

EFEKAT JONIZUJUĆEG ZRAČENJA NA MODULACIJU PURINERGIČKE SIGNALIZACIJE U NERNIM ČELIJAMA MOZGA PACOVA

Ivana STANOJEVIĆ, Maja MILOŠEVIĆ, Dunja DRAKULIĆ, Anica HORVAT
*Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Institut za nuklearne nauke
"Vinča", Beograd, Srbija, istanojevic@vin.bg.ac.yu*

SADRŽAJ

Purinergička signalizacija sadrži tri modulatorne komponente: a) izvor vanćelijskih nukleotida, b) specifične membranske receptore za ove transmitterske molekule i c) ektonukleotidaze koje diktiraju ćelijski odgovor postepenom degradacijom vanćelijskih nukleotida do nukleozida. Adenozin trifosfat (ATP) je brzi ekscitatorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu (CNS-u). Postsinaptičko delovanje ATP-a posredovano je familijom specifičnih purinergičkih receptora, P2X, koji su široko eksprimirani u CNS-u. Membranski enzimi nukleotid trifosfodifosfohidrolaze (NTPDaze) hidrolizuju vanćelijske nukleotide, ATP i ADP do AMP i odgovorni su za terminaciju purinergičke signalizacije. Da bi ispitali da li jonizujuće zračenje može da moduliše purinergičku signalizaciju u CNS, praćena je promena aktivnosti NTPDaza i količina receptora P2X7 u plazma membranama nervnih završetaka nakon akutnog ozračivanja celog tela malom (0,5Gy) ili teraeutskom (2Gy) dozom 1h i 72h nakon zračenja kod pacova u juvenilnom (15-dana stare životinje) i adultnom (90-dana stare životinje) uzrastu. Akutno zračenje celog tela moduliše ispitivane komponente purinergičkog sistema u mozgu pacova i način modulacije zavisi od stepena razvicia CNS-a, primenjene doze zračenja i vremena nakon ozračivanja.

1. Uvod

Nervne ćelije su izložene visokim koncentracijama purina u sinaptičkom regionu. Vanćelijski ATP deluje kao neurotransmiter i neuromodulator aktivacijom membranskih P2 receptora koji su široko rasprostranjeni u nervnom sistemu. P2 receptori su klasifikovani u dve familije: G-protein kuplovani P2Y_(1,2,4,6,11,12,13,14) i ligand-zavisni jonski kanali P2X₍₁₋₇₎. U većini slučajeva, aktivacija P2X7 receptora dovodi do otvaranja neselektivnih katjonskih kanala, do influksa Ca²⁺, izjednačavanja transmembranskog gradijenta Na⁺ i K⁺ što vodi depolarizaciji membrane. Produžena aktivacija P2X7 receptora uključuje formiranje neselektivnih pora, bubrenje ćelijske membrane i ćelijsku smrt [1].

Ektonukleotidazna enzimska kaskada, kao jedna od komponenti purinergičkog sistema, obezbeđuje balans između oslobođenih nukleotida u vanćelijski prostor, njihovog preuzimanja od strane ćelije i vanćelijskog metabolizma. Članove ektonukleotidazne enzimske kaskade čine i NTPDaze (NTPDaza 1, 2, 3 prisutne u CNS-u) koje su membranski vezani enzimi i hidrolizuju vanćelijski ATP i ADP. Ovi enzimi su neophodni inaktivirajući agensi u purinergičkoj signalizaciji i omogućuju brzu eliminaciju njihovih citotoksičnih efekata, a kao produkt nastaje adenozin kao neuroprotektivni molekul. Gubitak aktivnosti NTPDaza u nekim patološkim uslovima dovodi do akumulacije ekstraćelijskog ATP-a koji vodi do citotoksičnosti [2,3].

Jonizujuće zračenje može modulisati aktivnost nervnih ćelija delovanjem na membranske receptore i enzime, kao i na puteve signalne transdukcije [4]. Oštećenja tkiva jonizujućim zračenjem dešava se preko različitih simultanih puteva, genozom slobodnih radikala, koji mogu izazvati lipidnu peroksidaciju i različita oksidativna oštećenja. Efekti

malih doza jonizujućeg zračenja ne mogu biti objašnjeni samo direktnim oštećenjima DNA. Alternativni targeti za male doze su plazma membrane koje su visoko senzitivne na jonizujuće zračenje. Jonizujuće zračenje pogađa funkciju plazma membrane preko transmembranskih proteina, dovodeći do promena u njihovoj ekspresiji ili menjajući interakcije koje postoje između membranskih lipida i proteina [5].

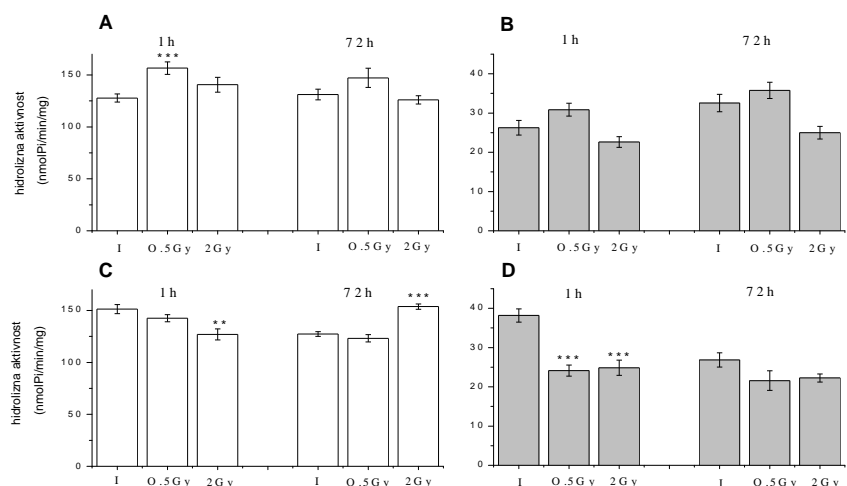
Kako su NTPDaze i P2X7 receptori membranski proteini, cilj ovog rada je bio da se ispita da li kratko vreme nakon izlaganja celog tela malim i terapijskim dozama jonizujućeg zračenja može doći do modulacije purinergičke signalizacije.

2. Materijali i metode

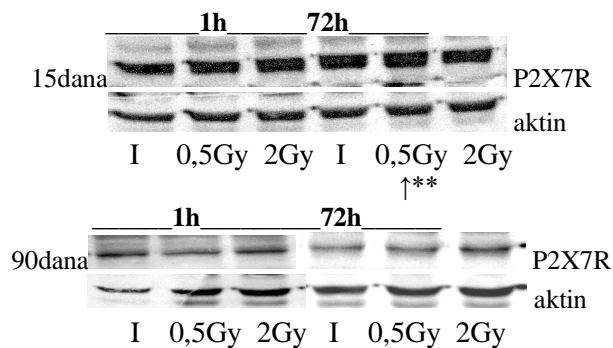
Ženke pacova soja Wistar, starosti 15 i 90 dana zračene su jednokratnim dozama od 0,5Gy ili 2Gy (10,7cGy/min, ⁶⁰Co). Grupa životinja koja je prošla isti tretman ali nije bila izložena zračenju označena je kao imobilisana grupa (I). Nakon tretmana životinje su vraćene u fiziološke uslove, i žrtvovane 1h i 72h nakon zračenja. Sinaptičke plazma membrane (SPM) su izolovane iz celih mozgova i aktivnost NTPDaza praćena je u *in vitro* uslovima kolorimetrijskim određivanjem produkata hidrolize ATP i ADP, odnosno oslobođenog neorganskog fosfata (Pi) u prisustvu 40μg SPM proteina, 1mmol/l ATP ili ADP, 5mmol/l MgCl₂, 50mmol/l Tris-HCl, pH 7,8, i inkubacijom 15min na 37°C. SPM proteini razdvojeni su SDS-PAGE elektroforezom, transferovani na PVDF membranu i inkubirani su sa goat-anti-P2X7 ili goat anti-aktin antitelima. Sekundarno anti-goat IgG-HRP konjugovano antitelo korišćeno je za vizuelizaciju specifičnih proteinskih traka, kvantifikovanih programom PC imager. Analiza varijanse (one-way ANOVA) praćena Tukey's post-hoc testom korišćena je za determinaciju statistički značajne razlike (P<0,01).

3. Rezultati i diskusija

Zračenje malom dozom jonizujućeg zračenja (0,5Gy) dovodi do povećanja hidrolize ATP kod mladih životinja 1h nakon ozračivanja, što može imati protektivni efekat, koje se nakon 72h smanjuje na kontrolni nivo. Kod polno zrelih životinja 0,5Gy ne dovodi do promene hidrolize ATP u posmatranim vremenima. Ozračivanje životinja dozom od 2Gy ne dovodi do promene hidrolize ATP kod mladih životinja dok kod polno zrelih se uočava bifazna modulacija u zavisnosti od vremena proteklog od ozračivanja. Promena hidrolize ADP se uočava samo kod odraslih životinja 1h nakon ozračivanja sa obe doze (Slika 1). Rezultati ukazuju da jonizujuće zračenje dovodi do modulacije aktivnosti NTPDaza već nakon 1h koje je izraženije kod odraslih životinja. Može se očekivati da je uočeni efekat posledica stvaranja reaktivnih kiseonikovih i azotovih jedinjenja koji narušavanjem plazma membrane inhibiraju aktivnost enzima i povećavaju količinu ekscitatornog ekstraćelijskog ATP koji stimulacijom P2X7R može da dovede do apoptoze ćelija [5]. Poređenjem količine P2X7R imunodetekcijom uočena je značajno veća zastupljenost ovog receptora kod životinja starih 15 dana. Tokom normalnog razvika uloga ovih receptora je u kontroli broja neurona preko indukcije apoptoze čime kontrolišu lokalnu gustinu i regularno rastojanje između neurona [1]. Jedan i 72 sata nakon ozračivanja životinja sa 0,5Gy zastupljenost receptora ostaje ista i kod mladih (15 dana) i kod adultnih životinja (90 dana). Zračenje dozom od 2Gy dovodi do značajnog povećanja proteina P2X7R kod adultnih životinja 72h nakon zračenja (Slika 2) što ukazuje da je zračenje indukovalo ili *de novo* sintezu proteina



Slika 1. Hidroliza ATP-a (A i C) i ADP-a (B i D) u zavisnosti od doze i vremena proteklog od zračenja. Nivo hidrolize prikazan je kao srednja vrednost specifične aktivnosti (nmolPi/mon/mg \pm SEM, n=3), 1h i 72h nakon zračenja dozama 0,5Gy i 2Gy ženki pacova starih 15 (A i B) i 90 (C i D) dana. (p<0,01; *** p<0,001)**



Slika 2. Nivo ekspresije P2X7 proteina i aktina u SPM ženki pacova starih 15 i 90 dana, 1h i 72h nakon zračenja dozama od 0,5Gy i 2Gy. Densitometrijski analizirani P2X7R normalizovan je u odnosu na aktin. I-imobilisana kontrola (p<0,01).**

ovog receptora ili ugradjivanje receptora u membranu iz intraćelijskih pulova. Povećanje broja receptora čini nervnu ćeliju podložnijom apoptotskim promenama nakon zračenja jer aktivacijom ovog receptora dolazi do nekontrolisanog ulaska jona u ćeliju.

4. Zaključak

Akutno zračenje celog tela malim i terapijskim dozama jonizujućeg zračenja moduliše već nakon 1h nervnu aktivnost delujući na aktivnost NTPDaza u mozgu pacova. Efekat jonizujućeg zračenja u ovom periodu može imati protektivni efekat kod mladih životinja, a kod odraslih može dovesti do pojave rane apoptotske ćelijske smrti. Nakon 72h uočava se vraćanje na fiziološki nivo usled adaptivnog odgovora ćelija. Iako je aktivnost NTPDaza u fiziološkim granicama nakon 72h, kod odraslih životinja povećanje količine proapoptotskog receptora P2X7 povećava mogućnost pojave apoptoze nakon ozračivanja sa 2Gy.

5. Literatura

- [1] B. Sperlagh, E.S. Vizi, K. Wirkner, P. Iles. P2X₇ receptors in the nervous system. *Prog Neuro.* 78 (2006) 327-346
- [2] H. Zimmermann. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 362 (2000) 299-309
- [3] S. C. Robson, J. Sevigny, H. Zimmermann. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Pur Sign.* 2 (2006) 409-430
- [4] W. A. Hunt, T. K. Dalton. Synthesis and degradation of cyclic nucleotides in the brain after a high dose of ionising radiation. *Radiat Res.* 85 (1981) 604-608
- [5] J. Verheyde, M. A. Benotmane. Unraveling the fundamental molecular mechanisms of morphological and cognitive defects in the irradiated brain. *Brain Res Rev.* 53 (2007) 312-320

ABSTRACT

EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON PURINERGIC SIGNALING MODULATION IN RAT BRAIN NERVE CELLS

Ivana STANOJEVIĆ, Maja MILOŠEVIĆ, Dunja DRAKULIĆ, Anica HORVAT
"Vinca" Institute of Nuclear Science, Belgrade, Serbia, , istanojevic@vin.bg.ac.yu

Purinergic signaling is composed of three modulatory components: a) source of extracellular nucleotides, b) specific receptor expression for these transmitter molecules and c) ectonucleotidase selection that dictate cell response gradually degradation extracellular nucleotides to nucleosides. ATP acts as a fast excitatory transmitter in the CNS. Postsynaptic actions of ATP are mediated by an extended family of purinergic, P2X receptors, widely expressed throughout the CNS. NTPDases hydrolyse extracellular ATP and ADP to AMP and are responsive for purinergic termination. To investigate if ionizing irradiation could modulate CNS purinergic signalization we monitored activity of NTPDases and abundance of P2X7 receptor in synaptic plasma membranes after whole-body acute irradiation using low (0,5Gy) or therapeutic (2Gy) doses, 1h i 72h after irradiating juvenile (15-day old) and adult (90-day old) rats. Acute irradiation modulate purinergic system components investigated at the different ways in the rat development brain SPM and in the adult brain dependent of dose and time after irradiation.