

Л.А.Романенко

Дніпропетровська державна
медична академія

Ключові слова: головний мозок, нейрофіламенти, гліальний фібрилярний кислий білок, іонізуюче опромінення.

Надійшла: 24.01.2008

Прийнята: 10.03.2008

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

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ВМІСТУ ГЛІАЛЬНИХ ТА НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИХ ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

Резюме. В даній роботі ми порівняли основні зміни вмісту нейрональних та гліальних проміжних філаментів індукованих впливом іонізуючого опромінення у старих та молодих щурів. Об'єктом для дослідження послужили 120 щурів (60 старих, 60 молодих). В залежності від тривалості впливу іонізуючого опромінення вони були розподілені на підгрупи: одноразове опромінення; впродовж доби; тижня; двох тижнів; трьох тижнів та контрольна група. Моделювання впливу іонізуючого опромінення установки РУМ-17 в дозі 0,0129 Кл/кг. Головний мозок розділяли на частини, гомогенізували, центрифугували. Кількість гліальних фібрилярних кислих білків та нейрональних проміжних філаментів визначали з допомогою ракетно-лінійного електрофорезу; якісні зміни досліджували з допомогою імуноблотингу з використанням специфічних антитіл. Після впливу іонізуючого опромінення ми не виявили ніяких вікових особливостей зміни вмісту проміжних філаментів. Всі зміни залежали від терміну дії опромінення. Головні зміни в складі нейрофіламентів були пов'язані зі зниженням 210 кДа субодиниці. На другому тижні експерименту визначались продукти деградації гліальних фібрилярних кислих білків (40 – 48 кДа). В гіпокампі та мозочку спостерігались біфазні зміни вмісту гліальних фібрилярних кислих білків.

Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №2.- С.61-65.

© Л.А.Романенко, 2008

Romanenko L.A. Age features in protein's composition modifications of the neurospecific and glial intermediate filaments in different parts of the red's brain depend on ionization radiation actions.

Summary. In this work we compare the main changes in protein composition of intermediate filaments due to ionization radiation actions on old and young rats. The objects of our investigation were 120 rats (60 old and 60 young). They were divided on groups in depend on ionization radiation action duration – 1 day, 1,2 and 3 week, and the control group. The action of ionization radiation was modeled with the help of “РУМ-17” in the dose 0,00129 Kl/kg. Brains were divided on parts (cortex, cerebellum, hippocampus), homogenized, centrifuged. The quantity of glial and neuronal filaments (NF) was defined by the rocket-lineal immunoelectrophoresis; immunoblotting with specific antibodies was used for qualitative changes defining. After ionization radiation action we observed no age features in protein composition of intermediate filaments. All changes were due to duration of the ionization radiation action. Main changes in neurofilaments were associated with decrease of 210 kDa subunit. Products of degradation (40 - 48 kDa) of fibrillar glial filaments were observed on the 2 week of experiment. There were biphasic changes in glial fibrillar acidic protein in cerebellum and hippocampus of young and old rats.

Key words: brain, neurofilaments, glial fibrillar acidic protein, ionization radiation.

Вступ

Не дивлячись на те, що останнім часом зросло кількість робіт в напрямку вивчення ефектів іонізуючого опромінення на різні системи органів, молекулярний механізм патологічного впливу радіації на нервову систему далеко не повністю зрозумілий.

На сьогоднішній день відомо, що механізми біологічної дії малих доз іонізуючого випромінювання мають множинні ефекти, до кінця не зрозумілі і пояснюються вони неоднозначно. Автори пов'язують наслідки впливу малих доз з наявністю в тканинах і органах різних за чутливістю до іонізуючого випромінювання популяцій

клітин (Спитковский Д.М., 1993), активною і пасивною реакціями клітин на опромінення (Гераськин С.А., 1995), явищем гормезису (Кузин А.М., 1991), полімодальністю іонізуючого випромінювання (Бурлакова Е.Б. и соавт., 1996).

Треба зазначити, що функції проміжних філаментів на сьогодні не обмежують лише скелетним чи каркасним навантаженням. Отримані за останні роки дані свідчать про те, що білки проміжних філаментів залучаються до великої кількості внутрішньоклітинних процесів. Існують експериментальні докази взаємодії нейрональних проміжних філаментів з мітохондріями (Leterrier J.F. et al., 1994), участі нейрофіламентів у аксо-

нальному транспорті (Petkov V.D. et al., 1990). Передбачають також, що білки НФ залучаються до процесів відновлення механічних пошкоджень нервової тканини (Posmantur R.M. et al., 2000), пошкоджень каїновою кислотою. Нейротоксична дія іонів металів в першу чергу відбивається на тій частині цитоскелету, яка сформована проміжними філаментами (Yokel R.A., O'Callaghan J.P., 1998).

Мета дослідження

Метою роботи було визначити вікові особливості змін вмісту гліальних та нейроспецифічних проміжних філаментів різних відділів головного мозку щурів під впливом низькодозового рентгенівського випромінювання при різній тривалості дії опромінення.

Матеріали та методи

Матеріалом для досліджень послужив головний мозок 120 білих щурів лінії Вістар серед яких виділяли 2 групи – статевонезрілих (60) та старих особин (60). В залежності від терміну дії опромінення вікові групи розділялись на 5 підгруп: контрольна; опромінення впродовж однієї доби; одного тижня; двох тижнів; трьох тижнів.

Вплив низькодозового іонізуючого опромінення моделювали з допомогою установки РУМ-17 в дозі 0,0129 Кл/кг. Після декапітації у тварин вилучали головний мозок та розділяли його на відділи, які гомогенізували, центрифугували. Вміст білків нейрофіламентів (НФ) та гліального фібрилярного кислого білку (ГФКБ) визначали з допомогою ракетно-лінійного імуноелектрофорезу пристосованого для міграції нерозчинних білків в 1% агарозному гелі на трисверналовому буфері, рН 8,6; використовували поліклональні моноспецифічні антисироватки проти білків нейрональних та гліальних проміжних філаментів. Імуноблотинг проводили за Towbin (1998). Оцінку достовірності результатів проводили за t-

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

Результати та їх обговорення

Вміст білків нейрофіламентів в мозку старих тварин суттєво не відрізнявся від вмісту нейрофіламентів в мозку статевонезрілих. В результаті наших досліджень виявилось, що зміни поліпептидного складу нейрофіламентів та ГФКБ в мозку старих щурів співпадають зі змінами в мозку статевонезрілих тварин, що свідчить про відсутність вікових особливостей впливу іонізуючого опромінення. В свою чергу зміни складу проміжних філаментів виявляли залежність від терміну дії опромінення.

Загалом можна дійти висновку, що дія іонізуючого випромінювання незначно відбивається за короткий час на кількості і якості складу гліальних і нейрональних проміжних філаментів при одноразовому опроміненні. Висока стабільність і низька чутливість до зовнішнього впливу сприяють тому, що певний час зберігається рівновага у цитоскелетних структурах. Довготривалий вплив низькодозованого випромінювання, навпаки, викликав значні порушення процесів полімеризації-деполімеризації проміжних філаментів, про що свідчать зміни поліпептидного складу проміжних філаментів нейронів і гліальних клітин. Так, в гіпокампі та мозочку як статевозрілих, так і старих щурів до 7 доби опромінення кількість фібрилярного ГФКБ знижувалась, а в підгрупах з двотижневим опроміненням спостерігалось навпаки, підвищення вмісту ГФКБ, тобто простежувались так звані біфазні зміни (табл. 3, 4). Відносно НФ було складно простежити такі ж чіткі тенденції змін вмісту; при опроміненні щурів впродовж 21 доби в гіпокампі, мозочку і корі великих півкуль також визначено збільшення вмісту нейрофіламентів (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Відносний вміст білків нейрофіламентів в різних відділах мозку статевонезрілих щурів при впливі іонізуючого опромінення (у кожній групі $n=6$)

Відділ головного мозку	Контрольна група	Одноразове опромінення	Опромінення 7 діб	Опромінення 14 діб	Опромінення 21 добу
Гіпокамп	100,0±5,4	98,7±6,3	96,7±7,0	110,0±8,7	112,6±6,5
Кора великих півкуль	100,0±5,2	97,9±7,0	103,7±8,3	106,4±7,2	119,6±9,5
Мозочок	100,0±6,3	102,9±5,8	107,5±7,1	111,4±8,4	122,6±10,0

Таблиця 2

Відносний вміст білків нейрофіламентів в різних відділах мозку старих щурів при впливі іонізуючого опромінення (у кожній групі $n=6$)

Відділ головного мозку	Контрольна група	Одноразове опромінення	Опромінення 7 діб	Опромінення 14 діб	Опромінення 21 добу
Гіпокамп	100,0±8,5	102,3±7,4	97,7±8,0	108,0±10,2	117,6±11,3
Кора великих півкуль	100,0±7,2	102,9±8,1	101,5±8,9	108,3±7,6	121,4±10,3
Мозочок	100,0±6,3	97,9±6,9	104,4±9,2	110,3±10,4	119,2±10,3

Таблиця 3

Відносний вміст філаментного ГФКБ в різних відділах мозку статевонезрілих щурів при впливі іонізуючого опромінення (у кожній групі n=6)

Відділ головного мозку	Контрольна група	Одноразове опромінення	Опромінення 7 діб	Опромінення 14 діб	Опромінення 21 добу
Гіпокамп	100,0±2,7	98,9±3,9	87,0±4,5	121,9±4,9	122,9±4,8
Кора великих півкуль	100,0±2,2	97,0±4,1	122,8±6,0	114,2±5,9	124,4±6,4
Мозочок	100,0±2,2	95,1±3,6	70,2±3,3	113,6±6,0	122,5±9,9

Таблиця 4

Відносний вміст філаментного ГФКБ в різних відділах мозку старих щурів при впливі іонізуючого опромінення (у кожній групі n=6)

Відділ головного мозку	Контрольна група	Одноразове опромінення	Опромінення 7 діб	Опромінення 14 діб	Опромінення 21 добу
Гіпокамп	100,0±3,9	97,1±4,8	89,1±3,2	120,4±6,0	125,8±5,2
Кора великих півкуль	100,0±4,3	94,1±5,9	105,2±5,8	132,1±6,8	129,4±5,3
Мозочок	100,0±3,7	93,2±6,0	66,8±3,0	110,3±8,3	117,9±8,3

При впливі Pb^{3+} автори спостерігали вельми схожі біфазні зміни гліальних філаментів: через 7 днів впливу концентрація ГФКБ знижується, а після 14 днів – підвищується. Біфазні зміни вмісту ГФКБ можна пояснити наступним чином: можливо, що опромінення щурів малими дозами впродовж 7 діб викликає такі пошкодження у гліальних клітинах, які клітини не мають змоги репарувати. Та ж сама доза випромінювання (0,0129 Кл/кг) пролонгована за термін 14 діб або 21 добу викликала у нервових клітинах зміни, що можуть бути компенсовані за рахунок регуляції метаболічних шляхів.

Зростання вмісту філаментної форми проміжних філаментів гліальних клітин пов'язують із фібрилогенезом і проліферацією астроцитів. Однак збільшення фібрилізованої форми ГФКБ можна пояснити не тільки збільшенням числа реактивних астроцитів. Можливо, що зазнають змін фізико-хімічні властивості гліальних проміжних філаментів, які схожі на зміни нейрофіламентів в клітинах, що зазнавали тривалого впливу Al^{3+} . Виділені з клітин такі нейрофіламенти більш стійкі до дефосфорилювання і деградації ендогенними кальцій-залежними протеазами, мають більш глибоку тенденцію до формування нерозчинних агрегатів (Shea T.B. et al., 1995).

Аналізуючи результати імуноблотингу виявляється, що в усіх досліджуваних відділах головного мозку щурів спостерігалось зростання кількості деградованих поліпептидів у межах молекулярної маси 48 – 40 кДа. Особливо ці зміни виражені в мозочку та гіпокампі, що свідчить про зв'язок із біфазними змінами, описаними вище (рис.1, 2, 3).

Виявлені зміни стехіометрії НФ субодиниць 210 кДа, 160 кДа і 70 кДа схожі у гіпокампі, мозочку і корі великих півкуль обох вікових груп;

особливо значні зміни стосувались зниження вмісту важкого поліпептиду 210 кДа (рис. 4).

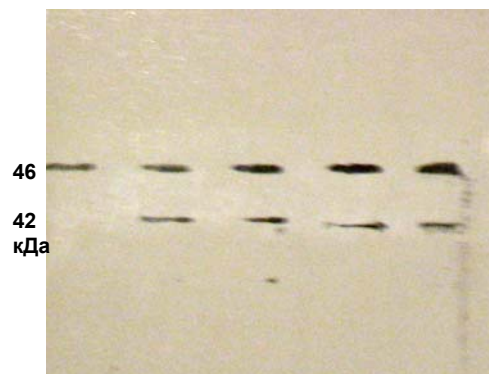


Рис. 1. Імуноблотинг філаментної фракції ГФКБ з кори великих півкуль статевонезрілих контрольних (1) та експериментальних груп щурів, які отримували одноразову дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) і 21 доби (5)

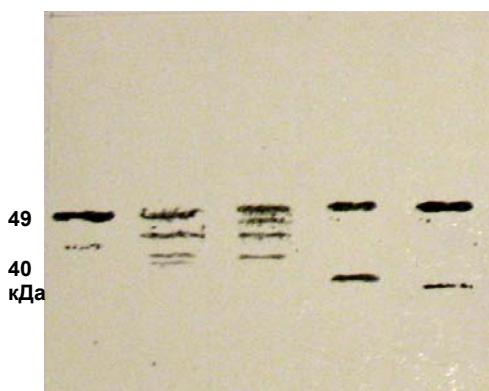


Рис. 2. Імуноблотинг філаментної фракції ГФКБ з гіпокампа статевонезрілих контрольних (1) та експериментальних груп щурів, які отримували одноразову дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) і 21 доби (5).

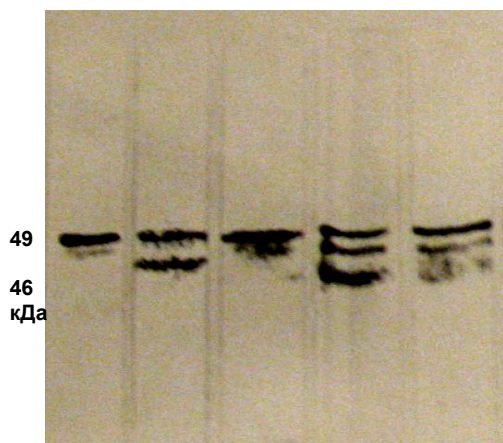


Рис. 3. Імуноблотинг філаментної фракції ГФКБ з мозочка статевонезрілих контрольних (1) та експериментальних груп щурів, які отримували одноразову дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) і 21 доби (5).

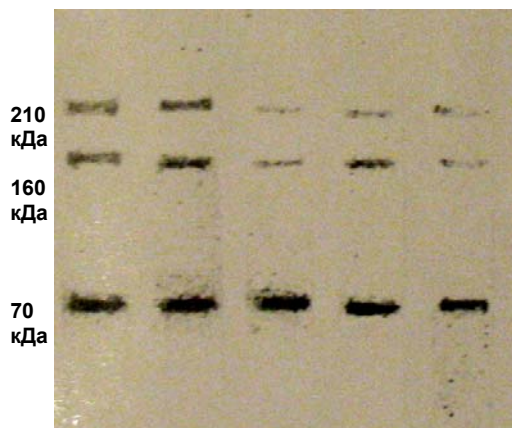


Рис.4. Імуноблотинг НФ статевонезрілих контрольних (1) та експериментальних груп щурів, які отримували дозу 0,0129 Кл/кг одноразово (2), впродовж 7 діб (3), 14 діб (4) і 21 доби (5).

Отримані дані підтверджують можливість реконструкції нейронального і гліального цитоскелета при впливі малих доз пролонгованого іонізуючого випромінювання. Перебудову проміжних філаментів клітин нервової тканини можна розглядати як морфологічну основу структурної реконструкції аксонів, функціональної відповіді клітин за умов дії несприятливих чинників. Ймовірно, що нейрональні філаменти залучаються до процесів пластичності після пошкоджуючого впливу іонізуючого випромінювання так само, як проміжні філаменти гліальних клітин до процесу реактивного гліоза, який індукується великою чисельністю пошкоджуючих факторів.

Підсумок

Характер змін поліпептидного складу нейрофіламентів в мозку старих і статевонезрілих щурів під впливом іонізуючого випромінювання співпадає, вікові особливості відсутні. Вплив іонізуючого опромінення визначається терміном його дії. Пролонговане іонізуюче випромінювання супроводжується збільшенням вмісту обох досліджуваних проміжних філаментів щурів в досліджуваних структурах мозку, що супроводжується зменшенням вмісту 210 кДа субодиниці нейрофіламентів, та появою деградованих ГФКБ в межах 40 – 48 кДа.

Перспективи подальших розробок

Для більш глибокого розуміння проблеми впливу низькодозового іонізуючого опромінення на головний мозок доцільно детальніше дослідити реорганізацію проміжних філаментів астроглії та зміни рівню вільного кальцію в нервовій тканині.

Літературні джерела

Гераськин С.А. Критический анализ современных концепций и подходов к оценке биологического действия малых доз ионизирующего излучения // Радиационная биология. радиоэкология. - 1995. - Т.35, №5. - С.563-571.

Кузин А.М. Проблемы малых доз и идеи гормезиса в радиобиологии // Радиобиология. - 1991. - Т.31, №1. - С.16-21.

Особенности биологического действия малых доз облучения / Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В. и др. // Радиационная биология. радиоэкология. - 1996. - Т.36, №4. - С.610-634.

Спитковский Д.М. Объяснение эффектов малых доз ионизирующего излучения на основе существования различных по чувствительности к ионизирующему излучению пулов клеток // Радиационная биология. радиоэкология. - 1993. - Т.33, №3. - С.382-400.

Leterrier J.F., Rusakov D.A., Nelson B.D. Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro // Microsc. res. and technol. - 1994. - Vol.27, №2. - P.233-261.

Petkov V.D., Mosoroff A.N., Petkov V.V. Age-related differences in the memory effects of nootropic drugs // Acta physiol. pharmacol. Bulgaria. - 1990. - Vol.16, №2. - P.28-32.

Posmantur R.M., Newcomb J.K., Kampfl A. Light and confocal microscopic studies of evolutionary changes in neurofilament proteins following cortical impact injury in the rat // Exp. neurol. - 2000. - Vol.161, №1. - P.15-26.

Shea T.B., Beermann M.L., Nixon R.A. Aluminium treatment of intact neuroblastoma cells al-

ters neurofilament subunit phosphorylation, solubility and proteolysis // Molec. & clin. neuropathol.- 1995.- Vol.26, №1.- P.1-14.

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

Yokel R.A., O'Callaghan J.P. An aluminium-induced increase in GFAP is attenuated by some chelators // Neurotoxicol. & teratology.- 1998.- Vol.2, №1.- P.55-60.

Романенко Л.А. Возрастные особенности изменений содержания глиальных и нейрональных промежуточных филаментов головного мозга крыс под влиянием ионизирующей радиации.

Резюме. В данной работе мы сравнили основные изменения в составе нейрональных и глиальных промежуточных филаментов вызванных действием ионизирующего излучения у старых и молодых крыс. Объектом для исследования послужили 120 крыс (60 старых, 60 молодых). В зависимости от длительности ионизирующего облучения они были разделены на подгруппы: однократное облучение; в течение суток; недели; двух недель; трех недель и контрольная группа. Моделирование воздействия ионизирующего излучения осуществлялось с помощью установки РУМ-17 в дозе 0,0129 Кл/кг. Головной мозг разделяли на части, гомогенизировали, центрифугировали. Количество глиальных фибриллярных кислых белков (ГФКБ) и нейрональных промежуточных филаментов определяли с помощью ракетно-линейного электрофореза; количественные изменения исследовали с помощью иммуноблотинга с использованием соответствующих антител. После воздействия ионизирующей радиации мы не обнаружили никаких возрастных особенностей изменений состава промежуточных филаментов. Все изменения зависели от длительности воздействия ионизирующего облучения. Главные изменения в составе нейрофиламентов были связаны со снижением содержания 210 кДа субъединицы. На второй неделе эксперимента обнаруживались продукты деградации ГФКБ (40 - 48 кДа). В мозжечке и гипокампе наблюдались бифазные изменения содержания ГФКБ.

Ключевые слова: головной мозг, нейрофиламенты, глиальный фибриллярный кислый белок, ионизирующее излучение.