

П.О. Неруш, О.М. Демченко

## Вплив гіпотиреозу на гліальний фібрилярний кислий білок у структурах головного мозку щурів

*В исследованиях на крысах трех возрастных групп (неполовозрелых 5 нед, половозрелых 5 мес и старых 18–20 мес) линии Вистар изучали содержание и полипептидный состав глияльного фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в коре больших полушарий, гипокампе, таламусе и стволе мозга в условиях гипофункции щитовидной железы. Гипотиреоидное состояние моделировали введением с пищей мерказолила (10 мг/кг). В конце эксперимента определяли содержание тиреотропного гормона (ТТГ) и тироксина ( $T_4$ ) в сыворотке крови иммуноферментным способом. Установлено, что экспериментальный гипотиреоз вызывал существенное повышение содержания филаментной фракции ГФКБ у крысят (в таламусе и стволе мозга) и половозрелых животных (в таламусе и коре больших полушарий) в пределах 14–72 %. При проведении иммуноблотинга отмечалось наличие деградированных полипептидов с молекулярной массой 47–37 кДа, которое вызвано активацией цитоскелетных перестроек астроглии. У старых крыс в этих условиях существенных изменений не отмечалось, что, возможно, снижает пластичность ЦНС.*

### ВСТУП

У нейрогуморальних механізмах регуляції фізіологічних функцій організму, його життєдіяльності й адаптації до різноманітних змін зовнішнього та внутрішнього середовища одне з провідних місць займають гормони. Починаючи з кінця 50-х років минулого століття, увагу дослідників усе більше привертають механізми впливу гормональних факторів на когнітивні функції головного мозку. Нині лишається відкритим питання відносно співвідношення вмісту гормонів в організмі та характеру процесів вищої нервової діяльності [8, 14, 15, 17].

Встановлено, що гіпотиреозидизм у процесі розвитку призводить до зниження нейрональної диференціації та синаптогенезу через зменшення дендритичних і аксональних відростків [16, 21]. Ці ефекти значно варіюють залежно від структур головного мозку і типу нервових клітин. У мозку щурів з гіпотиреозом встановлено зниження

загальної кількості мієліну та затримки дозрівання мієлінових білків. В олігодендроцитах мозку дорослих щурів з гіпотиреозом відмічено зниження вмісту тРНК головних мієлінових протеїнів, протеоліпідного білка, основного білка мієліну та мієлінзв'язаного глікопротеїну [20].

Разом з тим у літературі відсутні дані відносно впливу гіпотиреозидного стану на гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) в утвореннях головного мозку. Відомо, що ГФКБ впливає на синаптогенез. Мета нашої роботи – вивчити вплив гіпотиреозу на вміст ГФКБ у корі головного мозку, гіпокампі, стовбуровому відділі і таламусі щурів у процесі старіння.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 48 щурах трьох вікових груп лінії Вістар – статевонезрілі (5 тиж) статевозрілі (5 міс), старі (18–20 міс). Тварини були розподілені на дві

підгрупи кожної вікової групи – інтактні та щури з гіпотиреозом. Для дослідження брали тварин приблизно з однаковою емоційною характеристикою, котру визначали на основі загальноприйнятого тесту «відкрите поле».

Гіпотиреодний стан моделювали введенням з їжею мерказолілу в дозі 10 мг/кг упродовж двох тижнів. У кінці дослідження у сироватці крові тварин визначали вміст тиреотропного гормону та тироксину ( $T_4$ ) імуноферментним методом [4].

По закінченні зазначеного терміну тварин декапітували, виділяли головний мозок і розділяли його на відділи – кора великих півкуль, стовбур мозку, таламус і гіпокамп. Тканину мозку після очищення від оболонок і кровоносних судин поміщали у скляний гомогенізатор з тефлоновим поршнем з додаванням 50 ммоль/л тріс-НСІ буфера (рН 7,4) у співвідношенні тканина : буфер – 1:6. Тріс-буферна система (буфер А) була наступного складу (ммоль/л): ЕДТА – 2, меркаптоетанол – 1, фенілметилсульфоніл-фторид – 0,1 та соєвий інгібітор трипсину – 5. Дослідження проводили при 4°C. Гомогенат центрифугували при 30000 g впродовж 60 хв. Отриманий супернатант ( $S_1$ ) містив розчинні білки мозку. Осад ( $P_1$ ) промивали після його ресуспендування у тому ж буфері та центрифугування впродовж 45 хв при 30000 g. Після цього осад ресуспендували в буфері А з додаванням 4 моль/л сечовини (буфер В) і інкубували 12 год. Подальше центрифугування проводили при 30000 g упродовж 60 хв. Супернатант ( $S_2$ ) містив водонерозчинні філаментні білки. Білкові фракції  $S_1$  та  $S_2$  ділили за молекулярною масою методом електрофорезу у пластині поліакриламідного гелю товщиною 1 мм за методикою Laemmli [18].

Для розділення білків розчинної та сечовинної фракції головного мозку у гелі створювали градієнт акриламідну  $T=7-18$  % при наявності 0,1%-го додецилсульфату натрію. Аналіз поліпептидного складу проводили за допомогою імуноблотингу. Після

електрофоретичного розділення білки переносили на нітроцелюлозні мембрани у 12,5 ммоль/л тріс-НСІ буфері при наявності 0,2 моль/л в-гліцину, 30 % метанолу, 2 моль/л сечовини. Для імунохімічної ідентифікації ГФКБ використовували поліклональну моноспецифічну кролячу антисироватку у розведенні 1:1500 [19].

Кількісний аналіз ГФКБ проводили порівнянням інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон між експериментальними та контрольними пробами. Обробку одержаних результатів проводили методами математичної статистики для малих виборок [7].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Верифікація гіпотиреодного стану проводилася на основі визначення вмісту  $T_4$  та ТТГ у плазмі крові. Вміст тироксину за умов гіпотиреозу у статевонезрілих, статевозрілих і старих щурів становив  $6,31 \pm 0,09$ ,  $2,03 \pm 0,39$ ,  $6,35$  мкг/дл  $\pm 0,11$  мкг/дл відповідно. У інтактних тварин цей показник був  $9,22 \pm 0,15$ ,  $4,86 \pm 0,24$ ,  $9,32$  мкг/дл  $\pm 0,10$  мкг/дл відповідно. Концентрація тиреотропіну у щурів з гіпотиреодним станом коливалась у межах  $0,68$  мкМО/мл  $\pm 0,01$  мкМО/мл у першій віковій групі,  $0,44$  мкМО/мл  $\pm 0,07$  мкМО/мл у другій,  $1,46$  мкМО/мл  $\pm 0,38$  мкМО/мл у третій за віком групі. У інтактних осіб концентрація ТТГ становила у статевонезрілих  $0,42 \pm 0,03$ , у статевозрілих  $0,25 \pm 0,09$ , у старих тварин  $0,42$  мкМО/мл  $\pm 0,07$  мкМО/мл відповідно.

Встановлено, що дефіцит тиреоїдних гормонів відображувався на стані поліпептидів проміжних філаментів астроглії залежно від віку тварин.

У статевонезрілих щурів в умовах експериментального гіпотиреозу спостерігалось пригнічення рухливо-дослідницької активності: кількість пересічених квадратів, обстежених нірок, підйомів на задні лапи зменшувалася від 34 % до 65 % ( $P < 0,05$ ). Емоційність при

цьому підвищувалася на 38 % ( $P < 0,05$ ).

Відносно нейроспецифічних білків проміжних філаментів астроглії, маркером яких є ГФКБ, відмічалось істотне накопичення його філаментної фракції у таламусі та стовбурі мозку на 29 і 72 % ( $P < 0,05$ ) відповідно (рис. 1). Крім того, в таламусі підвищувався вміст і розчинної фракції до 78 % ( $P < 0,05$ ), що в 2,5 раза перевищував рівень зростання нерозчинної фракції. Тому співвідношення філаментна/розчинна форми зміщувалось у бік останньої – з 1,78 у контролі до 1,29 у групі тварин з гіпотиреозом. У стовбурі мозку цей індекс, навпаки, як це видно з отриманих результатів, збільшився з 3,5 до 5,19 відносно інтактних щурів.

Аналіз імуноблотингу ГФКБ, який дає можливість вивчити не тільки вміст, а і склад поліпептидів, показує наявність у філаментній фракції стовбура мозку статевонезрілих тварин низькомолекулярних поліпептидів з молекулярною масою 45–40 кДа поряд з основною субодиницею 49 кДа (рис. 2).

Таке значне підвищення філаментного пулу цитоскелетних поліпептидів могло відбуватися з причини підсилення генної експресії білка, прискореної проліферації астроцитів, а також інгібування протео-

літичної активності. Якщо враховувати, що за умов гіпотиреозу відбувається активація протеолізу, то останнє припущення можна відкинути.

Усе вищевикладене дає можливість стверджувати, що підвищення вмісту полімеризованого ГФКБ у таламусі та стовбуровому відділі та поява в останньому деградованих поліпептидів пов'язані з активацією експресії білка і проліферацією астроцитів, а також їх цитоскелетними перебудовами. Відомо, що дефіцит тиреоїдних гормонів на тлі підвищених катаболічних процесів супроводжується гальмуванням синтезу білків, зокрема завдяки зниженню матричної активності ДНК, процесів транскрипції [3]. Тому різке підвищення фібрилогенезу, особливо в стовбурі мозку, внаслідок підвищення експресії ГФКБ або проліферації астроцитів є неспецифічною, можливо, захисною реакцією глії за цих умов. Відомо, що астроглія, завдяки наявності в ній глутамінсинтетази, активно поглинає глутамат, який є основним збуджувальним медіатором у ЦНС [1, 2]. Астроцити локалізовані здебільшого поряд з глутаматергічними нейронами. Це означає, що вони займають позиції в синаптичному

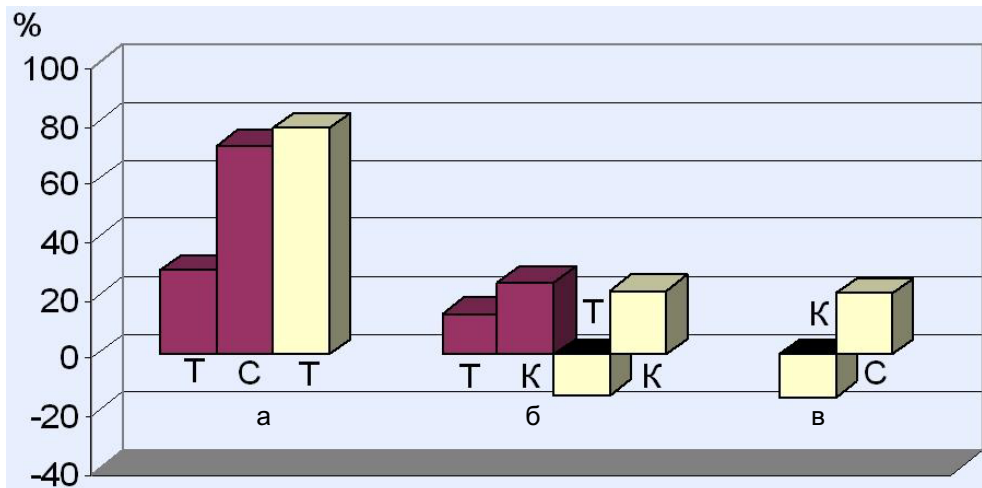


Рис. 1. Динаміка вмісту філаментної і розчинної форм гліального фібрилярного кислого білка в головному мозку щурів різного віку за умов гіпотиреоїдного стану: а – статевонезрілі, б – статевозрілі, в – старі щури; К – кора головного мозку, С – стовбур, Т – таламус, темні стовпчики – філаментна фракція; світлі – розчинна.  $P < 0,05$  відносно інтактних щурів

апараті, які дозволяють ефективно виконувати функцію поглинання та метаболізму глутамату. Можливо, в таламусі та, особливо, в стовбурі мозку статевонезрілих тварин активно зменшується вміст глутамату, що і призводить до гальмівних процесів у неспецифічній модулюючій системі мозку, яку представляє ретикулярна формація стовбурових утворень, а також неспецифічні ядра таламуса. Все це може підсилюватися впливом ГАМК, яка синтезується у нейронах після активного повернення глутаміну з астроцитів. Результатом цих процесів може бути різке пригнічення поведінкової діяльності незрілих щурів, яке було встановлене нами раніше. Зниження орієнтовно-дослідницької та рухової активності спостерігалось і при блокаді НМДА-рецепторів у 27–28-добових щурів [11].

У статевозрілих щурів адаптованість до перебігу гіпотиреозу була більш виражена. Це проявилось в активації поведінкової діяльності, яка була на рівні інтактних тварин. Пригніченим був тільки показник грумінгу на 58 %, що відмічали й інші дослідники [13].

Дисфункція щитоподібної залози викли-

кала також суттєві зміни рівня ГФКБ проміжних філаментів астроцитів, зокрема сприяла підвищенню сечовинного пулу поліпептидів цитоскелета гліальних філаментів у таламусі та корі великих півкуль на 14 та 25 % ( $P < 0,01$ ; див. рис. 1). Окрім фібрилізованої фракції, в корі спостерігалось накопичення і розчинної форми на 22 % ( $P < 0,01$ ) відносно інтактної групи тварин. Коефіцієнт співвідношення двох пулів ГФКБ у цій структурі збільшувався, незважаючи на перевищення „розчинності”, у бік полімеризованої фракції з 2,03 до 2,85. На імуноблотингу філаментних і розчинних форм ГФКБ різних відділів мозку статевозрілих щурів за умов гіпотиреозу видно, що основна їх частина належить головній субодиниці з молекулярною масою 49 кДа (див. рис. 2). У таламусі та корі головного мозку з’являються деградовані поліпептиди фракції масою 47–37 кДа. Зокрема, в нерозчинній фракції таламуса відмічено зони інтенсивності білків діапазона 45–43 кДа. У корі великих півкуль деградовані білки знаходяться в розчинній формі з молекулярною масою 40–37 кДа. Якщо

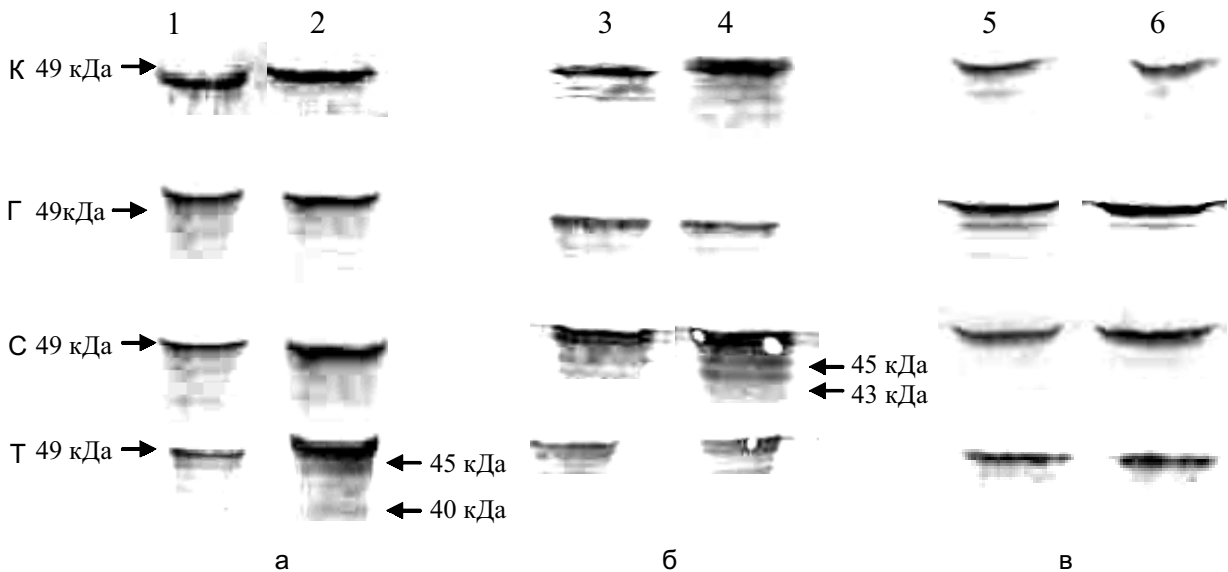


Рис. 2. Імуноблотинг препаратів гліального фібрилярного кислого білка з кори великих півкуль (К), гіпокамп (Г), стовбура мозку (С), таламуса (Т): а – статевонезрілі; б – статевозрілі; в – старі щури; 1, 3, 5 – інтактні тварини, 2, 4, 6 – тварини з гіпотиреозом

вважати, що підвищення вмісту деградованих форм – один із можливих шляхів перебудови клітинного цитоскелета, то можна дійти висновку, що в цих утвореннях мозку активується процес пластичних перетворень гліальних філаментів, що є позитивним моментом у діяльності ЦНС за цих умов, зокрема, відносно поведінкових реакцій. На відміну від статевонезрілих щурів, у зазначеній віковій групі підвищення вмісту ГФКБ проміжних філаментів астроцитів було досить помірним. Тому очевидно, такі зміни можна розглядати як неспецифічну адаптивно-компенсаторну реакцію таламуса та неокортекса статевозрілих тварин на дефіцит тиреоїдних гормонів, яка не впливає на метаболізм глутамату.

У старих щурів експериментальний гіпотиреоз призводив до різкого зниження рухливості: кількість пересічених квадратів і вертикальних підйомів зменшилась на 51 та 44 % відповідно ( $P < 0,05$ ). Дослідницька діяльність також гальмувалась на 39 % ( $P < 0,05$ ). Тривалість грумінгу скорочувалась на 58 % відносно контрольної групи.

Вміст філаментної фракції ГФКБ вивчених структур мозку у старих щурів з гіпотиреозом не відрізнявся від значень у інтактних тварин і був представлений в основному інтактним поліпептидом масою 49 кДа. Зміни вмісту ГФКБ спостерігалися лише в розчинній фракції, концентрація якої зменшувалась у неокортексі на 15 % і збільшувалась у стовбурі мозку на 21 % ( $P < 0,05$ ). У складі деполімеризованої форми зустрічалися і деградовані поліпептиди з нижчою за 49 кДа молекулярною масою: в корі мозку вони представлені зонами 47–37 кДа, а в стовбурі – 47–42 кДа. Отже, у старих щурів перебіг гіпотиреозу не викликав суттєвих змін у структурних поліпептидах проміжних філаментів астроглії.

Відсутність реакцій з боку гліальних філаментів у цій віковій групі тварин, можливо, пов'язана зі зменшенням чутливості ЦНС та інших систем організму до

тироксину [5, 9, 10]. Не можна виключити як процесу зниження пластичних перебудов, пов'язаних із загальним спадом білоксинтезуючих функцій, що на фоні гіпотиреозу має ще більше вираження, так і формування в процесі старіння особливої метаболічної ситуації, відносно стійкої до дії ендокринних регуляторів. Крім того, підвищення активності кальпаїнів (до 40 %) у мозку старих щурів може посилювати протеолітичні процеси [6].

Відсутність змін поліпептидного складу нерозчинної форми ГФКБ проміжних філаментів глії вказує на зменшення пластичності ЦНС і як наслідок – зниження можливостей адаптаційних реакцій організму, зокрема відносно поведінкових реакцій. Таке різке гальмування всіх її видів у старих щурів, можливо, пов'язане ще й зі змінами функціонування моноаміноергічних систем мозку [12]. Відомо, що у таких тварин зменшується як кількість адренорецепторів, так і вміст біогенних амінів. Поскілки пластичність нейронів і глії послаблюється з віком, це може бути причиною погіршення синаптичної передачі в моноамінергічних системах різних регіонів ЦНС. Дефіцит функціонування цього важливого активуючого механізму, який стає ще виразнішим на фоні гіпотиреозу, можливо, спричинює гальмування поведінкової реакції старих щурів.

Таким чином, можна вважати, що реактивність астрогліальної відповіді за умов дисфункції щитоподібної залози залежить від вікових особливостей розвитку нервової системи. У статевонезрілих щурів спостерігалось різке підвищення експресії ГФКБ як розчинної, так і нерозчинної фракції в таламусі та філаментної форми в стовбурових утвореннях, що в свою чергу спричинює фібрилогенез і проліферацію астроцитів. Реакція глії на дефіцит тиреоїдних гормонів у статевозрілих тварин мала таку саму направленість, але накопичення філаментної

фракції поліпептидів проміжних філаментів астроглії відбувалося в таламусі та неокортексі значно зменшеною мірою. У старих шурів істотних змін з боку ГФКБ цитоскелета астрочитів не відмічалось, що можливо, послаблює ступінь адаптованості ЦНС за умов експериментального гіпотиреозу, зокрема при формуванні поведінкових реакцій. Отримані нами результати свідчать про те, що ефекти гіпотиреоїдизму в дорослому віці потенційно можуть бути усунені при адекватній замісній терапії тиреоїдними гормонами.

**P. A. Nerush, E. D. Demchenko**

#### **THE CONDITION OF GLIAL FIBRILLARY ACID PROTEIN (GFAP) IN THE STRUCTURES OF RATS' BRAIN UNDER HYPOTHYROIDISM.**

The content and polypeptide composition of the glial fibrillary acid protein (GFAP) in the hemispheres' cortex, hippocamp, thalamus and brain stem in the condition of thyroid gland hypofunction in Wistar rats of different age (pre-adolescent rats five weeks old, pubertal rats five months old and old rats 18 – 20 months old) were investigated. Hypothyroidism was created by adding mercasolil (10 mg/kg) to the standard diet. At the end of experiment the level of thyrotropin and thyroxin in serum was defined with immunoenzyme method. It was established that experimental hypothyroidism caused significant increase 14-72% of the filament fraction GFAP content in the thalamus and brain stem (preadolescent rats) and in the thalamus and hemispheres' cortex (adult rats). Defragmented polypeptides with molecular weight 47-37 kDa were revealed by immunoblotting. It is connected with the activation of cytoskeletal changes of astroglia. There were changes in the group of old rats that is possibly a reason of reduced the flexibility of CNS.

*Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine.*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бокша И.С. Взаимосвязь нейронов и глиальных клеток через метаболизм глутамата в мозге здоровых людей и больных психическими заболеваниями // Биохимия. – 2004. – **69**, № 7. – С. 869–886.
2. Бурбаева Г. Ш., Бокша И.С., Турищева М.С. и др. Нарушение метаболизма глутамата в мозге при психической патологии // Вестн. РАМН. – 2001. – №7. – С. 34–37.
3. Громакова Н.А., Зильберман С.У., Коноваленко О.А. Возрастные особенности белок- и РНК-синтетических

процессов при экспериментальном гипер- и гипотиреозе // Биохимия. – 2001. – **66**, №7. – С. 940–946.

4. Демченко О.М., Неруш П.О. Особенности болевой реакции у старых шуров за умов тиреопатичного стану // Тавр. медико-биол. вестн. – 2004. – 7, №1. – С. 55–59.
5. Кавок Н.С., Бабенко Н.А. Возрастные особенности метаболизма глицеролипидов в печени крыс при кратковременном влиянии тироксина // Укр. биохим. журн. – 2001. – **73**, №5. – С. 80–84.
6. Кастрикина Т.Ф., Малышева М.К., Стельмах Л.Н. Возрастные изменения активности кальпаина в головном мозгу крысы // Пробл. старения и долголетия. – 2005. – **14**, приложение. – С. 31.
7. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – **47**, №6. – С. 776–791.
8. Комиссаренко В.П. Гормоны и головной мозг. – К.: Наук. думка, 1968. – 271 с.
9. Красильникова О.А., Кавок Н.С., Никитина И.В. и др. Возрастные особенности обмена гликозилфосфатидилинозитола в печени при действии на крыс L-тироксина // Укр. биохим. журн. – 2002. – **74**, № 5. – С. 83–88.
10. Красильникова О.А., Шахова Е.Г., Куликова В.С. и др. Возрастные особенности обмена сфинголипидов в печени крыс линии Вистар // Проблемы старения и долголетия. – 2005. – **14**, приложение. – С. 30.
11. Латышева Н.В., Раевский К.С. Поведенческий анализ последствий хронической блокады глутаматных рецепторов NMDA – типа в раннем постнатальном периоде у крыс // Журн. высш. нерв. деятельности. – 2001. – **51**, № 6. – С. 733–742.
12. Лысенко А.В., Карантыш Г.В., Менджеричкий А.М. Участие моноаминов в изменении представленности основных форм поведения крыс разного возраста при гипокинезии // Нейрохимия. – 2001. – **18**, № 2. – С. 132–141.
13. Сапронов Н.С., Федотова Ю.О. Влияние L-триптофана на условнорефлекторное обучение и поведение крыс при экспериментальной патологии щитовидной железы // Журн. высш. нерв. деятельности. – 2001. – **51**, № 3. – С. 367–372.
14. Сапронов Н.С., Федотова Ю.О. Гормоны гипоталамо – гипофизарно – тиреоидной системы и мозг. – СПб.: Лань, 2002. – 284 с.
15. Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции. – М.: Наука, 1999. – 299 с.
16. Biswas S.C., Pal U., Sarkar P.K. Regulation of cytoskeletal proteins by thyroid hormone during neuronal maturation and differentiation // Brain Res. – 1997. – **757**. – P.245–253.
17. Dorner G. Hormones, brain development and fundamental processes of life. – In: Hormones and brain development. Amsterdam. – N.V. Oxford, Elsevies, North-Holland Biochem. Press, 1978. – P.13–25.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. –

1970. – С.249–256.
19. McLean W., Lane E. Intermediate filaments in disease // *Cur. Opin. In Cell Biol.* – 1995. – №7. – P.118–125.
20. Munoz A., Rodrigues-Pena A., Perez-Castillo A. et al. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression // *Mol. Endocrinol.* – 1991. – 5. – P.273–280.
21. Rami A., Rabie A. Delayed synaptogenesis in the dental gyrus of the thyroid – deficient developing rat // *Dev. Neurosci.* – 1990. – 12. – P.398–405.

*Дніпропетров. мед. академія*

*Матеріал надійшов до редакції 02.03.2006*