

УДК 577.156:612.015.349
© 2010

В.І. ЧОРНА,
доктор біологічних наук

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОЇ
РАДІАЦІЇ НА ВМІСТ БІЛКА
ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ
ГЛІЇ І СТАН ПРОТЕОЛІЗУ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Визначена динаміка концентрації розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у тканинах неокортекса, гіпокампа, смугастого тіла, мозочка, середнього мозку та варолієва мосту під впливом фракціонованого рентгенівського опромінення. Встановлено збільшення розчинної форми ГФКБ у корі головного мозку та зниження концентрації в гіпокампі і смугастому тілі дослідних щурів. Виявлені зміни концентрації нейроспецифічного білка і активності катепсину L у сироватці крові опромінених щурів можуть бути інформативним тестом пошкоджуючої дії радіації та спрямованості перебігу патологічних станів ЦНС.

За умов сучасності актуальності набула проблема визначення механізмів дії хронічного опромінення за низьких рівнів іонізуючої радіації, коли головну роль у виникненні радіаційних змін відіграють ураження мембранних структур. У загальній концепції механізму дії малих доз радіації біологічним мембранам приділяється першочергове значення [1]. Вони, як і ядерний апарат, є важливими мішенями в разі радіаційного впливу. Розвиток та функціонування нормального мозку залежать від координованості процесів, у яких беруть участь нейрони і гліальні клітини.

Істотну роль у феномені пластичності нервової системи виконують астрогліальні клітини, які беруть участь у регуляції метаболізму і активності нейронів. Для астроцитів характерна експресія гліального фібрилярного кислого глікопротеїну (ГФКБ) – специфічного маркера проміжних філаментів цитоскелету. В астроцитах проміжні філаменти складаються здебільшого з гліального фібрилярного кислого білка (49 кДа) [2, 3]. Вважають, що саме дані білки визначають функціональну гетерогенність і специфіку цитоскелету гліальних клітин і нейронів у нормі, а також відіграють важливу роль у розвитку нейродегенеративних процесів. Механізми, що лежать в основі толерантності і реакції ЦНС на іонізуюче випромінювання, залишаються до кінця нез'ясованими. Одним із причинних факторів у радіаційно-індукованому

пошкодженні мозку є порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Вивчення проникності ГЕБ для ГФКБ відкриває певні перспективи як для дослідження патогенетичних механізмів радіаційного пошкодження ЦНС, так і для об'єктивної діагностики. Показано, що опромінення в помірних та високих дозах викликає зміни проникності ГЕБ [4], результатом чого може бути елімінація нейроспецифічних антигенів до кров'яного русла. Результатами сучасних радіобіологічних досліджень визначено, що порушення внутрішньоклітинної компартименталізації протеолітичних ферментів (особливо з лізосомною локалізацією) є одним із важливих ланцюгів розвитку променевої патології, тому що порушення проникності лізосомних мембран під впливом іонізуючої радіації створює сприятливі умови для виходу катепсинів з лізосом, дезорганізуючи метаболічні процеси в клітині і посилюючи первинні радіаційні зрушення. Лізосомний цистеїновий катепсин L (КФ 3.4.22.15) – найбільш вивчена ендопептидаза з молекулярною масою 30 кДа, активна за слабкокислих значень рН [5].

Метою нашої роботи було експериментальне дослідження радіаційно-індукованих змін вмісту білків проміжних філаментів астроглії у різних відділах головного мозку, сироватці крові та зміни активності лізосомного цистеїнового катепсину L у сироватці крові щурів після фракціонованого рентге-

ЕКОЛОГІЯ, ФІТОМЕЛІОРАЦІЯ ТА РЕКУЛЬТИВАЦІЯ ЗЕМЕЛЬ

Вплив іонізуючої радіації на вміст білка проміжних філаментів глії і стан протеолізу головного мозку

нівського опромінювання за дози 25 сГр.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проводили на білих лабораторних щурах масою 200–230 г. Щурів поділяли на дві групи – псевдоопромінену контрольну ($n = 12$) та дослідну ($n = 30$). Дослідну групу тварин опромінювали рентгенівськими променями за дози 25 сГр фракціоновано (0,01 сГр на добу протягом 25 діб) на установці РУМ-17 (напруга 150 кВ, сила струму 6 мА, фільтри Cu 2 мм + Cu 0,5 мм, фокусна відстань 186 см, потужність дози 0,043 мГр/с). Щурів декапітували через 1, 12, 24, 120 та 168 годин після опромінення. Після декапітації головний мозок охолоджували і розділяли на відділи: неокортекс, гіпокамп, смугасте тіло, мозочок, середній мозок та вароліїв міст, з яких отримували білкові фракції для визначення концентрації ГФКБ. Кількісний вміст ГФКБ визначали у розчинній фракції тканин головного мозку, які отримували завдяки екстракції буферами А (25 мМ трис-буфер, рН 7,4; 1 мМ фосфометил-сульфонілфторид;

10 мМ NaN_3). Концентрацію ГФКБ в одержаних фракціях вимірювали методом імуноферментного аналізу, що включав етап інгібування антитіл антигеном у рідкому середовищі [6].

Кров відстоювали 1 год за кімнатної температури та центрифугували на центрифугі К70Д 20 хв×3000 об/хв. Сироватку крові використовували для визначення концентрації нейроспецифічного білка (ГФКБ) та активності цистеїнової протеази (катепсину L).

Концентрацію ГФКБ виражали в мкг/г тканини та нг/мл сироватки крові. Активність катепсину L досліджували за розщепленням 1%-вого азоказеїну, денатурованого 3М сечовиною і виражали в умовних одиницях абсорбції при 366 нм за 1 хв на 1 мг білка. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорд. Статистична обробка результатів проводилася з використанням програми Stat-Win 98 за t-критерієм Ст'юдента.

Результати досліджень. Для з'ясування

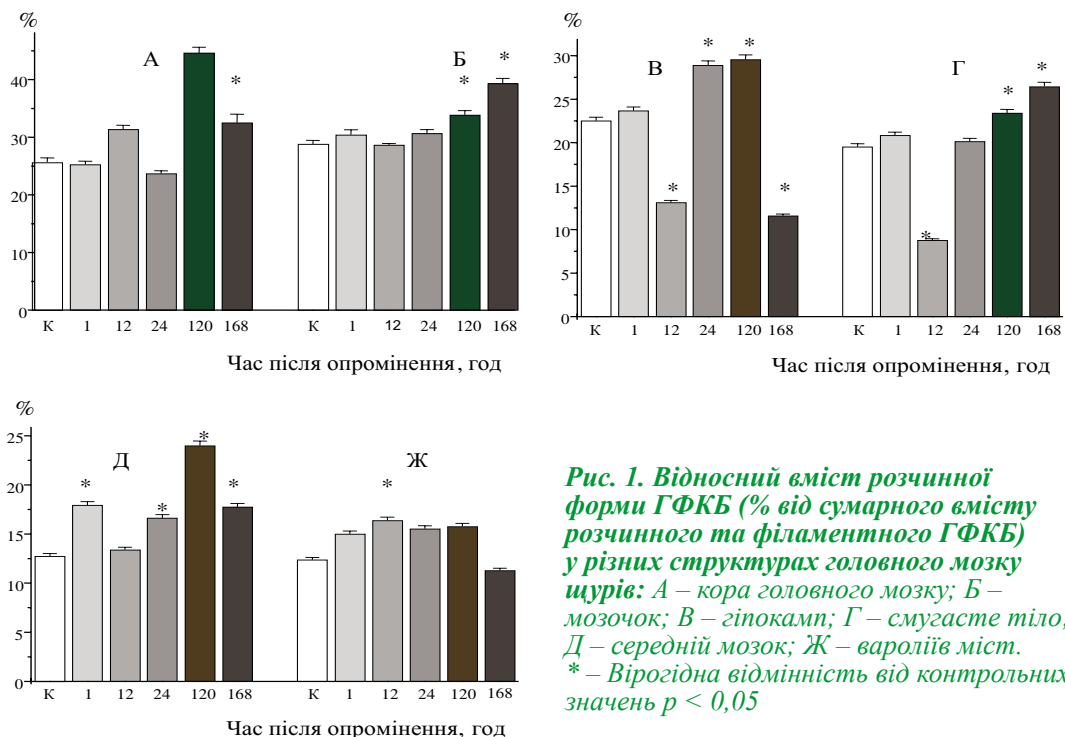


Рис. 1. Відносний вміст розчинної форми ГФКБ (% від сумарного вмісту розчинного та філаментного ГФКБ) у різних структурах головного мозку щурів: А – кора головного мозку; Б – мозочок; В – гіпокамп; Г – смугасте тіло; Д – середній мозок; Ж – вароліїв міст. * – Вірогідна відмінність від контрольних значень $p < 0,05$

ЕКОЛОГІЯ, ФІТОМЕЛІОРАЦІЯ ТА РЕКУЛЬТИВАЦІЯ ЗЕМЕЛЬ

Вплив іонізуючої радіації на вміст білка проміжних філаментів глії і стан протеолізу головного мозку

особливостей астроцитарної відповіді, викликаних фракціонованим опроміненням щурів за дози 25 сГр, аналізували зміни вмісту розчинної форми ГФКБ у мозкових структурах опромінених щурів. Зміни концентрації розчинної форми ГФКБ у відділах та структурах мозку щурів після фракціонованого рентгенівського опромінення за сумарної дози 25 сГр представлені на рис. 1.

Реакція астрогліальних елементів у відповідь на дію малих доз іонізуючої радіації виявляється не тільки в змінах кількості астрогліальних клітин як наслідок процесів міграції і проліферації, але дозволяє припустити і процеси перебудови (реорганізації) проміжних філаментів астроглії. Вміст розчинної форми ГФКБ зазнав значних змін у умовах фракціонованого опромінення.

Фракціоноване опромінення щурів призводить до модифікації вмісту маркерного білка астрогліальних клітин ГФКБ, що може свідчити про зміни кількості астроцитів і про посттрансляційні модифікації ГФКБ. У корі головного мозку через 1 год після опромінення рівень ГФКБ вірогідно підвищувався з $2,55 \pm 0,22$ до $4,20 \pm 0,41$ мкг/г тканини ($\Delta +64,8\%$). Через 24 год після фракціонованого радіаційного впливу параметр збільшився на 151%. Починаючи з 7 доби відзначалася поступова нормалізація концентрації нейроспецифічного білка, тобто зниження до 4,5 мкг/г. Аналогічні зміни були виявлені в мозочку і середньому мозку. Особливістю змін вмісту розчинної форми ГФКБ у гіпокампі щурів у пізні строки пострадіаційного періоду було істотне зниження на 7 добу спостережень на 55,9%. У варолієва мосту цей показник також мав тенденцію до зниження.

Як відомо, у сироватці крові нейроспецифічні білки практично не виявляються в нормі, або ж виявляються у слідовій кількості [3].

Аналізуючи дані імуноферментного визначення ГФКБ у сироватці крові щурів після фракціонованого опромінення (рис. 2), слід підкреслити, що через 1 год після опромінення рівень ГФКБ підвищився з 0,7 до 1,36 нг/мл і досяг максимального значення через 24 год. У більш пізні пострадіаційні терміни

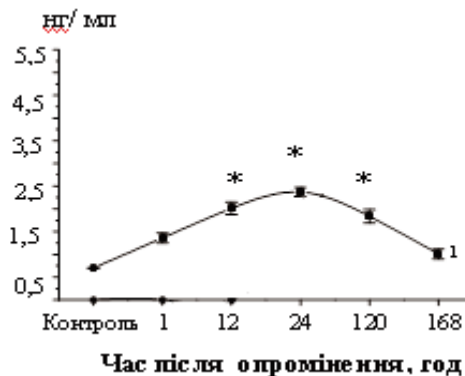


Рис. 2. Вміст ГФКБ у сироватці крові щурів за фракціонованого опромінення, доза 25 сГр. * – Вірогідна відмінність від контролю $p < 0,05$

концентрація ГФКБ в сироватці крові щурів знижувалася.

Визначений підвищений вміст ГФКБ у сироватці крові щурів, що зазнали фракціонованого опромінення за дози 25 сГр, може свідчити про радіаційно-індуковане порушення проникності ГЕБ, а рівень підвищення даного нейроспецифічного білка дозволяє прогнозувати тяжкість пошкодження тканин мозку і ступінь порушення функції ГЕБ. Механізм гіперпроникності ГЕБ у результаті дії радіації є неспецифічним та до кінця нез'ясованим.

Якщо розглядати динаміку концентрації

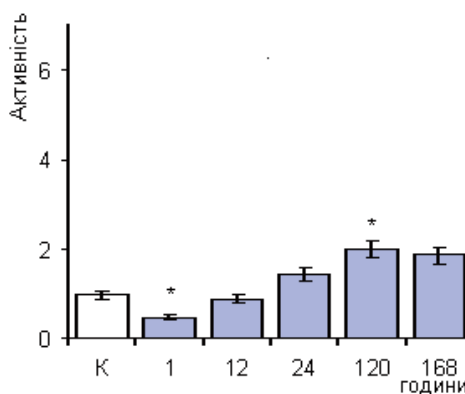


Рис. 3. Активність катепсину L у сироватці крові щурів після фракціонованого опромінення за дози 25 сГр ($M \pm m$, $n = 6$). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

ГФКБ у сироватці крові в пострадіаційний період, то підвищення його вмісту, можна припустити, відбувається або за рахунок підвищення експресії білка у мозку під впливом радіаційного ураження, або є результатом протеолітичної деградації цистеїновими ферментами цитоплазми – кальпаїнами, коли утворюються низькомолекулярні похідні ГФКБ [2], імовірність проходження яких через ГЕБ є значно вищою, ніж інтактною формою ГФКБ.

Експериментальні дані зміни активності лізосомного цистеїнового катепсину L у сироватці крові опроміненних щурів представлені на рис. 3. У нормі тканинні цистеїнові катепсини, як і нейроспецифічні білки

(ГФКБ), в сироватці крові визначаються у слідовій кількості [7, 8], тому значне підвищення їхнього рівня в крові може свідчити про розвиток патологічного процесу [9]. Дослідження впливу фракціонованого тотального рентгенівського опромінення щурів за дози 25 сГр на активність цистеїнового катепсину L у сироватці крові дозволяє оцінити радіобіологічний ефект опромінення і розбалансування системи внутрішньоклітинного протеолізу. Визначення активності катепсину L у сироватці крові опроміненних щурів є інформативним методом оцінки пошкоджуючої дії радіації і дозволяє прогнозувати ранні функціональні ураження, а також ризик появи віддалених наслідків.

Висновки

1. Фракціоноване тотальне рентгенівське опромінення щурів за дози 25 сГр спричиняє реорганізацію проміжних філаментів астроцитів головного мозку, що супроводжується кількісними змінами розчинної форми нейроспецифічного білка (ГФКБ) у динаміці експерименту: збільшення розчинної форми ГФКБ у корі головного мозку, зниження у гіпокампі та смугастому тілі опроміненних тварин.

2. Встановлена наявність ГФКБ у сироватці крові щурів, які зазнали радіаційного впливу, може свідчити про зміни проникності ГЕБ в експериментальних тварин.

3. Після фракціонованого опромінення

тварин система внутрішньоклітинного протеолізу в усі досліджувані терміни децтабілізована і має тенденцію до активзації. Динаміка вільної активності лізосомного цистеїнового катепсину L на фоні змін вмісту ГФКБ під дією іонізуючого випромінювання підтверджує їхню відповідну фізіологічну роль у розвитку пострадіаційних ушкоджень ЦНС.

4. Отримані результати дозволяють розглядати наявність даного нейроспецифічного білка і активності катепсину L у сироватці крові опроміненних тварин як маркери оцінки ступеня тяжкості та спрямованості перебігу патологічних станів.

Бібліографія

1. Барабой В.А. Чернобыль: через 10 лет. Медицинские последствия радиационных катастроф / В.А. Барабой; под ред. Гродзинського Д.М. – К. : Чернобыльинформ, 1996. – 187 с.

2. Дука Т.І. Характеристика гліального фібрилярного кислого білка – компонента астрогліальних проміжних філаментів ЦНС / Т.І. Дука, І.О. Лещинська, В.І. Чорна // Біополімери і клітина. – 2002. – Т. 18, № 3. – С. 179–185.

3. Inoue B. Coexistence of paired helical filaments and polyglucosan bodies in the same neuron in an autopsy case of Alzheimer's disease / B. Inoue, S. Yagishi, Y. Hoh // Acta Neuropathol. – 1996. – 90, № 5. – P. 511–514.

4. Rubin P. Distribution of the blood-brain barrier's the primary effects of CNS irradiation / P. Rubin, D. Gash, J. Hansen // Radiotherapy Oncology. – 2004. – Vol. 31. – P. 51–60.

5. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers / I. Berdowska // Clinica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 342. – P. 41–69.

6. Березин В.А. Специфические белки нервной ткани / Березин В.А., Белик Я.В. – К. : Вища школа. – 1990. – 263 с.

7. Дроздов А.Л. Нейроспецифические белки ГФКБ и NCAM гиппокампа при формировании энграмм условно-рефлекторной памяти / А.Л. Дроздов, В.И. Черная // Нейрохимия. – 2005. – Т. 22, № 4. – С. 285–289.

8. Kos J. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer / J. Kos, H. Schweiger // Radiol. Oncol. – 2002. – Vol. 36, № 2. – P. 176–179.

9. Somosy Z. X-irradiation-induced disorganization of cytoskeletal filaments and cell contacts in HT29 cells / Z. Somosy, M. Sass, G. Bogner // Scann.Microscopy. – 2009. – 9, № 3. – P. 763–772.