УДК 577.156; 612.015.349

Чорна В. І., Лянна О. Л.

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ЦИСТЕЇНОВОЇ ПРОТЕЇНАЗИ У СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПОТОМСТВА ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ У ПРОЦЕСІ ОНТОГЕНЕТИЧНОГО РОЗВИТКУ

Метою роботи було дослідження залежності активності лізосомного цистеїнового катепсину L головного мозку потомства опроміненої самки та інтактного самця в процесі онтогенетичного розвитку. Показано, що фракціоноване рентгенівське опромінення самок за дози 25 сГр індукує різні зміни рівнів активності катепсину L і перерозподіл їх у структурах головного мозку нащадків під час постнатального розвитку на користь неседиментованої активності з максимальним підвищенням на 6 добу. Отримані дані допомагають розумінню механізмів радіаційно-індукованих змін у нащадків опромінених батьків.

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

Целью работы было исследование зависимости активности лизосомного цистеинового катепсина L головного мозга потомства облученной самки и интактного самца в процессе онтогенетического развития. Показано, что фракционированное рентгеновское облучение самок в дозе 25 сГр индуцирует разные изменения уровней активности катепсина L и перераспределение их в структурах головного мозга потомства во время постнатального развития в пользу неседиментированной активности с максимальным повышением на 6 сутки. Полученные данные помогают пониманию механизмов радиационно-индуцированных изменений у потомства облученных родителей.

***Ключевые слова**: ионизирующее излучение, лизосомный цистеиновий катепсин L, головной мозг, крысы, потомство.*

The aim of the work was to investigate the kind of lysosomal cysteine cathepsin L activity dependency in brain structures of irradiated rat descendants during ontogenetic development. It was shown that fractional x-ray radiation (25 cGy) of the female rats induced different changes of cathepsin L activity levels and their redistribution in brain structures of female rats' descendants during postnatal development with the advantages of nonsedimentational activity that had maximum at the 6th day. The data obtained could be useful in understanding of mechanism of radiation-induced changes in descendants of irradiated parents.

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

Вступ. Діапазон «малих доз», що спричиняють адаптацію (1-20 сГр), відповідає дозам, що отримують при природному радіаційному фоні (10-20 мкр/год) протягом 5-200 років [1]. У лабораторних експериментах із застосуванням сучасних методів, як правило, не вдається визначити істотного збільшення рівня цитогенетичних пошкоджень після дії на клітину випромінювань в означених дозах [2]. Але це ще не означає, що пошкодження геному повністю відсутнє і, головне, не передається нащадкам.

Існує багато даних, згідно з якими опромінення в «малих дозах», незалежно від здатності збільшувати радіорезистентність, має несприятливі наслідки. Наприклад, встановлено, що у плазмі ліквідаторів і дітей, опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи, визначено кластогенні фактори, що являють собою суміш прооксидантів з хромосомопошкоджуючими властивостями [3]. Методами біохімічного аналізу ідентифіковано продукти пероксидації арахідонової кислоти, які вивільняються з фосфоліпідних мембран, цитокіни у вигляді α-фактору некрозу пухлин, а також атипові нуклеотиди, інозин-ді- та три-фосфати. Властивості цих компонентів підтверджено цитогенетичними дослідженнями. Кластогенні фактори частіше знаходили у плазмі крові ліквідаторів, опромінених у дозах більше за 250 мГр, ніж у опромінених у дозах до 100 мГр. Результати опромінення крові in vitro показали, що доза 500 мГр викликає значне підвищення кластогенної активності [3].

Оксидантний стрес є одним з неспецифічних наслідків опромінення навіть за малих доз. Вважають, що кластогенними факторами є фактори ризику розвитку віддалених ефектів опромінення [3]. Підвищення проявів нестохастичних ефектів малих доз пов'язують зі зниженням адаптивних можливостей організму [4; 5].

Несприятливі ефекти малих доз опромінення, які можуть проявитися в наступних клітинних поколіннях, пов'язані з індукованою нестабільністю геному, яка призводить до зміни в послідовності основ, зшивкам ДНК-ДНК та ДНК-білок, помилковій репарації пошкоджень ДНК та інш. [1]. Опубліковані дані свідчать, що опромінення батьків може приводити до підвищеної чутливості нащадків до таких активаторів розвитку раку, як 12-0-тетрадеканоілфорбол-13-оцет [6].

Сутковий Д. А. зі спів. у крові та мозку нащадків першого покоління щурів, отриманих від опромінених тварин за дози 1,0 сГр., встановили прояви підвищеної активності вільнорадикальних процесів (ПОЛ) та зміни показників антиоксидантної активності [7].

Результати дослідження in vitro показали, що іонізуюче опромінення підвищує частоту мутацій у статевих клітинах [7; 8]. При опроміненні людини в малих дозах можливість розвитку спадкових змін у статевих клітинах, які призводять до підвищення мутацій in vivo у нащадків, не доведено [9; 10].

При обстеженні дітей, які народилися від осіб, що пережили атомні бомбардування у Хіросімі і Нагасакі, виявлено незначні й невірогідні підвищення частоти мутацій [11]. Опромінення внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС розглядається як опромінення у малих дозах. Weinberg H. Sh. зі спів. свідчать про можливість генетичного ефекту опромінення батьківських статевих клітин, тобто опромінення людини в малих дозах викликає мутації в статевих клітинах [12].

Найбільш гострими питаннями, що хвилюють учених, лікарів є генетичні ефекти радіаційного забруднення після аварії на ЧАЕС і їх наслідки для здоров'я наступних поколінь. За даними 10-річних досліджень серед населення, яке мешкає в зонах радіаційного забруднення і яке отримало дози опромінення від 8 до 52 мЗв. Лазюк Г. І. зі спів. відмічають збільшення природжених пороків розвитку порівняно з періодом до аварії на ЧАЕС [13].

Аналіз даних літератури про генетичні наслідки малих доз іонізуючого опромінення свідчить про недостатність клінічних і експериментальних даних про особливості стохастичних і нестохастичних віддалених наслідків у потомків опромінених батьків.

Метою роботи було дослідження залежності активності лізосомного цистеїнового катепсину L головного мозку потомства опроміненої самки та інтактного самця в процесі онтогенетичного розвитку.

Методика досліджень.

Проведено експерименти на білих лабораторних щурах вагою 200-230 г. Вплив радіації з низькою інтенсивністю у дозі 25 сГр досліджували на щурах, яких поділяли на декілька груп: 1 – псевдо-опромінену контрольну; та 2 – фракціоновано опромінену групу, яку через два тижні після останнього сеансу опромінення спаровували для отримання потомства. В експерименті досліджували наступні серії потомків: I – потомство інтактних щурів; II – потомство від опромінених самок і контрольних самців. Тварин декапітували на 6, 12, 18 та 25 доби постнатального розвитку. 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. 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 [14]. Гомогенати тканин готували за стандартною методикою в гомогенізаторі Поттера-Ельвейема. Використовували 10 % гомогенати на 0,25 % розчині сахарози, на 0,025 М трис-буфері з pH 7.4, який містить 0,15 М NaCl та 1 мМ ЕДТО. Неседиментовану та седиментовану фракції отримували центрифугуванням на центрифузі VAC-601 (105 000 g × 50 хв). Диференційне центрифугування проводили за схемою [15; 16]. Активність катепсину L визначали за розщепленням азоказеїну, денатурованого 3М сечовиною [17]. Азоказеїн синтезували за методом Сурінова Б. Г. і Манойлова С. Е. [18]. Питому активність катепсину визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15 хв преінкубацією ферментів у присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу і 2 мМ Na_2EDTO та виражали в умовних одиницях абсорбції при 366 нм за 60 хв інкубації при +37°С на 1 мг,г білка. Кількісну оцінку загального білка в пробах проводили за методом Бредфорд [19]. Статистичну обробку результатів проводили за [20].

Результати та їх обговорення. Відомо, що активність лізосомних цистеїнових катепсинів відповідальна за часткові зміни, які з'являються у мозку за життя [15; 21]. Катепсин L – одна з найбільш продуктивних лізосомних цистеїнових ендопептидаз. Активність катепсину L знижується протягом життя в неокортексі, гіпокампі, стріатумі і мозочку щурів до 90 %, активність катепсину. Залежно від віку залишається постійною у мозку щурів, за винятком стріатуму, де вона збільшується за віком [21].

З метою встановлення ролі лізосомного цистеїнового катепсину L у розвитку патологій головного мозку, що розвивається, було досліджено особливості розподілу активності і компартменталізації даного ферменту у структурах головного мозку щурят-нащадків, матері яких зазнали фракціонованого опромінення за дози 0,25 Гр. Отримані дані наведено на рис. 1.

Вільна активність катепсину L істотно не відрізнялась від контрольних значень у корі великих півкуль у період онтогенетичного розвитку. В усі досліджувані періоди активність катепсину L головного мозку дослідних щурів була в межах контрольних значень. У мозочку спостерігалась аналогічна тенденція зміни активності, тобто в дослідній групі, як і в контрольній групі в динаміці постнатального розвитку відбувається процес поступового зниження активності катепсину L до 25 діб. Відмінності вільної активності катепсину L спостерігаються у мозочку саме в цей період, коли активність у нащадків дослідної групи була вище в 1,7 рази порівняно з контролем.

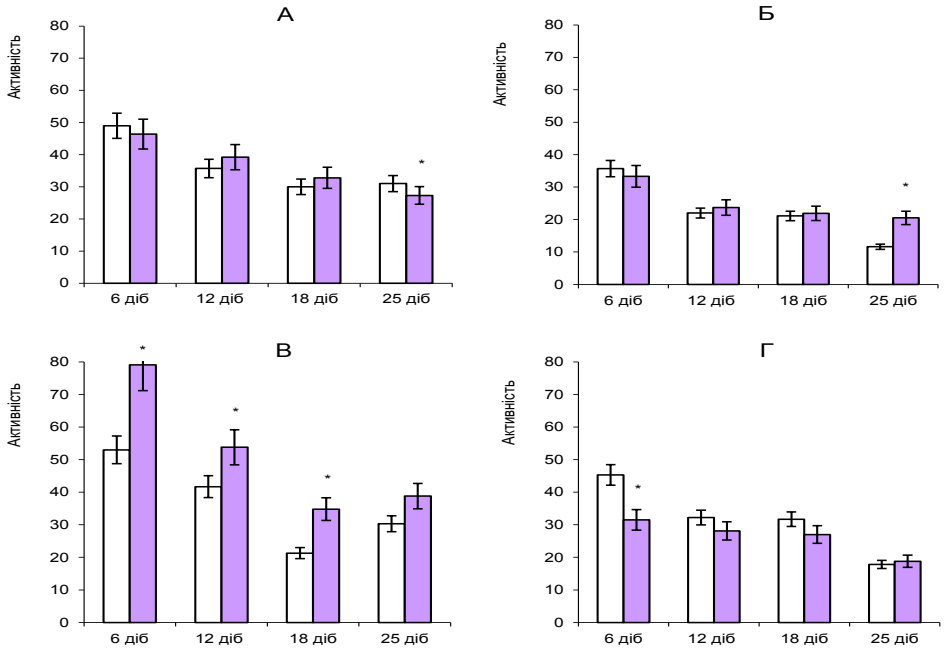

Рис. 1. Вільна активність катепсину L у корі великих півкуль (А), мозочку (Б), середньому мозку (В) та Варолієвому мості (Г) головного мозку нащадків опроміненої самки та інтактного самця (в од. абсорбції при 366 нм/мг білка, M ± m, n=6). *– $p < 0,05$ порівняно з контролем

У середньому мозку контрольних і дослідних тварин вільна активність катепсину L була максимальною на 6 добу постнатального розвитку, в дослідній групі вона була вище у 1,5 рази, і в подальші терміни активність знижувалась, залишаючись у дослідній групі вище за контрольну.

На 25 добу активність катепсину L у середньому мозку як контрольних, так і дослідних щурят підвищилась порівняно з попереднім періодом. У Варолієвому мості тенденція зміни вільної активності катепсину L збігається з динамікою у корі та мозочку дослідних щурят. Особливістю є зниження її в 1,4 рази порівняно з контролем на 6 добу постнатального розвитку.

Дані експериментальних досліджень із визначення неседиментованої активності катепсину L головного мозку нащадків наведено на рис. 2.

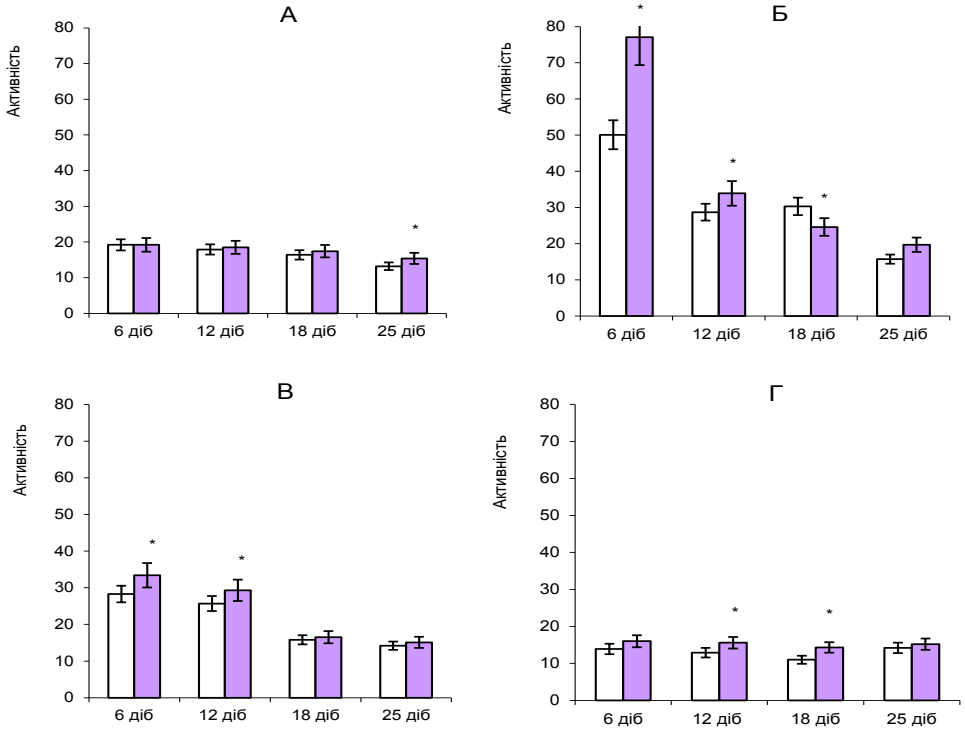

Рис. 2. Неседиментована активність катепсину L у корі великих півкуль (А), мозочку (Б), середньому мозку (В) та Варолієвому мості (Г) головного мозку нащадків опроміненої самки і інтактного самця (в од. абсорбції при 366 нм/мг білка, M ± m, n=6). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Дані, наведені на рис. 2, свідчать про односпрямованість змін у постнатальному розвитку контрольних і дослідних нащадків. Характерною особливістю змін активності дослідної групи є значне підвищення неседиментованої активності у мозочку, середньому мозку і Варолієвому мості на 6-ту добу постнатального розвитку в 1,5; 1,2 та 1,23 рази порівняно з контролем відповідно.

В інші досліджувані терміни значних розбіжностей у динаміці неседиментованої активності катепсину L у структурах головного мозку дослідних і контрольних нащадків не виявляється, за винятком Варолієвого мосту, в якому в усі періоди активність у дослідній групі була в 1,2 рази вище контрольного рівня.

Зміни мембранозв'язаної активності катепсину L головного мозку нащадків представлено на рис. 3.

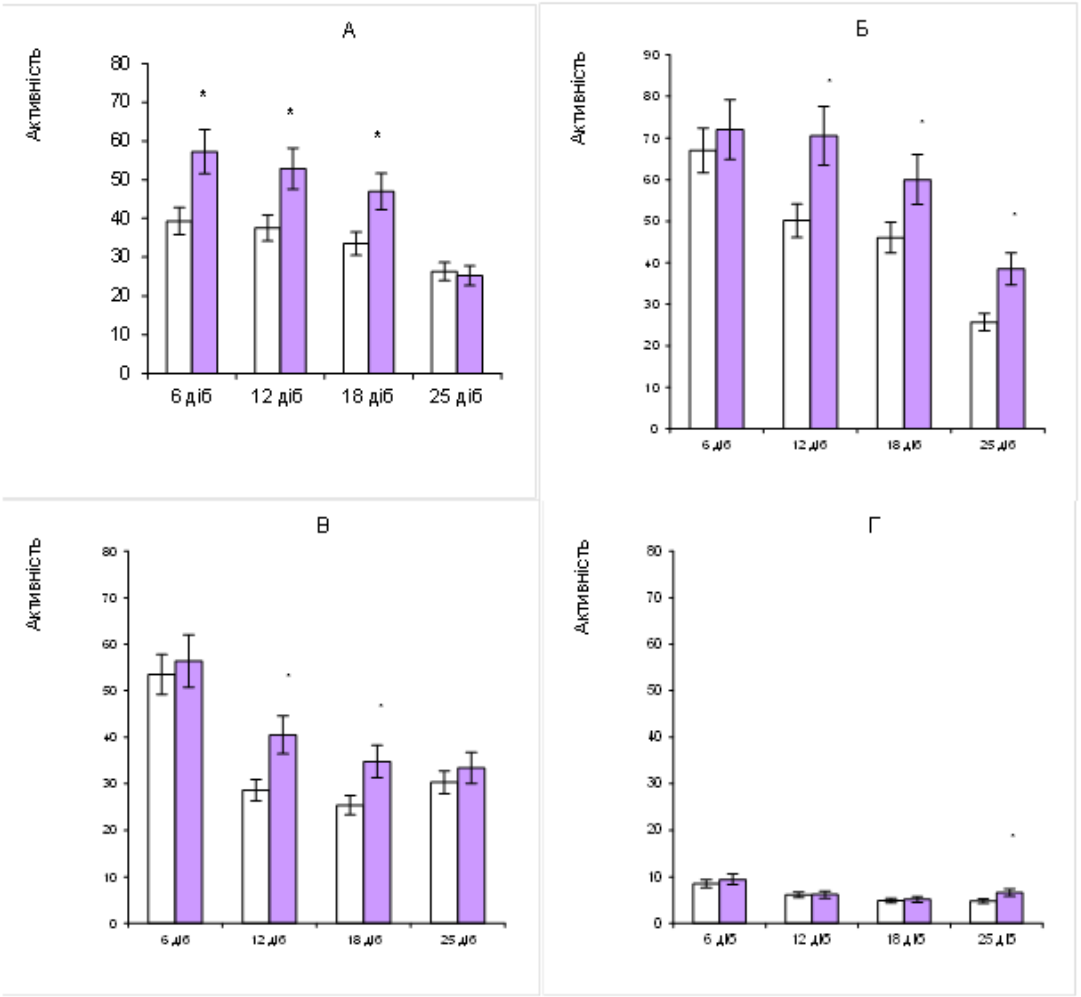

Рис. 3. Мембранозв'язана активність катепсину L у корі великих півкуль (А), мозочку (Б), середньому мозку (В) та Варолієвому мості (Г) головного мозку нащадків опроміненої самки і інтактного самця (в од. абсорбції при 366 нм/мг білка, M ± m, n=6). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Найвищий рівень досліджуваної форми активності катепсину L в усіх функціонально і морфологічно різних структурах головного мозку дослідних і контрольних щурят зареєстровані на 6-у добу постнатального розвитку. Ця закономірність, як відомо, була визначена для вільної та неседиментованої активності. В мозочку, середньому мозку і Варолієвому мості мембранозв'язана активність дослідних тварин на 6-у добу статистично не відрізняється від контрольних, а у корі великих півкуль вона була на 45 % вище від контрольного рівня.

На 12-ту добу підвищений рівень активності катепсину L головного мозку дослідних щурят визначався у корі великих півкуль, середньому мозку і мозочку в 1,4 рази відповідно до контролю. На 18 та 25 добу постнатального розвитку активність залишалася вище контрольного рівня в 1,4 рази у мозочку і Варолієвому мості. У корі великих півкуль і середньому мозку на 25 добу відхилень мембранозв'язаної активності катепсину L від контролю виявлено не було.

Дані про адаптивний характер змін вільної, неседиментованої і седиментованої активності цистеїнових катепсинів у функціонально і морфологічно різних структурах ЦНС щурів у динаміці онтогенетичного розвитку з максимальними рівнями в перші доби життя допомагають з'ясувати механізми радіаційно-індукованих змін у нащадків опромінених батьків. Під впливом лізосом відбувається активація ядерного хроматину. При контактуванні лізосом з ядром ядерна мембрана локально розпушується під дією лізосомальних катепсинів, що полегшує проникність вмісту лізосом в ядро. В ядрі лізосомальні катепсини за допомогою обмеженого протеолізу включаються в процес активації геному,

змінюючи активність відповідних ферментів, наприклад ДНК-полімерази, чи вилучаючи білок-репресор, і вносять свій вклад до загальної нестабільності ядерного геному, індуковану радіацією, і складають передумови для виникнення генетичних наслідків.

Таким чином, фракціоноване рентгенівське опромінення самок за дози 25 сГр індукує різні зміни рівнів активності катепсину L і перерозподіл їх у структурах головного мозку нащадків під час постнатального розвитку на користь неседиментованої активності з максимальним підвищенням на 6 добу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Котеров А. Н. Молекулярные и клеточные механизмы адаптивного ответа у эукариот / А. Н. Котеров, А. В. Никольский // Укр. биохим. журн. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 13–25.
2. Гераськин С. А. Концепция биологического действия малых доз ионизируюшей радиации на клетки / С. А. Гераськин // радиац. биол. Радиоэкол. – 1995. – Т. 35, № 5. – С. 571–580.
3. Эмери Н. Кластогенные факторы в качестве биомаркеров оксидантного стресса вследствие облучения / Н. Эмери // Междунар. журн. радиац. мед. – 1999. – Т. 2, № 2. – С. 22–33.
4. Пелевина И. Н. Изменения чуствительности к облучению после пребывания в зоне контроля аварии на ЧАЕС / И. Н. Пелевина, Г. Г. Афанасьев, Б. Я. Готлиб, А. С. Саенко // Тез. докл. Радиобиол. съезд. – Пущино. – 1993. – С. 781–782.
5. Ляско Л. И. Динамика содержания гормонов гипофиза, нейромедиаторов у ликвидаторов последствий Чернобыльской катастрофы. Попытка коррекции хлореллой Е25 / Л. И. Ляско, Г. Н. Сушкевич, А. Ф. Цыб // Мед. радиология и радиац. безопасность. – 1994. – Т. 39, № 4. – С. 22–25.
6. Vorobtsova I. E. Promotion of skin tumors by 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two generations of denscendants of male mice exposed to X-ray irradiation / I. E. Vorobtsova, L. M. Aliyakparova, V. N. Anisimov // Mutation Research. – 1993. – № 287. – P. 207–216.
7. Сутковой Д. А. Особливості вільно радикальних процесів у крові та мозку щурів з різною локомоторною активністю – потомстві опромінених тварин / Д. А. Сутковой, Е. М. Горбань, Н. В. Топольникова, О. М. Иванова // Укр. радіол. журн. – 1998. – Т. 6, Вип. 3. – С. 303–305.
8. Baker R. J., Van Den Busscke R. A., Amanda J. W., Lara E. W., Meredith J. H. High levels of genetic change in rodents of Chernobyl // Nature. – 1996. – № 308. – P. 707–708.
9. Ichikawa S., Nakano A., Kenmochi M., Murai M., Takashi E. Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of Tradescantia clone Ku9 grown outdoors, which showed a significant increase after Chernobyl accident // Mutation Res. – 1996. – Vol. 349. – P. 249–259.
10. Dubrova Y. E., Nesterov V., Krouchinsky N., Ostapenko I. Human minisatellite rate after the Chernobyl accident // Nature. – 1996. – Vol. 380. – P. 683–686.
11. Neel J. V., Saton G., Myers R. Report of mutation in the children of atomic bomb survivors // Mutation Res. – 1993. – Vol. 291. – P. 1–20.
12. Weinberg H. Sh, Korol A., Nevo E., Shapiro S., Rennet G. Increased mutation Molecular changes in the offspring of liquidators who emigrated to Israel from the Chernobyl disaster area // Environ. Health Perspectives. – 1997. – Vol. 105. – P. 1479–81.
13. Лазюк Г. И. Облучение населения Белорусии выбросами ЧАЭС и динамика врожденных пороков развития / Г. И. Лазюк, Д. Л. Николаев, В. Ф. Миненко // Мат. 2-й междун. конф. «Отдаленные медицинские последствия Чернобыльской катастрофы». – К. – 1998. – С.70-71.
14. Кристич Р. В. Гистологическая энциклопедия: Иллюстрированная энциклопедия гистологии человека / Р. В. Кристич. – Берлин-Гейдельберг-Токио : Из-во Шпрингера, 1984. – 341 с.
15. Покровский А. А. Лизосомы / А. А. Покровский, В. А. Тутельян. – М. : Наука, 1976. – 382 с.
16. Немова Н. Н. Внутриклеточные протеиназы в эколого-биохимических адаптациях у рыб: автореф. дисс…д-ра биол. наук : 03.00.04 / Ин-т биохимии им. Баха. – М., 1992. – 42 с.
17. Березин В. А. Очистка и некоторые свойства тиолактивируемого катепсина из больших полушарий головного мозга и мозжечка быка / В. А. Березин, В. И. Черная, А. Д. Рева, Л. Д. Смагина // Укр. биохим. журн. – 1982. – Т. 54, № 3. – С. 249–253.
18. 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.
19. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol.72. – P. 248–254.
20. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
21. Hirotsu L., Inoue T., Yamamoto K. Age-related changes in activities and localization of cathepsins D, E, B and L in the rat brain tissues // Exp. Neurol. 1994. – Vol. 126. – P. 119–128.

Рецензенти: ***Ковтуненко О.В.,*** д. мед.н., професор;
Іванкова В. С., д.мед.н., професор.

© Чорна В. І., Лянна О. Л., 2012

Дата надходження статті до редколегії 24.12.2012 р.

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

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