

УДК 517.112:612.8

**ВПЛИВ ФРАКЦІОНОВАНОГО ОПРОМІНЕННЯ В ДОЗІ 0,25 ГР
НА ВЗАЄМОДІЮ ГІАЛУРОНАТ-ЗВ'ЯЗУЮЧИХ БІЛКІВ МОЗКУ ЩУРІВ
ІЗ ВІДПОВІДНИМ ЛІГАНДОМ**

Г. Ушакова

*Дніпропетровський національний університет
вул. Наукова, 13, Дніпропетровськ 49050, Україна
e-mail: ushakova_g@ukr.net*

Встановлено віддалений ефект зміни гіалуронат-зв'язуючої активності білків мозку щурів під впливом фракціонованого іонізуючого опромінення у дозі 0,25 Гр у відділах лімбічної системи та мозочку. Найбільш толерантним відділом мозку до фракціонованої дії іонізуючої радіації у названій дозі є кора великих півкуль. Припускається, що гіалуронат-зв'язуючі білки міжклітинного матриксу беруть активну участь в адаптаційних процесах міжклітинної комунікації в умовах дії радіації низької інтенсивності.

Ключові слова: гіалуронова кислота, гіалуронат-зв'язуючі білки, мозок, радіація.

Взаємодії глікозаміногліканів з їх лігандами високочутливі до впливу вільних радикалів і змін рН середовища, тому логічно припустити, що вплив опромінення низької інтенсивності буде призводити до змін у цих взаємодіях [4]. Радіоактивне забруднення навколишнього середовища – це одна з серйозних проблем сучасності, у зв'язку з цим виявлення спектру дії малих доз іонізуючого випромінювання на нервову систему, в тому числі розкриття ступеня змін у міжклітинних взаємодіях у головному мозку, набуває все більшої актуальності.

Згідно з попередніми результатами, для організмів, що розвиваються, у процесі морфогенезу характерне зростання концентрації вільного гіалуронату [13]. Шляхи клітинної міграції зазвичай високогідратовані внаслідок накопичення гіалуронової кислоти. Таким чином, ділянки накопичення екстрацелюлярного гіалуронату в мозку, що розвивається, можуть забезпечувати гідратацію шляхів для паростків нервових клітин. Але підвищення рівня гіалуронату у сформованих тканинах частіше пов'язане з запаленням або з наявністю злоякісних пухлин. Таким чином, значне відхилення від нормального співвідношення зв'язаного та вільного гіалуронату може бути використане як показник патології.

Гіалуронова кислота може виступати в ролі посередника як гомотипової, так і гетеротипової клітинної адгезії. Підтвердженням цього є дані про бівалентну катіон незалежну агрегацію трансформованих клітин кількох ліній, котра гальмується у разі обробки гіалуронідазою, а також у випадку високої концентрації гіалуронової кислоти чи антитіл КЗ до рецептора гіалуронату (85 кДа) [5]. Головним механізмом цієї агрегації вважають мультивалентну перехресну взаємодію гіалуронату із рецепторами клітин, близьких одна до одної. Гальмування цієї взаємодії високим вмістом гіалуронату обумовлено насиченням специфічних рецепторів.

Літературні дані свідчать про активну участь гіалуронат-зв'язуючих білків мозку ссавців у процесах клітинної міграції. По-перше, ця участь може бути обумовлена пот-

ребою клітин під час руху відокремлюватися від свого субстрату (повністю чи частково), а також потім приєднуватися до нього. Було показано, що середовище прикріплених клітин збагачене головним чином гепарансульфатом, а так звані “сліди” мігруючих клітин містять найбільше гіалуронат і малосульфатований хондроїтинсульфат [12].

Метою цієї роботи було вивчити вплив фракціонованого рентгенівського опромінення в дозі 0,25 Гр на гіалуронат-зв'язуючу властивість білків (ГКЗВБ) у різних відділах мозку статевозрілих щурів.

Експерименти проводилися на лабораторних щурах лінії Вістар. Тварини перебували у стандартних умовах із циклічністю доби: світло – 12 год, ніч – 12 год. Об'єктом дослідження був головний мозок щурів. Декапітацію тварин проводили під легким наркозом. Головний мозок очищали від оболонки та залишків капілярів, усі процедури проводили при +4°C. Гомогенізацію тканини мозку проводили у скляному гомогенізаторі в буфері А, що містив трис – 0,25 мМ (рН7,4), ЕДТА – 1 мМ, дитіотрейтол – 2 мМ, ФМСФ – 0,2 мМ, NaN_3 – 3 мМ, у співвідношенні 1:10. У ході послідовних стадій центрифугування були виділені 4 фракції, що містили 1 – водорозчинні білки цитозолу та міжклітинного матриксу (буфер А); 2 – мембраносоційовані білки (білки, що локалізовані навколо плазматичної мембрани, й асоційовані з мембраною за рахунок слабких електростатичних взаємодій, буфер А + 2 М КСІ); 3 – мембранні (трансмембранні білки, що пронизують плазматичну мембрану наскрізь, буфер А + 2% Тритон Х-100) та 4 – екстрацелюлярні/цитоскелетні білки (філаментні білки цитоскелета і ядерного скелета й протеоглікани міжклітинного матриксу, буфер А + 4 М сечовини).

Для визначення загальної гіалуронат-зв'язуючої активності білків у різних фракціях мозку був використаний твердофазний вуглевод-ферментний аналіз [7]. Цей метод є модифікацією твердофазного імуноферментного аналізу. Його особливість полягає у використанні кон'югату, який складається з глікозаміноглікану з нашитою на нього ферментною міткою. Аналіз проводили в плоскодонних 96-коміркових планшетах (об'єм кожної комірки 300 мкл). Дані калібрувальних вимірювань використовували для перерахунку екстинції у кількість (мкг) зв'язаного з білками відповідного глікозаміноглікана у співвідношенні до 1 мг загальної кількості білка (ЗБ) у пробі. Вимірювання екстинції проводили на спектрофотометрі «Anthos 2010». Загальну кількість білків визначали за методом Бредфорд [6].

Модель фракціонованого опромінення створювали на тримісячних щурах масою 140–160 г. Тварини були розділені на групи: контрольну (імітація-опромінення) та дослідні. У даному експерименті ми використали рівну кількість самців і самок. Тварини опромінювали фракціоновано по 0,01 Гр/добу протягом 25 діб на установці РУМ-17 (напруга 150 кВ, струм 6 мА, фільтри Cu 2,0 мм, фокусна відстань 181 см, потужність дози 0,26 сГр/хв). Для вивчення динаміки змін глікозаміноглікан-зв'язуючої активності білків у різних відділах мозку під впливом фракційного рентгенівського опромінення дослідних тварин декапітували окремими групами через 1, 12, 24, 120 і 168 год після закінчення опромінення (накопичення дози 0,25 Гр).

Для статистичної обробки даних використовували t-тест Стьюдента та U-тест Манн-Уїтні.

Раніше нами був досліджений вплив одноразового тотального іонізуючого опромінення в дозі 0,25 Гр на щурів і показані ймовірні зміни взаємовідносин гіалуронат/гіалуронат-зв'язуючі білки у мозку ссавців [3]. Отримані дані оцінювали з урахуванням статі тварин. Було встановлено, що найбільша гіалуронат-зв'язуюча активність білків

характерна для стріатума (рис. 1), потім мозочка, а найменша – для кори великих півкуль і гіпокампа. Зміни активності у досліджених відділах лімбічної системи (гіпокамп і стріатум) добре узгоджувалися з даними інших авторів про розвиток стану страху й емоційного напруження у експериментальних тварин після одноразового радіаційного впливу в малій дозі.

Отримані дані свідчать про те, що, за результатами впливу одноразового опромінення на тварин у дозі 0,25 Гр, самці більш вразливі, ніж самиці. При цьому в самців характер змін у стріатумі, корі великих півкуль і мозочку відрізнявся. У досліджених самиць після опромінення протягом 168 год визначалася загальна тенденція до поступового збільшення гіалуронат-зв'язуючої активності білків (у середньому в 1,5 разу) на 24-ту год та поверненням цього показника до рівня контролю на 168-му год після опромінення (крім мозочка; можливо, у мозочку цей процес відбувається повільніше). Але у самиць зареєстровані значні коливання гіалуронат-зв'язуючої активності білків протягом години після опромінення. Можливо, це пов'язане зі ступенем адаптації ЦНС, який традиційно змінюється залежно від частоти зміни фаз естральних циклів у шурів, які спричиняють коливання гормонального статусу. Це зумовлює зниження адаптаційних здатностей організму до екстремальних впливів, у тому числі й до іонізуючого опромінення.

Зміна гіалуронат-зв'язуючої активності білків може бути пов'язана або зі зміною синтезу даних білків, або зі зміною у співвідношенні зв'язаний/вільний гіалуронат. Вважають, що процеси синтезу білка відносно стійкі до дії іонізуючої радіації. Під час дослідження чутливості до γ -опромінення (доза 0,12; 0,25; 0,5 і 4 Гр) синтезу двох різних груп білків (експортних і ядерних) у печінці шурів було показано, що вже при низьких дозах опромінювання у тварин різко знижується синтез експортних білків [8]. При цьому синтез деяких ядерних білків навпаки – підвищується. Швидкість синтезу сумарних білків після опромінення низькими дозами залишається незмінною. Таким чином, синтез різних груп білків має різну чутливість до опромінення. Порушення синтезу експор-

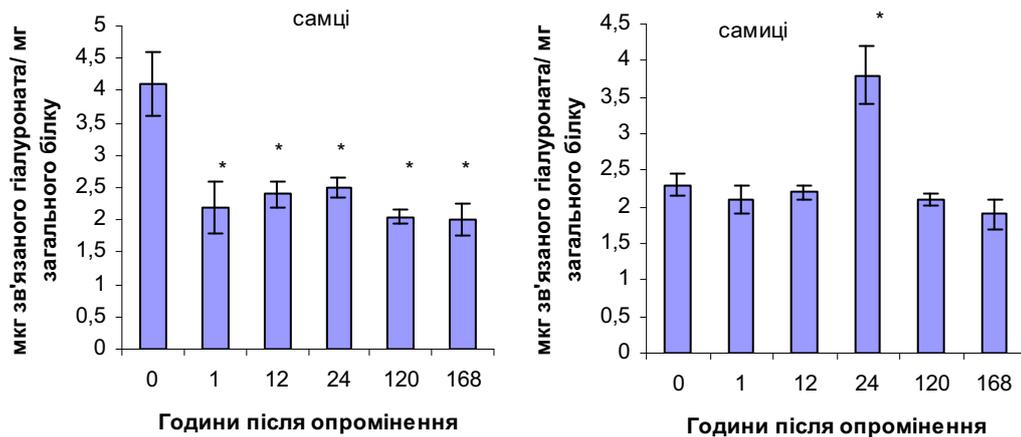


Рис. 1. Загальна гіалуронат-зв'язуюча активність сечовинорозчинних білків у стріатумі мозку шурів у період з 1 до 168 год після тотального одноразового рентгенівського опромінення в дозі 0,25 Гр: 0 – середнє значення усіх контрольних груп (n=18); кількість тварин у кожній дослідній групі дорівнює 12–13; * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,05$

тних білків перш за все пов'язують із пошкодженням мембранних структур під дією радіації.

Поступові зміни ГКЗВБ протягом 168 год були зареєстровані після фракціонованого опромінення до сумарної дози 0,25 Гр, із максимумом активності зв'язування на 120–168-му год після опромінення у структурах стовбура мозку (як у самців, так і у самиць), мозочку та зниженням у гіпокампі (рис. 2). Ймовірно, це пов'язано з включенням компенсаторних регуляторних механізмів, які поступово корегують співвідношення

вільний/зв'язаний глікозаміноглікан.

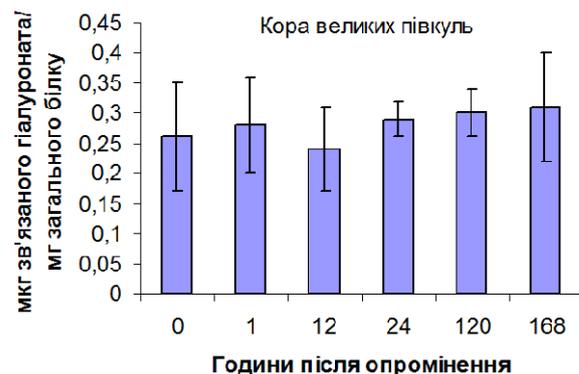
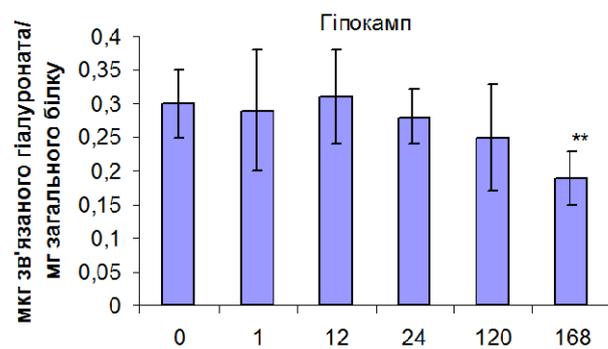
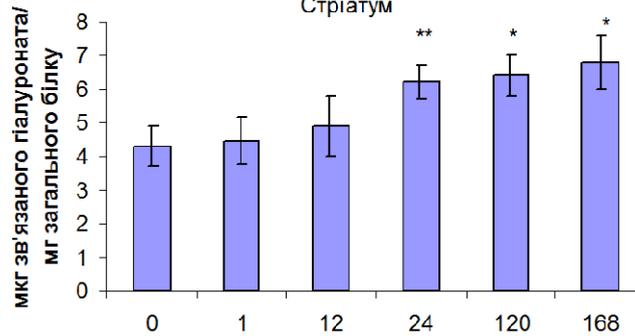


Рис. 2. Загальна гіалуронат-зв'язуюча активність сечовино-розчинних білків із мозку щурів у період з 1 до 168-ї год після фракціонованого рентгенівського опромінення в кінцевій дозі 0,25 Гр (позначення такі ж, як на рис. 1).

Відсутність зниження рівня ГКЗВБ у стовбурі мозку та мозочку після фракціонованого опромінення, порівняно з рівнем даного параметра у неопромінених тварин, ймовірно, пов'язана зі стійким збільшенням кількості сайтів зв'язування в матриці у відповідь на первинне гальмування специфічної взаємодії.

Зміна рівня вільного гіалуронату та зв'язуючої активності великих протеогліканів позаклітинної речовини після іонізованого опромінення може брати участь у модуляції клітинної відповіді та пластичних перебудов синаптичних контактів. Завдяки компонентам міжклітинного матриксу регулюється міграція клітин, їх виживання, диференціація, ріст паростків нервових клітин, формування та підтримка синаптичних контактів. В останні роки показана здатність глікозаміноглікан-зв'язуючих білків нервової тканини зв'язувати фактори росту та регулювати транспортні системи між клітинами, стабільність і активність міжклітинних взаємодій [9, 10, 14].

При порівняльному аналізі результатів впливу одноразового і фракціонованого опромінення з набором однакової дози 0,25 Гр на загальну гіалуронат-

зв'язуючу активність білків мозку звертає на себе увагу той факт, що динаміка змін даного параметра носила багато в чому протилежний характер залежно від моделі опромінення. Було встановлено, що після одноразового опромінення рівень загальної глікозаміноглікан-зв'язуючої активності білків коливався щодо контрольних значень протягом перших 24 годин після опромінення, а у відносно пізній період – на 120-ту годину у самців і на 168-му годину у самиць – повертався до контрольного рівня в більшості досліджених відділів мозку [3]. Фракціоноване опромінення з набором тієї ж кінцевої дози 0,25 Гр викликало більш спрямовані зміни гіалуронат-зв'язуючої активності білків цитоскелетної/екстрацелюлярної фракції мозку щурів з максимальним відхиленням від контролю на 120–168-му год, незалежно від статі тварин. З усіх досліджених відділів мозку тільки у варолієвому мосту й у мозочку в перші 24 год після фракціонованого опромінення спостерігалися помітні коливання рівня загальної глікозаміноглікан-зв'язуючої активності білків, причому в обох випадках у перші години після опромінення спостерігалось збільшення дослідного параметру. У той же час після одноразового радіаційного впливу в усіх досліджених відділах стовбура мозку й у мозочку через 1 год після опромінення спостерігалось зниження загальної активності білків щодо зв'язування специфічного ліганду. Взаємодії глікозаміногліканів із їх лігандами високочутливі до мінімальних змін іонної сили і рН середовища. Виходячи з цього, ми припускаємо, що первісне зниження ГКЗВБ у стовбурі мозку і мозочку після одноразового впливу радіації в дозі 0,25 Гр носить неспецифічний характер і може бути пов'язане зі змінами іонного складу середовища і/або активацією процесів неспецифічного протеолізу. Те, що обидва наведених вище фактори є наслідком оксидативного ушкодження мембран, яке відбувається в результаті радіоактивного впливу, вже підтверджено працями багатьох дослідників [1, 2, 11]. Зменшення кількості зв'язуючих сайтів і/або їх конформаційні зміни, які призводять до зменшення афінності зв'язування цих сайтів з ланцюгами гіалуронату, ймовірно, викликають зміни в системі вільний/зв'язаний глікозаміноглікан. З одного боку збільшення концентрації вільного гіалуронату поблизу клітинної поверхні може негативно позначатися на передачі сигналів усередину клітини, з іншого боку – це може бути сигналом для передачі інформації від ушкоджених клітин до неушкоджених ("ефект свідка").

Отже, отримані результати свідчать про чутливість системи вільний/зв'язаний гіалуронат у мозку щурів в умовах фракціонованого впливу іонізуючої радіації низької інтенсивності. Можливо, в основі даного явища лежить великий потенціал гетерогенних ансамблів нервових клітин у формуванні компенсаторних реакцій і передачі інформації за рахунок взаємодії "клітина-матрикс". Наявність на поверхні клітин багатьох специфічних рецепторів глікозаміногліканів, а також широкого спектру зв'язуючих адгезивних молекул і факторів росту, дає можливість системі вільний/зв'язаний гіалуронат корегувати поведінку клітини.

1. *Дворецкий А. И., Айрапетян С. Н., Шаинская А. М.* и др. Трансмембранный перенос ионов при действии ионизирующей радиации на организм. К.: Наук. думка, 1990. 136 с.
2. *Эйдус Л. Х.* Мембранный механизм биологического действия малых доз. М., 2001. 82 с.
3. *Ушакова Г. О.* Зміна гіалуронат-зв'язуючої активності білків мозку щурів за дією малих доз радіації // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. біол. екол. 2000. Вип. 8. Т. 1. С. 100–105.

4. Ушакова Г. О. Чинники, що впливають на афінність білків мозку свавців до гіалуронату в умовах *in vitro* // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. біол. екол. 2003. Вип. 11. Т. 2. С. 170–175.
5. Bignami A., Hosley M., Dahl D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix // *Anat. Embryol. (Berl)*. 1993. Vol. 188. N 5. P. 419–433.
6. Bradford M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
7. Dolzhenko M. I., Lepekhin E. A., Berezin V. A. A novel methods for evaluation of carbohydrate-binding activity: enzyme-linked carbohydrate-binding assay (ELCBA) // *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 1994. Vol. 34. N 2. P. 261–271.
8. Geraci J. P., Mariano M. S., Jackson K. L. Radiation hepatology of the rat: microvascular fibrosis and enhancement of liver dysfunction by diet and drugs // *Radiat. Res.* 1992. Vol. 129. N 3. P. 322–332.
9. Ichikawa T., Itano N., Sawai T. et al. Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells // *J. Invest. Dermatol.* 1999. Vol. 113. N 6. P. 935–939.
10. Mescher A. L., Cox C. A. Hyaluronate accumulation and nerve-dependent growth during regeneration of larval *Ambystoma* limbs // *Differentiation*. 1988. Vol. 38. N 3. P. 161–168.
11. Mun-Bryce S., Rosenberg G. A. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998. Vol. 18. P. 1163–1172.
12. Rollins B. J., Culp L. A. Glycosaminoglycans in the substrate adhesion sites of normal and virus-transformed murine cells // *Biochem.* 1979. Vol. 18. N 1. P. 141–148.
13. Ushakova G., Nikonenko I., Skibo G. et al. The role of hyaluronate in morphogenesis of the neurons // *Нейрофизиология/ Neurophysiology*. 1997. Vol. 29. N 1. P. 21–27.
14. Weigel P. H., Yik J. H. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1572. N 2–3. P. 341–363.

EFFECT OF FRACTIONATED IRRADIATION OF 0.25 Gy TO HYALURONATE-BINDING PROTEIN IN THE RAT BRAIN

G. Ushakova

*Dnipropetrovsk National University
13, Naukova St., Dnipropetrovsk 49050, Ukraine
e-mail: ushakova_g@ukr.net*

Showed a remote change of hyaluronate-binding activity of proteins in the rat brain under effect of ionizing irradiation dose of 0,25 Gy in the limbic system, and cerebellum. The most tolerant brain division to the effects of radiation dose was the hemisphere cortex. It is anticipated that hyaluronate-binding intercellular matrix proteins are actively involved in the process of adaptation of the intercellular communication in the context of low-intensity radiation.

Key words: hyaluronic acid, hyaluronate-binding protein, brain, irradiation.

Стаття надійшла до редколегії 21.02.08

Прийнята до друку 26.02.08