

## КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТИМОЦИТАХ ПРИ АПОПТОЗЕ. I. ПОВЫШЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОЗОЛЬНОГО Ca<sup>2+</sup> НА РАННЕЙ СТАДИИ АПОПТОЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

Д. М. ГРЕБИНЫК, Т. В. КОВАЛЬ, О. П. МАТЫШЕВСКАЯ

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;  
e-mail: grebinik@yahoo.com*

*Досліджували концентрацію вільного цитозольного Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), вхід <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> та вміст відновленого глутатіону (GSH) в ізольованих тимоцитах після рентгенівського опромінення в дозі 4,5 Гр або за дії 0,1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в період, який передує виявленій електрофоретично міжнуклеосомній фрагментації ДНК. Із використанням зонда фура-2 встановлено, що рівень цитозольного Ca<sup>2+</sup> в опроміненіх клітинах не змінюється порівняно з контролем, а вміст GSH не знижується. В оброблених пероксидом водню клітинах виявлено поступове підвищення [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> одночасно зі зниженням вмісту GSH. Вхід <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> в тимоцити під дією апоптогенних чинників не посилюється. Додавання H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до клітин, попередньо оброблених тапсигаргіном, також призводить до подальшого зростання [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> як у стандартному, так і в номінально безкальцієвому середовищі. Циклоспорин А пригнічує Ca<sup>2+</sup>-мобілізуючий ефект пероксиду водню, але не попереджає його повністю. Обговорюється роль внутрішньоклітинних депо в порушенні кальцієвого гомеостазу в тимоцитах за умов моделювання окисного стресу та апоптозу.*

*Ключові слова: кальцій, апоптоз, пероксид водню, рентгенівське опромінення, мітохондрії, циклоспорин А, тимоцити.*

**Н**есмотря на то, что в последнее время интенсивно исследуются механизмы апоптоза, пути контролирования этого процесса остаются недостаточно изученными. Отчасти это объясняется тем, что в каскадах реакций, запускающих программу клеточной гибели, постоянно выявляются новые звенья, последовательность включения которых зависит от природы апоптогенного стимула, типа и функциональной активности клеток. Согласно данным работ последних лет, одним из факторов контроля как раннего, так и завершающегося упорядоченной деградацией ДНК позднего этапа апоптоза является повышение концентрации свободного цитозольного Ca<sup>2+</sup> в клетке ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Зарегистрировано возрастание [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в лимфоидных клетках и тимоцитах при апоптозе в ответ на обработку глюкокортикоидами, антителами к CD3 [1–3], а также в клетках различных типов при апоптозе, вызванном тапсигаргином или кальциевыми ионофорами [4,5]. Показано, что апоптогенный эффект может наблюдаться в случае освобождения Ca<sup>2+</sup> из эндоплазматического ретикулума (ЭПР), “емкостного” входа катиона в клетку через Ca<sup>2+</sup>-каналы, активируемые опустошением ЭПР, а также выхода Ca<sup>2+</sup> из митохондриального матрикса [6–8]. Очевидно, что важную роль в инициации апоптоза играет не столько повышение общего уровня Ca<sup>2+</sup> в цитозоле, сколько

нарушение его внутриклеточной компартиментализации вследствие дисбаланса Ca<sup>2+</sup>-пулов эндоплазматического ретикулума и митохондрий. В связи с этим важное значение приобретает оценка концентрации цитозольного Ca<sup>2+</sup> в динамике апоптоза, индуцированного различными факторами и исследование возможных причинно-следственных связей между проявлением морфологических признаков апоптоза и нарушениями кальциевого гомеостазу в системе его поддержания.

Для экспериментального моделирования апоптоза нами была использована суспензия изолированных тимоцитов, подверженная действию ионизирующей радиации как фактора, основной мишенью которого является ДНК, либо пероксида водорода – универсального индуктора окислительного стресса. Согласно данным, полученным нами с использованием флуоресцентной микроскопии, на раннем этапе инкубации тимоцитов после рентгеновского облучения (4,5 Гр) или в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 мМ) в суспензии тимоцитов обнаруживается значительное количество апоптических клеток с конденсированным и фрагментированным хроматином [9].

Целью данной работы было изучить динамику накопления продуктов межнуклеосомного расщепления ДНК, параллельно оценить уровень цитозольного Ca<sup>2+</sup> в клетках и проанализировать

возможные причины его изменения после действия исследуемых апоптогенных факторов.

### Материалы и методы

Тимоциты получали из тимуса крыс линии Вистар массой тела 120–150 г. Тимус протирали через нейлоновое сито в буфер А, содержащий (мМ):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 3,  $\text{KCl}$  – 5,  $\text{NaCl}$  – 120, глюкоза – 10,  $\text{HEPES}$  – 5,  $\text{NaHCO}_3$  – 4,  $\text{MgCl}_2$  – 1 и  $\text{CaCl}_2$  – 1. Количество жизнеспособных клеток определяли в камере Горяева с использованием 0,2%-го трипанового синего.

Условия постановки эксперимента: суспензию контрольных тимоцитов инкубировали в течение указанного времени; в среду инкубации добавляли пероксид водорода до конечной концентрации 0,1 мМ; перед инкубацией клеточную суспензию подвергали одноразовому рентгеновскому облучению на установке РУМ–17 при экспозиционной дозе –  $11,61 \times 10^{-2}$  Кл/кг (4,5 Гр, мощность дозы – 0,24 Гр/мин); фильтры 0,5 мм ( $\text{Cu} + \text{Al}$ ), напряжение 200 кВ, сила тока 10 мА, фокусное расстояние – 50 см.

Инкубацию тимоцитов в концентрации  $(2-4) \times 10^6$  клеток/мл проводили в термостате в среде RPMI-1640 с добавлением 5%-й эмбриональной телячьей сыворотки. После осаждения (600 г, 10 мин) клетки помещали в буфер А.

Концентрацию свободного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах определяли с помощью фура-2АМ («Sigma», США). Клеточную суспензию ( $3 \times 10^7$  клеток/мл) нагружали зондом в течение 40 мин при 25 °С и отмывали от избытка зонда трехкратным центрифугированием (600 г, 10 мин) с последующим ресуспендированием в буфере А до концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл. При исследовании эффектов различных добавок инкубацию нагруженных зондом тимоцитов проводили непосредственно в кювете в стандартной (буфер А) и номинально безкальциевой (не содержащей  $\text{CaCl}_2$ ) среде. Спектры флуоресценции фура-2 регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-510,  $\lambda_{\text{возбужд.}} = 330$  и  $375$  нм,  $\lambda_{\text{излуч.}} = 505$  нм. Концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) рассчитывали с использованием двухлучевого флуоресцентного параметра R [10].

Для оценки входа  $\text{Ca}^{2+}$  тимоциты ( $5 \times 10^6$  клеток) инкубировали при 37 °С в среде объемом 0,5 мл, содержащей буфер А и 1 мКи  $^{45}\text{CaCl}_2$  («Amersham», Великая Британия). Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб через фильтры «Millipore» (0,45 мкм), которые трижды промывали 3 мл охлажденного раствора, содержащего 150 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 мМ  $\text{HEPES}$ , pH 7,4. Для определения адсорбции кальция суспензию клеток наносили на

фильтры сразу же после добавления метки. Радиоактивность проб измеряли на жидкосцинтилляционном счетчике Delta (США).

Структурное состояние ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,5 мкг/мл), в трис-ацетатном буфере (pH = 8,3), на протяжении 5 ч при напряжении 5 В/см.

Для экстракции ДНК к тимоцитам добавляли лизирующий буфер, содержащий 10 мМ трис –  $\text{HCl}$  (pH = 7,4), 10 мМ ЭДТА, тритон X-100 (0,5%), смесь инкубировали 10 мин при +4 °С. Экстракцию ДНК из депротенинизованных протеинкиназой K («Sigma», США) проб проводили при –20 °С смесью 3 М ацетата натрия (pH 5,2) : этанол (1 : 20) и центрифугированием (13 000 г, 10 мин).

Количество восстановленного глутатиона (GSH) оценивали флуоресцентным методом с применением ортофталевого альдегида [11]. Для определения использовали супернатант клеточного экстракта, полученный после разрушения тимоцитов ( $2 \times 10^7$  клеток/мл) в среде, содержащей 1,5 мл 0,1 М  $\text{HCO}_2\text{H}$ , и центрифугирования (10 000 г, 15 мин). Флуоресценцию проб измеряли при  $\lambda_{\text{возбужд.}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{излуч.}} = 420$  нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-510 (Япония).

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Результаты электрофоретического анализа структурного состояния ДНК, выделенной из тимоцитов через 1 и 3 ч после рентгеновского облучения в дозе 4,5 Гр или действия 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , представлены на рис. 1. На протяжении инкубации контрольных тимоцитов высокополимерное состояние ДНК сохраняется, тогда как в облученных и подверженных действию пероксида клетках происходит расщепление ДНК. Так, уже через 1 ч возле линии старта отмечается накопление продуктов крупномасштабной фрагментации ДНК, вызванной неупорядоченными разрывами молекулы. Через 3 ч на электрофореграммах обнаруживаются продукты межнуклеосомной деградации ДНК – олигонуклеосомные фрагменты ДНК, кратные 200 п.о. Хотя динамика повреждения структуры ДНК в клетках после действия исследуемых факторов подобна, количественная оценка показала, что общее содержание накопленных в течение 3 ч высокополимерных фрагментов ДНК выше в тимоцитах, подвергшихся действию пероксида водорода, а олигонуклеосомных фрагментов – в облученных клетках [12].

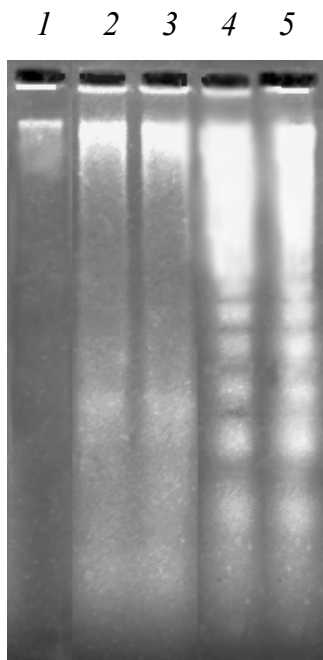


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК, выделенной из контрольных тимоцитов (1) и инкубированных в течение 1 ч (2,3) и 3 ч (4,5) после добавления 0,1 мМ пероксида водорода (2,4) или облучения в дозе 4,5 Гр (3,5).

Эти результаты согласуются с литературными данными, согласно которым процесс фрагментации ДНК при облучении тимоцитов *in vitro* характеризуется наличием независящего от дозы и мощности радиационного воздействия лаг-периода и линейным нарастанием количества продуктов межнуклеосомной деградации ДНК в диапазоне доз 0,5–6 Гр [13]. В случае обработки клеток разного типа пероксидом водорода в концентрациях ниже 1 мМ межнуклеосомная фрагментация ДНК подтверждена электрофоретически и методом мечения *in situ* расщепленных концов молекулы [1, 14].

Полученные нами данные позволили оценить длительность периода, который предшествует межнуклеосомному расщеплению ДНК – необратимой стадии апоптоза тимоцитов, индуцированного ионизирующей радиацией или пероксидом водорода. Предполагается, что именно в этот “преапоптотический” период происходит активация контролирующего апоптоз каскадов, в том числе и формирование кальциевого сигнала [1,3].

Результаты определения концентрации свободного цитозольного  $Ca^{2+}$  в тимоцитах, которое проводили с использованием флуоресцентного зонда фура-2, приведены на рис. 2. Величина  $[Ca^{2+}]_i$  в контрольных тимоцитах составляет  $104 \pm 9$  нМ и не изменяется на протяжении ин-

кубации клеток в контроле.

Нами не было выявлено изменений в концентрации цитозольного  $Ca^{2+}$  в тимоцитах после действия рентгеновского излучения (рис. 2, 1). В тимоцитах, инкубированных в присутствии  $H_2O_2$ , наблюдается быстрое повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле – уже через 30 мин он возрастает в 2,7 раза, а в период 2–3 ч достигает максимальной величины, превышающей контрольную в 5 раз (рис. 2, 2). Через 5 ч наблюдается ее снижение. Следует учитывать, что мониторинг  $[Ca^{2+}]_i$  на уровне суспензии клеток позволяет оценить повышение его содержания в среднем, которое является более низким по сравнению с таковым в цитозоле отдельной клетки. Поэтому обнаруженное возрастание  $[Ca^{2+}]_i$  указывает на значительное раннее нарушение кальциевого гомеостаза в тимоцитах, обработанных  $H_2O_2$ .

Причиной увеличения  $[Ca^{2+}]_i$  может быть либо усиленный вход катиона через плазматическую мембрану клеток (повышение специфической и неспецифической проницаемости), либо его выброс из внутриклеточных депо. Как показано нами ранее, добавление в среду инкубации блокатора кальциевых каналов верапамила не влияет на величину повышения  $[Ca^{2+}]_i$ , наблюдаемого через 0,5 и 1 ч после действия  $H_2O_2$  [15]. Это позволяет предположить, что специфическая проницаемость кальциевых каналов плазматической мембраны тимоцитов в этот период времени не изменяется.

Как интегральный показатель трансмембранного перемещения ионов Ca через плазматическую мембрану оценивали пассивный вход  $^{45}Ca^{2+}$  в тимоциты. Согласно полученным данным (рис. 3), через 15 мин после действия как облу-

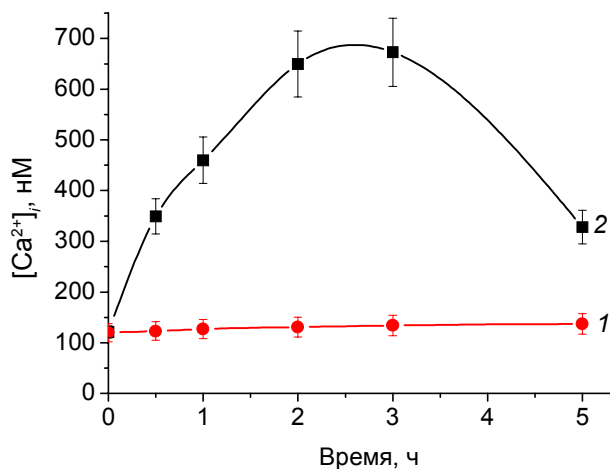


Рис. 2. Динамика изменения концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитозоле тимоцитов после рентгеновского облучения (1) или добавления  $H_2O_2$  (2).

чения, так и пероксида водорода, уровень  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , поступившего в клетки за 1 мин, достоверно не изменяется. Через 30 мин инкубации клеток в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  показатель снижается на 47%. Такое его уменьшение, скорее всего, связано с активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы плазматической мембраны тимоцитов в условиях повышения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, т.к. показано, что в Т-лимфоцитах активность  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменника не фиксируется, а скорость откачивания катиона  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азой значительно увеличивается при возрастании  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [16].

В совокупности эти результаты позволяют заключить, что на раннем этапе после рентгеновского облучения система поддержания кальциевого гомеостаза в тимоцитах не нарушается, тогда как после действия пероксида водорода происходит повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  вследствие неконтролируемого поступления катиона в цитозоль из внутриклеточных депо. Причиной этого может быть дискоординация функционирования ЭПР и митохондрий в условиях окислительного стресса и снижения антиоксидантной защиты внутриклеточных мембранных структур. Поскольку окислительный стресс считается важным компонентом программы апоптоза, индуцированного как пероксидом водорода, так и ионизирующей радиацией, мы оценили состояние антиоксидантной системы в тимоцитах по такому показателю, как содержание восстановленного глутатиона.

Содержание GSH в контрольных клетках составило  $0,8 \pm 0,05$  мкг/ $10^7$  клеток и достоверно не снижается в период до 3-х часов инкубации. После обработки тимоцитов наблюдаются

существенные отличия в изменении уровня GSH, зависящие от природы апоптогенного фактора (рис. 4). Так, через 15 мин после облучения уровень GSH в клетках был существенно повышен, через 1 ч показатель возвращается к контрольному значению и снижается на 24% через 3 ч. Таким образом, если в облученных тимоцитах и происходит смещение в цикле глутатиона в направлении увеличения содержания окисленного глутатиона, то в период, отдаленный от момента радиационного воздействия. В клетках, обработанных пероксидом водорода, содержание GSH быстро снижается – на 28% от контроля через 30 мин и на 48% через 1 ч, удерживаясь на этом уровне до 3 ч.

Полученные нами данные согласуются с тем, что пероксид водорода, который сам по себе не является сильным окислителем, быстро проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки, где могут накапливаться продукты его превращения, в частности, наиболее реакционно-активный гидроксильный радикал. В значительной мере повреждающему действию пероксида подвержены митохондрии, в которых отсутствует каталаза и восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$  осуществляется глутатионпероксидазой [7,17]. Образовавшийся в клетках окисленный глутатион может быть восстановлен до GSH глутатионредуктазой, но при этом потребляется восстановленный NADPH, поэтому при длительном воздействии пероксида может происходить окисление SH-групп структурных и регуляторных белков, истощение пулов NADPH и NADH, нарушение Ca-аккумулирующей способности ЭПР и митохондрий.

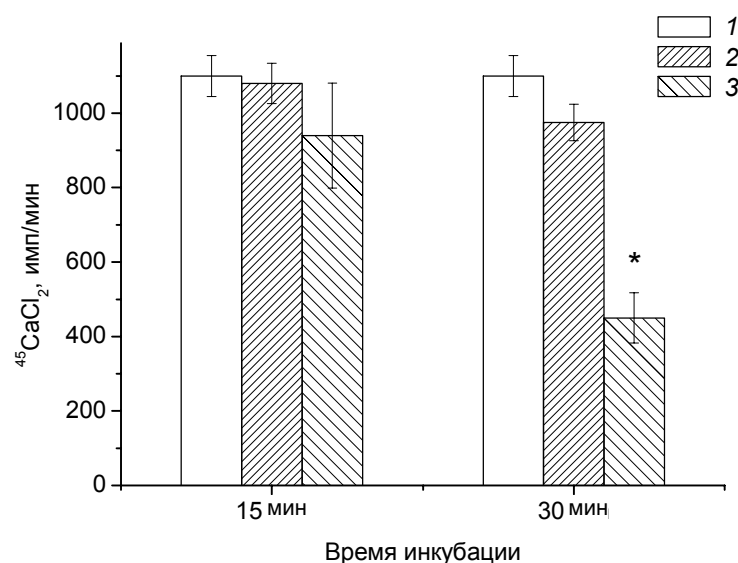


Рис. 3. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  в тимоциты в контроле (1), после рентгеновского облучения (2) или добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3). \* $p \leq 0,05$  относительно контроля.

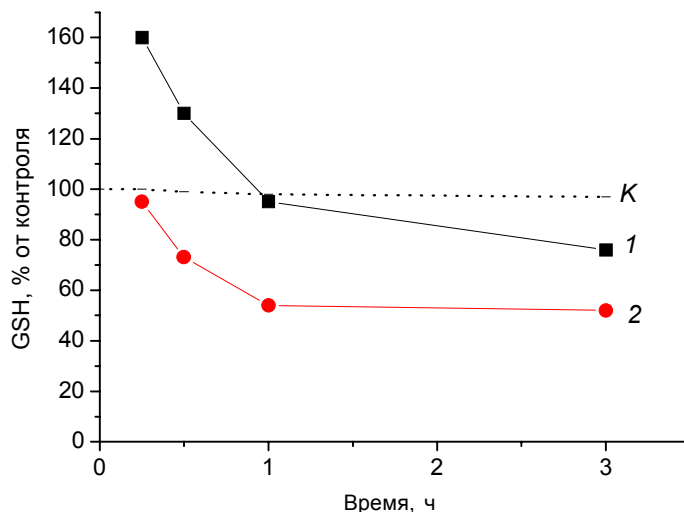


Рис. 4. Динамика изменения содержания восстановленного глутатиона в тимоцитах после рентгеновского облучения (1) или добавления  $H_2O_2$  (2).

Чтобы оценить возможную роль основных внутриклеточных депо в повышении  $[Ca^{2+}]_i$  после действия  $H_2O_2$ , мы исследовали, влияет ли пероксид водорода на уровень катиона в цитозоле тимоцитов в условиях предварительного опустошения кальциевых запасов ЭПР. Для этого использовали ингибитор  $Ca^{2+}$ -АТФ-азы ЭПР тапсигаргин, который в концентрациях 100–500 нМ вызывает быстрое повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в тимоцитах вследствие опустошения кальциевых запасов ЭПР и входа  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану без генерации инозитолфосфатов [4,8]. Эксперименты проводили, используя предварительно нагруженные зондом тимоциты, добавляя тапсигаргин и пероксид непосредственно в исследуемую пробу.

На рис. 5, А представлены данные, полученные при инкубации клеток в среде, содержащей 1 мМ  $CaCl_2$ . В этом случае добавление в пробу 300 нМ тапсигаргина приводит к быстрому повышению (в пять раз) уровня цитозольного  $Ca^{2+}$ , которое удерживается в течение 30 мин вследствие входа катиона через плазматическую мембрану. После добавления на 15-й минуте  $H_2O_2$  наблюдается дальнейшее, более замедленное повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , достигающее уровня более 1 мкМ.

Результаты экспериментов, проведенных в номинально безкальциевой среде представлены на рис. 5, Б. В ходе предварительной 10-минутной инкубации клеток в номинально безкальциевой среде в цитозоле тимоцитов устанавливалась равновесная концентрация  $62 \pm 7$  нМ. Добавление тапсигаргина приводит к опустошению ЭПР и повышению  $[Ca^{2+}]_i$  до  $96 \pm 8$  нМ, которое удерживается в течение 5 мин, после чего уровень

катиона постепенно снижается. В случае добавления  $H_2O_2$  также наблюдается дальнейшее возрастание уровня цитозольного  $Ca^{2+}$  с выходом на плато через 20 мин.

Полученные результаты свидетельствуют, что источником выявленного на ранних этапах апоптоза поступления  $Ca^{2+}$  в цитозоль может быть не только ЭПР, но и другие внутриклеточные депо. Если роль таковых выполняют митохондрии, то освобождение  $Ca^{2+}$  под действием такого окислителя, как  $H_2O_2$ , может происходить и без кальциевой перегрузки.

Для проверки предположения об участии митохондрий в нарушении кальциевого гомеостаза нами были использованы рутениевый красный (RuR, ингибитор митохондриального  $Ca^{2+}$ -унипортера) и циклоспорин А (CsA, блокатор неспецифической митохондриальной поры, НМП), которые вносили в инкубируемую пробу с нагруженными зондом фура-2 тимоцитами одновременно с  $H_2O_2$ . Добавление RuR в среду инкубации приводит к снижению уровня катиона (рис. 6). В присутствии CsA  $Ca^{2+}$ -мобилизирующий эффект  $H_2O_2$  не проявляется в начальный период инкубации и значительно снижается при ее продолжении, однако не предотвращается полностью.

Для объяснения этих результатов следует учитывать разнообразие возможных путей мобилизации  $Ca^{2+}$  при действии  $H_2O_2$ , моделирующем окислительный стресс. Так, усиление процессов липопероксидации в таких условиях может оказывать разобщающий эффект и приводить к снижению мембранного потенциала митохондрий, обращению  $Ca^{2+}$ -унипортера и частичному выходу катиона из митохондриального

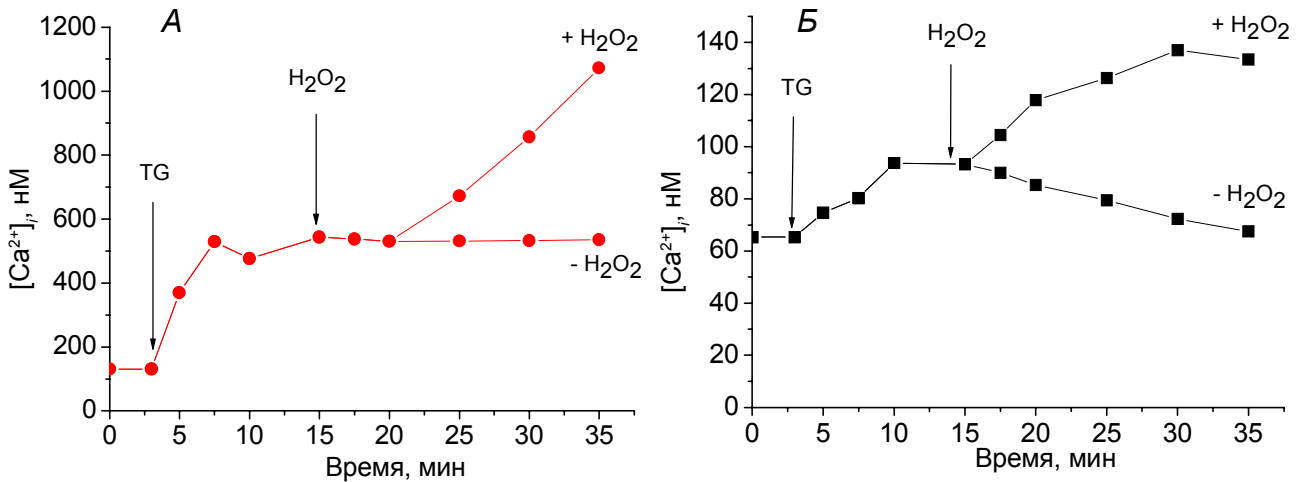


Рис. 5. Динамика повышения  $[Ca^{2+}]_i$  в тимоцитах при инкубации в стандартной (А) и номинально безкальциевой (Б) среде после добавления 320 нМ тапсигарина (TG) и  $H_2O_2$ .

матрикса [18]. Блокирование  $Ca^{2+}$ - унипортера предотвращает такой выход, что и наблюдается в присутствии RuR в пробе. Тот факт, что эффект CsA проявляется достаточно быстро, но повышение  $[Ca^{2+}]_i$  предотвращается не полностью, указывает не только на раннее образование поры в митохондриях, обработанных  $H_2O_2$  тимоцитов, но и на участие других внутриклеточных органелл в поддержании высокого уровня катиона в цитозоле. Открытие НМП в части митохондрий представляется вполне вероятным в условиях локального повышения уровня  $Ca^{2+}$ , значительного окисления клеточного глутатиона и мембранных дитиолов в митохондриях, а также снижения содержания эндогенных пиридиновых нуклеотидов. Предполагается, что окисление кардиолипи-

на, удерживающего цитохром С на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, сопровождается выходом цитохрома С в цитозоль и его связыванием с рецепторами к инозитолтрифосфату ЭПР, что делает их нечувствительными к аутоингибированию повышенными концентрациями  $Ca^{2+}$ , в результате чего из ЭПР также освобождается кальций [7].

Полученные результаты позволяют сделать несколько общих выводов. Характерная для апоптоза фрагментация ДНК наблюдается в тимоцитах в ответ на действие как ионизирующей радиации, так и обработки клеток пероксидом водорода, однако раннее повышение уровня  $[Ca^{2+}]_i$  вследствие нарушения внутриклеточной компартиментализации  $Ca^{2+}$  наблюдается лишь после дей-

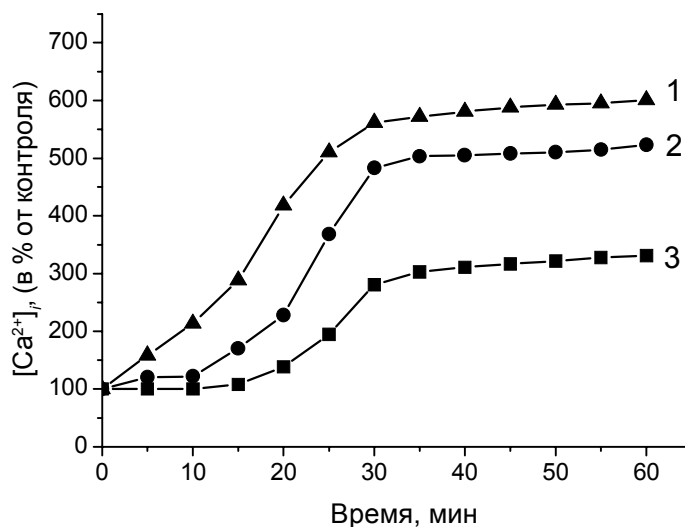


Рис. 6. Динамика повышения  $[Ca^{2+}]_i$  в тимоцитах при инкубации в присутствии  $H_2O_2$  без ингибиторов (1), при добавлении 5 мкМ рутениевого красного (2) или 5 мкМ циклоспорина А (3).

ствия  $H_2O_2$ . Хотя оба исследуемых апоптогенных фактора действуют по внутриклеточному сигнальному механизму, его инициация и усиление может происходить с вовлечением различных внутриклеточных компартментов и различными путями — как с участием факторов, освобождающихся из митохондрий и каскада исполнительных каспаз, так и через формирование протеосомных комплексов, активации гранзимов, катепсинов и др., что требует более глубокого изучения.

**CALCIUM HOMEOSTASIS DURING THYMOCYTE APOPTOSIS. I. INCREASE IN CYTOSOLIC  $Ca^{2+}$  CONCENTRATION AT THE EARLY STAGE OF APOPTOSIS INDUCED BY HYDROGEN PEROXIDE**

*D. M. Grebinyk, T. V. Koval,  
O. P. Matyshevska*

Kyiv Taras Shevchenko National University, Ukraine;  
e-mail: grebinik@yahoo.com

**S u m m a r y**

The concentration of free cytosolic  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ),  $^{45}Ca^{2+}$  entry and the level of reduced glutathione (GSH) after x-irradiation in a dose of 4.5 Gy or 0.1 mM  $H_2O_2$ -treatment were investigated in isolated rat thymocytes during the period preceding electrophoretically detected DNA intranucleosomal fragmentation.

Using fura-2 it was shown that the level of  $[Ca^{2+}]_i$  in X-irradiated thymocytes was not changed as compared with the control, while the GSH content was increased. The gradual increase in  $[Ca^{2+}]_i$  along with GSH level falling was detected in the  $H_2O_2$ -treated cells.  $^{45}Ca^{2+}$  entry in the cells exposed to apoptogenic stimuli was not enhanced.

After addition of  $H_2O_2$  to the cells previously treated with thapsigargin further  $[Ca^{2+}]_i$  increase in both normal and nominally calcium-free medium was detected. Cyclosporine A inhibited  $Ca^{2+}$ -mobilizing effect of  $H_2O_2$ , but did not prevent it completely. The role of intracellular calcium depots in calcium homeostasis disturbance during oxidative stress and apoptosis is discussed.

**К е y w o r d s:** calcium, apoptosis, hydrogen peroxide, X-irradiation, mitochondria, cyclosporine A, thymocytes.

1. *Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P.* // Nature Reviews. 2003. **4**. P. 552–565.
2. *Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L.* // Nature Reviews. 2003. **4**. P. 517–529.
3. *McConkey D. J., Orrenius S.* // Stem Cells. — 1996. —14. — P. 619–631.
4. *Bustamante J., Di Libero E., Fernandez-Cobo M.* // Free Rad. Biol. and Med. 2004. **37**, N 9. P. 1490–1498.
5. *Rodriguez-Tarduchy G., Collins M., Lopez-Rivas A.* // EMBO J. 1990. **9**. P. 2997–3002.
6. *Pinton P., Ferrari D., Rapizzi E., et al.* // EMBO J. 2001. **20**. P. 2690–2701.
7. *Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. I. et al.* // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2004. **287**. P. 817–833.
8. *Zhu L. P., Yu X. D., Ling S. et al.* // Cell Calcium. 2000. **28**, N 2. P. 107–117.
9. *Гринюк І. І., Корнійчук Г. М., Капралов О. О., Матишевська О. П.* // Укр. біохім. журн. 2004. **76**, № 5. С. 69–74.
10. *Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R. Y.* // J. Biol. Chem. — 1985. 260, N 6. P. 3440–3450.
11. *Hissin P. J., Hilf R.* // Anal. Biochem. 1976. **74**. P. 214–227.
12. *Коваль Т. В., Капралов О. О., Матишевська О. П., Кучеренко М. Є.* // Доп. НАН України. 2004. № 7. С. 166–171.
13. *Utansky S. R., Korol' B. A., Nelipovich P. A.* // Biochem. Biophys. Acta. 1981. **27**, N 665 (1). P. 9–17.
14. *Lelli J. L., Becks L. L., Dabrowska M. I., Hinshaw D. B.* // Free Rad. Biol. and Med. 1998. **25**, N 6. P. 694–702.
15. *Гребіник Д. М., Артеменко О. Ю., Семенов Ю. В., Зима В. Л., Матишевська О. П.* // Вісн. Київ. нац. ун-ту. Біологія. 2003. **38**. С. 16–18.
16. *Donnadieu E., Bismuth G., Trautmann A.* // JBC. 1992. **267**, N 36. P. 25864–25872.
17. *Crompton M.* // Biochem. J. — 1999. — 341. — P. 233–249.
18. *Montero M., Alonso M. T., Albillos A. et al.* // Mol. Biol. Cell. 2001. **12**. P. 63–71.

Получено 19.11.2004