

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

САВЧУК ОЛЕНА ІВАНІВНА

УДК 616-055.4:616.8-003.98

**УЧАСТЬ ПРОТЕАСОМНОГО ПРОТЕОЛІЗУ В ІШЕМІЧНОМУ
УШКОДЖЕННІ МОЗКУ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділі цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Національної Академії Наук України.

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України, доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України,
Скибо Галина Григорівна
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, завідувач відділу цитології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Гарбузова Вікторія Юрївна
Сумський державний університет,
завідувач лабораторії молекулярно-генетичних досліджень

кандидат біологічних наук
Півень Оксана Олександрівна
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, провідний науковий співробітник відділу генетики людини

Захист дисертації відбудеться “11” червня 2019 р. о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті Інституту <http://biph.kiev.ua/>

Автореферат розіслано 8 травня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогодні ішемічний інсульт є однією з головних причин смертності в більшості країн світу і, зокрема, в Україні. Враховуючи те, що лише близько 20 % осіб, що перенесли інсульт, повертаються до попередньої праці, стає зрозумілим, яке соціальне та економічне значення має ця проблема як для хворого та його родини, так і для держави в цілому (Котвіцька А.А., Лобова І.О., 2012). За оцінками експертів, щорічно інсульт виникає у 10 млн. людей (Muckherjee D., Patil C.G., 2011).

Показник смертності від мозкового інсульту в Україні є досить високим: 91,3 випадки на 100 тис. населення (у 2007 р. від мозкового інсульту померло 44 тис. людей), тоді як у розвинених країнах 37-47 випадків на 100 тис. населення (Зозуля І.С., Зозуля А.І., 2011; Гандзюк В.А., 2014).

У зв'язку з цим велика кількість досліджень присвячується отриманню нових даних про патогенез цього захворювання, результати яких можуть бути використані для вдосконалення старих та розробки нових терапевтичних засобів. Тим не менш, молекулярні зміни, які відбуваються у тканинах мозку за умов ішемії-реперфузії, залишаються маловивченими, а такі дані необхідні для більш повного розкриття механізмів патогенезу ішемічного інсульту.

Адекватне функціонування мозку не можливе без відповідної рівноваги між процесами синтезу та вчасної утилізації протеїнів у зоні пошкодження мозку. Такою внутрішньоклітинною системою деградації зношених протеїнів є убіквітинзалежний протеасомний протеоліз, за рахунок якого руйнується до 90% внутрішньоклітинних протеїнів. З'являються поодинокі роботи присвячені ролі порушень протеасомного протеолізу в патогенезі ішемічного пошкодження мозку (Gonzalez M.A., Selwyn A.P., 2003; Wojcik C., diNapoli M., 2014). Видається актуальним дослідження стану внутрішньоклітинних протеолітичних ферментів (протеасом) у тканинах мозку щурів. Слід зазначити, що частота різних варіантів генів, що кодують субодиниці протеасоми (PSMA6 та LMP2) в українській популяції раніше не досліджувалася, а про значення алельного поліморфізму цих генів в патогенезі ішемічного інсульту майже нічого не відомо.

Вивчення механізмів фенотипової реалізації алельних варіантів різних генів при поліморфізмі поодиноких нуклеотидів є однією з найактуальніших задач медичної генетики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (2012-2016 рр.): «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патології» в рамках цільової академічної програми «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболіка в системній біології» №0112U001475.

Мета дослідження: виявлення змін протеасомної активності в нервовій тканині, а також ролі алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми (PSMA6 та LMP2) у патогенезі ішемічного інсульту.

Завдання дослідження:

1. Оцінити ступінь ішемічного пошкодження структур мозку щурів при проведенні оклюзії середньої мозкової артерії як експериментальної моделі фокальної ішемії мозку.
2. Вивчити структурні та ультраструктурні зміни нервових клітин головного мозку тварин в різні строки після ішемічного ушкодження головного мозку.
3. Визначити хімотрипсиноподібну (ХТП) трипсиноподібну (ТП) та пептидилглутаміл пептидгідролазну (ППГ) активність протеасоми у нервовій тканині щурів у динаміці розвитку ішемічного ушкодження головного мозку.
4. Співставити зміни протеасомної активності з морфологічними ознаками нейронального пошкодження та змінами поведінкової активності тварин в динаміці розвитку ішемічного інсульту.
5. Дослідити частоту алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми (LMP2 та PSMA6), у хворих на ішемічний інсульт та у практично здорових осіб.

Об'єкт дослідження – протеасоми у тканинах мозку щурів та алельний поліморфізм генів субодиниць конституційної (PSMA6) та імунопротеасоми (LMP2).

Предмет дослідження – структурні зміни нервової тканини головного мозку щурів та частота алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми у хворих на ішемічний інсульт та у практично здорових осіб.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої мети були використані наступні методи: фізіологічні – експериментальна модель фокальної церебральної ішемії шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії; електронно-мікроскопічні; біохімічні – спектрофлюориметричний метод; генетичні методи – полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі; статистичні методи аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. В результаті проведених експериментів отримані дані, що дозволяють певною мірою пояснити участь протеасомного протеолізу в процесах ішемічного ушкодження головного мозку. Вперше виміряно всі три види протеолітичної активності протеасоми (хімотрипсиноподібна, трипсиноподібна та пептидглутаміл пептидгідролазна) в нервовій тканині щурів і їх зміни за умов відтворення ішемічного інсульту. Ці дані дозволяють робити висновки стосовно порушень функції протеасоми при дії вищевказаних факторів, і, відповідно ролі цих порушень у патогенезі ішемічного інсульту. Вперше проведено комплексні дослідження нервових клітин кори та стріатума головного мозку на світлооптичному та електронно-мікроскопічному рівнях з вивчення динаміки їх структурних змін після фокальної церебральної ішемії у щурів. Вперше виявлено кореляцію між змінами протеасомної активності та змінами поведінкової активності тварин в динаміці розвитку ішемічного інсульту. Вперше досліджено частоту алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці конституційної та імунопротеасом, у хворих на ішемічний інсульт. Усі зазначені

дані отримані вперше і дозволяють вважати, що протеасомний протеоліз відіграє суттєву роль у патогенезі ішемічного ушкодження мозку.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. З'ясування ролі протеасомного протеолізу в розвитку ушкодження головного мозку при відтворенні патогенного впливу відкриває можливості для подальшого вивчення протеасомного протеолізу та його ролі в ішемічному інсульті, а також створення можливостей впливу на нього з метою профілактики та лікування мозкових захворювань в цілому та ішемічного інсульту зокрема. Проведені дослідження також були скеровані на з'ясування значення алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці конституційної та імунопротеасом, в патогенезі ішемічного інсульту. Встановлені факти дозволяють оцінювати ризик виникнення гострого ішемічного інсульту, диференційовано підходити до терапії цих захворювань з урахування генотипу певного хворого та проводити запобіжні заходи для попередження виникнення важких ускладнень зазначеного захворювання. Генотипування людей за алельними варіантами гена, що кодує субодиницю конституційної протеасоми PSMA6 може бути використано для скринінгу хворих на ішемічний інсульт та його ранньої діагностики. Крім того в ході даної роботи відпрацьована методика моделювання фокальної церебральної ішемії у щурів, що може застосовуватися у науковій роботі.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, поставлено задачі дослідження, виконано необхідні експериментальні дослідження, відпрацьовано експериментальне моделювання фокальної ішемії, отримання тканин головного мозку, вимірювання активності протеасомного протеолізу у вищевказаному матеріалі, статистично оброблено, проаналізовано та узагальнено отримані результати. Планування експерименту, інтерпретація отриманих даних і формулювання висновків проведено спільно із науковим керівником. Деякі експерименти були проведені разом із співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Діагностику захворювань та відбір хворих для генотипування було проведено у неврологічному відділенні №1 та №2 Київської міської лікарні №4 під керівництвом професора Л.І. Соколової.

Апробація результатів дисертації. Отримані в дисертаційній роботі дані були апробовані на: VI Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю "Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології" (3-5 жовтня 2012, Ялта, Україна); World Congress of Neuroscience (17-19 June 2013, Barcelona, Spain); 7th International Symposium On Experimental And Clinical Neurobiology (23-27 June 2013, Kosice, Slovak Republic); X Anniversary Ukrainian–Polish–Belorussian Conference "Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications", Bogomoletz Institute of Physiology (10-13 October 2013, Kyiv, Ukraine); III conference "Physiology: from molecules to the body" at Bogomoletz Institute of Physiology (24-25 October 2013, Kyiv, Ukraine); Засіданні сектору нейронаук Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

(17 січня 2014, Київ, Україна); Засіданні сектору вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (28 лютого 2019, Київ, Україна).

Публікації. Результати дисертації викладено в 14 публікаціях: статті – 7, тези міжнародних та вітчизняних конференцій, симпозіумів, з'їздів – 7.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаної літератури та списку опублікованих за темою дисертації праць. Обсяг дисертації становить 130 с. Дисертаційна робота ілюстрована 24 рисунками (графіками і мікрофотографіями) і 6 таблицями. Список використаної літератури налічує 192 джерела.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних джерел складається з чотирьох розділів, присвячений аналізу сучасних уявлень щодо участі протеасомного протеолізу в ішемічному ушкодженні мозку. Представлено відомості про убіквітинзалежний протеоліз. Наведено дані про алельний поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми.

В розділі **Матеріали та методи досліджень** описано методичні підходи, використані при виконанні роботи. Всі експерименти на тваринах виконано з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятих в установах НАН України.

Ішемічне пошкодження моделювали шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії (ОСМА) за методикою J. Koizumi et. al., (1986), яка передбачає введення монофіламентної нитки у просвіт внутрішньої сонної артерії, що блокує кровоплив у СМА, у щурів лінії Вістар. Тривалість фокальної церебральної ішемії становила 2 хв. та 60 хв. Оперативні втручання здійснювали під загальним знеболюванням, якого досягали шляхом внутрішньом'язового введення суміші розчинів ксилзину (Sedazin, Biowet, Польща) з перерахунку 10 мг/кг маси тіла і кетаміну (Каліпсол, Гедеон Ріхтер А.О., Угорщина) з розрахунку 75 мг/кг маси тіла. Оцінка ішемічного пошкодження проводилась через 6, 24 та 72 години після відновлення кровоплину. Для визначення розміру інфаркту головного мозку в експериментах *in vivo* використовували загальноновживаний метод, що дозволяє на макроскопічному рівні відокремити пошкоджену (некротизовану) ділянку мозку від тканини мозку, яка зберегла життєздатність, та обґрунтований на фарбуванні зрізів мозку ТТХ. Зрізи мозку поміщали в 2% розчин ТТХ, що фарбує життєздатну тканину в яскраво-червоний колір. Інкубацію зрізів проводили протягом 15 хвилин при температурі 37°C.

Світлова мікроскопія застосовувалась як проміжний етап електронно-мікроскопічного дослідження. Отримання напівтонких та ультра тонких зрізів проводили за стандартизованою методикою (Fedoroff et. al., 2001). Напівтонкі зрізи, забарвлені 1 % розчином толуїдинового синього, оцінювали за допомогою світлового мікроскопу Zeiss Jena (збільшення $\times 400$), виявляючи зону інтересу для електронної

мікроскопії.

Електронна мікроскопія. Фронтальні зрізи головного мозку завтовшки 400 мкм отримували за допомогою вібротома Ultracut-E («Reichert-Jung», Австрія). Контрастовані в уранілацетаті і цитраті свинцю зрізи головного мозку вивчали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-100 CX (Японія).

Біохімічні дослідження. Визначення хімотрипсिनоподібної (ХТП), трипсिनоподібної (ТП) та пептидилглутаміл пептидгідролазної (ПГПГ) активності протеасоми проводили в 0.025 МТрисНСІ буфері (рН 7.5), що містив у кінцевій концентрації 6 мкМ одного із субстратів протеасоми: сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (LLVT-АМС), бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину (LSTA-АМС) або N-Cbz-лейцин-лейцин-глутамін-амідо-4-метилкумарину (LLG-АМС). Активність протеасомного протеолізу в нервовій тканині визначали за інтенсивністю гідролізу цих специфічних флуорогенних субстратів. Флуоресценція продуктів гідролізу фіксувалася за допомогою спектрофлуориметру Hitachi-4000 (довжина хвилі збудження (Ex) становила 360 нм, а емісії (Em) – 440 нм) з використанням вільного 7-аміно-4-метилкумарину як стандарту. Для підтвердження специфічності протеасомального гідролізу в проби додавали селективні інгібітори протеасоми – класто-лактацистин бета-лактон або MG-132 в концентрації 5 мкМ. Відсоток зменшення активності гідролізу відповідних субстратів під дією вказаних інгібіторів трактували як активність протеасоми і виражали в мкМ 7-аміно-4-метилкумарину на 1 г. білку за 1 хвилину.

Поведінкові тести. Для оцінки наявності ішемічного ушкодження мозку перед моделюванням ішемії та після 6, 24 та 72 годин реперфузії проводили тест “відкрите поле”, який оцінював локомоторну активність, та робили пробу на тактильну чутливість (Schallert T., Woodlee M.T., Fleming S.M., 2002; Komotar R.J. et. al., 2009). В індивідуальній поведінці тварин реєстрували їх горизонтальну рухову активність (локомоції); вертикальну активність (перінг, підведення на задні лапки); грумінг (всі різновидності даної реакції, що проявлялись у актах вилизувань та почісувань) та фрізинг (кількість завмирань). Наявність сомато-сенсорного дефіциту при ішемії визначали пробою на тактильну чутливість за допомогою адгезивно-видаляючого сомато-сенсорного тесту, який проводили до та після операції. У ролі білатерального тактильного стимулу використовували адгезивні (липкі зі зворотньої сторони) паперові клаптики діаметром 6 мм, які прикріплювали до обох передніх лап в дистально-радіальній ділянці зап'ясть. Реєстрували час до усунення (зняття) кожного подразника з передніх лап.

Генетичні методи визначення алельного поліморфізму розпочинали з виділення ДНК з цільної крові із використанням наборів (“NucleoSpin®Blood, USA”) згідно до рекомендацій виробника. Використаний метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідин тіо-ціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За присутності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoSTM-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагували із сорбента та переносили у стерильні вільні від ДНК мікропробірки.

Визначення алельного поліморфізму генів проводили методами полімеразних ланцюгових реакцій: гена LMP2-субодиниці імунопротеасоми (Arg₆₀→His) за Vinasco J. et. al., з модифікаціями Vinasco J. et. al., 1998); гена PSMA6 (C⁸→G) (rs 1048990) із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_11599359_10 та 7500 Fast Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, USA).

Статистичний аналіз результатів. Аналіз та статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням програмного забезпечення: Image J, Excel, Origin 8.0, SPSS ver. 22.0, 7500 Fast Real-Time PCR System Software. Кореляційний аналіз був проведений за допомогою статистичного пакету SPSS (ver. 22.0). Зв’язок між кількісними показниками оцінювався за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона. Для порівняльної оцінки результатів моніторингу неврологічних функцій та з метою встановлення достовірності різниці показників між порівнюваними групами та підгрупами використовували однофакторний дисперсійний аналіз із функцією повторних вимірювань (One-way repeated measures Analysis of Variance — ANOVA). Статистичну значущість результатів молекулярно-генетичних досліджень оцінювали за критерієм χ^2 . Поширення поліморфізмів перевіряли на відповідність закону Харді-Вайнберга

Для створення прогностичної моделі ризику виникнення інсульту була використана бінарна логістична регресія. Предикторами виступали наступні фактори: 2 поліморфізми (LMP2 та PSMA6), стать та вік. Всі дані кількісної природи представлені як середні \pm (стандартна похибка середнього). Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

Оцінка ішемічного пошкодження проводилась через 6, 24 та 72 години після відновлення кровотоку. В результаті моделювання ОСМА виникли значні зміни, які чітко можна спостерігати на рис. 1, де чорною лінією обведена зона інфаркту, синьою – зона пенумбри та зеленою – контралатеральна ділянка мозку по відношенню до ішемізованої ділянки мозку (рис. 1).

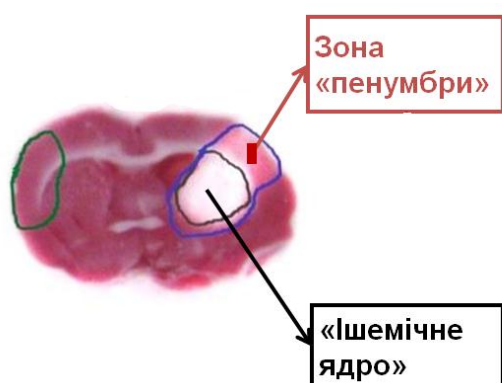


Рис. 1. Зрізи після фарбування ТТХ для виявлення некротичних ділянок та зони пенумбри.

Фарбування ТТХ виявило значне переважання об’єму ділянки інфаркту в групі довготривалої оклюзії СМА з часом реперфузії 72 години (21.27 ± 2.07 мм³) над відповідними величинами в інших групах тварин (короткотривала ішемія з часом реперфузії 72 години - 10.01 ± 2.34 мм³, $P < 0.05$) (рис. 2).

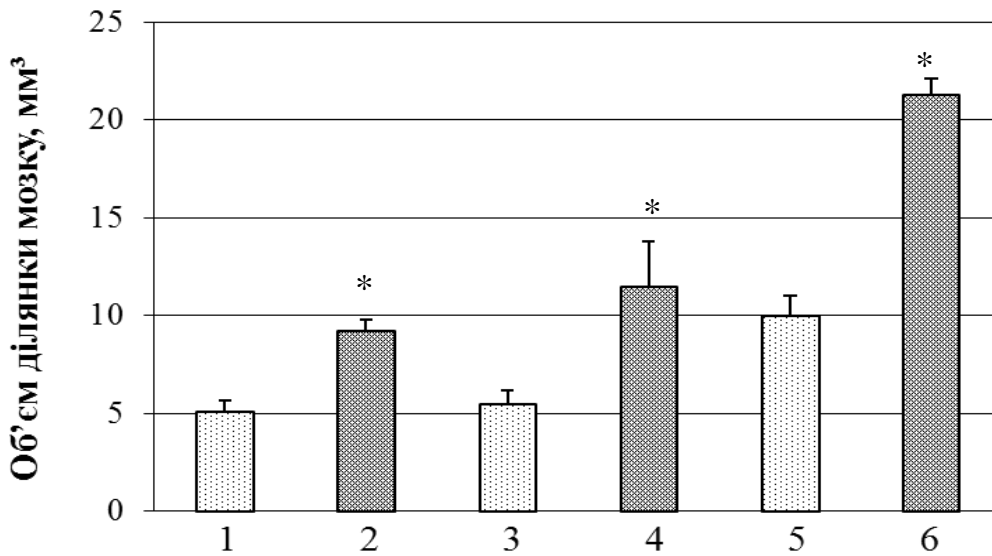


Рис. 2. Об'єм ділянки (мм³) ішемічного ушкодження у тварин при різних періодах реперфузії після ОСМА. 1 – 6-годинна реперфузія, група короткотривалої ОСМА; 2 – 6-годинна реперфузія, група довготривалої ОСМА; 3 – 24-годинна реперфузія, група короткотривалої ОСМА; 4 – 24-годинна реперфузія, група довготривалої ОСМА; 5 – 72-годинна реперфузія, група короткотривалої ОСМА; 6 – 72-годинна реперфузія група довготривалої ОСМА. N=7. * - P<0.05.

Для вивчення структурних та ультраструктурних змін нейронів кори та стріатума головного мозку та розвитку відстроченої загибелі нервових клітин при моделюванні порушення кровопостачання мозку різного ступеня ми досліджували різні строки ОСМА та постішемічного періоду у щурів.

У корі контрлатеральної півкулі (контроль) ми спостерігали нормальну структуру нейропіля, синапси мали чітко окреслені пресинаптичні везикули, синаптичну щілину та постсинаптичну щільність (рис. 3А). Найпершими на ішемічне ушкодження реагували мікрогліальні клітини – мікроглія та астроцити. Вже через 6 годин ми спостерігали набряк астроцитних відростків (рис. 3Б).

Зі збільшенням постоклюзійного періоду наростали деструктивні зміни в корі. Через 24 години ми спостерігали набряк не лише астроцитних відростків, а й семи астроцитів (вказано зірочкою, рис. 3В).

Електронно-мікроскопічне дослідження кори показало, що на 72 годину постоклюзійного періоду спостерігалися як темні зморщені нейрони, так і просвітлені набухлі, що свідчило про різні шляхи загибелі цих клітин. На даному періоді реперфузії нами були виявлені чіткі ознаки дегенеративних змін нейропіля, що проявлялися в опустошенні та набряку дендритів та астроцитних відростків (вказано зірочками), патологічних змінах мієлінових волокон (вказано стрілкою, рис. 3Г). У мікросудинах спостерігався прогресуючий з часом периваскулярний набряк структур, з яких складається гематоенцефалічний бар'єр, головним чином, астроцитарних відростків.

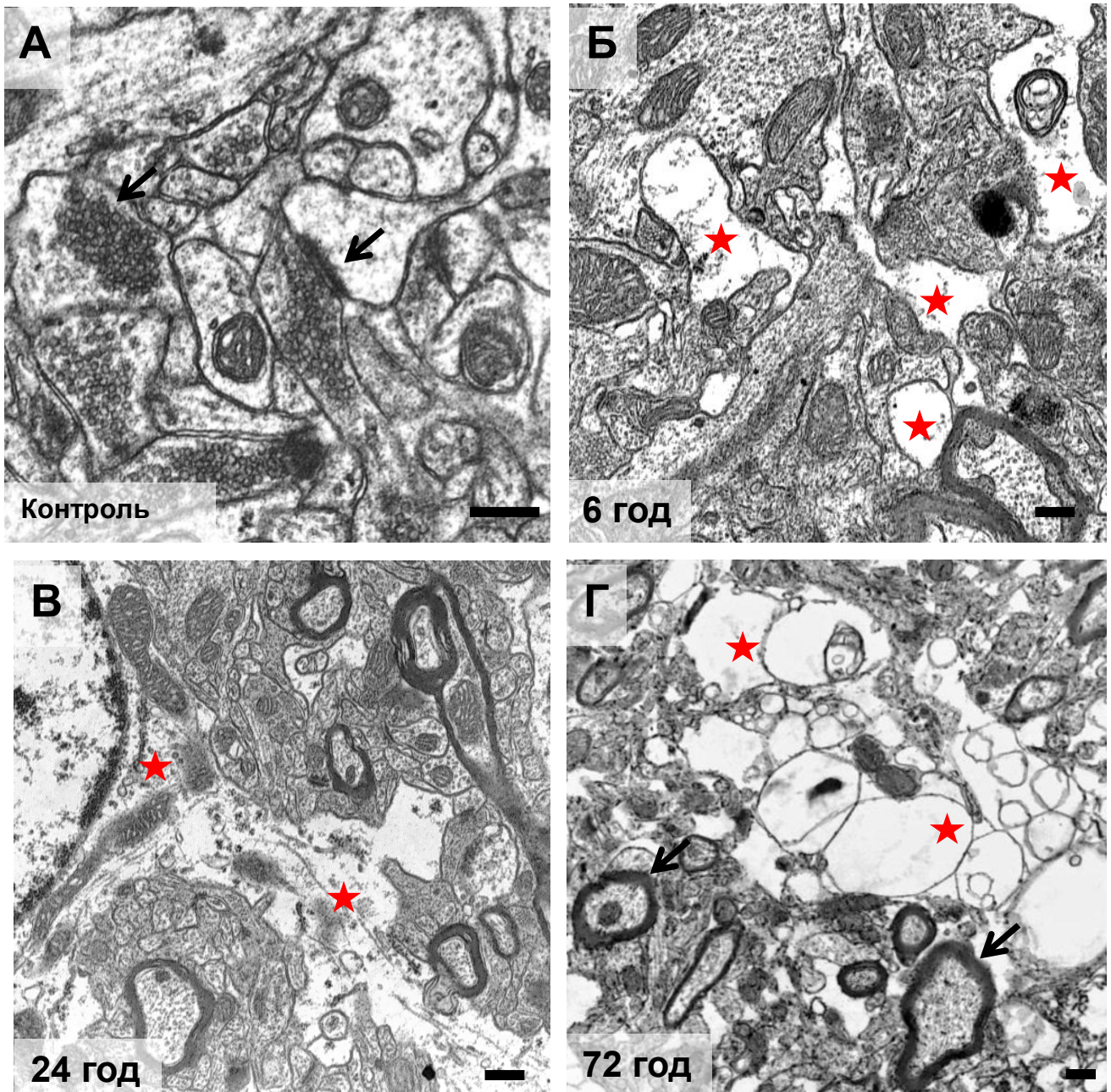


Рис. 3. Електронні мікрофотографії кори після ішемічного ушкодження у тварин при різних періодах реперфузії після довготривалої ОСМА: А – контроль; Б – через 6 годин структурні зміни нейроніля виражені нечітко; В – через 24 години спостерігаються більш виражені деструктивні зміни, набряк не лише відростків, а й соми астроцитів (вказано зірочкою); Г – через 72 години виявлені чіткі ознаки дегенеративних змін нейроніля, що проявлялися в опустошенні та набряку дендритів та астроцитних відростків (вказано зірочками), патологічних змінах мієлінових волокон (вказано стрілкою). Масштабна лінійка А, Б, Г – 0,4 мкм, В – 0,8 мкм.

Зміни в стріатумі були аналогічними змінам в корі, які прогресували зі збільшенням постоклюзійного періоду.

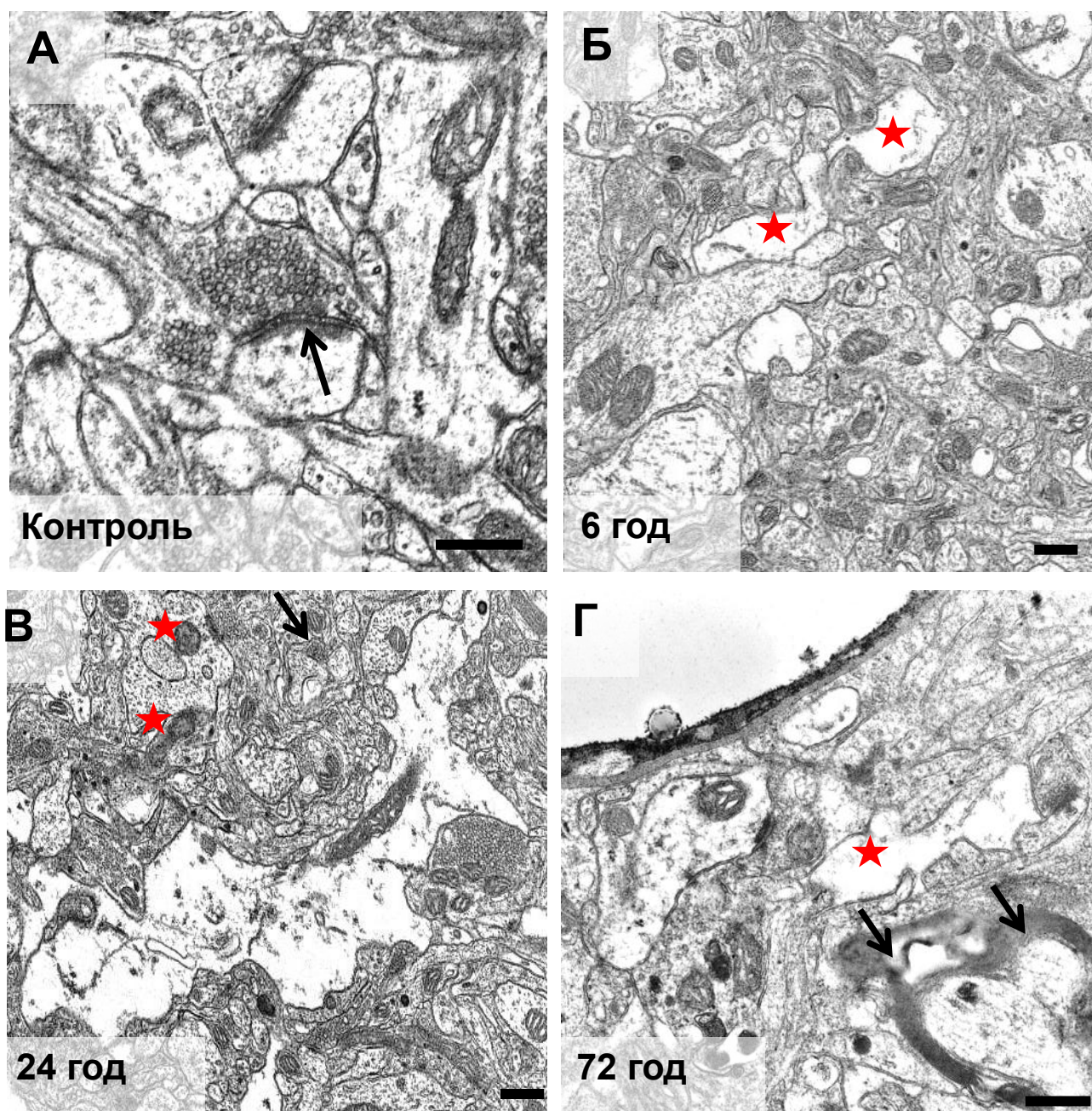


Рис. 4. Електронні мікрофотографії стріатума після ішемічного ушкодження у тварин при різних періодах реперфузії після довготривалої ОСМА: А – контроль; Б – через 6 годин спостерігаються незначні зміни нейропіля, які проявляються в просвітлення астроцитних відростків; В – через 24 години деструктивні зміни ставали більш вираженими, деструкція мітохондрій (вказано зірочками), порушення структури синапсів (вказано стрілочкою); Г – через 72 години спостерігається набряк відростків (вказано зірочкою), розшарування мієліну (вказано стрілочками). Масштабна лінійка – 0,4 мкм.

На електроннограмі ділянки стріатума ми спостерігали розшарування мієлінової оболонки, руйнування мікротрубочок в дендритах, наявність дегенеративних змін в синаптичних терміналях.

У стріатумі контрлатеральної півкулі (контроль) тіла нейронів мали велике світле округле ядро з добре розрізняваними одним чи двома ядерцями та вузьку смужку дещо темнішої цитоплазми навколо ядра. У групі контролю можна візуалізувати синапси з чітко окресленими пресинаптичними везикулами, синаптичною щільною та постсинаптичною щільністю (рис. 4А).

ОСМА через 6 годин реперфузії призводила до незначних структурних змін нейропіля, які проявлялися в просвітленні астроцитних відростків (рис. 4Б). Через 24 години деструктивні зміни ставали більш вираженими, спостерігається деструкція мітохондрій (вказано зірочками), порушення структури синапсів (вказано стрілочкою, рис. 4В).

Найбільш показовими були зміни у стріатумі на 72 годину після оклюзії сонної артерії. Спостерігаються значні деструктивні зміни нейропіля, набряк відростків (вказано зірочкою), розшарування мієліну (вказано стрілочками, рис. 4Г).

Таким чином, отримані дані свідчать про суттєві зміни структури кори та стріатума в постішемичному періоді і про прогресуючий характер цих змін.

Зміни активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного пошкодження

В результаті проведених досліджень були отримані дані стосовно участі протеасомного протеолізу при моделюванні ішемічного пошкодження мозку, зокрема вдалося встановити зміни всіх трьох протеолітичних активностей протеасоми (трипсиноподібної, хімотрипсиноподібної та пептидглютамін пептидгідролазної) в умовах ішемічного пошкодження мозку. Після 6-годинного періоду реперфузії в “ядерній зоні” ішемії виникала активація всіх видів протеасомної активності, що співставленні по амплітуді в групі тварин як короткотривалої так і довготривалої ОСМА, при чому для групи довготривалої ішемії ця активація була статистично достовірною ($P < 0.05$ порівняно з контролем).

Трипсиноподібна активність в “ядерній зоні” мозку для групи короткотривалої ішемії зменшилась в 7,1 рази порівняно з контролем ($P < 0.05$), а для довготривалої ОСМА зменшилась в 12,5 рази порівняно з контролем ($P < 0.05$) через 6-годинний період реперфузії (рис. 5А).

Хімотрипсиноподібна активність в даній зоні для групи короткотривалої ішемії зменшилась в 4,1 рази порівняно з контролем ($P > 0.05$), тоді як для довготривалої ОСМА зменшилась в 5,8 рази порівняно з контролем ($P < 0.05$) при 6-годинному періоді реперфузії (рис. 5А). ПГПГ активність в “ядерній зоні” мозку для групи короткотривалої ішемії зменшилась в 8 разів порівняно з контролем ($P < 0.05$), а для довготривалої ОСМА зменшилась в 2,8 рази ($P < 0.05$) (рис. 5А).

Трипсиноподібна активність в зоні “пенумбри” зменшилась в 4,1 рази порівняно з контролем для групи короткотривалої ішемії ($P < 0.05$), для групи довготривалої ОСМА зменшилась в 25 рази ($P < 0.05$) через 6-годинний період реперфузії (рис. 5Б).

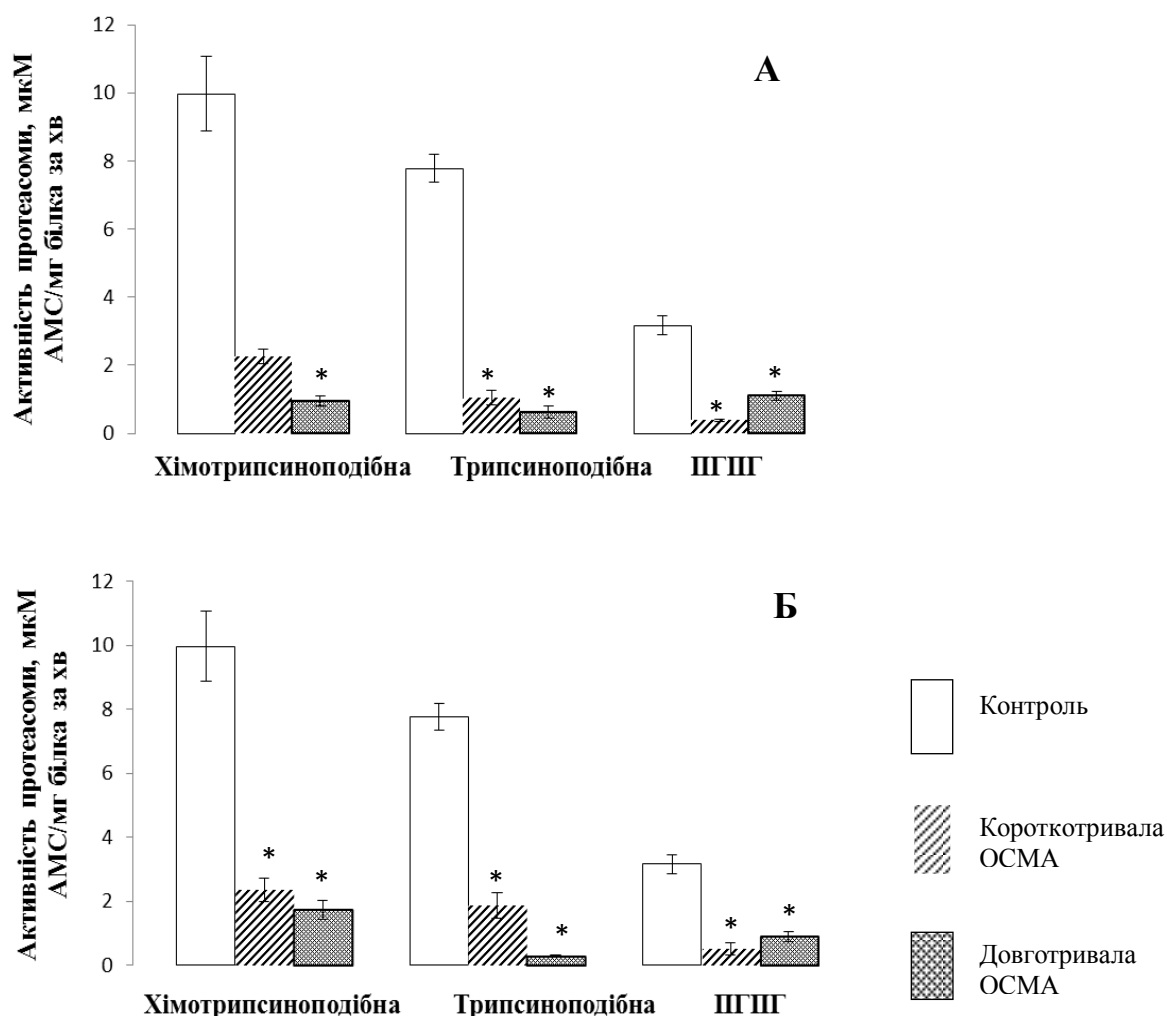


Рис. 5. Хімотрипсиноподібна, трипсиноподібна та пептидилглютаміл пептидгідролазна активності протеасоми в “ядерній зоні” мозку (А) та зоні “пенумбри” (Б) після моделювання ОСМА з 6-годинним періодом реперфузії. $N=7$. * – $P<0.05$.

Хімотрипсиноподібна активність в зоні “пенумбри” для групи короткотривалої ішемії зменшилась в 4,3 рази порівняно з контролем ($P<0.05$), для групи довготривалої ішемії зменшилась в 11 разів порівняно з контролем ($P<0.05$) (рис. 5Б). ПГПГ активність в зоні “пенумбри” зменшилась в 6,3 рази порівняно з контролем для групи короткотривалої ішемії ($P<0.05$), для групи довготривалої ОСМА зменшилась в 3,7 рази ($P<0.05$) через 6-годинний період реперфузії (рис. 5Б).

На період 24-годинної реперфузії виникало значне підсилення трипсиноподібної активності як в “ядерній зоні” ішемії, так і в зоні “пенумбри”, при чому дана активація спостерігалась лише для групи довготривалої ОСМА. В групі короткотривалої ішемії ми не спостерігали такого ефекту. Трипсиноподібна активність в “ядерній зоні” мозку через 24-годинний період реперфузії для групи короткотривалої ішемії зменшилась в 5,5 рази порівняно з контролем ($P<0.05$), а для довготривалої ОСМА зменшилась в 1 раз порівняно з контролем ($P>0.05$) (рис. 6А). Дана активність протеасоми зменшилась для зони “пенумбри” в 4 рази для групи короткотривалої ішемії ($P<0.05$), в той час як для групи довготривалої ішемії

трипсиноподібна активність збільшилась у 1,8 рази порівняно з контролем ($P < 0.05$) (рис. 6Б).

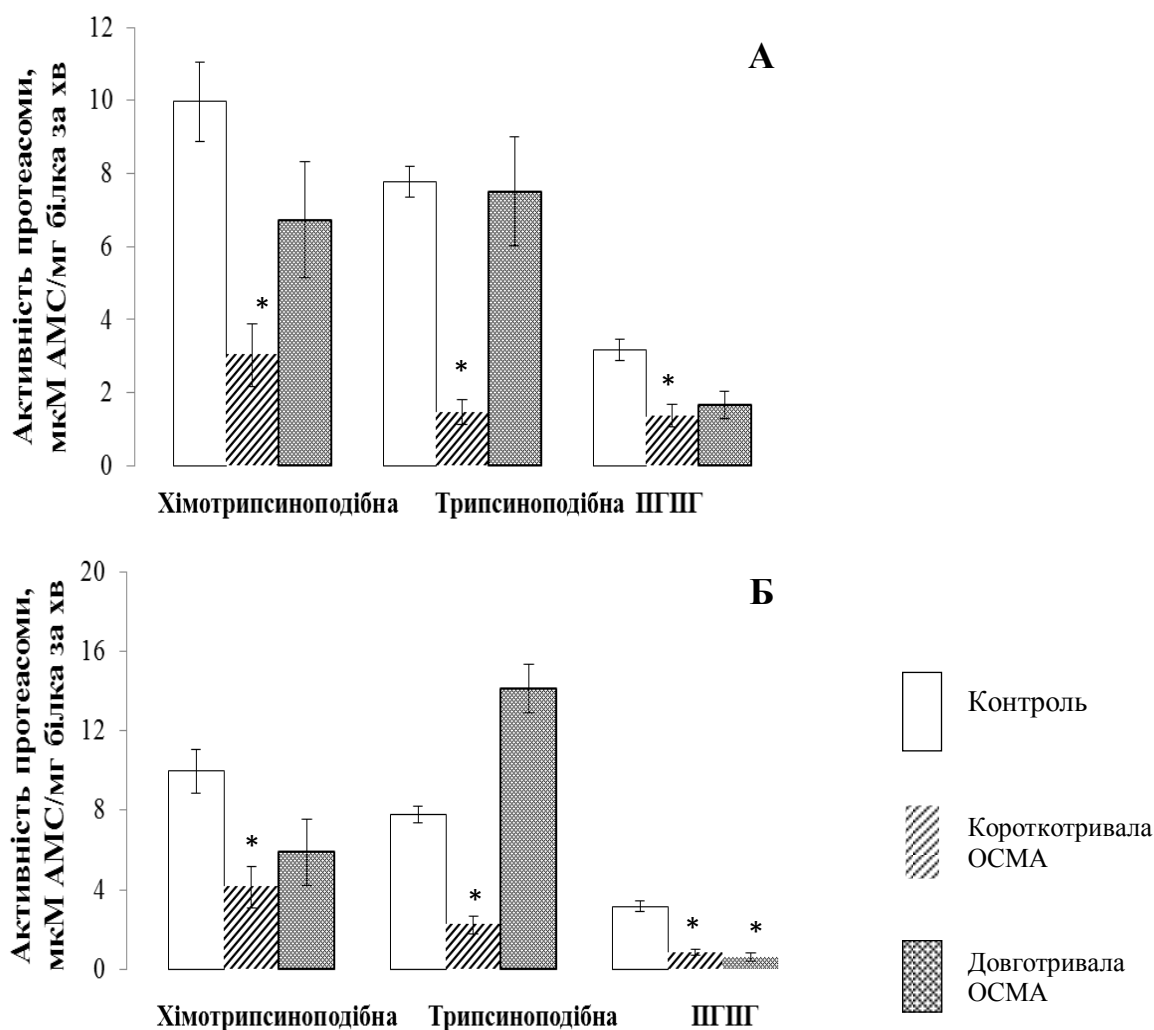


Рис. 6. Хімотрипсиноподібна, трипсиноподібна та пептидилглютамін пептидгідролазна активності протеасоми в “ядерній зоні” мозку (А) та зоні “пенумбри” (Б) після моделювання ОСМА з 24-годинним періодом реперфузії. $N=7$. * – $P < 0.05$.

У випадку короткотривалої ішемії пік активації припадав не на 24 години після реперфузії, а на 72 години, при чому виникала реакція як трипсиноподібної активності, так і хімотрипсиноподібної активності. Дана реакція спостерігалась в “ядерній зоні” і в зоні “пенумбри”(рис. 7А, 7Б). Для групи довготривалої ішемії пік активації припадав на 24-годинний період реперфузії, а не на 72-годинний період. Активація виникала раніше для даної групи.

Хімотрипсиноподібна активність зменшилась в 1,7 разів для “ядерної зони” групи короткотривалої ішемії в період 24-годинної реперфузії порівняно з контролем ($P < 0.05$), а для пенумбри – зменшилась в 1,4 рази порівняно з контролем ($P < 0.05$) (рис. 6 А); в період 72-годинної реперфузії хімотрипсиноподібна активність збільшилась у 2,2 рази для “ядерної зони” порівняно з контролем ($P > 0.05$) і зменшилась в 1,5 рази для пенумбри порівняно з контролем ($P < 0.05$).

ПГПГ активність для “ядерної зони” групи короткотривалої ішемії в період 24-годинної реперфузії зменшилась в 2,3 рази порівняно з контролем ($P<0.05$), для групи довготривалої ішемії – зменшилась в 1,9 разів порівняно з контролем ($P>0.05$) (рис. 6А).

ПГПГ активність для “ядерної зони” групи короткотривалої ішемії в період 72-годинної реперфузії зменшилась в 2,7 рази порівняно з контролем ($P<0.05$), для групи довготривалої ішемії – зменшилась в 20 разів порівняно з контролем ($P<0.05$) (рис. 7А).

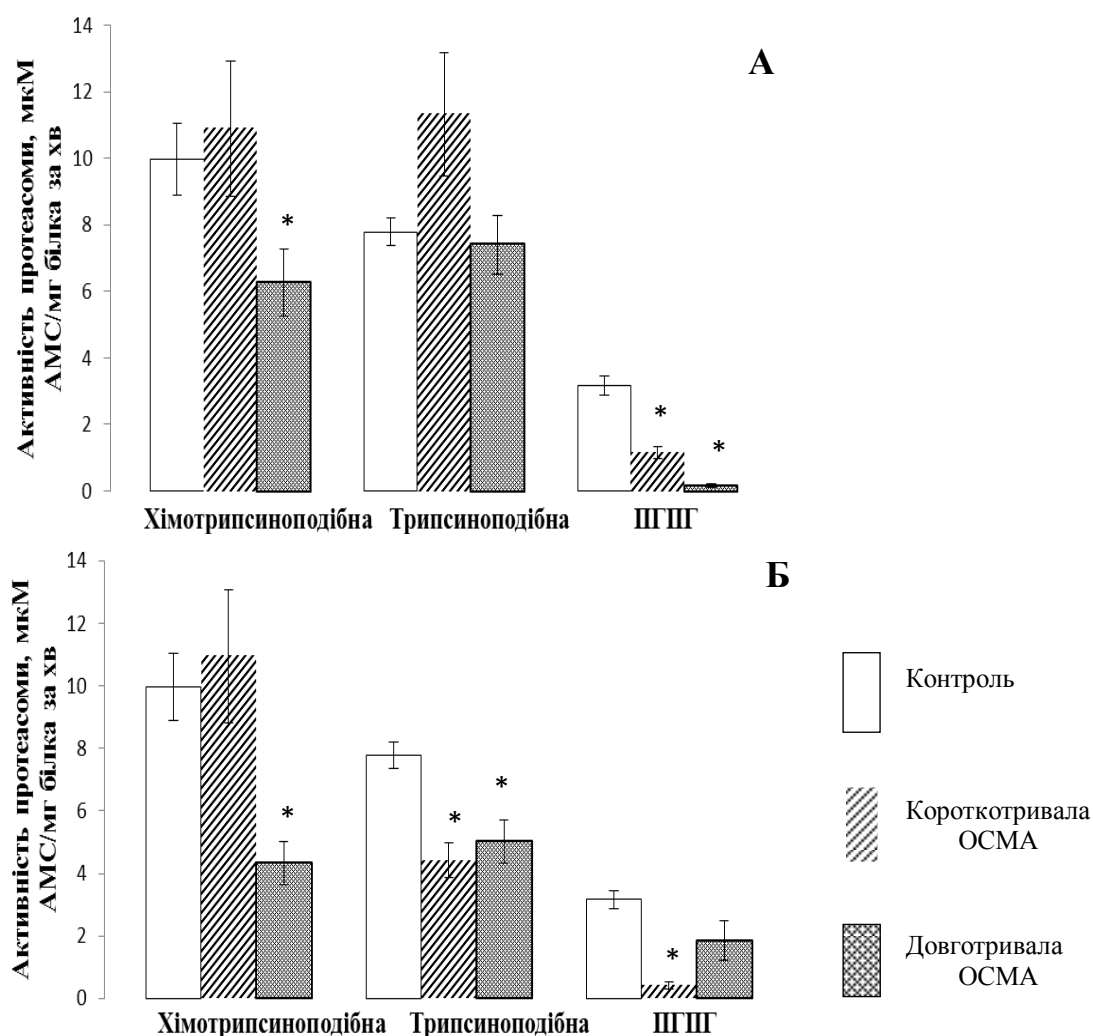


Рис. 7. Хімотрипсиноподібна, трипсиноподібна та пептидилглютаміл пептидгідролазна активності протеасоми в “ядерній зоні” мозку (А) та зоні “пенумбри” (Б) після моделювання ОСМА з 72-годинним періодом реперфузії. $N=7$. * – $P<0.05$.

Загалом дані результати дозволяють стверджувати, що моделювання ішемічного пошкодження мозку має вплив на систему протеасомної деградації білків, зменшуючи її активність у тканинах мозку, зокрема зниження двох видів протеолітичної активності (трипсиноподібної у 2 рази, хімотрипсиноподібної в 1,2 рази). Зміни активностей протеасоми можуть свідчити про переважання імунопроteaseоми порівняно до конституційної протеасоми при 6 та 72-годинних періодах реперфузії в тканинах мозку, а також про переважання конституційної протеасоми при 24-годинній реперфузії.

Поведінкові тести

Нами було проведено поведінкові реакції у тварин різних груп через 6, 24 та 72 години після моделювання фокальної ішемії. Оцінювалися основні показники: рухова активність, дослідницька активність і ступінь тривожності, яку оцінювали за грумінгом (всі різновиди даної реакції, які проявлялися у вилизуванні та почісуванні), фризінгу (завмиранню). Виявлено зниження дослідницької активності, що проявлялось в зменшенні кількості квадратів, які вони пересікали, кількості стійок, збільшенні актів грумінгу та тривалості актів фризінгу.

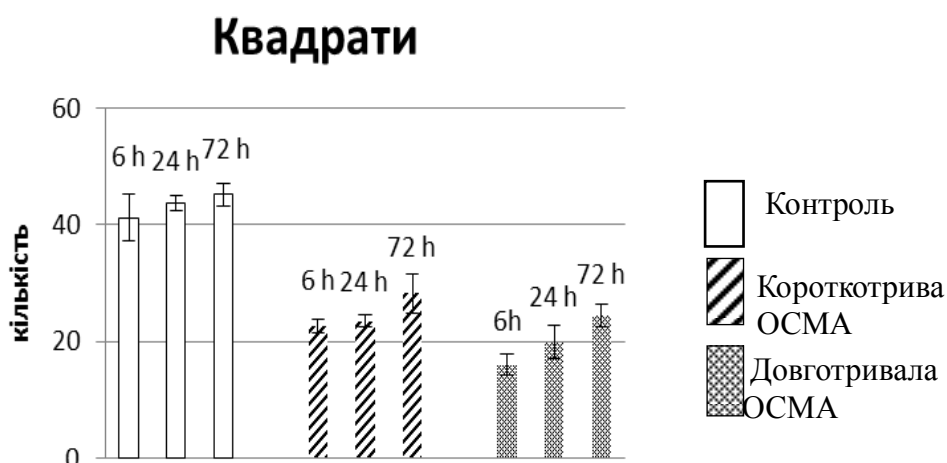


Рис. 8. Підрахунок кількості квадратів (N), які пересікалися щурами при тестуванні на локомоторну активність (тест “відкрите поле”): в контрольній групі (псевдооперовані тварини та через 6, 24 та 72 години після ішемії. (*- $p < 0,01$).

Після ішемічного ушкодження мозку спостерігалось також порушення сомато-сенсорних функцій, про що свідчило збільшення часу, протягом якого тварина знімала тестовий стимул (“липучку”) з обох передніх лап при тестуванні на тактильну чутливість (adhesive removal test) (рис. 9).

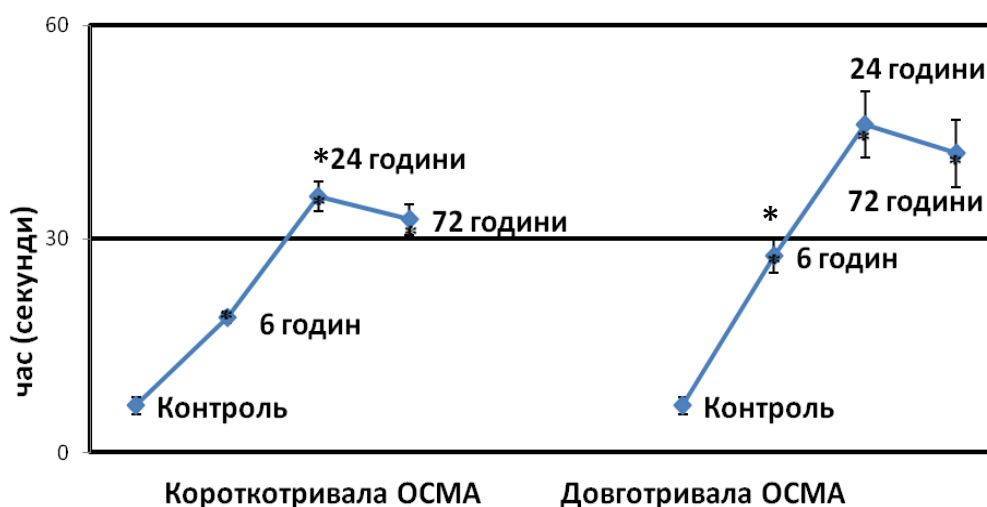


Рис. 9. Тривалість зняття щурами тестового подразника при тестуванні на тактильну чутливість (adhesive removal test) до ішемії (Контроль) та через 6, 24 та 72 години після ішемії. (*- $p < 0,01$).

Кореляційний аналіз підтвердив наявність сильних та середньої сили різноспрямованих зв'язків між поведінковими реакціями щурів після моделювання ОСМА та активностями протеасоми (рис. 10).

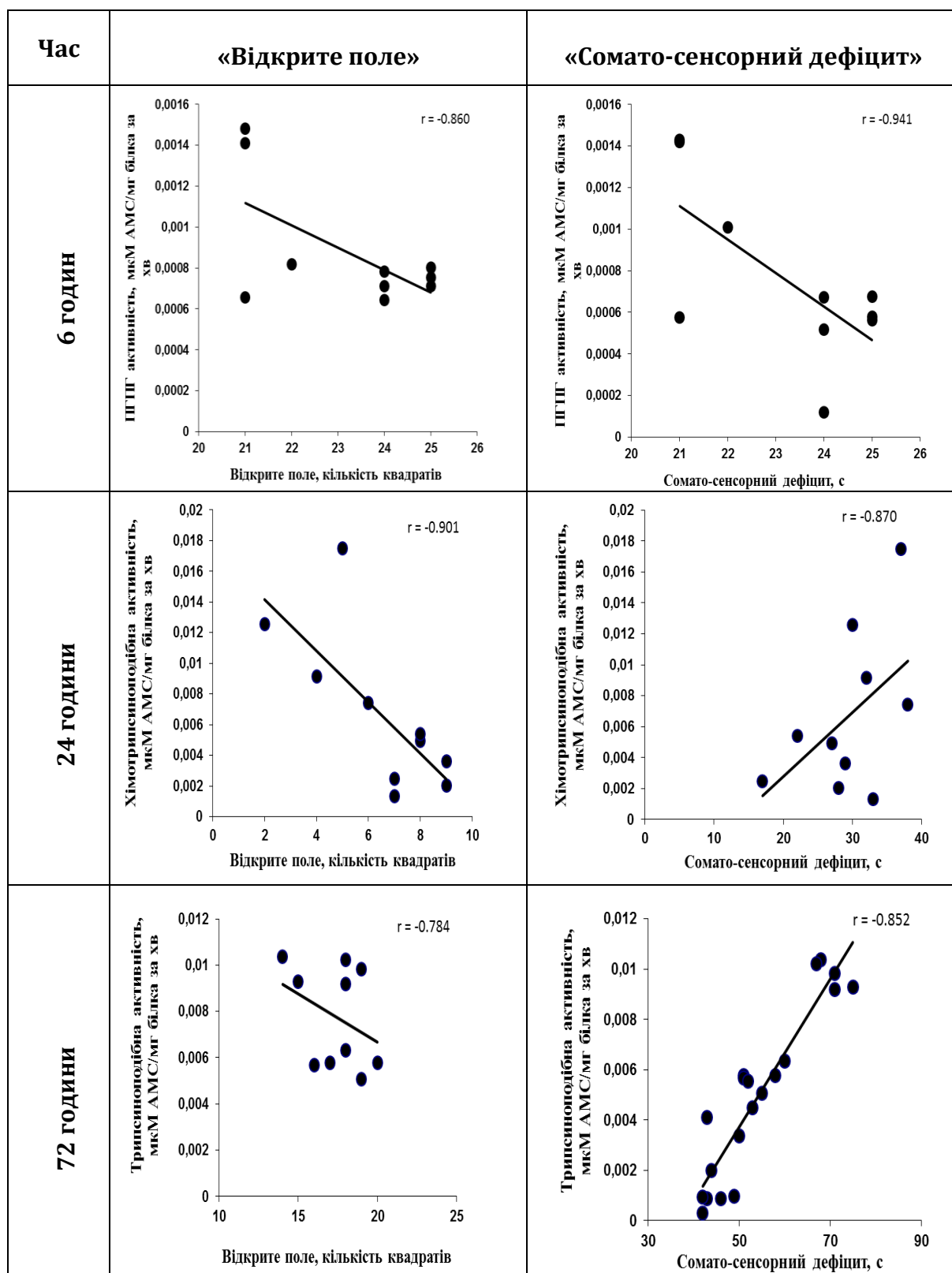


Рис. 10. Кореляційний аналіз між поведінковими реакціями щурів після моделювання ОСМА та активностями протеасоми

Так, ПГПГ активність протеасоми в зоні ішемічного ядра після 6-годинного періоду реперфузії тісно пов'язана з кількістю пересічених квадратів щурами у поведінковому тесті «Відкрите поле» ($r = -0,860$) та сомато-сенсорним дефіцитом ($r = -0,941$). Хімотрипсиноподібна активність протеасоми в зоні пенумбри після 24-годинного періоду реперфузії тісно пов'язана з кількістю пересічених квадратів щурами у поведінковому тесті «Відкрите поле» ($r = -0,901$) та сомато-сенсорним дефіцитом ($r = +0,870$).

Трипсиноподібна активність протеасоми в зоні пенумбри після 72-годинного періоду реперфузії тісно пов'язана з кількістю пересічених квадратів щурами у поведінковому тесті «Відкрите поле» ($r = -0,784$) та сомато-сенсорним дефіцитом ($r = +0,852$).

Генетичні методи

При генотипуванні було встановлено, що частота різних алельних варіантів субодиноці імунопротеасоми LMP2 у хворих з ішемічним інсультом достовірно відрізнялась від пацієнтів без інсульту та була наступною: Arg/Arg–55,9%, Arg/His–34,3%, His/His–9,8%, а у хворих групи контролю: Arg/Arg–53,3%, Arg/His–43,5%, His/His–6,7% ($p>0,05$) (рис. 11).

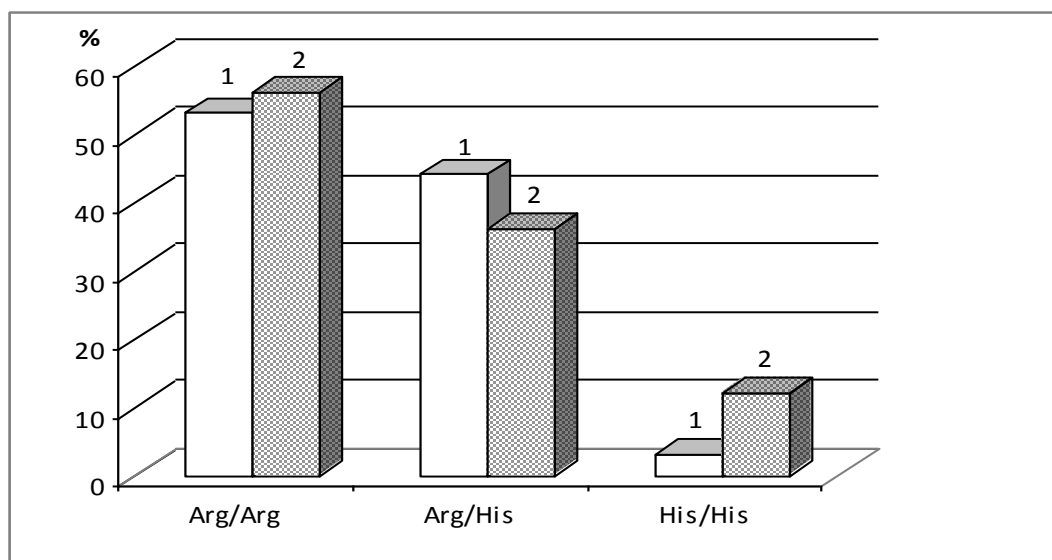


Рис.11. Частота алельних варіантів субодиноці імунопротеасоми LMP2 ($Arg_{60} \rightarrow His$) серед осіб контрольної (1) та хворих основної груп (2) (%).

В результаті генотипування було встановлено, що частота різних алельних варіантів гена протеасоми PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$) у пацієнтів з ішемічним інсультом була такою: C/C – 75,5 %, C/G – 21,4 %, G/G – 3,1 %, що достовірно не відрізнялось від групи контролю: C/C – 80,2 %, C/G – 19,8 %, G/G – зареєстровано ($P=0,22$ за критерієм χ^2); (рис. 12).

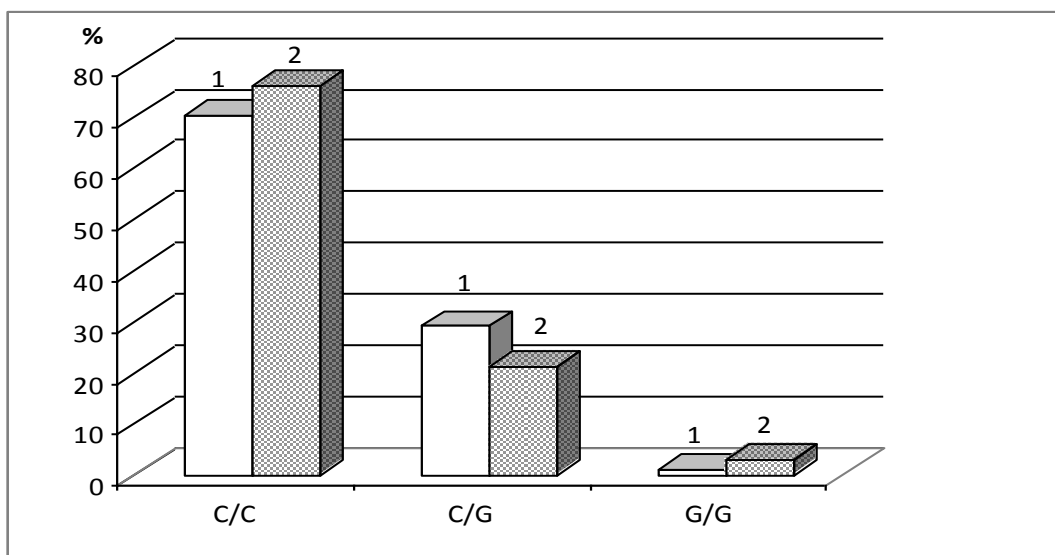


Рис.12. Частота алельних варіантів субодиниці гена протеасоми PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$) серед осіб контрольної (1) та хворих основної груп (2) (%).

Таким чином, серед 92 генотипованих осіб не було жодної гомозиготи (G/G). Це свідчить про те, що в українській популяції цей поліморфізм гена PSMA6 зустрічається надзвичайно рідко.

Ми проаналізували вік, в якому розвинувся ішемічний інсульт, у хворих з різними алельними варіантами субодиниць гена LMP2 ($Arg_{60} \rightarrow His$) та PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$). Було встановлено, що середній вік хворих з мажорним гомозиготним алельним варіантом (Arg/Arg) становив $69,4 \pm 10,8$ роки, алельним варіантом (Arg/His) – $73,9 \pm 7,7$ роки та мінорним гомозиготним алельним варіантом (His/His) – $63,3 \pm 6,5$ роки. Таким чином, було встановлено, що у пацієнтів – гомозигот за мінорним алельним варіантом гена LMP2 ішемічний інсульт розвинувся в середньому на 10,6 років раніше порівняно з гетерозиготним варіантом (Arg/His) та на 6,1 роки раніше порівняно з хворими з мажорним гомозиготним варіантом (Arg/Arg). Подібна, однак дещо менш виражена, тенденція була виявлена і при аналізі впливу алельного поліморфізму субодиниці гена протеасоми PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$): середній вік хворих з мажорним гомозиготним алельним варіантом (C/C) становив $70,3 \pm 10,3$ роки, гетерозиготним алельним варіантом (C/G) – $71,7 \pm 9,5$ роки та мінорним гомозиготним алельним варіантом (G/G) – $66,0 \pm 9,5$ роки ($P > 0,05$). У хворих з мінорним гомозиготним алельним варіантом субодиниці гена протеасоми PSMA6 (G/G) ішемічний інсульт виник в середньому на 5,7 роки раніше порівняно з пацієнтами з гетерозиготним варіантом (C/G) та в середньому на 4,3 роки раніше порівняно з особами з мажорним гомозиготним алельним поліморфізмом (C/C) ($P > 0,05$).

Також ми проаналізували поширеність цукрового діабету, миготливої аритмії, перенесеного в минулому інфаркту міокарда та ішемічного інсульту серед пацієнтів з різними алельними варіантами субодиниць гена LMP2 ($Arg_{60} \rightarrow His$) та гену PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$).

При порівнянні частоти вищезгаданих факторів ризику у хворих з різними варіантами субодиниць гена PSMA6 ($C^8 \rightarrow G$) встановлено, що у пацієнтів з мінорним варіантом генотипу поширеність перенесених в минулому інфаркту міокарда та

ішемічного інсульту, хоча й не сягали достовірної різниці, були більш розповсюдженими порівняно з гетерозиготним та мажорним гомозиготним варіантом субодиниць гена PSMA6: інфаркт міокарда в анамнезі зареєстровано у 1 з 3 хворих ($P=0,098$), а перенесений в минулому ішемічний інсульт у 2 з 3 хворих ($P=0,056$).

В результаті проведеного порівняння нами встановлено, що поширеність цукрового діабету серед хворих на гострий ішемічний інсульт з різними алельними варіантами субодиниць гена LMP2 ($\text{Arg}_{60} \rightarrow \text{His}$) достовірно відрізнялась ($P=0,032$): найбільш поширеним цукровий діабет був серед пацієнтів з гетерозиготним варіантом (Arg/His) – зареєстрований у 11 (31,4%) з 36 хворих. Поширеність миготливої аритмії, перенесених в минулому інфаркту міокарда та ішемічного інсульту достовірно не відрізнялась у пацієнтів з різними варіантами субодиниць гена LMP2.

В результаті проведеного дослідження встановлено, що частота різних алельних варіантів гену субодиниці протеасоми PSMA6 та імунопротеасоми LMP2 у хворих з ішемічним інсультом достовірно не відрізнялась від пацієнтів без інсульту. Нами виявлено, що у пацієнтів з мінорним гомозиготним алельним варіантом (His/His) гена субодиниці імунопротеасоми LMP2 та у осіб з мінорним гомозиготним алельним варіантом субодиниці гена протеасоми PSMA6 (G/G) ішемічний інсульт виникає в значно молодшому віці порівняно з пацієнтами з гетерозиготним та мажорним гомозиготним поліморфізмом; цукровий діабет був серед пацієнтів з гетерозиготним варіантом (Arg/His).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою сучасних молекулярно-генетичних методів проведено дослідження ролі протеасомного протеолізу при ішемічному інсульті (дослідження змін протеасомної активності в нервовій тканині), а також ролі алельних поліморфізмів генів PSMA6 та LMP2 у патогенезі даної патології, що відкриває можливості для подальшого вивчення протеасомного протеолізу та його ролі в ішемічному інсульті, а також створення можливостей впливу на нього з метою профілактики та лікування мозкових захворювань в цілому та ішемічного інсульту зокрема.

1. На моделі транзиторної оклюзії середньої мозкової артерії встановлено, що структурні та ультраструктурні зміни в зоні пошкодження тканин головного мозку щурів мали прогресуючий характер зі збільшенням постоклюзійного періоду.
2. Показано зниження двох видів протеолітичної активності (трипсиноподібної у 2 рази, хімотрипсиноподібної в 1,2 рази) у тканинах мозку при транзиторній оклюзії середньої мозкової артерії.
3. Зміни активностей протеасоми можуть свідчити про переважання імунопротеасоми порівняно до конституційної протеасоми при 6 та 72 годинних періодах реперфузії в тканинах мозку, а також про переважання конституційної протеасоми при 24 годинній реперфузії.

4. Виявлено кореляцію між змінами протеасомної активності, морфологічними ознаками нейронального пошкодження та змінами поведінкової активності тварин в динаміці розвитку ішемічного інсульту.
5. Виявлено, що у пацієнтів з мінорним гомозиготним алельним варіантом (His/His) гена субдиниці імунопротеасоми LMP2 та у осіб з мінорним гомозиготним алельним варіантом субдиниці гена протеасоми PSMA6 (G/G) ішемічний інсульт виникає в значно молодшому віці порівняно з пацієнтами з гетерозиготним та мажорним гомозиготним поліморфізмом, що може слугувати прогнозованим висновком для групи ризику.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Савчук О.І., Ярмолюк Є.С., Гончаров С.В., Пашевін Д.О., Досенко В.Є., Скибо Г.Г. (2012). Зміни активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного інсульту. *Таврійський медико-біологічний вісник*, 3, 295-298. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).
2. Савчук О.І., Скибо Г.Г. (2013). Моделювання ішемічного інсульту в щурів в різні періоди реперфузії. *Галицький лікарський вісник. Науково-практичний часопис*, 1/2(20), 75-77. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).
3. Соколова Л.І., Мельник В.С., Маньковський Д.С., Савчук О.І., Досенко В.Є., Скибо Г.Г. (2014). Особливості динаміки неврологічного дефіциту та рання летальність у хворих з гострим ішемічним інсультом залежно від алельного поліморфізму генів протеасоми. *Український неврологічний журнал*, 3/4, 15-21. (Особистий внесок здобувача полягає у визначенні алельного поліморфізму генів протеасоми, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).
4. Савчук О.І., Мельник В.С., Гончаров С.В., Шандюк В.Ю., Строй Д.О., Досенко В.Є., Соколова Л.І., Скибо Г.Г. (2014). Частота алельного поліморфізму генів субдиниць конституційної протеасоми та імунопротеасоми у хворих на ішемічний інсульт. *Фізіологічний журнал*, 1(60), 49-55. (Особистий внесок здобувача полягає у визначенні алельного поліморфізму генів протеасоми, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

5. Ярмолюк Є.С., Стайно Л.П., Савчук О.І., Захарцева Л.М. (2015). Ангіогенний і нейропротекторний вплив тканинної трансплантації при експериментальному ішемічному інсульті. *Медична наука України*, 1(11), 28-36. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження).
6. Savchuk O.I., Orlovsky M.O., Iarmoliuk Ie.S., Goncharov S.V., Dosenko V.E., Skibo G.G. (2015). Proteasomal activity in brain tissue following ischemic stroke in Wistar rats. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 5(15), 11-20. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).
7. Савчук О.І., Скибо Г.Г. (2018). Характеристика нервової тканини при моделюванні фокальної церебральної ішемії у щурів у різні періоди реперфузії. *Вісник морфології*, 3(24), 58-64. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

Тези доповідей на наукових конференціях:

1. Savchuk O.I., Goncharov S.V., Pashevin D.O., Dosenko V.E., Skibo G.G. (2012). Effect of ischemic stroke on proteasome activity in brain tissues. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 6, 100 (II conference "Physiology: from molecules to the body" at Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, October, 8-9). *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
2. Savchuk O.I., Orlovsky M.O., Dosenko V.E., Skibo G.G. (2013). Proteasome activity changes at different periods after focal ischemia. *7th International Symposium On Experimental And Clinical Neurobiology*, Kosice, Slovak Republic, June 23-27, 95. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
3. Melnyk V., Savchuk O., Dosenko V., Sokolova L., Skibo G. (2013). Allelic polymorphism of the LMP2 and PSMA6 gene in acute ischemic stroke patients in Ukrainian population. *Barcelona Journal of the Neurological Sciences*, 333, 184.
4. Savchuk O.I., Goncharov S.V., Dosenko V.E., Skibo G.G. (2013). Proteasome activity changes after focal ischemia. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 59(4), 30. (тези X Anniversary Ukrainian–Polish–Belorussian Conference “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications”, Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, 10-13 October). *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
5. Savchuk O.I., Yarmoluk E.S., Dosenko V.E., Skibo G.G. (2013). Proteasome proteolysis at focal ischemia. (тези III conference "Physiology: from molecules to the body" at Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, October, 24-25). *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

6. Скибо Г.Г., Коваленко Т.М., Ніконенко О.Г., Лушнікова І.В., Осадченко І.О., Орловський М.О., Пацева М.А., Майстренко А.М., Савчук О.І., Гончарова К.О., Малєєва Г.В. (2014). Структурна пластичність нервових клітин в умовах нестачі кисню та глюкози. *Фізіологічний журнал*, 3(60), 18-19. *Публікація тез, участь у портрній сесії.*
7. Савчук О.І., Скибо Г.Г. (2018). Характеристика нервової тканини при моделюванні фокальної церебральної ішемії у щурів у різні періоди реперфузії. *Збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю. Тернопіль*, 109-111. *Публікація тез, участь у портрній сесії.*

АНОТАЦІЯ

Савчук О.І. Участь протеасомного протеолізу в ішемічному ушкодженні мозку. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, Україна.

Дисертація присвячена вивченню змін протеасомної активності в нервовій тканині, а також ролі алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми (PSMA6 та LMP2) у патогенезі ішемічного інсульту за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, а також експериментальної моделі фокальної церебральної ішемії шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії (ОСМА). Алельний поліморфізм генів LMP2 (Arg₆₀→His) та PSMA6 (C⁸→G) (rs 1048990) визначали із застосуванням методики RealTimePCR. Вперше виміряно всі три види протеолітичної активності протеасоми (трипсиноподібна, хімотрипсиноподібна та пептидглютаміл пептидгідролазна) в нервовій тканині щурів і їх зміни за умов відтворення ішемічного інсульту. Результати дослідження показали, що зміни активностей протеасоми свідчать про переважання імунопротеасоми порівняно до конституційної протеасоми при 6 та 72 годинних періодах реперфузії в тканинах мозку, а також про переважання конституційної протеасоми при 24 годинній реперфузії. Вперше проведено комплексні дослідження нервових клітин кори та стріатума головного мозку на світлооптичному та електронно-мікроскопічному рівнях з вивчення динаміки їх структурних змін після фокальної церебральної ішемії у щурів. Виявлено кореляцію між змінами протеасомної активності та змінами поведінкової активності тварин в динаміці розвитку ішемічного інсульту. Вперше досліджено частоту алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці конституційної та імунопротеасом, у хворих на ішемічний інсульт. Виявлено, що у пацієнтів з мінорним гомозиготним алельним варіантом (His/His) гена субодиниці імунопротеасоми LMP2 та у осіб з мінорним гомозиготним алельним варіантом субодиниці гена протеасоми PSMA6 (G/G) ішемічний інсульт виникає в значно молодшому віці порівняно з пацієнтами з гетерозиготним та мажорним гомозиготним поліморфізмом.

Ключові слова: ішемічний інсульт, алельний поліморфізм, оклюзія середньої мозкової артерії, протеасома

АННОТАЦІЯ

Савчук Е.И. Участие протеасомного протеолиза в ишемическом повреждении мозга. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина.

Диссертация посвящена изучению изменений протеасомной активности в нервной ткани, а также роли аллельных полиморфизмов генов, кодирующих субъединицы

протеасомы (PSMA6 и LMP2) в патогенезе ишемического инсульта с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, а также экспериментальной модели фокальной церебральной ишемии путем монофиламентной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). Аллельный полиморфизм генов LMP2 (Arg60→His) и PSMA6 (C⁻⁸→G) (rs 1048990) определяли с применением методики RealTime PCR. Впервые измерены все три вида протеолитической активности протеасомы (трипсиноподобная, химотрипсиноподобная и пептидглутамил пептидгидролазная) в нервной ткани крыс и их изменения в условиях воспроизведения ишемического инсульта. Результаты исследования показали, что изменения активностей протеасомы свидетельствуют о преобладании иммунопротеасомы сравнению с конституционной протеасомы при 6 и 72 часовых периодах реперфузии в тканях мозга, а также о преобладании конституционной протеасомы при 24 часовой реперфузии. Впервые проведены комплексные исследования нервных клеток коры и стриатума мозга на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях по изучению динамики их структурных изменений после фокальной церебральной ишемии у крыс. Выявлена корреляция между изменениями протеасомной активности и изменениями поведенческой активности животных в динамике развития ишемического инсульта. Впервые исследовано частоту аллельного полиморфизма генов, кодирующих субъединицы конституционной и иммунопротеасом, у больных с ишемическим инсультом. Выявлено, что у пациентов с минорным гомозиготным аллельных вариантов (His/His) гена субъединицы иммунопротеасомы LMP2 и у лиц с минорным гомозиготным аллельных вариантов субъединицы гена протеасомы PSMA6 (G/G) ишемический инсульт возникает в значительно более молодом возрасте по сравнению с пациентами с гетерозиготным и мажорным гомозиготным полиморфизмом.

Ключевые слова: ишемический инсульт, аллельные полиморфизм, окклюзия средней мозговой артерии, протеасома

SUMMARY

Savchuk O.I. Participation of proteasomal proteolysis following ischemic damage of the brain. – Manuscript.

Thesis submitted to obtain a scientific degree of the candidate of biological sciences in the specialty 03.00.13 — physiology of human and animals. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

The thesis is dedicated to study changes in proteasome activity in the nervous tissue, as well as the role of allelic polymorphisms of the genes coding for the proteasome subunits (PSMA6 and LMP2) in the pathogenesis of ischemic stroke using the real-time polymerase chain reaction method, also the experimental model of focal cerebral ischemia by monofilament occlusion of the middle cerebral artery (MCAO). The allelic polymorphism of the genes LMP2 (Arg60→His) and PSMA6 (C⁻⁸→G) (rs 1048990) was determined using the Real Time PCR method. For the first time, all three types of proteolytic activity of proteasome (trypsin-like, chymotrypsin-like and peptidylglutamyl

peptidhydrolase) were measured in the nerve tissue of rats and their changes in conditions of reproduction of ischemic stroke. The results of the study showed that changes in proteasome activity indicate predominance of immunoproteasomes compared to constitutional proteasome at 6 and 72 hours of reperfusion in brain tissues, as well as the predominance of constitutional proteasome at 24 hour reperfusion. For the first time complex investigations of cortical nerve cells and striatum of the brain on optical and electron microscopic levels have been carried out to study the dynamics of their structural changes after focal cerebral ischemia in rats. The correlation between changes in proteasome activity and changes in behavioral activity of animals in the dynamics of ischemic stroke was revealed. For the first time, the frequency of allelic polymorphism of genes encoding subunit constitutional and immunoproteasome in patients with ischemic stroke has been investigated. We found that in patients with a minor homozygotes allelic variant (His/His) of the subunit of the LMP2 immunoproteasome member and in patients with a minor homozygotes allelic variant of the PSMA6 (G/G) subunit, the ischemic stroke occurs at a significantly younger age compared with heterozygotes and major homozygotes polymorphism.

Key words: ischemic stroke, allelic polymorphism, the middle cerebral artery occlusion, proteasome.

Перелік основних умовних позначень

BCA – внутрішня сонна артерія

ЗСА – загальна сонна артерія

ЗоСА – зовнішня сонна артерія

І – ішемічний інсульт

ОСМА – оклюзія середньої мозкової артерії

ПГПГ – пептидилглутаміл пептидгідролазна активність протеасомного комплексу

СМА – середня мозкова артерія

ТП – трипсиноподібна активність протеасомного комплексу

ТТХ – 2,3,5 – трифенілтетразолію хлорид

ХТП – хімотрипсиноподібна активність протеасомного комплексу

LMP – великі мультифункціональні протеїнази

SNP – поліморфізм поодиноких нуклеотидів