі 0,2Гр було відзначено виражену експресію антигену білка p53 у лімфоцитах кіркової речовини та її відсутність в епітеліоретикулоцитах кори та у мозковій речовині. При цьому активація p53 була нерівномірною в лімфоцитах кіркової речовини, суттєво зростала до 10 доби експерименту і супроводжувалась формуванням своєрідних вогнищ посиленої експресії. При проведенні імуногістохімічного дослідження з метою виявлення експресії рецепторів Fas(Apo-1/CD95) нами було встановлено, що в усіх тварин контрольної та експериментальних груп експресія цих «рецепторів смерті» була відсутня чи слабка (0-1 бал). Винятком були ювенільні миші через 10 діб після опромінення в дозі 0,2Гр, в кірковій речовині тимуса яких нами були виявлені вогнищеві скупчення Fas(Apo-1/CD95) – позитивних лімфоцитів. Узагальнюючи особливості у пострадіаційних морфологічних змінах клітинних популяцій тимуса можна виділити феномени «квантування», «кластеризації» та «компартаменталізації». Феномен «квантування» проявляється тим, що в ранні строки експерименту одні клітини залишаються інтактними, інші характеризуються ознаками апоптозу, а ще інші – ознаками некрозу. Феномен «кластеризації» характеризується появою спочатку поодиноких змінених лімфоцитів, а згодом і їх груп. У тимусі поєднання цього феномену з евакуацією лімфоцитів проявляється ефектом «зоряного неба» – вогнищевим зникненням лімфоцитів. Збільшення кількості або ж злиття декількох кластерів апоптозних лімфоцитів приводить на 7 добу після опромінення до розвитку феномену «компартаменталізації», який в тимусі носить органоспецифічний характер і проявляється утворенням «кистоподібних структур». Прояв феномену «квантування» у тимусі за часом співпадає із активацією білка p53, яка обумовлює пригнічення поділу клітин і викликає p53-залежну індукцію апоптозу. «Квантування», «кластеризація» та «компартаменталізація» у тимусі є результатом розгорнутої у часі реалізації різних шляхів трансдукції апоптозного сигналу: а) рецептор-залежного шляху з участю рецепторів Fas(Apo-1/CD95); б) рецептор-незалежного шляху (p53-залежного та мітохондріального), а також мультиплікації різноманітних проявів апоптозу, який індукований малими дозами іонізуючого випромінювання.