

Л.А.Романенко

Дніпропетровська державна
медична академія

Ключові слова: щур, мозок, гліальні проміжні філаменти, іонізуюче випромінювання.

Надійшла: 28.05.2007

Прийнята: 19.07.2007

УДК: 616.89-008.46+616.831.+616.831.5]-02-001.28/.29-085.21

ВПЛИВ МАЛИХ ДОЗ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА СТАН ГЛІАЛЬНИХ ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ

Резюме. Метою дослідження було визначити зміни вмісту білків проміжних філаментів у різних відділах головного мозку щурів, в залежності від терміну опромінення. Для дослідження було використано 30 щурів, які були розділені на групи, в залежності від терміну опромінення – 1 доба, 1, 2 та 3 тижні, в тому числі контрольна група. Рентгенівське опромінення проводили на установці РУМ-17 в дозі – 0,0129 Кл/кг. Головний мозок розділяли на відділи (кора великих півкуль, мозочок, гіпокамп), гомогенізували, центрифугували. Кількість гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) визначали з допомогою ракетно-лінійного електрофорезу. Під впливом низькодозового іонізуючого випромінювання нами були визначені достовірні зміни вмісту ГФКБ в усіх групах, що підлягали опроміненню. Виразність цих змін виявляла залежність від терміну дії опромінення. Характер змін в досліджуваних відділах головного мозку був однаковий. Зміни вмісту розчинної та кислої форми ГФКБ були незалежні одна від одної. Отже, однократне опромінення впродовж 7 днів викликало зниження обох фракцій в гіпокампі і мозочку, тоді як в корі великих півкуль мало місце підвищення філаментної фракції в межах 5-23%. Опромінення протягом 14-21 супроводжувалось зростанням філаментної форми ГФКБ у всіх досліджуваних структурах мозку.

Romanenko L.A. The influence of small doses of ionizing radiations on a glial intermediate filament's condition.

Summary. The purpose of research was to define changes of structure of glial intermediate filaments in different departments of a brain of rats, depending on term of an irradiation. For research 30 rats that have been divided into groups have been used, depending on term of an irradiation - 1 day, 1, 2 and 3 weeks, including control group. The x-ray irradiation was spent on installation PYM-17 in a doze of 0, 0129 Kl/kg. A brain divided on departments (a bark of the big hemispheres, a cerebellum, and gypocampus), homogenizing, and centrifugation. Quantity glial and fibrillar sour fiber (GFSF) defined with the help rocket – linear electrophoresis. Under action ionizing low-dose radiations by us have been determined authentic changes of contents GFSF in all groups subjected to an irradiation. Intensity these changes revealed dependence on validity of radiation. Character of these changes in researched departments of a brain was identical. Change of the contents of soluble and sour form GFSF were independent from each other. Thus, the unitary irradiation during 7 day caused decrease in both fractions GFSF in gypocampus and a cerebellum while in a bark of the big hemispheres increase filaments fractions took place within the limits of 5-23 %. The irradiation during 14-21 day was accompanied by increase filaments forms GFSF in researched structures of a brain.

Key words: rat, brain, glial intermediate filaments, ionizing radiations.

Вступ

Інтерес дослідників до проблеми пошкоджуючої дії малих доз радіації на нервову систему обумовлений високою питомою вагою нервово-психічних розладів у осіб, що зазнали впливу іонізуючого опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС (Волошин П.В. та співавт., 1998). Як показує аналіз літературних джерел, тривалий час дослідження цієї проблеми були спрямовані на вивчення впливу великих доз іонізуючого опромінення на організм в цілому і на функціональний стан нервової системи зокрема.

В той же час значно менше досліджень направлено на вивчення нейрохімічних механізмів, які розкривають молекулярні основи дії низькодозованого опромінення на центральну нервову систему.

Найважливіша особливість дії іонізуючої радіації на біологічні системи полягає в ураженні клітинного ядра, хроматину, молекул ДНК (Hagan M. et al., 2000). Окрім того на різних рівнях організації живих систем існують механізми посилення, лавиноподібного збільшення змін під впливом кількісно незначного, але точно прикладеного первинного пошкодження (Жаворонкова Л.А. та співавт., 2000). Необхідно зазначити, що в області малих доз опромінення, на відміну від традиційних уявлень, центральна нервова система є однією з найбільш вразливих систем організму (Дроздов А.Л. та співавт., 1999). Серед реакцій на дію радіації описані форми енцефалопатії з ознаками порушення вищих психічних функцій, вегетативними та іншими порушеннями. Встановлено, що ефекти іонізуючої радіації реалізуються

на плазматичних мембранах, призводячи до змін у структурі мембран, що значною мірою змінює їхні рецепторні властивості, впливає на ефективність трансмембранного переносу медіаторів, а також внутрішнього і міжклітинного транспорту (Жаворонкова Л.А. та співавт., 2000). Структурно-метаболичні зміни в нервовій тканині при дії опромінення виявляються у всьому мозку, хоча їх вираженість у різних структурах неоднакова. Так, за даними деяких вчених (Нягу А.И. та співавт., 1997) у підкірково-стовбурових відділах зсувів більше, ніж у корі головного мозку. Більшість робіт підтверджують ранню реакцію медіаторних систем на дію іонізуючої радіації, що супроводжується мобілізацією катехоламінів в ранні терміни після опромінення.

Метою роботи було дослідження зміни вмісту білків проміжних філаментів, а також поліпептидний їх склад у різних відділах головного мозку щурів в залежності від терміну опромінення.

Матеріали та методи

Дослідження проводилися на 30 білих щурах лінії Вістар віком 4-5 місяців. Загальне рентгеновське опромінення проводили на установці РУМ-17 (доза – 0,0129 Кл/кг, потужність дози – 0,143 мА/кг, напруги – 200 кВ, ампераж – 15 мА, шкіряно-фокусна відстань – 50 см, час – 1,6 хв). Всі групи тварин отримували аналогічну дозу опромінення впродовж 1 доби, 1, 2 та 3 тижнів.

Після декапітації тварин, вилучали головний

мозок, охолоджували, розділяли на відділи. Для дослідження брали по 0,2 г тканини (головний мозок загалом, кора великих півкуль, мозочок, гіпокамп), гомогенізували. Гомогенат центрифугували протягом 60 хв., осад ресуспендували. Супернатант, отриманий після другого центрифугування, містив нерозчинну філаментну форму ГФКБ і триплет білків нейрофіламентів. Кількість білків нейрофіламентів і ГФКБ визначали за допомогою ракетно-лінійного імуоелектрофорезу. Останній проводили з використанням поліклональних моноспецифічних антисывороток проти білків нейрональних та гліальних компонентів. Імуноблотинг проводили за методикою, запропонованою Towbin Н. (1998).

Результати та їх обговорення

Специфічні білки цитоскелету нейронів представлені у головному мозку триплетом білків нейрофіламентів (НФ, Мг 70, 160 та 210 кДа), а в астроцитах проміжні філаменти складені з гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) (Lee K. et al., 1997). Гетерогенність і специфіка цитоскелету гліальних клітин і нейронів визначається саме цими молекулярними компонентами. Відносний вміст білків гліальних проміжних філаментів у розчинній і філаментній фракціях визначали методом ракетно-лінійного імуоелектрофорезу. Дані кількісного визначення фракцій ГФКБ в гіпокампі, корі великих півкуль і мозочку після впливу іонізуючого випромінювання у статевозрілих щурів представлені у таблицях 1, 2, 3.

Таблиця 1

Відносний вміст ГФКБ в гіпокампі щурів ($M \pm m$)

Фракції ГФКБ	Контрольна група (n=6)	Разове опромінення (n=6)	Опромінення 7 днів (n=6)	Опромінення 14 днів (n=6)	Опромінення 21 день (n=6)
Розчинний ГФКБ	100,0 \pm 2,64	98,1 \pm 4,72	79,4 \pm 3,02	124,0 \pm 9,45	134,1 \pm 7,03
Філаментний ГФКБ	100,0 \pm 2,70	98,9 \pm 3,94	87,0 \pm 4,53	121,9 \pm 4,96	122,9 \pm 4,78

Таблиця 2

Відносний вміст ГФКБ в корі великих півкуль щурів ($M \pm m$)

Фракції ГФКБ	Контрольна група (n=6)	Разове опромінення (n=6)	Опромінення 7 днів (n=6)	Опромінення 14 днів (n=6)	Опромінення 21 день (n=6)
Розчинний ГФКБ	100,0 \pm 2,81	89,7 \pm 7,04	61,2 \pm 4,15	135,2 \pm 6,19	120,5 \pm 8,96
Філаментний ГФКБ	100,0 \pm 2,15	97,0 \pm 4,13	122,8 \pm 6,03	114,2 \pm 5,90	124,4 \pm 6,38

Таблиця 3

Відносний вміст ГФКБ в мозочку щурів ($M \pm m$)

Фракції ГФКБ	Контрольна група (n=6)	Разове опромінення (n=6)	Опромінення 7 днів (n=6)	Опромінення 14 днів (n=6)	Опромінення 21 день (n=6)
Розчинний ГФКБ	100,0 \pm 3,48	94,7 \pm 6,35	92,3 \pm 5,01	123,0 \pm 4,11	126,7 \pm 6,52
Філаментний ГФКБ	100,0 \pm 2,17	95,1 \pm 3,56	70,2 \pm 3,25	113,6 \pm 6,01	122,5 \pm 9,87

Аналіз даних, які приведені в табл.1 свідчать, що в мозку щурів філаментний ГФКБ становить значно більшу частину в порівнянні з розчинною формою. Так, в корі великих півкуль розчинна форма складає в середньому 8% від філаментної, в гіпокампі і мозочку 15%, в середньому мозку більше за 20%.

Загалом, зміни філаментної і розчинної форми ГФКБ не мають спільноспрямованого характеру. Суттєві зміни кількості розчинного ГФКБ при дії малих доз рентгенівського опромінення спостерігаються в гіпокампі і корі великих півкуль. В мозочку значні зміни кількості білка гліальних філаментів виявлені для філаментної форми ГФКБ.

При опроміненні щурів впродовж 7 діб простежена тенденція до пониження вмісту білка проміжних філаментів глії у гіпокампі, мозочку і корі великих півкуль. Значне зниження філаментної форми ГФКБ визначено в гіпокампі і корі великих півкуль (74,8% та 61,4% відповідно). Суттєву втрату кількості розчинної форми ГФКБ спостерігали у мозочку при опроміненні щурів 7 діб. У випадку, коли тварини отримували ту ж саму дозу впродовж 14 та 21 доби виявлено зростання ГФКБ у гіпокампі, мозочку та корі великих півкуль. Потрібно зазначити, що кількість філаментної форми ГФКБ знижується при опроміненні за термін 7 діб і зростає при дії іонізуючого випромінювання впродовж 21 доби практично у всіх дослідженнях.

Методом імуноблотингу виявлені зміни поліпептидного складу у гіпокампі, мозочку та корі великих півкуль у всіх досліджуваних групах. У корі великих півкуль збільшується інтенсивність поліпептиду 49 кДа при опроміненні (рис. 1).

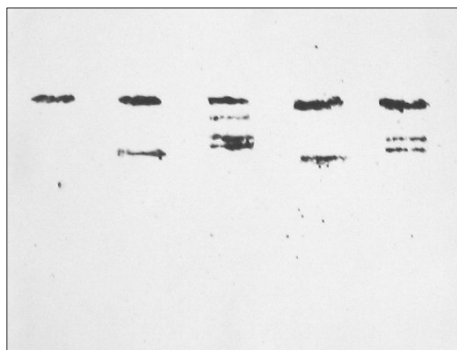


Рис.1. Імуноблотинг філаментної фракції ГФКБ з кори великих півкуль контрольних та експериментальних (1) груп щурів, які отримували дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) та 21 доби (5).

У гіпокампі виявляються додатково поліпептиди з Мг 42 кДа (рис. 2).

Найбільш істотні зміни поліпептидного складу ГФКБ виявлені у фракціях мозочка. При опроміненні впродовж 7 та 14 діб збільшується вміст деградованих поліпептидів в діапазоні Мг

47-42 кДа (рис. 3).

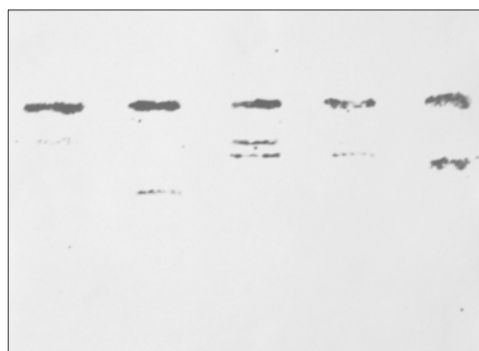


Рис.2. Імуноблотинг філаментної фракції ГФКБ з гіпокампу контрольних та експериментальних (1) груп щурів, які отримували дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) та 21 доби (5).

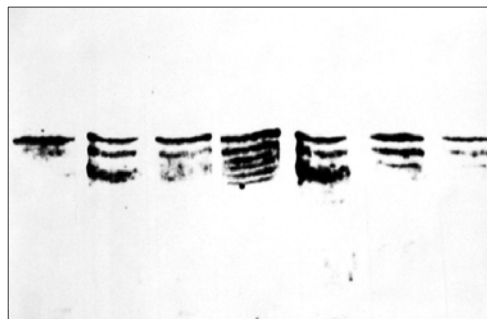


Рис.3. Імуноблотинг філаментної фракції ГФКБ з мозочку контрольних та експериментальних (1) груп щурів, які отримували дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) та 21 доби (5).

Для всіх термінів опромінення характерна поява деградованих поліпептидів. В усіх досліджених відділах мозку при опроміненні впродовж 7 і 14 діб виявлено значну кількість деградованих поліпептидів відносно разового опромінення і опромінення за термін 21 доби. Така залежність спостерігалась як для розчинної, так і для філаментної форми гліальних проміжних філаментів.

Підсумок

Дія низькодозованого опромінення супроводжувалась змінами філаментної і розчинної форми ГФКБ в корі головного мозку, гіпокампі і мозочку статевозрілих і старих щурів і характеризувалась двухфазною реакцією. Однократне опромінення впродовж 7 днів викликало зниження обох фракцій в гіпокампі і мозочку, тоді як в корі великих півкуль мало місце підвищення філаментної фракції в межах 5-23%. Опромінення протягом 14-21 супроводжувалось зростанням філаментної форми ГФКБ у всіх досліджуваних структурах мозку.

Перспективи подальших розробок

У подальшому доцільне проведення морфо-

логічного дослідження стану структур головного мозку в умовах дії різних доз іонізуючого випро-

мінювання.

Літературні джерела

Вміст молекули клітинної адгезії NCAM в структурах мозку щурів / Дроздов А.Л., Лещинська І.А., Кошелев О.С. та ін. // Нейрофізіологія.- 1999.- Т.1.- С.73-74.

Волошин П.В., Мищенко Т.С., Здесенко И.В. Неврологические нарушения у лиц, подвергшихся воздействию в результате аварии на Чернобыльской АЭС, их лечение, профилактика // Междун. Мед. Журн.- 1998.- Т.3.- С.44-47.

Жаворонкова Л.А., Готидзе Н.В., Холодова Н.Б. Пострадиационные изменения асимметрии мозга и высших психических функций // Журн. Высш. Нервн. Деят.- 2000.- Т.50, №1.- С.68-79.

Нягу А.И., Логановский К.Н. Изменения в нервной системе при хроническом воздействии

ионизирующего излучения // Журн. невропатол. и психiatr. им. С.С.Корсакова.- 1997.- Т.97, №2.- С.62-70.

Ionizing radiation-induced mitogen activated protein kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells: MAPK inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M phase arrest / Hagan N., Wang L., Hanley J. et al. // Radiat. Res.- 2000.- Vol.153, №4.- P.371-383.

Lee K., Johnston R. Neurofilaments are part of the High molecular weight complex containing neuronal cdc2-like kinase // Brain Res.- 1997.- Vol.773, №1.- P.197-202.

Towbin H. Immunoblotting an upulate. Biochem // Sos. Trans.- 1998.- Vol.16, N4.- P.131.

Романенко Л.А. Влияние малых доз ионизирующего излучения на состояние глиальных промежуточных филаментов.

Резюме. Целью исследования было определить изменения состава белков промежуточных филаментов в разных отделах головного мозга крыс, в зависимости от срока облучения. Для исследования было использовано 30 крыс, которые были разделены на группы, в зависимости от срока облучения – 1 сутки, 1,2 и 3 недели, в том числе и контрольная группа. Рентгеновское облучение проводили на установке РУМ-17 в дозе 0,0129 Кл/кг. Головной мозг разделяли на отделы (кора больших полушарий, мозжечок, гипокамп), гомогенизировали, центрифугировали. Количество глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) определяли с помощью ракетно-линейного электрофореза. Под действием ионизирующего низкодозового излучения нами были определены достоверные изменения содержания ГФКБ во всех группах, подвергнутых облучению. Выраженность этих изменений выявляла зависимость от срока действия излучения. Характер этих изменений в исследуемых отделах головного мозга был одинаковый. Изменение содержания растворимой и кислой формы ГФКБ были независимыми друг от друга. Таким образом, однократное облучение в течении 7 суток вызывало снижение обеих фракций ГФКБ в гипокампе и мозжечке, в то время как в коре больших полушарий имело место повышение филаментной фракции в пределах 5-23%. Облучение на протяжении 14-21 суток сопровождалось возрастанием филаментной формы ГФКБ во исследуемых структурах мозга.

Ключевые слова: крыса, мозг, глиальные промежуточные филаменты, ионизирующее излучение.