

# ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ВМІСТ БІЛКА ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ ГЛІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ І ЦИСТЕЇНОВІ ПРОТЕАЗИ

У роботі визначена динаміка концентрації розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у тканинах неокортекса, гіпокампа, смугастого тіла, мозочка, середнього мозку та Варолієвого мосту під впливом рентгенівського опромінення у дозі 25 сГр. Дослідження проводили через 1, 12, 24, 120 і 168 годин після радіаційного впливу. Кількісне визначення вмісту нейроспецифічного білка проводили методом твердофазного імуноферментного аналізу. Концентрація ГФКБ у сироватці крові щурів експоненціально підвищувалась з 24 години після опромінення і через 168 годин набула максимального значення. Встановлено підвищення активності тканинного лізосомного цистеїнового катепсину В у сироватці крові під дією іонізуючої радіації. Виявлені зміни концентрації нейроспецифічного білка і активності катепсину В у сироватці крові опромінених щурів можуть бути інформативним тестом пошкоджуючої дії радіації.

**Ключові слова:** іонізуюча радіація, нейроспецифічний білок (ГФКБ), катепсин В, мозок, сироватка крові.

В работе определена динамика концентрации растворимой формы глияльного фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в тканях неокортекса, гиппокампа, полосатого тела, мозжечка, среднего мозга и Варолиева моста под влиянием рентгеновского облучения в дозе 25 сГр. Исследования проводили через 1, 12, 24, 120 и 168 часа после радиационного воздействия. Количественное определение содержания нейроспецифического белка проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. Концентрация ГФКБ в сыворотке крови крыс экспоненциально повышалась с 24 часов после облучения и через 168 часа достигла максимального значения. Установлено повышение активности тканевого лизосомного цистеинового катепсина В в сыворотке крови под воздействием ионизирующей радиации. Обнаруженные изменения концентрации нейроспецифического белка и активности катепсина В в сыворотке крови облученных крыс могут быть информативным тестом повреждающего действия радиации.

**Ключевые слова:** ионизирующая радиация, нейроспецифический белок (ГФКБ), катепсин В, мозг, сыворотка крови.

The concentration dynamics of soluble form of glial fibrillar acid protein (GFAP) in neocortex, hippocampus, striped body, cerebellum, middle brain and pons varolii under influence of x-ray radiation in the dose 25 cGr was researched in the work. The investigations were held in 1, 12, 24, 120 and 168 hours after radiation affect. The quantitative determination of neurospecific protein context was made by ELIZA method. The GFAP content in rat blood serum exponentially increased from the twenty fourth hour after radiation and in 168 hours was observed maximal. It was established that tissue lysosomal cysteine cathepsin B activity in blood serum was increased under influence of ionizing radiation. The changes observed of neurospecific protein concentration and cathepsin B activity in blood serum of radiated rats could be valuable test of harming effect of radiation.

**Key words:** ionizing radiation, neurospecific protein (GFAP), cathepsin B, brain, blood serum.

У функціонуванні нервової системи значну роль відіграють специфічні для нервових і гліальних клітин білки. Нейроспецифічні білки (НСБ) беруть активну участь у таких фундаментальних для нервової тканини процесах, як синаптогенез, синаптична передача, аксонний транспорт тощо. Важливим структурним компонентом клітин нервової системи є їх цитоскелет, до складу якого входять мікрофіламенти, проміжні філаменти і мікротрубочки; нормальний стан цитоскелету є необхідною умовою адекватного функціонування ЦНС [1]. Істотна особливість проміжних філаментів – специфічність білків, з яких вони сформовані, відносно гістотипу клітин. В аксонах і дендритах нейронів головного мозку білки цитоскелету представлені триплетом білків нейрофіламентів (молекулярна маса 70, 160 і 210 кДа). Істотну роль у феномені пластичності нервової системи виконують астрогліальні клітини, які беруть участь у регуляції метаболізму і активності нейронів. Для астроцитів характерна експресія ГФКБ – специфічного маркера проміжних філаментів цитоскелету. В астроцитах проміжні філаменти складаються в значній мірі з гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ, 49 кДа) [2]. Вважають, що саме данні білки визначають функціональну гетерогенність і специфіку цитоскелету гліальних клітин і нейронів у нормі, а також відіграють важливу роль у розвитку нейродегенеративних процесів. Наприклад, ушкодження структури проміжних філаментів є однією з морфо-фізіологічних і біохімічних ознак хвороби Альцгеймера, синдрому Паркінсона, аміотрофічного латерального склерозу та ін. [3; 4]. Різні хімічні, фізичні і біологічні чинники здатні впливати на цитоскелет клітин нервової системи. Опромінення в летальних дозах веде до істотних змін концентрації ГФКБ, а також до модифікації поліпептидного складу розчинної форми досліджуваного білка [5]. ГФКБ особливу роль відіграє при формуванні відростків астроцитарних одиниць у відповідь на стимуляцію нейронів, а також у процесі пластичних перебудов синаптичних зв'язків [6]. Механізми, що лежать в основі толерантності і реакції ЦНС на іонізуюче випромінювання залишаються до кінця не з'ясованими. Одним із причинних факторів у радіаційно-індукованому пошкодженні мозку є порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Експериментальними і клінічними дослідженнями показано, що визначення нейроспецифічних білків у сироватці крові може розглядатися як показник проникності ГЕБ у напрямку мозок-кров і мати діагностичний характер за різних патологічних станів [7]. Показано, що опромінення в помірних та високих дозах викликає зміни проникності ГЕБ [8], результатом чого може бути елімінація нейроспецифічних антигенів до кров'яного руслу. Результатами сучасних радіобіологічних досліджень визначено, що при дії низьких рівнів іонізуючого випромінювання важливу роль у виникненні радіаційних реакцій відіграють пошкодження мембранних структур, що забезпечують житте-

діяльність клітини. Порушення внутрішньоклітинної компартменталізації 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. Цистеїновий катепсин В (КФ 3.4.22.1) – найбільш вивчена протеаза з молекулярною масою 24-30 кДа, активна при слабко кислих значеннях рН [9].

Метою нашої роботи було визначення динаміки вмісту білків проміжних філаментів у різних відділах головного мозку, сироватці крові та зміні активності лізосомного цистеїнового катепсину В у сироватці крові щурів після опромінення малими дозами іонізуючої радіації.

#### Методика досліджень

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 одноразово 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 Варолієв міст, з яких отримували білкові фракції для визначення концентрації ГФКБ. Кількісний вміст ГФКБ визначали у розчинній фракції тканин головного мозку, які отримували внаслідок екстракції буферами А (25 мМ трис-буфер, рН 7,4; 1 мМ фосфометил-сульфонілфторид; 10 мМ NaN<sub>3</sub>). Концентрацію ГФКБ в одержаних фракціях вимірювали методом імуноферментного аналізу, який включав етап інгібування антитіл антигеном у рідинному середовищі [10].

Кров відстоювали 1 годину при кімнатній температурі та центрифугували на центрифугі К70Д 20 хв × 3000 об/хв. Сироватку крові використовували для визначення концентрації нейроспецифічного білка, активності цистеїнової протеази (катепсину В).

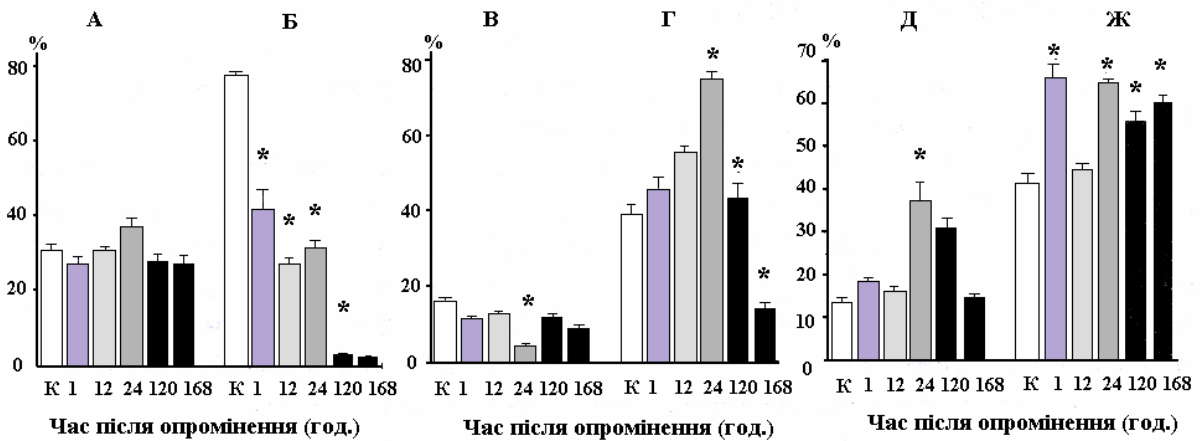
Концентрацію ГФКБ виражали в нг/мл сироватки крові. Активність катепсину В досліджували за розщепленням p-нітроаніліду N,α-бензоіл-D,L-аргініну (БАПА) «Fluka» (Швейцарія) [11] і виражали в мкМ p-нітроаніліну (p-НА) за 1 хв на 1 мг білка. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорд [12]. Статистична обробка результатів проводилась з використанням програми Stat-Win 98 за t-критерієм Ст'юдента [13].

#### Результати та їх обговорення

Кількісне визначення розчинної форми ГФКБ у відділах мозку щурів після одноразового тотального рентгенівського опромінення за дози 25 сГр представлено 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 в умовах одноразового опромінення. Особливістю змін відносно вмісту розчинної форми ГФКБ у шурів у динаміці пострадіаційного опромінення є різний характер розподілу ГФКБ у морфо-

функціональних структурах головного мозку шурів у залежності від терміну після опромінення. Вміст розчинної форми підвищувався у середньому мозку на 5 добу, смугастому тілі та гіпокампі через 12 годин після дії радіації, що свідчить про вибіркочку відповідь з боку астроглії на опромінення. Встановлено підвищення вмісту розчинної форми ГФКБ у корі головного мозку та зменшення концентрації досліджуваного білка у гіпокампі та смугастому тілі мозку дослідних шурів.

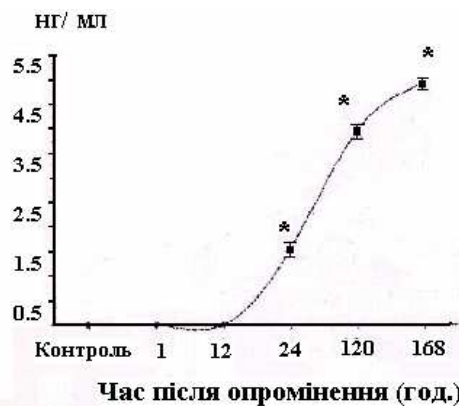


**Рис. 1.** Вміст розчинної форми ГФКБ у різних структурах головного мозку шурів під впливом одноразового опромінення (0,25 Гр) (% від сумарного вмісту розчинного та філаментного ГФКБ):

А – кора головного мозку; Б – мозочок; В – гіпокамп; Г – смугасте тіло; Д – середній мозок; Ж – варолієв міст. \* – вірогідна відмінність від контрольних значень ( $p < 0,05$ )

Як відомо, у сироватці крові нейроспецифічні білки практично не виявляються в нормі, або ж виявляються у слідовій кількості [14]. Динаміка зміни концентрації ГФКБ у сироватці крові опромінених шурів представлена на рис. 2. Встановлене

підвищення концентрації ГФКБ через 24, 120 та 168 годин після опромінення може бути результатом деструктивних процесів у тканинах мозку, при порушенні стану центральних нейротрансмітерних систем та зміні функціонування ГЕБ.



**Рис. 2.** Вміст ГФКБ у сироватці крові шурів при одноразовому опроміненні в дозі 0,25 Гр.

\* – вірогідна відмінність від контрольних значень ( $p < 0,05$ )

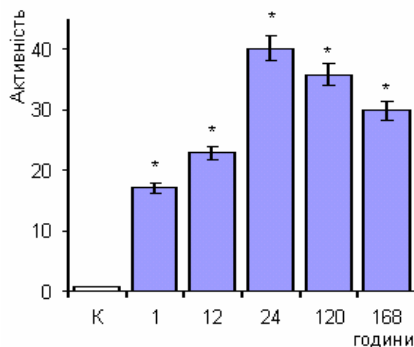
Гематоенцефалічний бар'єр – утворення, яке існує завдяки тісним контактам між ендотеліальними та межуючими з ними нейрогліальними клітинами, а основна його функція – підтримка гомеостазу ЦНС. Відомо, що великі дози радіації не тільки порушують проникність, але й спричиняють «дифузну течу», яка включає втрату капілярної сітки, кортикальну атрофію та некроз білої речовини мозку [15]. Радіація викликає також порушення

ультраструктури компонентів ГЕБ. Механізм гіперпроникності ГЕБ у результаті дії радіації є неспецифічним та до кінця не з'ясованим. Відомо, що ступінь деструктивного ефекту ГЕБ опромінених регіонів мозку знаходиться у прямопропорційній залежності від дози [8]. Ряд патологій, таких як черепно-мозкові травми, ішемія мозку та ін., супроводжуються порушенням проникності ГЕБ. При даних патологіях виявлена наявність у спинно-

мозкової рідини та сироватці крові нейроспецифічних білків, а саме ГФКБ, S100 та основного білка мієліну [15].

Якщо розглядати динаміку концентрації ГФКБ у сироватці крові в пострадіаційний період, то експоненціальне наростання, певно, відбувається або за рахунок підвищення експресії білка в мозку

під впливом радіаційного ураження, або за рахунок протеолітичної деградації цистеїновими ферментами цитоплазми – кальпаїнами, в результаті якої утворюються низькомолекулярні похідні ГФКБ [2], імовірність проходження яких через ГЕБ є значно вищою, ніж інтактної форми ГФКБ.



**Рис. 3.** Активність катепсину В у сироватці крові щурів після одноразового опромінення за дози 0,25 Гр (в мкМ р-НА/мг білка,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Експериментальні дані зміни активності лізосомного цистеїнового катепсину В у сироватці крові опромінених щурів представлені на рис. 3. Характерною рисою сироваткових протеаз, яка відрізняє їх від тканинних, є те, що вони просторово нероз'єднані і можуть взаємодіяти між собою. В нормі тканинні цистеїнові катепсини, як і нейроспецифічні білки (ГФКБ), в сироватці крові визначаються у слідовій кількості, тому значне підвищення їхнього рівня в крові може свідчити про розвиток патологічного процесу [16; 17]. Встановлення закономірностей та умов, за яких можлива елімінація цистеїнових катепсинів у кров, може бути корисною для розробки діагностики і прогнозування перебігу тканинних патологій, у тому числі й зумовлених дією радіації. Дослідження впливу одноразового тотального опромінення щурів у дозі 25 сГр на активність цистеїнового катепсину В у сироватці крові дозволяє оцінити радіобіологічний ефект опромінення і розбалансування системи протеолізу. Визначення активності катепсину В у сироватці крові опромінених щурів є інформативним методом оцінки пошкоджуючої дії

радіації і дозволяє прогнозувати ранні функціональні ураження, а також ризик появи віддалених наслідків.

#### Висновки

Одноразове тотальне рентгенівське опромінення щурів за дози 25 сГр спричиняє реорганізацію проміжних філаментів астроцитів головного мозку, що супроводжується кількісними змінами розчинної форми ГФКБ у динаміці експерименту.

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

Радіаційний вплив за дози 25 сГр супроводжується підвищенням рівня активності катепсину В у сироватці крові дослідних щурів. Через 12 і 24 години після опромінення активність катепсину В підвищилась і досягла максимального рівня на 24 годину після рентгенівського випромінювання.

Отримані результати дозволяють розглядати даний нейроспецифічний білок (ГФКБ) і активність катепсину В у сироватці крові як маркери оцінки ступеня тяжкості та спрямованості перебігу патологічних станів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Дука Т.І., Лещинська І.О., Чорна В.І. Характеристика гліального фібрилярного кислого білка – компонента астрогліальних проміжних філаментів ЦНС // Біополімери і клітина. – 2002. – Т. 18. – № 3. – С. 179-185.
2. Березин В.А., Белик Я.В. Специфические белки нервной ткани. – К.: Вища школа. – 1990. – 263 с.
3. Inoue B., Yagishi S., Hoh Y. Coexistence of paired helical filaments and polyglucosan bodies in the same neuron in an autopsy case of Alzheimer's disease // Acta Neuropathol. – 1996. – 90. – № 5. – P. 511-514.
4. Somosy Z., Sass M., Bogner G. X-irradiation-induced disorganization of cytoskeletal filaments and cell contacts in HT29 cells // Scann.Microscopy. – 2009. – 9. – № 3. – P. 763-772.
5. Недзвецкий В.С., Бусыгина С.Г., Березин В.А., Дворецкий А.И. ЦНС-синдром, характеристика промежуточных филаментов головного мозга крыс // Радиобиология. – 1990. – № 30, вып. 2. – С. 243-246.
6. Дроздов А.Л., Черная В.И. Нейроспецифические белки ГФКБ и NSAM гиппокампа при формировании энграмм условно-рефлекторной памяти // Нейрохимия. – 2005. – Т. 22, № 4. – С. 285-289.
7. Trnovec T., Kallay Z., Bezek S. Effects of ionizing radiation on the blood brain barrier permeability to pharmacologically active substances // Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. – 2000. – Vol. 19. – P. 1581-1587.
8. Rubin P., Gash D., Hansen J. Distribution of the blood-brain barrier's the primary effects of CNS irradiation // Radiotherapy Oncology. – 2004. – Vol. 31. – P. 51-60.

9. Mohamed M.M., Sloane B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer // Nature. – 2006. – 6. – P. 764-775.
10. Иммуноферментный анализ. Под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М.: Мир. – 1988. – 444 с.
11. Черная В.И. Изучение активности катепсина В в опухолях головного мозга человека // Доповіді Національної академії наук України. 1999. – № 2. – С. 172-176.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quatisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. – № 72. – P. 248-254.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. Лиджиева Р.П. Специфические антигены мозга как показатели проницаемости ГЭБ при болезни Альцгеймера // Журн.Ин-та невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1997. – С. 134-136.
15. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal.Chem. – 2006. – 31, № 5. – P. 964-966.
16. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers // Clinica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 342. – P. 41-69.
17. Kos J., Schweiger. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer // Radiol.Oncol. – 2002. – Vol. 36, № 2. – P. 176-179.

Рецензенти: Хворостенко М.І., д.м.н., професор, Дніпропетровська державна медична академія;  
Томілін Ю.А., д.б.н., професор, Чорноморський державний університет імені Петра Могили.

© Чорна В.І., Лянна О.Л., 2010

Стаття надійшла до редколегії 18.06.2010 р.