

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ»

КОВАЛЬЧУК ЮЛІЯ ПЕТРІВНА

УДК 612.82-884 + 577.112

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ГЛІАЛЬНИХ БІЛКІВ У МОЗКУ ССАВЦІВ

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ТЕРНОПІЛЬ 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Дніпропетровському національному університеті імені Олеся Гончара МОН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Ушакова Галина Олександрівна,
Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара МОН України,
завідувач кафедри біофізики та біохімії

Офіційні опоненти : доктор біологічних наук, професор
Кучмеровська Тамара Муратівна,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник

доктор біологічних наук, професор
Шевцова Алла Іванівна
ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ
України», професор кафедри біохімії та медичної хімії

Захист дисертації відбудеться « 29 » червня 2017 р. о 14 год на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 у ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» зал засідань спеціалізованих вчених рад за адресою: 46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» за адресою: 46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розіслано « 24 » травня 2017 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради К 58.601.04
Кандидат біологічних наук, доцент

Т.Я. Ярошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Астроцити відіграють важливу роль у розвитку та функціях мозку, тому їм приділяють усе більшу увагу за останні два десятиліття (Chandrasekaran A., 2016). Наразі активно розглядається гіпотеза старіння головного мозку, пов'язаного з активацією реактивного астрогліозу та демієлінізацією, в механізмах яких астроцити та олігодендроцити беруть активну участь. Основними білками астрогліальних клітин є кальційзв'язувальний S-100b білок та гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) (Martinez M.A., 2015). У новонароджених радіальна глія і незрілі астроцити експресують, в основному, віментин. На ранніх етапах розвитку в процесі дозрівання нервової тканини віментин у диференційованих астрогліальних клітинах поступово замінюється на ГФКБ (Bramanti V., 2010, Giliarov A., 2009). Останній бере участь у формуванні гліальних філаментів цитоскелета клітини та опосередковано впливає на механізми нейрон-астроцитних взаємодій. Білок S-100b розглядають як один із молекулярних компонентів складних внутрішньоклітинних систем, які забезпечують функціональний гомеостаз клітин мозку шляхом інтеграції різних метаболічних процесів (Glaser N., 2015). Збільшення рівня S-100b викликає активацію деполімеризації проміжних філаментів мозку за рахунок деградації гліального фібрилярного кислого білка (Pelinka L.E., 2004). Процеси старіння мозку пов'язують з порушенням не тільки структури та функцій астроцитів, а й олігодендроцитів також, від якої залежить стан мієлінової оболонки (Buttermore E.D., 2013). Функціями мієлінової оболонки є прискорене проведення нервового збудження, формування опорного молекулярного матриксу аксонів та забезпечення процесів їх трофічного росту, а також підтримка сталості систем міжклітинної комунікації (Snaidero N., 2017). Основний білок мієліну (ОБМ) – структурно-функціональний маркер мієліну. ОБМ входить до складу серозної (білкової) лінії мієліну, утворюючи при цьому щільні інтегративні комплекси зі сфінголіпідами та стабілізує аксони нервових клітин (Ozgen H., 2014). Цей білок специфічний для нервової тканини, зниження його експресії індукує порушення перебігу процесів мієлінізації у мозку (Zuchero J.V., 2015). Порушення мієлінової оболонки спричинює розвиток різних патологічних станів нервової системи.

Дослідження останніх років свідчать, що упродовж нормального онтогенезу розвиток астроглії, як і мієлінізація аксонів у мозку гризунів, починається з 3-4-ї доби постнатального розвитку (Caprariello A.V., 2015). Із досягненням тваринами дворічного віку стан астроглії та мієлінової оболонки зазнає суттєвих змін, що свідчить про поступове старіння організму (Ciftci G., 2012).

Наразі відомі стадії формування астроцитів у різних відділах головного мозку гризунів та людини. У гризунів та у людини терміни розвитку мозку різні. У гризунів гіпокамп закладається на 17-20-й день ембріогенезу, а у людини лише на третьому місяці ембріогенезу та закінчує формуватися в перший день народження. Мозочок починає формуватися на пізніх етапах ембріогенезу та продовжує розвиток у постнатальний період, як у гризунів, так і людини, але у гризунів він повністю формується до 30-го дня онтогенезу, а в людини цей процес відбувається значно довше. Формування рецепторів гравітації, вестибулярного апарату й якості

локомоторної активності залежить від терміну розвитку мозочка. Таламус та кора великих півкуль також закладаються в ході ембріогенезу та завершують формуватися на більш пізніх етапах розвитку.

Важливо зазначити, що період постнатального розвитку гризунів – досить складний та динамічний процес. У ньому умовно можна виділити три етапи: етап раннього постнатального розвитку, етапи зрілості та пізнього постнатального розвитку (період старіння, старечий період). Кожний із цих періодів характеризується певним розвитком гліальних клітин та різним ступенем мієлінізації нервових волокон (Chiba T., 2016). Існують суперечливі дані щодо реактивного астрогліозу: чи є це патологічною ознакою, чи це захисна реакція центральної нервової системи за для збереження енантіостазу.

Гліальні клітини дуже чутливі до будь-якої стресової ситуації та токсикації, які можуть прискорювати процеси старіння. Особливу увагу приділяють ризику накопичення важких металів, що може провокувати розвиток нейродегенеративних захворювань. Але ці питання наразі відносно мало вивчені. Проте відомо, що будь-який стрес супроводжується посиленням окиснювальних процесів. Тому активно досліджуються антиоксиданти різного походження з метою розроблення системи превентивного захисту нервової системи, або корекції за умов наявності порушення центральної нервової системи.

Враховуючи те, що на сьогодні залишається не з'ясованим кількісний розподіл глія-специфічних білків у різних відділах головного мозку гризунів за умов постнатального розвитку та факторів, що прискорюють процеси старіння мозку, актуально дослідити ці біохімічні параметри саме у тварин, яких найчастіше використовують у дослідженнях нейродегенеративних хвороб.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася на кафедрі біофізики та біохімії Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара в межах держбюджетної науково-дослідницької роботи «Використання природних антиоксидантів та продуктів нанотехнологій в якості нейропротекторів за умов несприятливого впливу навколишнього середовища та метаболічних порушень» (номер державної реєстрації 0113U003041), «Молекулярно-біохімічні механізми когнітивного дефіциту мозку та ретинопатії за умов антропогенного навантаження та порушення системи травлення» (номер державної реєстрації 0116U001521) та за угодою про наукову співпрацю між ДНУ імені Олеся Гончара та Університетом м. Люнд (Швеція) (№ 17 від 10.02.15).

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* – визначити кількісний розподіл астро- та олігодендроглія-специфічних білків у різних відділах головного мозку щурів та піщанок під час постнатального розвитку, за впливу стресогенних факторів і дії альфа-кетоглутарату (АКГ).

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:

1) Визначити кількісний розподіл глія-специфічних білків на різних етапах постнатального розвитку головного мозку щурів та піщанок.

2) Оцінити короткотривалий вплив адреналіну на рівень глія-специфічних білків у мозку щурів.

3) Проаналізувати рівень глія-специфічних білків у різних відділах головного мозку щурів за пітуїтрин-ізадринного ушкодження міокарда.

4) Дослідити вплив малих доз кадмію на розподіл астроцит-специфічних білків у різних відділах головного мозку дорослих щурів.

5) Проаналізувати вміст астроцит-специфічних білків у мозку старих тварин за умов дії альфа-кетоглутарату.

Об'єкт дослідження: вікові зміни глії головного мозку у постнатальному розвитку.

Предмет дослідження: вміст астро- та олігодендроглія-специфічних білків: S-100b, гліального фібрилярного кислого білка та основного білка мієліну у різних відділах головного мозку щурів та піщанок у постнатальному розвитку, за впливу стресогенних факторів та дії альфа-кетоглутарату.

Методи дослідження – біохімічні (метод ультрацентрифугування; імуноферментний аналіз; метод визначення загального білка; електрофорез, імуноблотинг); експериментальні моделі (нетривалого впливу адреналіну; пітуїтрин-ізадринного ушкодження міокарда; впливу малих доз кадмію); гістохімічні методи; тестування поведінкових реакцій; статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше встановлено перерозподіл рівня основного білка мієліну, білка S-100b та гліального фібрилярного кислого білка у різних відділах головного мозку щурів та піщанок під час постнатального розвитку, за впливу стресогенних факторів і дії альфа-кетоглутарату.

За результатами проведених досліджень виявлено, що під час постнатального розвитку зміни загального вмісту водорозчинних білків мозку досить схожі у щурів та піщанок, але відрізняються за кількістю залежно від відділу мозку. Рівень кальційзв'язувального S-100b білка збільшується у 4 рази за перші 30 діб та продовжує зростати до 180 діб постнатального розвитку у всіх відділах головного мозку як у щурів, так і піщанок. Відмічено мінімальний рівень гліального фібрилярного кислого білка у новонароджених піщанок і щурів та поступове збільшення його вмісту за розвитку у всіх досліджуваних відділах мозку упродовж формування астроглії, а також значне збільшення його рівня за старіння мозку, що свідчить про активацію реактивного астрогліозу у старих тварин. Визначено характерні особливості коливання вмісту цитоскелетних білків проміжних філаментів у різних відділах головного мозку упродовж постнатального розвитку для щурів та піщанок. Експериментально доведено, що процеси старіння мозку безпосередньо пов'язані з процесами реактивного астрогліозу та демієлінізації, результатом яких є зменшення кількості основного білка мієліну, особливо у мозочку, та збільшення вмісту астроцит-специфічних білків у всіх досліджуваних відділах головного мозку.

Показано, що за короткотривалого впливу адреналіну не відбувається змін вмісту глія-специфічних білків у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів.

Уперше продемонстровано, що за впливу пітуїтрину та ізадрину, що індукує ушкодження міокарда, збільшується рівень як розчинного гліального фібрилярного кислого білка (у мозочку на 20 %, корі великих півкуль на 41 %), так і філаментного

(у мозочку на 18 %, корі великих півкуль на 13 %, таламусі на 14 %, гіпокампі на 23 %). При цьому відбувається також зменшення рівня основного білка мієліну у мозочку на 33 %, таламусі на 51 %, гіпокампі на 27 %.

Експериментально доведено негативний вплив іонів кадмію в дозі 1,0 мкг/кг тіла, що характеризується зменшенням розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка у мозочку на 29 %, а в таламусі на 55 %, та збільшення його філаментної форми у мозочку на 60 %, а в таламусі на 55 %, і може свідчити про розвиток реактивного астрогліозу та ризик розвитку нейродегенеративних порушень.

Уперше виявлено позитивний вплив альфа-кетоглутарату за старіння та пітуїтрин-ізадрин індукованого ушкодження серця, що підтверджено вірогідним зниженням ризику розвитку астрогліозу.

Практичне значення роботи. Отримані результати значно доповнюють сучасні уявлення щодо розподілу глія-специфічних білків у різних відділах головного мозку ссавців на різних етапах постнатального розвитку та факторів ризику, що прискорюють старіння астроцитів і мозку. Установлено зміну рівня астрогліальних та олігодендрогліальних білків за пітуїтрин-ізадрин індукованого ушкодження міокарда, негативного впливу іонів кадмію в дозі 1,0 мкг/кг тіла залежно від відділу мозку щурів, що має не тільки теоретичне, а і практичне значення для оцінювання ризику розвитку нейродегенеративних захворювань.

Зміни вмісту глія-специфічних білків у різних відділах головного мозку – важливий діагностичний показник багатьох патологічних станів центральної нервової системи. Детальніше вивчення змін вмісту гліального фібрилярного кислого білка, S-100b та основного білка мієліну на функції центральної нервової системи за старіння та впливу альфа-кетоглутарату дозволить розробити протокол превентивної нейропротекції.

Результати досліджень упроваджені в навчальну та науково-дослідницьку діяльність студентів, аспірантів і здобувачів Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були особисто представлені на Підсумкових наукових конференціях ДНУ імені Олеся Гончара (Дніпропетровськ, 2014, 2015); X Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (Київ, 2012); III Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 25-річчю біологічного факультету «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2012); X Міжнародному симпозиумі «Биологические механизмы старения» (Харьков, 2012); IX Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів, приуроченій до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського (Львів, 2013); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» (Дніпропетровськ, 2013); VI Міжнародному конгресі Українського товариства нейронаук, присвяченому 90-річчю видатного українського вченого, академіка НАН України та НАМН України П. Г. Костюка (Київ, 2014); X, XI Міжнародним науковим конференціям студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014, 2015); міжнародній науково-практичній

конференції "Сучасні наукові дослідження і розробки: теоретичне значення і практичні результати", (Братислава, Словаччина, 2016); 41st FEBS Congress «Molecular and Systems Biology for a Better Life» (Kusadasi, Turkey, 2016).

Публікації. Результати досліджень опубліковані у 6 статтях (із них 2 цитовані у Scopus) та 10 тезах у профільних вітчизняних та закордонних журналах та матеріалах з'їздів й конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 132 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, основної частини, що містить розділи: «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень», «Обговорення отриманих результатів», висновки та список використаних джерел. Робота ілюстрована 47 рисунками. Перелік використаної літератури включає 149 найменувань (з яких 128 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури проаналізовано сучасні дані щодо структури та функцій глія-специфічних білків. Наведено літературні дані про біохімічні основи старіння астроцитів та фактори ризику, що спричинюють розвиток нейродегенеративних захворювань і прискорюють старіння мозку. Значну увагу приділено наявним відомостям щодо кількісного перерозподілу астроцит-специфічних білків у різних відділах головного мозку гризунів у процесі постнатального розвитку та за впливу стресогенних факторів і дії альфа-кетоглутарату.

Матеріали і методи дослідження. Експериментальну частину роботи проведено на щурах лінії Вістар (72 тварини) та піщанках (Mongolian gerbils, 42 тварини), яких утримували у стандартних умовах віварію. Експерименти на тваринах здійснювали відповідно до Закону України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Модель процесів постнатального розвитку мозку щурів та піщанок. Для даної моделі дослідження було використано 24 щури та 24 піщанки, які були поділені на чотири групи (n = 6) за віком. Перша група – новонароджені тварини, друга – віком 30 днів, третя – 90 днів, четверта – 180 днів.

Модель короткотривалого впливу адреналіну на щурах. Для даної моделі використовували 12 дорослих (чотиримісячних) щурів лінії Вістар. Дослідження виконували за схемою, запропонованою Л. Д. Хідіровою (Хидирова Л.Д., 2010). Тварин було поділено на дві групи (n = 6). Перша група – контрольна, друга – тваринам упродовж 10 днів вводили підшкірно 0,1 % розчин адреналіну по 2 мг/кг маси тіла. Ці групи вивели з експерименту після завершення ін'єкцій адреналіну.

Модель пітуїтрин-ізадринове ушкодження міокарда на щурах. У дослідженні була використана модель, запропонована І.Ф. Беленічевим та ін. (Беленічев І.Ф. и др., 2012). Використано 18 чотиримісячних щурів. Тварин поділено на три групи (n = 6): перша – контрольна (контроль) – тварин утримували за стандартною дієтою, упродовж 10 днів вводили фізіологічний розчин (0,9 % розчин натрій хлориду); друга – пітуїтрин-ізадринове ушкодження міокарда – вводили пітуїтрин (AB

«Endokrininiai», Литва) (внутрішньочеревинно, 100 мг/кг (0,2 мл на одну тварину) + ізадрин (Sigma-Aldrich, USA) (підшкірно, 0,5 ОД/кг (0,4 мл на одну тварину) упродовж 10 днів; третя – після завершення 10-денної експозиції тварин лікували альфа-кетоглутаратом (1 % розчин) упродовж 6 днів (перорально). Тварин другої групи виводили з експерименту після завершення введення пітуїтрину та ізадрину; тварин третьої – після завершення застосування альфа-кетоглутарату.

Упродовж експерименту один раз на тиждень у тварин реєстрували вагу тіла та поведінкові реакції (локомоторну, орієнтовно-дослідницьку активність, грумінг) у відкритому полі методом Буреша (Буреш та ін., 1991).

Модель впливу малих доз кадмію на щурах. Використано 18 дорослих щурів, які були поділені на три групи ($n = 6$): перша – контрольна група тварин, які утримувалися в стандартних умовах, зі стандартною дієтою, друга – з додаванням до стандартної дієти кадмію дозою 0,1 мкг/кг маси тіла, третя – з додаванням кадмію дозою 1 мкг/кг маси тіла. Експериментальним тваринам кадмій давали з питною водою упродовж 37 днів. У всіх тварин був вільний доступ до їжі та води.

Модель дослідження дії альфа-кетоглутарату на перерозподіл астроцит-специфічних білків у процесі старіння піщанок. Для даної моделі використовували 18 піщанок, котрі були поділені на три групи ($n = 6$): перша – дорослі (6 місяців), друга – старі (2 роки) тварини зі стандартною дієтою, третя – старі тварини з дієтою, що містила 2 % альфа-кетоглутарат у сухому кормі упродовж шести місяців.

Для оцінювання розподілу білків, які різняться за місцем локалізації, були отримані різні фракції, що містили водорозчинні, мембранні та цитоскелетні білки, за допомогою диференційного центрифугування.

Кількісне визначення гліальних білків здійснювали методом імуноферментного аналізу [Нго та ін., 1988] з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл до ГФКБ («Boehringer Mannheim», Німеччина), S-100b («Sigma-Aldrich», США) та ОБМ («Santa Cruz Biotechnology», США) відносно відповідних стандартних білків (ГФКБ, S-100b, ОБМ) та антитіл проти IgG кролів та проти IgG кози, мічених пероксидазою хрому («Sigma», США та («Santa Cruz Biotechnology», США). Кількість загального білка в отриманих екстрактах із різних відділів мозку тварин визначали методом Бредфорд (Bradford, 1976). Дослідження поліпептидного складу астроцит-специфічних білків проводили методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності додецилсульфату натрію (ДСН) за Леммлі (Lemmlí U.K., 1970). Серед білків, що були розділені під час електрофорезу, специфічні білки визначали методом імуноблотингу (Nedzvetskiy V.S., 2011). Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакетів прикладних програм «Microsoft® Excel 2000» (Microsoft®), «STATISTICA® for Windows 13.0» (StatSoft Inc.). Статистичну обробку результатів проведено за однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA) та t-критерієм Стьюдента. Статистично значимими вважалися дані за $P < 0,05$ (Лакин Г.Ф., 1990).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст астроцит-специфічних білків на різних етапах розвитку головного мозку щурів та піщанок. Наші дослідження спрямовані на порівняльну оцінку рівня астроцит-специфічних білків у мозочку, гіпокампі та таламусі щурів та

піщанок у процесі постнатального розвитку.

Установлено, що зміни вмісту білка S-100b упродовж постнатального розвитку у всіх досліджуваних відділах головного мозку піщанок схожі як і у щурів (рис. 1), але сам вміст нижчий ніж у щурів. Вміст S-100b у мозочку новонароджених піщанок становив $0,08 \pm 0,003$ мкг/100 мг тканини, у гіпокампі $0,05 \pm 0,001$ мкг/100 мг тканини, у таламусі $0,06 \pm 0,005$ мкг/100 мг тканини. У новонароджених щурів вміст S-100b був майже вдвічі більший: у мозочку становив $0,18 \pm 0,03$ мкг/100 мг тканини, гіпокампі – $0,09 \pm 0,04$ мкг/100 мг тканини, таламусі – $0,15 \pm 0,01$ мкг/100 мг тканини.

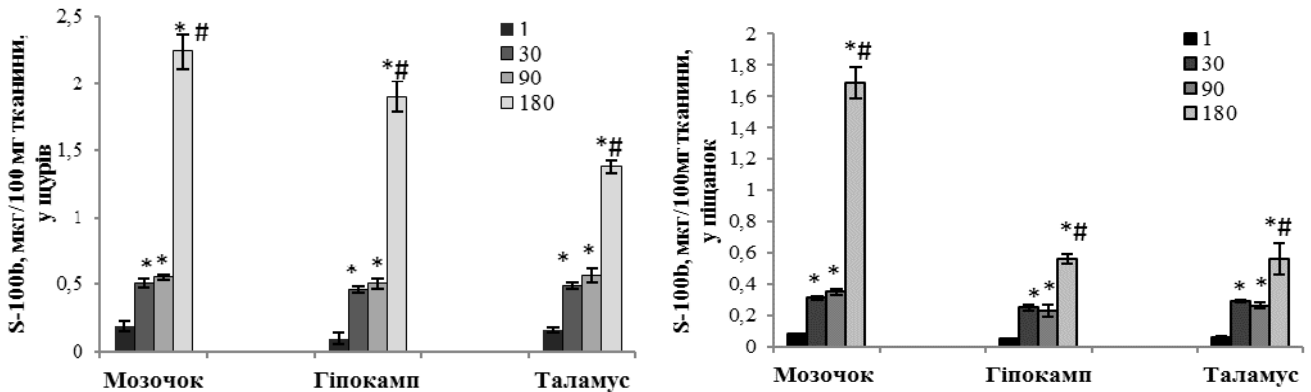


Рис. 1. Вміст білка S-100b у різних відділах головного мозку щурів та піщанок упродовж постнатального розвитку. Примітка: 1, 30, 90 та 180 днів розвитку, $n=6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з 1-м днем; # – $p < 0,05$ відносно 90 днів

На 30-й день постнатального розвитку у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів та піщанок установлено збільшення білка S-100b майже у 4 рази, а на 90-й день суттєвих змін відносно 30-ї доби не виявлено. Проте було суттєве збільшення білка S-100b у тварин віком 180 днів у мозочку, гіпокампі та таламусі.

Рівень гліального фібрилярного кислого білка досліджували в отриманих із мозку цитозольних та цитоскелетних фракціях, оскільки цей білок має дві форми: розчинну та філаментну. Виявлено малу кількість як розчинної (рис. 2), так і філаментної (рис. 3) форми ГФКБ у новонароджених щурів та піщанок у всіх досліджуваних відділах головного мозку. На 30-й день життя тварин установлено статистично значиме збільшення розчинного та філаментного ГФКБ у мозочку, гіпокампі та у таламусі, причому найвищий рівень рГФКБ був у таламусі, а фГФКБ – у гіпокампі піщанок та у мозочку щурів. У 90-денних тварин установлено статистично значиме збільшення кількості рГФКБ лише у мозочку: в щурів – у 2,5 рази, та у піщанок – у 1,5 рази. Щодо філаментного ГФКБ, то на 90-й день розвитку установлено значне збільшення кількості цього білка в щурів у гіпокампі у 4,5 рази та у таламусі у 4 рази порівняно з 30-денними, в той час як у піщанок рівень цього білка вірогідно збільшувався у мозочку та таламусі. На 180-й день розвитку виявлено статистично значиме збільшення розчинного ГФКБ у щурів у всіх досліджуваних відділах головного мозку, а у піщанок – лише в таламусі.

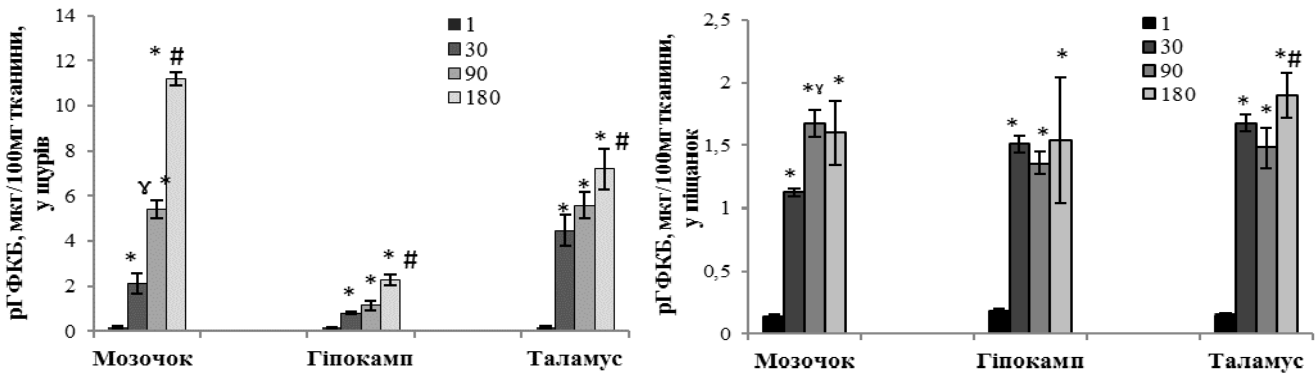


Рис. 2. Вміст розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка у різних відділах головного мозку щурів та піщанок упродовж постнатального розвитку. Примітка: 1, 30, 90 та 180 днів розвитку. $n = 6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з 1-м днем; γ – $p < 0,05$ відносно 30 днів; # – $p < 0,05$ відносно 90 днів.

Філаментний ГФКБ на 180-й день розвитку також збільшувався у всіх відділах головного мозку щурів, у той час як у піщанок спостерігали збільшення цього білка лише у таламусі, а в мозочку та гіпокампі виявлено статистично значиме зменшення рівня фГФКБ.

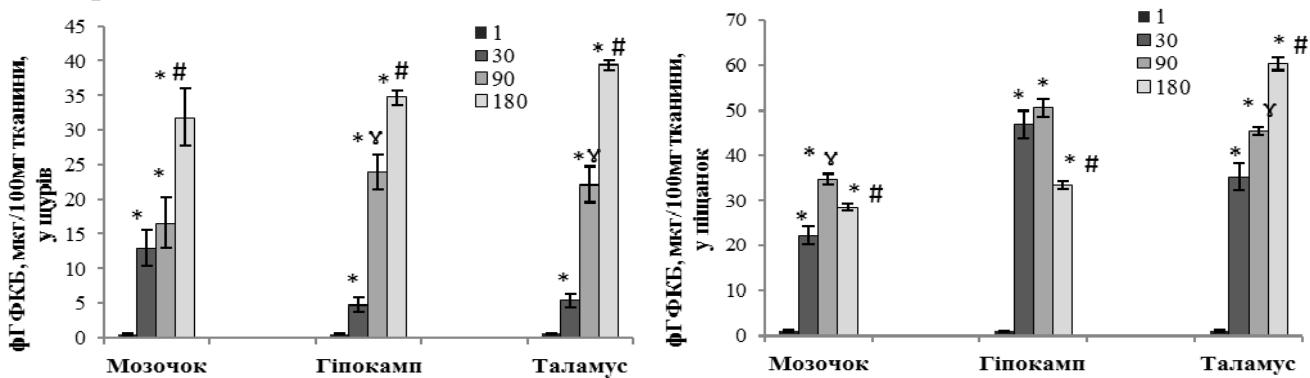


Рис. 3. Вміст філаментної форми гліального фібрилярного кислого білка у різних відділах головного мозку щурів та піщанок упродовж постнатального розвитку. Примітка: 1, 30, 90 та 180 днів розвитку. $n = 6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з 1-м днем; γ – $p < 0,05$ відносно 30 днів; # – $p < 0,05$ відносно 90 днів.

Відомо, що процеси старіння мозку безпосередньо пов'язані з процесами демієлінізації, наслідком яких є зменшення кількості мієліну. В результаті наших досліджень в одностатевих щурів виявлено мінімальну кількість основного білка мієліну у всіх досліджуваних відділах головного мозку (рис. 4). Згідно з отриманими даними, вміст ОБМ значно збільшувався упродовж першого місяця розвитку тварин. У мозочку 30-денних щурів вміст основного білка мієліну становив $4,56 \pm 0,28$ мкг/100 мг тканини, у таламусі $1,99 \pm 0,42$ мкг/100 мг тканини, у гіпокампі $0,63 \pm 0,08$ мкг/100 мг тканини. На 90-й день постнатального розвитку тварин встановлено стрімке збільшення рівня ОБМ у гіпокампі до $2,29 \pm 0,72$ мкг/100 мг тканини. Таке збільшення рівня досліджуваного білка можна пояснити процесами швидкої мієлінізації нервових волокон у складі CA1- та CA3-зон гіпокампа. У

таламусі встановлено лише тенденцію до збільшення рівня досліджуваного білка на 90-й день розвитку, що свідчить про уповільнення процесів мієлінізації у таламусі.

Вміст ОБМ у мозочку 30-денних щурів найвищий серед інших відділів головного мозку. Після народження тварин процеси мієлінізації розпочинаються у всіх відділах мозку й досягають максимуму на 30-ту добу постнатального розвитку, за винятком гіпокампа. Однак у мозочку інтенсивність мієлінізації починає знижуватися на 90-ту добу постнатального розвитку до рівня $3,08 \pm 0,57$ мкг/100 мг тканини, що може вказувати на початок демієлінізації аксонів білої речовини мозочка. Вміст ОБМ на 180-й день постнатального розвитку мав тенденцію до зменшення у всіх досліджуваних відділах головного мозку гризунів.

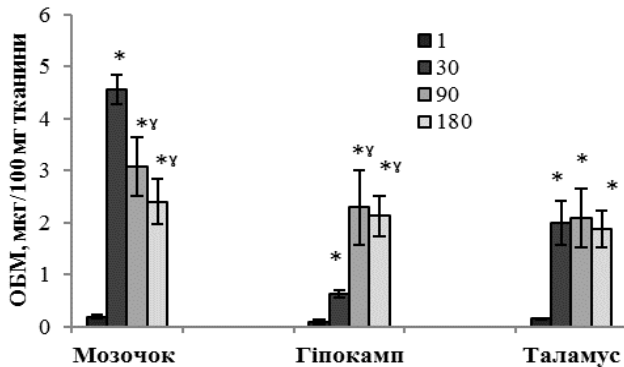


Рис. 4. Вміст основного білка мієліну в різних відділах головного мозку щурів упродовж постнатального розвитку. Примітка: 1, 30, 90 та 180 днів розвитку. $n = 6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з 1-м днем; γ – $p < 0,05$ відносно 30 днів

Отримані дані вказують на те, що під час старіння не всі відділи головного мозку зазнають демієлінізації.

Вміст астроцит-специфічних білків у мозку щурів за короткотривалого впливу адреналіну. Отримані експериментальні дані свідчать, що за введення розчину адреналіну підшкірно не відбувалось вірогідних змін рівню білка S-100b у досліджуваних відділах мозку щурів (рис. 5).

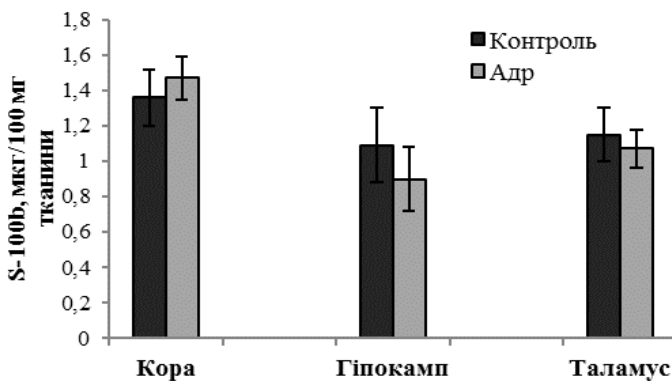


Рис. 5. Рівень S-100b білка в різних відділах мозку дорослих щурів. Примітка: Контроль – контрольна група тварин, Адр. – отримували підшкірно 0,1 % розчин адреналіну в дозі 2 мг/кг маси 1 раз на добу упродовж 10 днів; $n = 6$

Тобто за короткотривалого впливу адреналіну шляхом підшкірних ін'єкцій змін у розподілі кальційзв'язувального білка S-100b у мозку досліджуваних щурів не відбувалось, хоча за даними електрокардіографії у них визначався розвиток слабкої ішемії серця. Можливо, характер уведення адреналіну (підшкірно) та швидкість напівжиття даного гормону не дають підґрунтя для зміни метаболізму цього білка у визначених відділах мозку щурів. Вірогідних змін кількості ГФКБ та ОБМ за даної схеми введення адреналіну також не було виявлено.

Перерозподіл астроцит-специфічних білків у різних відділах головного мозку щурів за пітуїтрин-ізадринного ушкодження міокарда. Вірогідні зміни

рівня білка S-100b в умовах розвитку застосованої моделі ушкодження серця реєстрували лише у мозочку (рис. 6), в інших відділах спостерігали статистично не значиме зниження рівня цього білка у щурів.

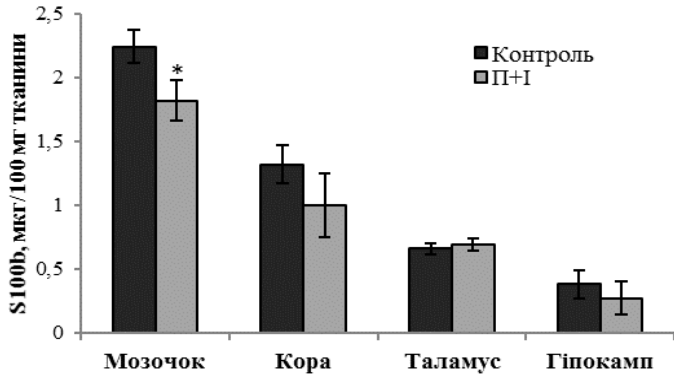


Рис. 6. Рівень S-100b білка в цитозольних фракціях, отриманих із різних відділів головного мозку щурів за пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда. ($n = 6$); * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з контролем

У мозочку контрольної групи тварин вміст S-100b білка становив $2,24 \pm 0,13$ мкг/100 мг тканини, а у дослідних щурів за впливу пітуїтрину та ізадрину рівень цього білка знижувався до $1,82 \pm 0,16$ мкг /100 мг тканини.

Результати дослідження рівня ГФКБ за пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця свідчать про статистично значиме збільшення рівня розчинної форми у мозочку та у корі великих півкуль та рівня філаментної форми ГФКБ у всіх досліджуваних відділах головного мозку порівняно з контрольною групою (рис. 7).

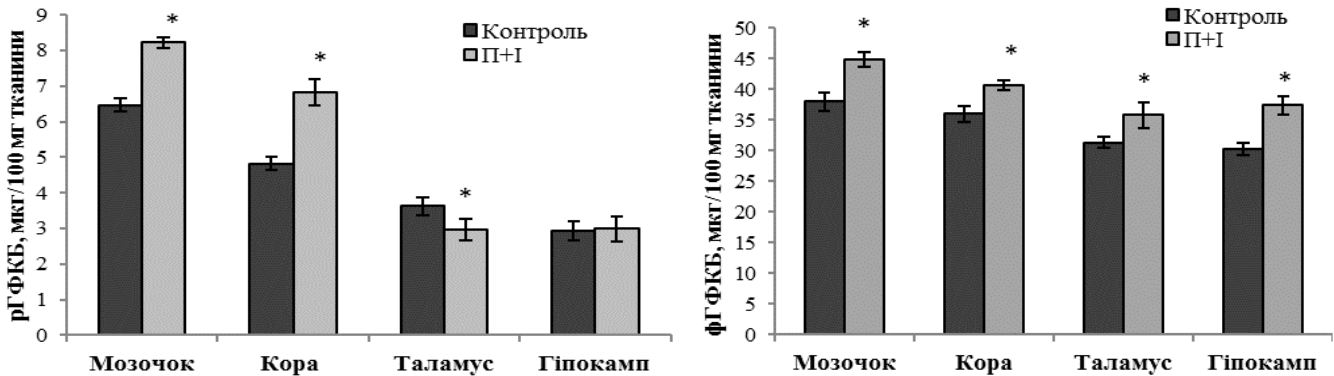


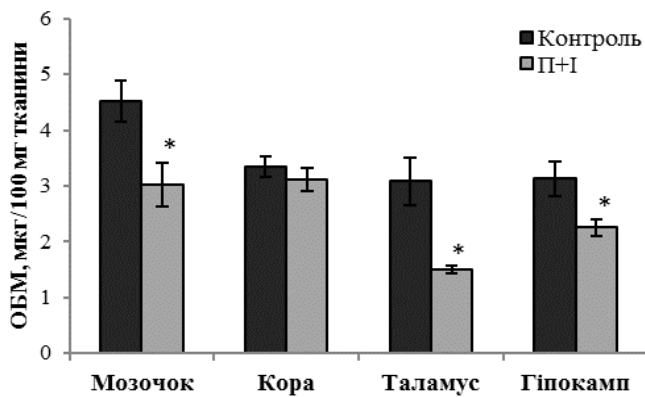
Рис. 7. Рівень ГФКБ у цитозольній та цитоскелетній фракціях, отриманих із різних відділів головного мозку щурів за пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда. Примітка: $n = 6$; * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з контролем

У мозочку контрольної групи щурів рівень рГФКБ становив $6,47 \pm 0,18$ мкг/100 мг тканини, а за пітуїтрин-ізадринового ушкодження виявлено збільшення рівня дослідного білка до $8,22 \pm 0,1$ мкг/100 мг тканини. У корі великих півкуль у контрольній групі рівень розчинної форми ГФКБ складає $4,83 \pm 0,18$ мкг/100 мг тканини, за впливу пітуїтрину та ізадрину встановлено збільшення до $6,81 \pm 0,36$ мкг/100 мг тканини. У таламусі в контрольній групі вміст розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка складав $3,63 \pm 0,25$ мкг/100 мг тканини, за пітуїтрин-ізадринового ушкодження встановлено зменшення до рівня $2,97 \pm 0,32$ мкг/100 мг тканини. У гіпокампі за впливу пітуїтрину та ізадрину значних змін не встановлено порівняно з контролем. У цитоскелетній фракції кори великих

півкуль спостерігали підвищення філаментного ГФКБ у групі тварин за впливу пітуїтрину та ізадрину ($40,62 \pm 0,79$ мкг/100 мг тканин) на 13 % відносно контрольної групи ($35,96 \pm 1,32$ мкг/100 мг тканин). Рівень філаментного ГФКБ в гіпокампі підвищувався за впливу пітуїтрину та ізадрину ($37,37 \pm 1,43$ мкг /100 мг тканин) на 23 % порівняно з контрольною групою ($30,27 \pm 0,95$ мкг/100 мг тканин).

Отримані дані свідчать про розвиток астрогліозу за впливу пітуїтрину та ізадрину, що підтверджується збільшенням рівня філаментного ГФКБ у всіх досліджуваних відділах мозку.

Установлено статистично значиме зменшення рівня основного білка мієліну у мозочку, таламусі та гіпокампі (рис. 8). У корі великих півкуль зменшення вмісту білка було статистично не значимим. У мозочку, таламусі та у гіпокампі установлено зменшення ОБМ на 33 %, 53 % та 30 %, відповідно, порівняно з контрольною групою.



*Рис. 8. Рівень ОБМ, отриманого із різних відділів головного мозку щурів за пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда. Примітка: $n = 6$; * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з контролем*

Згідно з отриманими даними, вміст ОБМ у контрольній групі щурів становив у мозочку – $4,52 \pm 0,36$ мкг/100 мг тканини, корі – $3,34 \pm 0,19$ мкг/100 мг тканини, таламусі – $3,08 \pm 0,43$ мкг/100 мг тканини та гіпокампі – $3,13 \pm 0,31$ мкг/100 мг тканини, відповідно. За впливу пітуїтрину та ізадрину установлено такі показники: мозочок – $3,03 \pm 0,39$ мкг/100 мг тканини, кора – $3,12 \pm 0,21$ мкг/100 мг тканини, таламус – $1,50 \pm 0,07$ мкг/100 мг тканини та гіпокамп – $2,25 \pm 0,15$ мкг/100 мг тканини відповідно.

Зміна вмісту астроцит-специфічних білків за дії малих доз кадмію. За тривалого застосування стандартної дієти разом із додаванням кадмію у питну воду в дозі 0,1 мкг/кг маси тіла упродовж 37 діб у всіх досліджуваних відділах мозку щурів спостерігали схожу тенденцію до зниження рівня розчинної форми ГФКБ (рис. 9). Збільшення вмісту кадмію у питній воді до 1,0 мкг/кг маси тіла упродовж 37 діб викликало більш значне зменшення рівня розчинного ГФКБ у всіх відділах головного мозку: у мозочку установлено зменшення на 29 % порівняно з контролем, а у таламусі – на 55 %. У той же час за хронічного впливу кадмію в дозі 1,0 мкг/кг маси тіла спостерігалось значне зростання рівня філаментної форми цього цитоскелетного білка: в мозочку і таламусі зростання вмісту ГФКБ на 60 % і 55 %, відповідно.

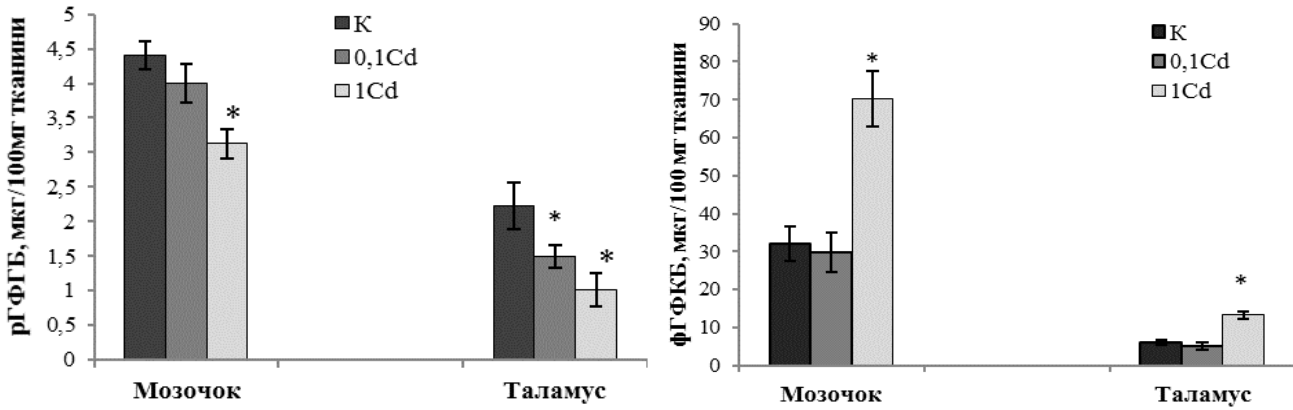


Рис. 9. Вміст розчинної та філаментної форми гліального фібрилярного кислого білка в мозочку та таламусі щурів за впливу кадмію упродовж 37 діб у дозах 0,1 та 1 мкг/кг маси тіла. Примітка: $n = 6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з контролем (К)

Результати імуноблотингу вказують на відсутність суттєвої деградації розчинного ГФКБ за впливу іонів кадмію (рис. 10).

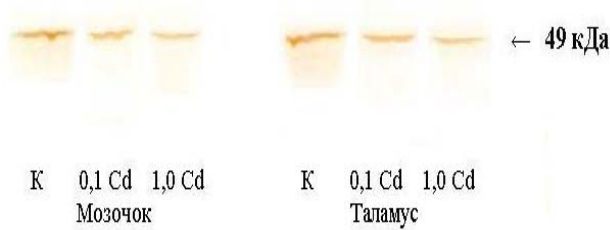


Рис. 10. Імуноблотинг проти ГФКБ у цитозольних фракціях, отриманих із мозочка та таламуса щурів. Примітка: К – контрольна група, 0,1 та 1,0 Cd – групи тварин за впливу різних доз $CdCl_2$

За впливу кадмію в дозі 1,0 мкг/кг маси тіла у мозочку та гіпоталамусі визначаються низькомолекулярні поліпептидні фрагменти філаментного ГФКБ, в той час як у групі щурів, які отримували кадмій в дозі 0,1 мкг/кг маси тіла, та контрольної групи не було виявлено таких фрагментів (рис. 11).

Враховуючи той факт, що надмірна експресія гена ГФКБ є надійним маркером астрогліозу, виявлене в нашому дослідженні зростання вмісту філаментної форми ГФКБ вказує на активацію астроцитів у відповідь на ушкоджувальну дію іонів кадмію.

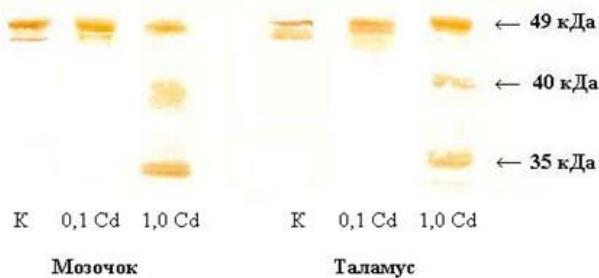


Рис. 11. Імуноблотинг проти ГФКБ у філаментних фракціях, отриманих із мозочка та таламуса щурів. Примітка: К – контрольна група, 0,1 та 1,0 Cd – групи тварин за впливу різних доз $CdCl_2$

У результаті досліджень встановлено, що за впливу кадмію дозою 0,1 мкг/кг маси тіла упродовж 37 діб значних змін рівня S-100b білка не виявлено в жодному з

досліджуваних відділів головного мозку (рис. 12). У випадку збільшення дози кадмію до 1,0 мкг/кг маси тіла упродовж 37 діб спостерігали статистично значиме збільшення рівня S-100b білка в мозочку до $4,37 \pm 0,45$ мкг/100 мг тканини, таламусі – до $1,48 \pm 0,24$ мкг/100 мг тканини.

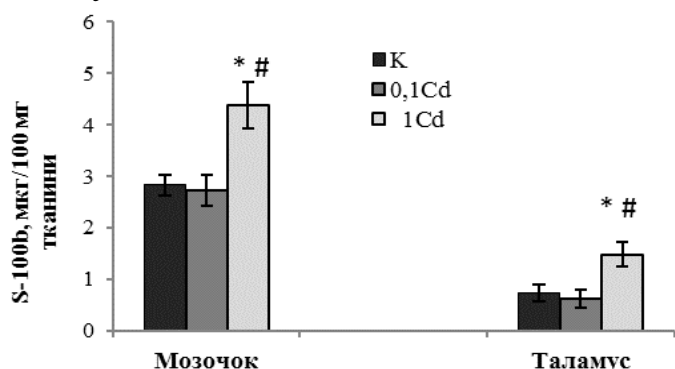


Рис. 12. Вміст білка S-100b у різних відділах головного мозку щурів за впливу CdCl_2 упродовж 37 діб у дозах 0,1 та 1 мкг/кг маси тіла тварини. Примітка: $n = 6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з контролем(К), # – $p < 0,05$ відносно 0,1 CdCl_2

Статистично значиме збільшення рівня білка S-100b, можливо, відбувалося за рахунок збільшення кількості астрогліальних клітин у результаті розвитку астрогліозу.

Дослідження дії альфа-кетоглутарату у процесі старіння піщанок. За даними деяких дослідників, продемонстровано позитивний вплив АКГ на відновлення метаболізму нейронів та астроцитів (Фоменко О. З., 2011). З метою запобігання процесів старіння мозку ми проаналізували можливість використання альфа-кетоглутарату як нейропротектора. Отримані нами дані вказують на те, що для старих піщанок додавання до корму 2 % АКГ упродовж 6 місяців спричинювало збільшення рівня розчинного ГФКБ у гіпокампі піщанок до $5 \pm 0,33$ мкг/100 мг тканини (рис. 13).

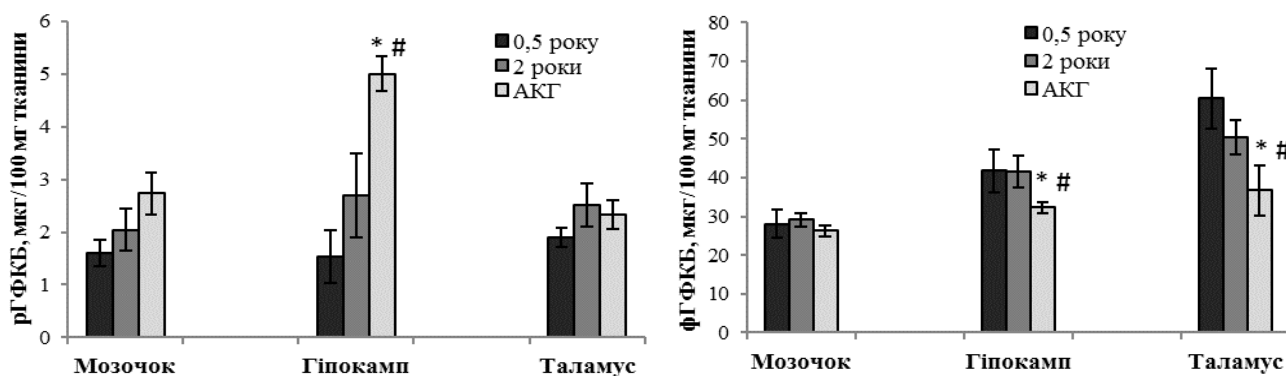


Рис. 13. Вміст розчинної та філаментної форми гліального фібрилярного кислого білка в різних відділах головного мозку старих піщанок. Примітка: 0,5 року – піврічні тварини зі стандартним раціоном; 2 роки – дворічні тварини зі стандартним раціоном, АКГ – дієта старих тварин (2 роки) із додаванням до корму 2 % альфа-кетоглутарату упродовж останніх 6 місяців; $n = 6$, * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з дорослими тваринами, # – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно зі старими тваринами

У мозочку та у таламусі вміст рГФКБ вірогідно не змінювався порівняно з дворічними тваринами, які не вживали АКГ. На тлі зростання кількості розчинної

форми ГФКБ за умов застосування АКГ у старих тварин встановлено гальмування полімеризації ГФКБ у гіпокампі та таламусі. У старих тварин вміст філаментного ГФКБ у таламусі становив $50,44 \pm 4,4$ мкг/100 мг тканини, а застосування 2 % АКГ упродовж тривалого часу викликало зменшення рівня цього білка до $36,7 \pm 6,6$ мкг/100 мг тканини. У гіпокампі дворічних піщанок вміст досліджуваного білка встановлено на рівні $41,5 \pm 4,03$ мкг/100 мг тканини, а за впливу 2 % АКГ виявлено зменшення до $32,3 \pm 1,4$ мкг/100 мг тканини.

Рівень S-100b у мозочку та таламусі старих піщанок не змінювався залежно від використаної дієти та порівняно з тваринами віком 0,5 року (рис. 14).

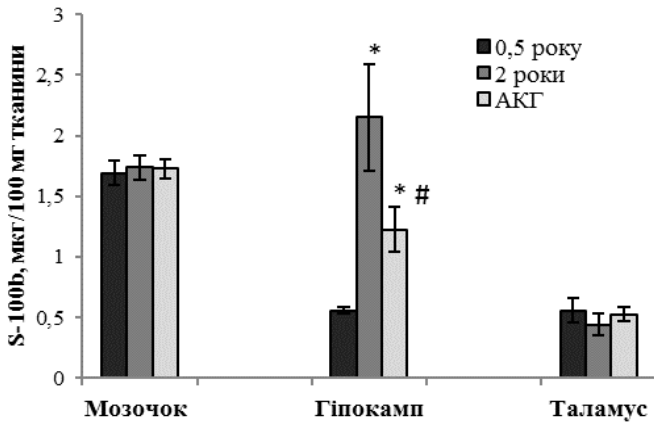


Рис. 14. Вміст білка S-100b у різних відділах головного мозку старих піщанок. Примітка: 0,5 року – піврічні тварини зі стандартним раціоном; 2 роки – дворічні тварини зі стандартним раціоном, АКГ – дієта старих тварин (2 роки) із додаванням до корму 2 % альфа-кетоглутарату упродовж останніх 6 місяців; $n = 6$; * – вірогідність відмінностей $p < 0,05$ порівняно з дорослими тваринами, # – $p < 0,05$ відносно старих тварин

Але застосування 2 % альфа-кетоглутарату в сухому кормі упродовж 6 місяців гальмувало гіперактивацію астроцитів у гіпокампі старих тварин, у яких вміст S-100b у гіпокампі становив $2,15 \pm 0,44$ мкг/100 мг тканини, а за внесення 2 % АКГ до тривалої дієти викликало зменшення його рівня майже вдвічі до $1,22 \pm 0,18$ мкг/100 мг тканини.

Дослідження дії альфа-кетоглутарату за пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда. Дослідження рівня розчинної форми ГФКБ за застосування альфа-кетоглутарату у разі пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця вказують на статистично значиме зменшення рівня рГФКБ у мозочку до $5,2 \pm 0,26$ мкг/100 мг тканини, корі великих півкуль до $3,6 \pm 0,32$ мкг/100 мг тканини, гіпокампі до $2,29 \pm 0,15$ мкг/100 мг тканини. Вміст філаментного ГФКБ за дії АКГ достовірно зменшувався у всіх досліджуваних відділах головного мозку порівняно з пітуїтрин-ізадриновим ушкодженням і досягав рівня контролю. У досліджуваних відділах головного мозку щурів (за винятком мозочка) було встановлено лише направленість до зменшення рівня білка S-100b, але дані були статистично не значимі.

Дослідження рівня основного білка мієліну показало, що за впливу альфа-кетоглутарату за даної моделі ушкодження серця щурів фактично не спостерігали відновлення вмісту цього білка до нормального рівня. У мозочку у разі застосування альфа-кетоглутарату вміст ОБМ відносно контрольної групи був значно нижчим. Звідси видно, що використана доза АКГ та термін не достатні для відновлення вмісту ОБМ у мозочку в постішемичний період. У корі великих півкуль та у гіпокампі встановлено направленість до зменшення рівня ОБМ за впливу альфа-

кетоглутарату. У таламусі у випадку введення альфа-кетоглутарату наявне невелике підвищення вмісту білка до $1,93 \pm 0,23$ мкг/100 мг тканини, що може свідчити про поступовий процес регенерації ушкоджених структур мозку.

Нейропротекторна дія АКГ узгоджувалася із даними дослідження поведінки дослідних тварин у відкритому полі після впливу пітуїтрину та ізадрину. У разі застосування АКГ тварини відновлювали свою поведінкову активність: зазначено збільшення кількості перетину ліній, заглядань у нірку та вертикальних стійок.

Обговорення. Отримані дані показують, що є специфіка змін як загального пулу білків у досліджуваних відділах, так і вмісту глія-специфічних білків у різних відділах мозку піщанок та щурів залежно від терміну постнатального розвитку та старіння мозку. Установлено, що у піщанок рівень астроцит-специфічних білків майже удвічі менший, ніж у щурів. Також виявлено різний характер кількісного перерозподілу цих білків у процесі постнатального розвитку, особливо у мозочку та у гіпокампі, тому, проводячи експерименти на тваринах, потрібно враховувати ці особливості. Виявлено, що під час старіння активні процеси демієлінізації характерні не для всіх відділів головного мозку.

Процеси старіння головного мозку провокуються також наявністю стресогенних факторів. Відповідно до отриманих нами результатів, короткотривале введення адреналіну не викликає значних змін кількості глія-специфічних білків. Довготривалі гіпоксичні ефекти, які спричинюють порушення забезпечення нейронів киснем, одночасно зумовлюють зниження реактивності нейронів, адаптивні зміни в астроглії та демієлінізації.

За пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця, що провокує розвиток гіпоксії мозку, спостерігається збільшення кількості астроцит-специфічних білків та зменшення кількості основного білка мієліну, що може свідчити про розвиток астрогліозу. Показано, що малі дози кадмію не викликають значних змін вмісту білків у астроцитах, але у разі збільшення дози кадмію відбувається реактивація астроцитів, що свідчить про розвиток астрогліозу.

Установлені ефекти дії на глію альфа-кетоглутарату, який розглядають як один із позитивних препаратів, що може уповільнити процеси старіння. Відомо, що альфа-кетоглутарат бере участь у забезпеченні клітин енергією, а також у метаболізмі амінокислот і білків. Наразі альфа-кетоглутарат активно вивчається у руслі поліпшення загального функціонального стану організму. Однак детальні механізми дії альфа-кетоглутарату як харчової добавки досі залишаються не з'ясованими. У результаті наших досліджень установлено, що цей препарат може гальмувати розвиток астрогліозу за умов старіння та розвитку гіпоксії мозку, а також позитивно впливати на відновлення поведінкової реакції за пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця.

ВИСНОВКИ

Досліджено розподіл астро- та олігодендро-гліальних білків у мозку щурів та піщанок залежно від терміну постнатального розвитку та відділу мозку, а також за впливу адреналіну, пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда та тривалого впливу іонів кадмію. Показано, що за пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда та тривалого впливу іонів кадмію відбувається індукція реактивного астрогліозу та

дем'єлінізація. Установлено позитивний ефект альфа-кетоглутарату на гліальні клітини за старіння та пітуїтрин-ізадринного ушкодження міокарда.

1. У ході постнатального розвитку у мозку як щурів, так і піщанок виявлено подібний характер змін загального вмісту цитозольних та цитоскелетних білків, при цьому відмічено збільшення водонерозчинних білкових агрегатів упродовж старіння мозку.

2. Установлено зміни вмісту кальційзв'язувального S-100b білка, гліального фібрилярного кислого білка та основного білка мієліну залежно від відділу мозку та терміну постнатального розвитку й старіння мозку. За старіння мозку в мозочку активується реактивний астрогліоз та дем'єлінізація.

3. За короткотривалого впливу 0,1 % розчину адреналіну в дозі 2 мг/кг маси тіла щодобово упродовж 10 діб у щурів не відбувалося змін у розподілі астроцит-специфічних білків.

4. Пітуїтрин-ізадринне ушкодження серця провокує розвиток реактивного астрогліозу в мозку щурів, що підтверджується збільшенням вмісту як розчинного, так і філаментного гліального фібрилярного кислого білка. При цьому установлено процеси дем'єлінізації у мозочку, таламусі та гіпокампі, що супроводжується зниженням рівня основного білка мієліну.

5. Хлорид кадмію в дозі 0,1 мкг/кг тіла упродовж 37 діб не впливав на загальний пул білків та вміст гліального фібрилярного кислого білка в мозку щурів, однак у дозі 1,0 мкг/кг тіла викликав зменшення розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка та збільшення його філаментної форми у мозочку та у таламусі, що може свідчити про розвиток реактивного астрогліозу та ризик розвитку нейродегенеративних порушень.

6. Застосування альфа-кетоглутарату в дозі 1 % у питній воді упродовж 6 діб після пітуїтрин-ізадринного ушкодження міокарда у щурів та в дозі 2 % у кормі під час годування старих піщанок упродовж 6 місяців пригнічувало розвиток астрогліозу в мозку.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. The changes of glial fibrillary acid protein level in the different brain areas of gerbils under development, aging and alpha-ketoglutarate effect / *Y.P. Kovalchuk, G.A. Ushakova* // *Medical and clinical chemistry J.* – 2016. – V. 18, № 1. – P. 29–35. *(Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).*

2. Aging-related peculiarities of the distribution of myelin basic protein in cerebral structures of gerbils / *Yu.P. Kovalchuk, A.Ye. Zhdankin, G.O. Ushakova* // *Neurophysiology.* – 2015. – V. 47, № 2. – P. 165–167. *(Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).*

3. Distribution of glial fibrillary acidic protein in different parts of the rat brain under cadmium exposure / *Y.P. Kovalchuk, I.V. Prischepa, U. Ci, V.S. Nedzvetskiy, Y.G. Kot, E.E. Perskiy, G.A. Ushakova* // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – V. 87, № 3. – P. 80–87. *(Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).*

4. Вплив короткотривалої дії адреналіну на рівень протеїну S-100b та НМКА у різних відділах головного мозку щурів / Ю.П. Ковальчук, О.О. Довбань, А.М. Канга, Г.О. Ушакова // *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine.* – 2015. – V. 6, № 2. – P. 119–124. *(Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).*

5. Зміна рівня S-100b протеїна у різних відділах мозку піщанок за умов старіння та дії альфа-кетоглутарату / Ю.П. Ковальчук, Г.О. Ушакова // *Вісник Харківського національного університету ім. Каразіна. Серія «Біологія», Харків.* – 2015. – Вип. 24, №1153. – С. 187–191. *(Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).*

6. The multipotent role of metallothionein in the nervous system / G.A. Ushakova, Y.P. Kovalchuk // *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.* – 2013. – V. 21, № 2. – P. 113–119. *(Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).*

7. Distribution soluble form glial fibrillar acidic protein in different parts of the brain gerbils during development and aging / Y.P. Kovalchuk, G.A. Ushakova // *Molecular and Systems Biology for a Better Life: 41st FEBS Congress, September 03–08, 2016: Congress materials.* – Kusadasi, Turkey. – 2016. – V. 283. – P. 323.

8. Розподіл ГФКП у різних відділах головного мозку за ізадрин-пітуїтринової моделі ішемії у щурів / О.О. Довбань, Ю.П. Ковальчук, Г.О. Ушакова // *Молодь і поступ біології: XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, 19–21 квітня, 2016 р. : матеріали конф.* – Львів, 2016. – С. 33.

9. The myeline basic proteine level in the different brain areas of rats under izadryn-pituyitryn model of ischemia / Y. Kovalchuk, G. Ushakova // *Modern scientific researches and developments: theoretical value and practical results: International scientific and practical conference, March 15–18, 2016: conf. materials.* – Bratislava, Slovak Republic. – 2016. – P. 183–184.

10. Перерозподіл S-100b у різних відділах головного мозку гербелів під час онтогенезу / Ю.П. Ковальчук, Г.О. Ушакова // *Актуальні проблеми фундаментальних наук: I міжнародна наукова конференція, 30 травня – 3 червня, 2015р. : матеріали конф.* – Луцьк, 2015. – С. 344–347.

11. Короткотривалий вплив адреналіну на рівень білків S-100b та NCAM у різних відділах головного мозку щурів / А.Є. Жданкін, О.О. Довбань, Ю.П. Ковальчук, Г.О. Ушакова // *III міжнародний форум студентів, аспірантів і молодих учених, 23–24 квітня 2015 р. : матеріали конф.* – Дніпропетровськ, 2015. – С. 377–378.

12. Зміна вмісту гліального фібрилярного кислого білка у різних відділах головного мозку щурів за умов впливу кадмію / Ю.П. Ковальчук, Г.О. Ушакова // *Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України: I Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю, 8–9 жовтня 2014 р. : матеріали конф.* – Дніпропетровськ, 2014. – С. 20–22.

13. Зміна вмісту розчинної форми гліального фібрилярного кислого білка у різних відділах головного мозку щурів за умов впливу кадмію / *Ю.П. Ковальчук, У Сі, Г.О. Ушакова* // Фізичні методи в екології, біології та медицині: V наукова конференція, 18–21 вересня, 2014р. : матеріали конф. – Львів-Ворохта, 2014. – С.134–137.

14. Розподіл основного білка мієліну у різних відділах мозку гербелів за умов старіння / *Ю.П. Ковальчук, А.Є. Жданкін, Г.О. Ушакова* // VI Конгрес Українського товариства нейронаук, 4–8 червня, 2014 р. : матеріали конгр. – Київ, 2014. – С.72–73.

15. Розподіл основного білка мієліну у різних відділах мозку щурів протягом постнатального розвитку / *Ю.П. Ковальчук, Г.О. Ушакова* // Молодь і поступ біології: X міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, 8–11 квітня, 2014 р. : матеріали конф. – Львів, 2014. – С. 26–27.

16. Изменение продукции астроглиальных белков при старении / *Ю.П. Ковальчук, Я.В. Бабец, Г.А. Ушакова* // Теоретические и прикладные проблемы современной науки и образования: международная научно-практическая конференция, 27–28 марта 2014г. : материалы конф. – Курск, 2014. – С.104–108.

АНОТАЦІЯ

Ковальчук Ю. П. Вікові особливості гліальних білків у мозку ссавців. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», Тернопіль, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню розподілу глія-специфічних білків у різних відділах головного мозку щурів та піщанок за умов постнатального розвитку, впливу стресогенних факторів та за дії альфа-кетоглутарату. Вперше показано, що низький рівень білків S-100b та гліального фібрилярного кислого білка у новонароджених піщанок і щурів поступово збільшується під час розвитку у всіх відділах мозку, що свідчить про формування астроцитів та розвиток реактивного астрогліозу із віком. Показано, що процеси старіння мозку безпосередньо пов'язані з процесами демієлінізації. За пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця та впливу іонів кадмію в дозі 1,0 мкг/кг маси тіла індукується розвиток реактивного астрогліозу та ризик розвитку нейродегенеративних порушень. Застосування альфа-кетоглутарату за умов старіння та пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця може запобігати розвитку реактивного астрогліозу.

Ключові слова: мозок, S-100b, гліальний фібрилярний кислий білок, основний білок мієліну, адреналін, кадмій, альфа-кетоглутарат.

АННОТАЦИЯ

Ковальчук Ю. П. Возрастные особенности глиальных белков в мозге млекопитающих. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Государственное высшее учебное заведение «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины», Тернополь, 2017.

Диссертация посвящена исследованию распределения глиа-специфических белков в различных отделах головного мозга крыс и песчанок в условиях постнатального развития, влияния стрессогенных факторов и альфа-кетоглутарата. Установлено, что изменения содержания белка S-100b в течение постнатального развития во всех исследуемых отделах головного мозга песчанок схожи с таковыми у крыс, но само содержание ниже, чем у крыс. Впервые показано, что уровень кальцийсвязывающего белка S-100b увеличивается в 4 раза на 30-е сутки и значительно увеличивается на 180-е сутки постнатального развития во всех отделах головного мозга как крыс, так и песчанок. Обнаружено низкий уровень глиального фибриллярного кислого белка у новорожденных песчанок и крыс, и постепенное увеличение его в условиях развития во всех исследуемых отделах мозга, что может свидетельствовать об активации развития реактивного астроглиоза в условиях старения мозга. Показано, что процессы старения мозга непосредственно связаны с процессами демиелинизации, результатом которых является уменьшение количества миелина, особенно в мозжечке. После рождения животных процессы миелинизации начинаются во всех отделах мозга и достигают максимума на 30-е сутки постнатального развития за исключением гиппокампа. Однако в мозжечке интенсивность миелинизации начинает снижаться на 90-е сутки постнатального развития, что может указывать на начало демиелинизации аксонов белого вещества мозжечка. Процесс старения головного мозга провоцируется также наличием стрессогенных факторов.

Впервые выявлено, что в условиях кратковременного воздействия адреналина путем подкожных инъекций существенных изменений в мозге крыс не происходило, хотя, по данным электрокардиографии, у них определялось развитие слабой ишемии сердца. Возможно, характер введения адреналина (подкожно) и скорость полураспада данного гормона не дают основания для изменения метаболизма исследуемых белков в мозге крыс.

Долговременные гипоксические эффекты, которые приводят к нарушению обеспечения нейронов кислородом, одновременно приводят к снижению реактивности нейронов, адаптивных изменений в астроглии и демиелинизации. При питуитрин-изадриновом повреждении сердца, которое провоцирует развитие гипоксии мозга, увеличивается содержание как растворимой, так и филаментной формы глиального фибриллярного кислого белка, при этом происходит уменьшение уровня основного белка миелина. Полученные данные свидетельствуют о развитии астроглиоза при влиянии питуитрина и изадрина, что подтверждается повышением уровня глиального фибриллярного кислого белка во всех исследуемых отделах мозга. При этом установлено статистически значимое снижение уровня основного белка миелина в мозжечке, таламусе и гиппокампе.

В условиях длительного применения стандартной диеты вместе с добавлением кадмия в питьевой воде в дозе 0,1 мкг/кг массы тела в течение 37 суток наблюдали похожую тенденцию к снижению уровня растворимой формы глиального фибриллярного кислого белка во всех исследуемых отделах мозга крыс. Увеличение содержания кадмия в воде до 1 мкг/кг массы тела в течение 37 суток приводило к более значительному уменьшению уровня растворимого глиального фибриллярного

кислого белка во всех отделах головного мозга: в мозжечке установлено уменьшение на 29 % по сравнению с контролем а в таламусе – на 55 %. В то же время при хроническом воздействии кадмия в дозе 1,0 мкг/кг массы тела наблюдался значительный рост уровня филаментной формы глиального фибриллярного кислого белка: в мозжечке и таламусе на 60 % и 55 % соответственно. Установлено негативное влияние ионов кадмия в дозе 1,0 мкг/кг массы тела, что приводит к уменьшению растворимой формы глиального фибриллярного кислого белка, и увеличению его филаментной формы, которое может указывать на развитие реактивного астроглиоза и риск развития нейродегенеративных нарушений.

Установлены эффекты воздействия на глию альфа-кетоглутарата, который рассматривают как один из положительных препаратов, способный замедлить процессы старения. Известно, что альфа-кетоглутарат участвует в обеспечении клеток энергией, а также в метаболизме аминокислот и белков. Экспериментально доказано, что добавление альфа-кетоглутарата к пищевому рациону животных может улучшать белковый обмен и стимулировать энергетический обмен в организме. Применение альфа-кетоглутарата в условиях старения и при питуитрин-изадринном повреждении сердца может предотвращать развитие реактивного астроглиоза.

Ключевые слова: мозг, S-100b, глиальный фибриллярный кислый белок, основной белок миелина, адреналин, кадмий, альфа-кетоглутарат.

SUMMARY

Kovalchuk Y.P. Age features glial proteins in the mammalian brain.-The manuscript.

Thesis for a Candidate's Degree in Biology, Speciality 03.00.04 – Biochemistry. – The State Higher Education Institution «I. Horbachevsky Ternopil State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine», Ternopil, 2017.

Dissertation is devoted to the study of the distribution of glia-specific proteins in different brain regions of rats and gerbils in terms of postnatal development, the impact of stressors and effect of alpha-ketoglutarate. It was shown that the level of proteins S-100b and glial fibrillary acidic protein was specified in newborn rats and gerbils, and gradually increased during development in all brain areas, indicating the astroglia formation and activation of reactive astrogliosis. It was shown that the brain aging process is directly linked to demyelination processes. The pituitrin-izadrin heart induced damage and influence of cadmium ions at the dose of 1.0 mg/kg led to development of the reactive astrogliosis and the risk of neurodegenerative disorders development. The use of alpha-ketoglutarate under conditions of aging and pituitrin-izadrin of heart damage can prevent the development of reactive astrogliosis development.

Keywords: brain, S-100b, glial fibrillary acidic protein, myelin basic protein, adrenaline, cadmium, alpha-ketoglutarate.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГФКБ – гліальний фібрилярний кислий білок;

ОБМ – основний білок мієліну;

АКГ – альфа-кетоглутарат;