

ІНІЦІАЦІЯ АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ КЛІТИН ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА ВПЛИВ НИЗЬКИХ ДОЗ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Метою даної роботи було дослідження адаптивної відповіді клітин головного мозку на вплив низьких доз іонізуючого випромінювання, яку визначали за зміною активності лізосомного цистеїнового катепсину L у структурах головного мозку щурів. Показано, що дозова залежність активності катепсину L структур головного мозку має складний, нелінійний характер, і можливим механізмом переключення клітин у новий режим функціонування можуть бути індуковані малими дозами зміни стабілізації лізосомально-вакуолярного апарату клітин мозку. Досліджена активність катепсину L у субклітинних фракціях сірої речовини півкуль головного мозку.

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, лізосомний цистеїновий катепсин L, головний мозок.

Целью данной работы было исследование адаптивного ответа клеток головного мозга на влияние низких доз ионизирующего излучения, которую определяли по изменению активности лизосомного цистеинового катепсина L в структурах головного мозга крыс. Показано, что дозовая зависимость активности катепсина L структур головного мозга имеет сложный, нелинейный характер, и возможным механизмом переключения клеток на новый режим функционирования может быть индуцированное малыми дозами изменение стабилизации лизосомально-вакуолярного аппарата клеток мозга. Исследована также активность катепсина L в субклеточных фракциях серого вещества полушарий головного мозга.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, лизосомный цистеиновый катепсин L, головной мозг.

The aim of the work was researching of adaptive response of brain cells on ionizing radiation with low dose influence, which was studied by measuring of lysosomal cysteine cathepsin L activity in brain structures. It was shown that dose dependency of cathepsin L activity of brain structures has had complicated and non-linear character, and the possible mechanism of cell switching on new functional stage could be induced by low dose change of brain cellular lysosomal-vacuolar apparatus stability. The activity of cathepsin L in subcellular fractions of grey matter of cerebral hemispheres was researched.

Key words: ionizing radiation, lysosomal cysteine cathepsin L, brain.

Вступ. Однією із актуальних задач сучасної радіобіології є розширення фундаментальних досліджень з'ясування біологічної дії малих доз радіації на всіх рівнях біологічної організації. Про вплив низьких доз радіації в літературі зустрічаються суперечливі дані. Зараз накопичилося багато даних про неправомірність екстраполяції біологічних ефектів іонізуючого опромінення від великих до малих доз [1; 2]. Відомо, що при малих дозах опромінення, на відміну від традиційних уявлень, центральна нервова система є однією з найвразливіших систем організму. Відповідь ЦНС на опромінення принципово відрізняється від реакції інших тканин і органів. Зріла нервова тканина – непроліферуюча система, яка складається з

високодиференційованих клітин, заміщення яких за життя не відбувається, і тому вона є радіо-резистентною. Загибель нервових клітин, яка призводить до церебрального синдрому, відбувається при масованому опроміненні [3; 4]. Ще не з'ясовано, чи є причиною загибелі нервових клітин їх безпосереднє ушкодження, чи вона викликана опосередкованими ураженнями кровотворної та інших систем, геморагічного чи аутоінфекційного синдрому тощо. Дослідження протеолітичних ферментів має першочергове значення для з'ясування механізму дії іонізуючої радіації на структурно-функціональні і метаболічні властивості нервової тканини. Зміни вмісту та інтенсивності оновлення білків ЦНС супроводжуються ранніми післяра-

діаційними змінами активності ферментів метаболізму білків [4; 5]. Лізосомальні цистеїнові катепсини нервової системи особливого інтересу набувають, з одного боку, тими функціями, які вони виконують у клітині, а з іншого – тією роллю, яку ці ферменти відіграють в системі відповіді організму на дію шкідливих факторів навколишнього середовища [7]. З усіх лізосомних цистеїнових пептидгідролаз катепсин L (КФ 3.4.22.15) є однією з активних та найпоширеніших цистеїнових пептидаз тканин організму. Інтерес до вивчення цього протеолітичного ферменту при патологічних процесах, зокрема тих, що розвиваються внаслідок радіаційного пошкодження тканин, особливо нервової, пояснюється його високою біологічною активністю [8], участю у захисних реакціях організму [8], процесі росту та поділу клітин [9].

Розуміючи актуальність цього напрямку, метою роботи було дослідження дозової залежності активності лізосомального цистеїнового катепсину L у діапазоні малих доз для з'ясування адаптивної відповіді по зміні вільної активності катепсину L різних структур головного мозку щурів.

Методика досліджень. Проведено експерименти на білих лабораторних щурах 3-місячного віку вагою 200-230 г. Щурів опромінювали на апараті РУМ-17, застосовували дозу 25 сГр. Опромінення відбувалося за таких технічних умов: напруга – 150 кВ, сила струму – 6 мА, фільтри – 0,5 мм Cu + 2 мм Cu, потужність дози – 0,26 сГр/хв, фокусна відстань – 1,86 м. Дозові залежності визначали через 12 годин після опромінення щурів за доз 5 сГр, 10 сГр, 20 сГр, 25 сГр. Головний мозок щурів розділяли на кору великих півкуль, гіпокамп, смугасте тіло, середній мозок, мозочок та Варолієв міст. Усі ці мозкові структури виділяються анатомічно, мають морфологічні та функціональні особливості при здійсненні інтегративно-синтетичної діяльності головного мозку [10]. Гомогенати тканин готували за стандартною методикою в гомогенізаторі Поттера-Ельвейма. Використовували 10 % гомогенати на 0,25 % розчині сахарози, на 0,025 М трис-буфері з рН 7,4, який містить 0,15 М NaCl та 1 мМ ЕДТО. Виділення лізосом проводили методом диференційного центрифугування в гомогенному середовищі з удосконаленням, суть якого зводиться до розділу

загальної мітохондріальної фракції на «важку» і «легку», при цьому «легка» мітохондріальна фракція багата лізосомами і фактично є лізосомальною фракцією [11]. Активність катепсину L визначали за розщепленням азоказеїну, денатурованого 3М сечовиною [12]. Азоказеїн синтезували за методом Сурінова Б. Г. і Манойлова С. Е. [13]. Питому активність катепсину визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферментів у присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу і 2 мМ Na₂EDTO та виражали в умовних одиницях абсорбції при 366 нм за 60 хв інкубації при + 37°C на 1 мг,г білка. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорд [14]. Статистичну обробку результатів проводили за [15].

Результати та їх обговорення

При опроміненні щурів в інтервалі доз від 0,05 Гр до 0,25 Гр з потужністю дози 0,26 сГр/хв визначаються відповідні зміни вільної активності катепсину L у структурах головного мозку (рис. 1-3).

Експериментальні дані по зміні вільної активності катепсину L у корі великих півкуль головного мозку і мозочку залежно від дози опромінення представлені на рис. 1.

За дози 0,05 Гр спостерігали незначне зниження рівня вільної активності катепсину L в цих структурах. Підвищення активності ферменту спостерігається після дози 0,1 Гр, і за дози 0,25 Гр збільшення вільної активності катепсину L у корі великих півкуль і мозочку набуває вірогідних значень, і перевищує контрольний рівень на 26 % і 21,5 % відповідно. З наведених даних видно, що переломною у ефекті впливу на рівень вільної активності катепсину L мозку є доза 0,1 Гр.

Ейдус Л. Х. також зазначає, що для ініціації адаптивної відповіді достатньо декількох секунд дії дози 1 сГр [16]. Радіаційні ефекти таких впливів можуть викликати порушення проникності клітинних, а в нашому випадку – лізосомальних мембран. Згідно з концепцією первинної активуючої дії малих доз Ейдуса Л. Х., для ініціації адаптивної відповіді достатньо дуже малої (1 сГр) дози, яка порушує проникність плазматичних мембран, що спричиняє вихід із клітин і зниження внутріклітинного пулу різних низькомолекулярних субстратів.

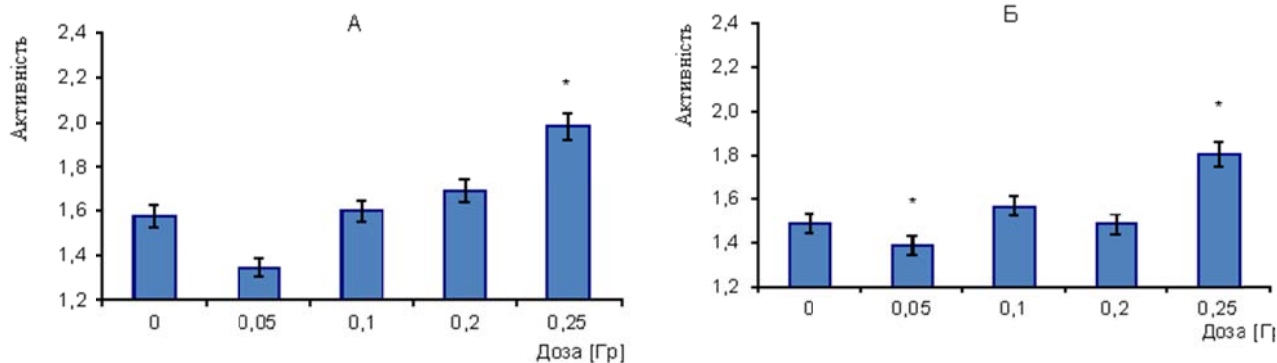


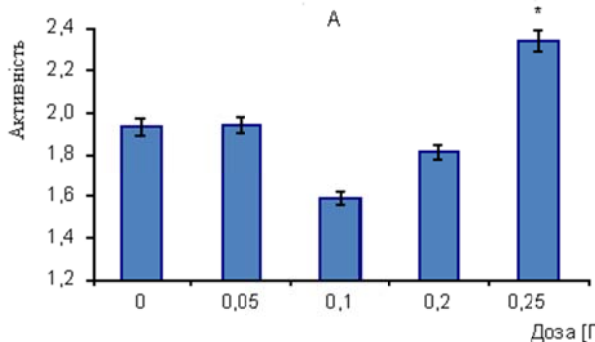
Рис. 1. Залежність вільної активності катепсину L у корі великих півкуль (А), мозочку (Б) головного мозку щурів від дози опромінення (активність – в од. абсорбції при 366 нм/мг білка, М ± m, n = 6 ± 8).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

В результаті ефекту неспецифічної регуляції активності ферментів підвищується активність попередніх репаративних ферментів та інтенсифікуються процеси їх відновлення. Порушення проникності, викликане такою слабкою дією, швидко репаруються, і тим швидше, чим вони слабкіші. Якщо швидкість репарації перебільшує швидкість виходу субстратів із клітин, адаптивна відповідь не спостерігається. Це зумовлює існування нижнього порогу малих доз, які ініціюють адаптивну відповідь. Наявність такого порогу показано при аналізі адаптивної відповіді в клітинах китайського хом'яка із застосуванням мікроядерного тесту [16].

З ростом дози зверх цього порогу пошкодження мембранних функцій підвищується, репарація не встигає їх компенсувати, і в клітині виникає стан підвищеної активності, який спричиняє адаптивну відповідь [16].

Відповідно до концепції Ейдуса Л. Х., зміни вільної активності катепсину L, які спостерігаються у



корі великих півкуль і мозочку, мають поріг за дози 0,1 Гр, а стан підвищеної активності клітин мозку припадає на дозу 0,25 Гр.

В експериментах різних авторів на різних об'єктах показано, що суміжні з малими дозами індують процеси, які спричиняють активацію геному і супроводжуються появою нових генних продуктів, у тому числі білків, які в інтактних клітинах знайдені не були, а також відбувається підвищення кількості ферментів, які репарують пошкодження ДНК [17].

В основі відповідної реакції клітини на опромінення в діапазоні від декількох мГр до 10 сГр лежить ініціація синтезу ферментів репарації, не зумовленої функціонуванням SOS-системи. Більш того, на відмову від SOS-репарації адаптивна відповідь приводить до зниження виходу мутацій [17].

Залежність вільної активності катепсину L від дози опромінення в середньому мозку і смугастому тілі представлений на рис. 2.

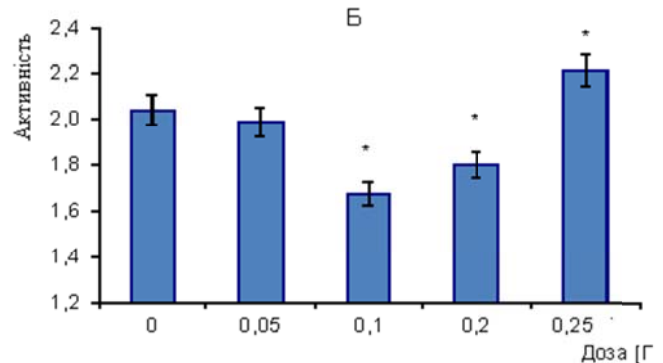


Рис. 2. Залежність вільної активності катепсину L у середньому мозку (А), смугастому тілі (Б) головного мозку щурів від дози опромінення (активність – в од. абсорбції при 366 нм/мг білка, $M \pm m$, $n = 6 \pm 8$).

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

З аналізу даних випливає, що як у середньому мозку, так і в смугастому тілі за дози 0,05 Гр починається поступове зниження активності ферменту, а за дози 0,25 Гр має місце різке підвищення вільної активності катепсину L на 21 % у середньому мозку і на 8,4 % у смугастому тілі порівняно з контролем. За дози 0,1 Гр досліджувані структури мозку реагують значним зниженням активності порівняно з попереднім терміном зниження вільної активності катепсину L, а потім це зниження зменшується, тобто

спрацьовують процеси репарації, які сприяють компенсації цих змін під впливом іонізуючої радіації.

За дози 0,25 Гр відбувається процес лабілізації мембран лізосом, який супроводжується підвищенням рівня вільної активності катепсину L і формуванням адаптивної відповіді на опромінення в діапазоні малих доз.

Аналогічні зміни рівнів вільної активності катепсину L залежно від дози опромінення спостерігали у гіпокампі і Варолієвому мості (рис. 3).

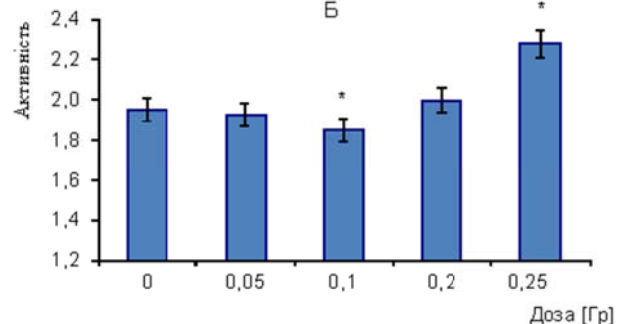
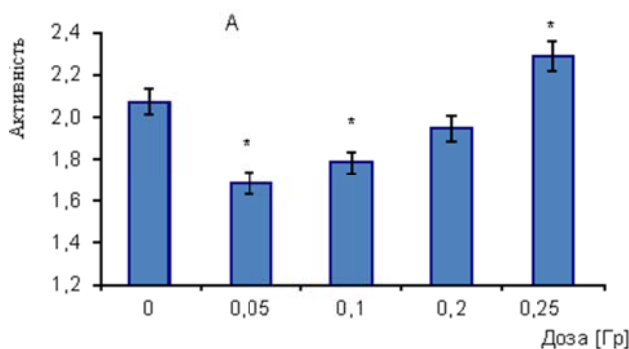


Рис. 3. Залежність вільної активності катепсину L у гіпокампі (А), Варолієвому мості (Б) головного мозку щурів від дози опромінення (активність – у од. абсорб. при 366 нм/мг білка, $M \pm m$, $n = 6 \pm 8$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

За доз 0,05 Гр, 0,1 Гр і 0,25 Гр характерним є зниження активності ферменту у гіпокампі, причому зі збільшенням дози ефект зниження вільної активності катепсину L зменшується. У Варолієвому мості вже за дози 0,2 Гр активність знаходиться в межах контрольного рівня. А за дози 0,25 Гр відбувається вірогідне підвищення вільної активності у гіпокампі на 10,4 %, а у Варолієвому мості – на 16,6 % від контрольного рівня, і це виглядає як тригерне переключення клітин мозку в інший режим функціонування, для якого характерний підвищений рівень вільної активності лізосомального катепсину L.

Саме функціонуванням репараційних систем адаптивної відповіді можна пояснити на молекулярному рівні зниження (іноді статистично вірогідні) вільної активності лізосомального катепсину в дозовому діапазоні 0,05-0,2 Гр. Подальше збільшення дози опромінення до 0,25 Гр у всіх досліджуваних структурах головного мозку викликає підвищення рівня вільної активності катепсину L, що, у порівняно з попереднім зниженням, можна інтерпретувати як тригерне переключення лізосом мозку в інший режим функціонування. При інтерпретації цієї ділянки дозової залежності слід мати на увазі, що іонізуюче опромінення здатне індукувати в клітині декілька незалежних репараційних систем.

Про різницю пускових механізмів систем адаптивної і SOS-відповіді свідчать результати роботи [17], в якій показано, що опромінення лімфоцитів дозою 2-3 сГр ініціює перебудову структури хроматину, необхідну для зміни активності генів, специфічних для адаптивної

відповіді, а дозою 10 сГр – конденсацією хроматину і активацією репараційних систем, відмінних від адаптивної відповіді. Плато, яке реєструється нами в цьому діапазоні (0,05 Гр-0,2 Гр) на дозовій залежності, може розглядатися як маркер переходу опромінених клітин у якісно інший режим функціонування. Для лімфоцитів людини ця межа лежить від 10 сГр до 50 сГр, фібробластів китайського хом'яка – 50-100 сГр [17].

Вплив іонізуючої радіації високої інтенсивності дозозалежно підвищує активність цистеїнових катепсинів у клітинах головного мозку; причому фазовість змін виявляється у динаміці перебігу ЦНС-синдрому; а також змінюється внутрішньоклітинна компартменталізація досліджуваних катепсинів, значно підвищується неседиментована активність.

За величиною зміни активності катепсинів можна визначати ступінь променевої дії на мембрани клітини і організм у цілому [18].

Аналізуючи дані з субклітинного розподілу активності катепсину L у сірій речовині головного мозку щурів (рис. 4), слід відмітити, що характер субклітинного розподілу катепсину L підтверджує гетерогенність популяції лізосом головного мозку [19; 20] і зв'язок катепсину L з субклітинною фракцією.

Найбільша питома активність катепсину L зосереджена у фракції легких мітохондрій, тому що на їх долю припадає 82 % активності від сумарної у сірій речовині головного мозку. У мікросомально-розчинній фракції міститься всього близько 6 % активності катепсину L.

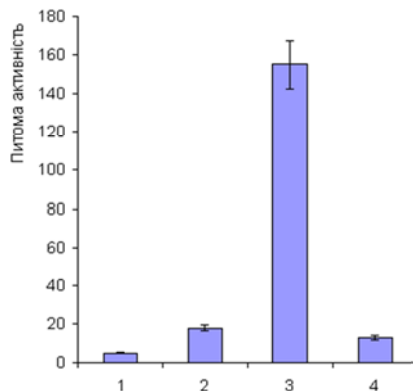


Рис. 4. Активність катепсину L у субклітинних фракціях сірої речовини великих півкуль головного мозку щурів (в од. абсорбції при 366 нм/мг білка): 1 – ядерна фракція; 2 – фракція важких мітохондрій; 3 – фракція легких мітохондрій; 4 – мікросомально-розчинна фракція ($M \pm m, n = 6$).

Таким чином, нами встановлено, що дозова залежність вільної активності катепсину L структур головного мозку має складний, нелінійний характер, і можливим механізмом переключення клітин у новий режим функціонування можуть бути індуковані малими дозами зміни стабілізації лізосомально-вакуолярного

апарату клітин мозку, тотальне рентгенівське опромінення щурів спричиняє у сірій речовині великих півкуль головного мозку порушення системи протеолізу, які проявляються в активації лізосомального цистеїнового катепсину L.

ЛІТЕРАТУРА

1. Влияние низких доз ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм / [под ред. М. И. Руднева]. – К. : Наукова думка, 1994. – 214 с.
2. Oliveieri G., Bodycote J. And Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine // Science. – 1984. – Vol. 223. – P. 594-597.
3. Ярмоненко С. П. Радиобиология человека и животных / С. П. Ярмоненко. – М. : Высшая школа, 1988. – 424 с.

4. Кудряшов Ю. Б. Радиорезистентность и регуляция метаболизма нервной ткани / Ю. Б. Кудряшов, Н. Е. Кучеренко, А. Н. Васильев. – К. : Либідь, 1992. – 234 с.
5. Чорна В. І. Структурно-функціональні зміни в лізосомально-вакулярному апараті мозку при хронічному емоційному стресі / В. І. Чорна, Л. Ф. Педан, Г. І. Зозуля // Нейрофізіологія. – 1999. – Т. 31, № 4. – С. 351-352.
6. Рева А. Д. Ионизирующее излучение и нейрохимия / А. Д. Рева. – М. : Атомиздат, 1974. – 237 с.
7. Палладин А. В. Вопросы биохимии нервной системы / А. В. Палладин. – К. : Наук. думка, 1965. – 185 с.
8. McGrath M. E. The lysosomal cysteine proteases // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 1999. – Vol. 28. – P. 181-204.
9. Веремеенко К. Н. Роль протеолитических ферментов в регуляции обмена веществ / К. Н. Веремеенко // Биохимия животных и человека. – 1983. – Т. 7. – С. 37-46.
10. Кристич Р. В. Гистологическая энциклопедия: Иллюстрированная энциклопедия гистологии человека / Р. В. Кристич. – Берлин-Гейдельберг-Токио : Из-во Шпрингера, 1984. – 341 с.
11. Покровский А. А. Лизосомы / А. А. Покровский, В. А. Тутельян. – М. : Наука, 1976. – 382 с.
12. Очистка и некоторые свойства тиолаktivированого катепсина из больших полушарий головного мозга и мозжечка быка / [Березин В. А., Черная В. И., Рева А. Д., Смагина Л. Д.] // Укр. биохим. журн. – 1982. – Т. 54, № 3. – с. 249 – 253.
13. Суринов Б. Г. Определение активности протеолитических ферментов с помощью азоказеина / Б. Г. Суринов, С. Е. Манойлов // Вопросы мед. химии. – 1965. – Т. 11, № 5. – с. 55-58.
14. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
15. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
16. Эйбус Л. Х. О механизмах инициации эффекта малых доз / Л. Х. Эйбус // Радиацион. биол. Радиоэкол. – 1994. – Т. 34, вып. 6. – С. 748-758.
17. Гераськин С. А. Концепция биологического действия малых доз ионизирующей радиации на клетки / С. А. Гераськин // Радиацион. биол. Радиоэкол. – 1995. – Т. 35, № 5. – С. 571-580.
18. Parasassi T., Sapora O., Giusti A., De Stasio, Ravagnan G. Alteration erythrocyte membrane lipids induced by low doses of ionizing radiation as revealed by 1,6 diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime // Int. J. Radiat. Biol. 1991. – Vol. 59. – P. 69.
19. Чорна В. І. Структурно-функціональні зміни в лізосомально-вакулярному апараті мозку при хронічному емоційному стресі / В. І. Чорна, Л. Ф. Педан, Г. І. Зозуля // Нейрофізіологія. – 1999. – Т. 31, № 4. – С. 351-352.
20. Панин А. Е. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении / А. Е. Панин, Н. Н. Маянская. – Новосибирск : Наука, 1987. – 198 с.

Рецензенти: **Томілін Ю. А.**, д.б.н., професор;
Кутлахмедов Ю. О., д.б.н., професор.

© Чорна В. І., Лянна О. Л.,
 Бразалук О. З., 2012

Дата надходження статті до редколегії: 24.01.2012 р.

ЧОРНА Валентина Іванівна – д.б.н., проф., головний науковий співробітник, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, м. Дніпропетровськ, Україна.

Коло наукових інтересів: радіаційна медицина, радіобіологія, біохімічні порушення під впливом іонізуючого випромінювання.

ЛЯННА Ольга Леонідівна – к.б.н., науковий співробітник, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, м. Дніпропетровськ, Україна.

Коло наукових інтересів: радіаційна медицина, радіобіологія, біохімічні порушення під впливом іонізуючого випромінювання.

БРАЗАЛУК О. З. – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, м. Дніпропетровськ, Україна.

Коло наукових інтересів: радіаційна медицина, радіобіологія, біохімічні порушення під впливом іонізуючого випромінювання.