

**Л.А.Романенко**

Дніпропетровська державна  
медична академія

**Ключові слова:** нейрофіламенти, іонізуюче випромінювання, цитоскелет.

Надійшла: 02.09.2007

Прийнята: 19.12.2007

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

## **ЗМІНИ ВМІСТУ НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ В РІЗНИХ ВІДДІЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ НИЗЬКОДОЗОВОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ**

**Резюме.** В роботі було проведено дослідження зміни вмісту білків нейроспецифічних проміжних філаментів у різних відділах головного мозку щурів, в залежності від терміну дії іонізуючого випромінювання. Для дослідження було використано 60 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 нейроспецифічних проміжних філаментів визначали з допомогою ракетно-лінійного імуноелектрофорезу. Під впливом низькодозового рентгенівського випромінювання нами були визначені достовірні зміни вмісту нейроспецифічних проміжних філаментів в усіх групах, що підлягали опроміненню. Виразність цих змін виявляла залежність від терміну дії опромінення. Отже, вміст білків НФ у експериментальних щурів при одноразовому опроміненні практично не відрізняється від контрольної групи. При опроміненні щурів впродовж 21 доби в гіпокампі, мозочку та корі великих півкуль визначено збільшення вмісту нейрофіламентів. Ці зміни головним чином по'язані з поліпептидом 210 кДа.

**Морфологія.**– 2008.– Т.ІІ, №1.– С.91-94

© Л.А.Романенко, 2008

**Romanenko L.A. Modification of the protein's composition from the neurospecific intermediate filaments in different parts of the red's brain depend on actions of the ionisation radiation.**

**Summary.** In our work was spend the research about modification of the protein's composition from the neurospecific intermediate filaments in different parts of the red's brain, which depend on duration actions of the ionisation radiation. To the research traded on 30 reds. It were devided on groups, which depend on fate of radiation – 1 day, 1,2 and 3 week, like the control group. We spending the Rh – irradiation on the putting RUM – 17 in the fate 0,00129 Kl/kg. We was devide the brain on parts ( there are: the cortex, the cerebellum, the gypocamp), homogenize, centrifugize. Nhe quantity of neurofilaments (NF) was defined by the rocket-lineal immunoelectrophoresis. We defined reliable changes of the neurofilaments's support in aii groups, which was expose by the action of small – fate ionisation radiation. The character of manifestations from this changes determined by the fate of action. So, the support of the protein NF at the experimental reds was not practically differ of control group by the unitary irradiation. The extension of the quantity of neurofilaments was set in the cortex of greater hemispheres, the cerebellum, the gypocamp at the irradiation reds during 21 days. We colligated this changes with polypeptide 210 kDa.

**Key words:** neurofilaments, ionisation radiation, cytoskeleton.

### **Вступ**

Вивченню особливостей впливу радіації на організм присвячено багато досліджень, переважне число яких було отримано в 60-і роки ХХ ст. в експериментах на тваринах. Їх аналіз вказує на чутливість нервової системи до радіаційного впливу, що не було на той час загальновизнаним. Натепер, численними клінічними спостереженнями висока чутливість ЦНС до впливу навіть невеликих доз радіації неодноразово підтверджена (Волошин П.В. та ін., 1998; Джоджуа А.Г., 1998). Ці дослідження не тільки спростували первісні уявлення про те, що нервова система людини є радіорезистентною, або мало чутливою до

дії радіації, але й водночас виявили, що в структурі захворювань опромінених пацієнтів нерво-психічні розлади займають провідне місце.

Нейрофіламенти (НФ) є високостабільним цитоскелетним компонентом, відносно стійким до різних впливів. Однак довготривалий вплив деяких нейротоксичних чинників індукує порушення в структурі проміжних філаментів нервових клітин, стимулює розвиток нейропатії, аксонопатії. Формування таких цитоскелетних пошкоджень супроводжується атрофією та дегенерацією нейронів. Існують дані про те, що деякі нейротоксичні чинники впливають на фізико-хімічні властивості НФ інтактних нейронів у

культури клітин. Наприклад, дія іонів деяких металів індукуює *de novo* появу надмірно фосфорильованих важких субодиниць нейрофіламентів 210 кДа в цитоскелеті недиференційованих клітин (Troncoso J.C. et al., 1995). В той же час реєстрували підвищення рівня поліпептиду 210 кДа в цитоскелеті диференційованих нейронів (Shea T. et al., 1998). Такий вплив підвищує стійкість нейрофіламентів до дефосфорильовання і протеклізу ендогенними кальційзалежними протеїназами. Цей вплив на цитоскелет інтактних нейронів вельми схожий з дією нейротоксичних чинників *in vitro* на білки нейрофіламентів. На відміну від важкої субодиниці, вміст залишків фосфорної кислоти у 70 кДа поліпептиді незначно відбивається на процесі об'єднання їх у філамент (Sonska A., Entlicher G., 1997).

Механізм біологічної дії малих доз іонізуючого випромінювання на сьогодні не зовсім зрозумілий і пояснюється неоднозначно. Низька здатність НФ до солюбації в аксонах зрілих нейронів підтверджується тим, що знов синтезовані субодиниці швидко асоціюються у високостабільні полімери. Потім ці полімери об'єднуються в ТритонХ-нерозчинний цитоскелет. Існують дані про унікальний ТритонХ-нерозчинний пул білків нейрофіламентів з Mr 200 кДа (Gong Z. et al., 1995). Представники цього пулу мають високий ступінь фосфорильовання. При впливі іонізуючого випромінювання найбільш істотні зміни визначені саме для важкої (210 кДа) субодиниці нейрофіламент (Недзвецький В.С., Неруш П.А., 1999). Відомо, що ця субодиниця розташована на периферії проміжного філамента і є найбільш досяжною для хімічних і фізичних чинників.

#### **Мета**

Враховуючи те, що майже відсутні комплексні дослідження, які розкривають молекулярний механізм пошкоджень нейронів під впливом радіації, метою роботи було дослідити можливі кількісні зміни вмісту нейрофіламентів в нейронах різних відділів мозку щурів під впливом низькодозового рентгенівського випромінювання в залежності від терміну дії опромінення.

#### **Матеріали та методи**

Матеріалом для досліджень був головний мозок білих щурів лінії Вістар. Було досліджено 60 щурів, які, в залежності від терміну дії опромінення, були розділені на групи: 1- контрольна, 2 – опромінення впродовж однієї доби, 3 – одного тижня, 4 – двох тижнів, 5 – трьох тижнів.

Рентгенівське опромінення проводилось на установці РУМ-17 в дозі 0,0129 Кл/кг. Головний мозок розділяли на відділи, гомогенізували, центрифугували. Відносний вміст білків нейрофіламентів (НФ) визначали методом ракетно-лінійного імуноелектрофорезу пристосованого для міграції нерозчинних білків в 1% агарозному гелі, який готували на трисверналовому буфері рН 8,6. Імуноблотинг проводили за методикою, запропонованою Towbin (1998). Оцінку достовірності результатів проводили за t-критерієм

Стьюдента, при цьому зміни, розцінювались, як достовірні при  $p < 0,05$ .

#### **Результати та їх обговорення**

Під впливом рентгенівського опромінення в усіх досліджуваних відділах мозку відбувались достовірні зміни складу нейрофіламентів, але в кожному з відділів відзначалась власна динаміка.

Так, в гіпокампі після одноразового пливу випромінювання відзначалось достовірне зниження вмісту НФ; ця тенденція зберігалась до кінця 7-ї доби дії опромінення. Після другого тижня впливу радіації кількість нейрофіламентів збільшувалась навіть в порівнянні з контрольною групою тварин, та ще більш зростала по закінченні другого тижня експерименту. Подібні зміни спостерігались і в корі великих півкуль, з тією лише різницею, що зростання вмісту НФ починалось вже з 7 доби. На відміну від кори та гіпокампу, в мозочку опромінених щурів відзначалось стаке зростання вмісту НФ в усіх експериментальних групах, тобто від початку впливу опромінення і закінчуючи 21 добою експерименту.

Відмінність реакції різних відділів головного мозку на дію іонізуючого випромінювання можна пояснити різною активністю антиоксидантної системи нейронів різних структур, яка знешкоджує вільні радикали та попережає їх взаємодію з біологічними макромолекулами (Troncoso J.C. et al., 1995). Окрім того, має значення якість кровопостачання відділу, від чого залежатиме насиченість його клітин киснем – основним субстратом утворення активованих кисеньовмістних метаболітів.

Аналізуючи дані імуноблотингу можна зробити висновок, що зміни вмісту НФ в основному відбуваються за рахунок важкої фракції – 210 кДа. Можливо, відмінність фізико-хімічних властивостей важкого поліпептиду нейрофіламентів дозволяє йому динамічніше включатися у філамент, а відносно зниження вмісту 210 кДа поліпептиду при впливі іонізуючої радіації обумовлене фізико-хімічними особливостями цієї молекули (Shea T. et al., 1998). Значно в меншій мірі були помітні зміни вмісту 160 кДа поліпептиду; відносно 70 кДа протеїну, в усіх досліджуваних групах його кількість залишалась на сталому рівні. Отримані таким чином дані узгоджуються з вищевикладеними даними літератури (Sonska A., Entlicher G., 1997).

Таким чином, співставляючи дані змін кількісного та якісного вмісту протеїнів головного мозку щурів під впливом радіації, можна дійти висновку, що початкове зниження загального вмісту протеїнів НФ відбувається за рахунок всіх фракцій. Подальше ж зростання їх вмісту супроводжується підвищенням всіх фракцій НФ, окрім 210 кДа. Таким чином не всі фракції зберігають тенденцію, простежену для НФ цілому. Отже, різний якісний склад НФ (по фракціях) досліджуваних відділів головного мозку може бути ще однією причиною відмінності отрима-

них результатів по різних відділах.  
Результати кількісного визначення білків

НФ у мозку контрольної та експериментальної груп щурів представлено в табл.1-3.

Таблиця 1

Відносний вміст білків нейрофіламентів у відділах головного мозку щурів

Відділ мозку	Контрольна група (n=12)	Одноразове опромінення (n=12)	Опромінення 7 діб (n=12)	Опромінення 14 діб (n=12)	Опромінення 21 добу (n=12)
Гіпокамп	100,0±5,41	98,7±6,33	96,7±7,04	110,0±8,71	112,6±6,49
Кора	100,0±5,18	97,9±7,03	103,7±8,32	106,4±7,23	119,6±9,52
Мозочок	100,0±6,27	102,9±5,83	107,5±7,12	111,4±8,43	122,6±10,02

В усіх досліджених відділах мозку визначені збіжні зміни поліпептидного складу нейрофіла-

ментів. Результати імуноблотингу представлені на рис. 1.

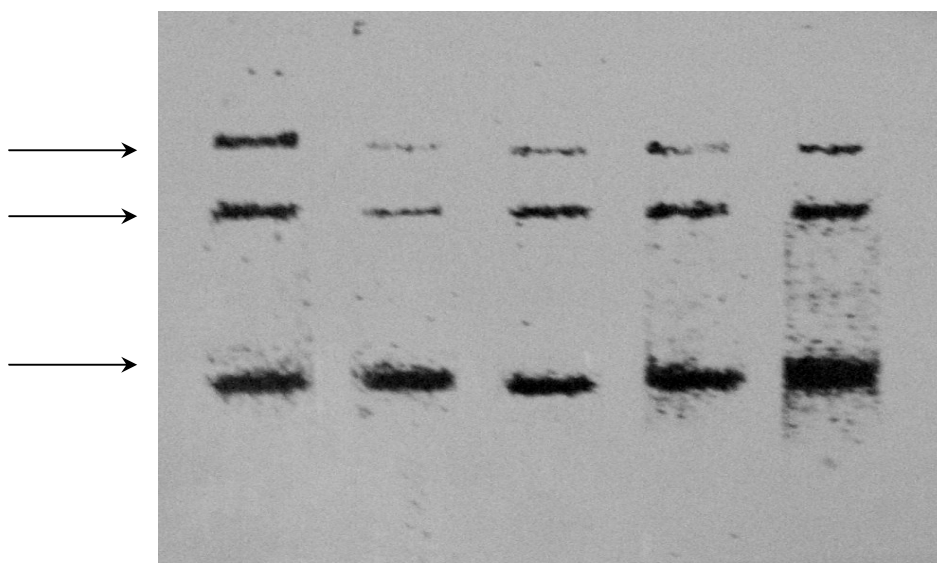


Рис.1. Імуноблотинг НФ з гіпокампу контрольних (1) та експериментальних груп щурів, які отримували дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4), 21 доби (5).

### Висновки

Вміст білків НФ практично не відрізняється при одноразовому опроміненні. При опроміненні щурів впродовж 21 доби в гіпокампі, мозочку та корі великих півкуль визначено збільшення вмісту нейрофіламентів. Зміни вмісту головним чи-

ном пов'язані з поліпептидом 210 кДа.

### Перспективи подальших розробок

В подальшому важливо дослідити стан та склад антиокислювальної системи різних відділів головного мозку з метою її коригування за умов іонізуючого опромінення.

### Літературні джерела

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.

Джоджуа А.Г. Нейрофізіологічна характеристика функціонального стану головного мозку у гірників-ліквідаторів аварії на ЧАЕС // Фізіол. журн.- 1998.- Т.44, №3.- С.290.

Недзвецкий В.С., Неруш П.А. Білок гліальних проміжних філаментів в різних відділах головного мозку щурів при експеримен-

тальному неврозі // Нейрофізіологія.- 1999.- Т.31, №2.- С.115-119.

Aluminium salts induce the accumulation of neurofilaments in perikaryal of NB 2a/dl neuroblastoma / Shea T., Clarke J., Whelock T. et al. // Brain Res.- 1998.- Vol.14, № 5.- P.53-64.

Gong Z., Little A.R., el-Fawal H. Trimethyl lead neurotoxicity in the rat: changes in glial fibrillary acidic protein // Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju.-1995.-Vol.46, № 4.-P.381-390.

Sonska A., Entlicher G. Phosphorylation of 68 kDa neurofilament proteins has no significant effect

on their assembly // *Acta Neurobiologiae Experimentalis*.- 1997.- Vol.57, № 4.- P.333-338.

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

Troncoso J.C., Costello A.C., Kim J.H. Metal-catalyzed oxidation of bovine neurofilaments in vitro // *Free. Rad. Biol. Med.*- 1995.- Vol.18, № 5.- P.891-899.

**Романенко Л.А. Изменение содержания нейроспецифических белков в разных отделах головного мозга крыс под действием низкодозового рентгеновского облучения.**

**Резюме.** В работе было проведено исследование изменения состава белков нейроспецифических промежуточных филаментов в разных отделах головного мозга крыс, в зависимости от длительности действия ионизирующего излучения. 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 нейрофиламентов (НФ) определяли с помощью ракетно-линейного иммуноэлектрофореза. Под действием ионизирующего низкодозового излучения нами были определены достоверные изменения содержания НФ во всех группах, подвергнутых облучению. Выраженность этих изменений выявляла зависимость от срока действия излучения. Таким образом, содержание белков НФ у экспериментальных крыс при однократном облучении практически не отличалось от контрольной группы. При облучении крыс на протяжении 21 суток в гипокампе, мозжечке и коре больших полушарий установлено увеличение количества НФ. Эти изменения главным образом связаны с полипептидом 210 кДа.

**Ключевые слова:** нейрофиламенты, ионизирующее излучение, цитоскелет.