

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

*Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису*

САВЧУК ОЛЕНА ІВАНІВНА

УДК 616-055.4:616.8-003.98

**УЧАСТЬ ПРОТЕАСОМНОГО ПРОТЕОЛІЗУ В ІШЕМІЧНОМУ  
УШКОДЖЕННІ МОЗКУ**

Спеціальність 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
Савчук О.І. \_\_\_\_\_

Науковий керівник: **Скибо Галина Григорівна**,  
Чл.-кор. НАН України, доктор медичних наук, професор

**Київ - 2019**

## 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, 2019.

В дисертаційній роботі представлені результати змін протеасомної активності в нервовій тканині, а також ролі алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми (PSMA6 та LMP2) у патогенезі ішемічного інсульту.

Для оцінювання ступеня ішемічного пошкодження структур мозку щурів відтворювали експериментальну модель фокальної церебральної ішемії шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії (ОСМА). Така експериментальна модель характеризується розвитком відтворюваних вогнищ інфаркту в басейні середньої мозкової артерії (СМА), а також дає змогу дослідникам вивчати ефекти реперфузії на еволюцію зони ішемічного ушкодження. Алельний поліморфізм генів LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His) та PSMA6 (C<sup>-8</sup>→G) (rs 1048990) визначали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Вперше виміряно всі три види протеолітичної активності протеасоми (хімотрипсиноподібна, трипсиноподібна 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.

З'ясування ролі протеасомного протеолізу в розвитку ушкодження головного мозку при моделюванні 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 спрямовані 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 урахуванням генотипу певного хворого та проводити запобіжні заходи для попередження виникнення важких ускладнень зазначеного захворювання. Генотипування людей за алельними варіантами гена, що кодує субодиницю конституційної імунопротеасоми PSMA6 може бути використано для скринінгу хворих на ішемічний інсульт та його ранньої діагностики.

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

## SUMMARY

**Savchuk O.I. Participation of proteasomal proteolysis following ischemic damage of the brain.** – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for PhD degree by specialty 03.00.13 — human and animal physiology. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation presents the results of 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.

To evaluate the degree of ischemic damage to the brain structures of the rats were reproduced experimental model of focal cerebral ischemia by monofilament occlusion of the middle cerebral artery (MCAO). Such an experimental model is characterized by the development of reproductive centers of infarction in the AMC basin, and also allows researchers to study the effects of reperfusion on the evolution of the zone of ischemic damage.

The allelic polymorphism of the genes LMP2 (Arg60→His) and PSMA6 (C<sup>-8</sup>→G) (rs 1048990) was determined using the Real Time PCR method.

For the first time, all three types of proteolytic activity of proteasome (chymotrypsin-like, trypsin-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.

The clarification of the role of proteasome proteolysis in the development of brain damage in the modeling of pathogenic effects opens up opportunities for further study of proteasome proteolysis and its role in ischemic stroke, as well as the creation of opportunities for its influence on the prevention and treatment of cerebral diseases in general and ischemic stroke in particular.

The studies were also aimed at finding out the value of the allelic polymorphism of the genes encoding subunit constitutional and imunoproteasome in the pathogenesis of ischemic stroke. Established facts allow us to assess the risk of acute ischemic stroke, to differentiate approach to the treatment of these diseases taking into account the genotype of a patient and to take preventive measures to prevent the occurrence of severe complications of the specified disease. The genotyping of people by allelic variants of the gene encoding the subunit of the constitutional immunoproteasome PSMA6 can be used to screen patients with ischemic stroke and its early diagnosis.

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

## НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

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 субодиниць конституційної протеасоми та імунопроотеасоми 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).*

## **НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:**

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 постерній 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 постерній сесії.*



## **ЗМІСТ**

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....</b>	<b>11</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>12</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>21</b>
1.1. Убіквітин-залежний протеасомний протеоліз .....	21
1.2. Протеасома та її структура.....	26
1.3. Протеасомний протеоліз та його роль в патології .....	37
1.3.1. Протеасомний протеоліз в патогенезі ішемічного інсульту ...	37
1.4. Алельний поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми .....	43
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>50</b>
2.1. Об'єкти дослідження .....	50
2.1.1. Характеристика експериментального матеріалу .....	50
2.1.2. Характеристика клінічного матеріалу .....	51
2.2. Експериментальне моделювання ішемічного ушкодження мозку .....	53
2.3. Методи морфологічного дослідження.....	57
2.3.1. Підготовка препаратів для проведення світлооптичного та електронно-мікроскопічного аналізу .....	59
2.4. Біохімічні дослідження.....	60
2.4.1. Отримання гомогенатів тканин мозку щурів.....	60
2.4.2. Визначення протеолітичної активності протеасоми в тканинах мозку .....	60
2.5. Поведінкові тести .....	61
2.6. Генетичні методи визначення алельного поліморфізму.....	64
2.6.1. Виділення ДНК з лейкоцитів цільної крові.....	65
2.6.2. Визначення алельного поліморфізму генів протеасоми LMP2 та PSMA6.....	66
2.7. Методи статистичного аналізу .....	68
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>70</b>

3.1. Визначення зони ішемічного пошкодження мозку .....	70
3.2. Макроскопічні зміни при ішемічному пошкодженні мозку .....	72
3.3. Оцінка стану нервових клітин після ішемічного ушкодження.....	75
3.4. Зміни активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного пошкодження.....	80
3.5. Оцінка поведінкових реакцій щурів.....	85
3.6. Визначення алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці протеасоми.....	91
<b>РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>96</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>109</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>111</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

BCA - внутрішня сонна артерія

ГЕБ - гематоенцефалічний бар'єр

МНС- головний комплекс гістосумісності

ЗСА – загальна сонна артерія

ЗоСА – зовнішня сонна артерія

ІІ – ішемічний інсульт

ОСМА – оклюзія середньої мозкової артерії

ПГПГ – пептидилглутаміл пептид-гідролазна активність протеасомного комплексу

СМА – середня мозкова артерія

ТП – трипсиноподібна активність протеасомного комплексу

ТТХ – 2,3,5 – трифенілтетразолію хлорид

ХТП – хімотрипсиноподібна активність протеасомного комплексу

ЦНС – центральна нервова система

DUB – система ферментів деубіквітинізації протеїнів

HIF – фактор транскрипції, що індукується гіпоксією

іNF-κB – інгібітор ядерного фактору каппа В

LMP – великі мультифункціональні протеїнази

LMP2 та PSMA6

NF-κB – ядерний фактор каппа В

NO – оксид азоту

PF II – протеасомна фракція ішемічного інсульту

SNP – поліморфізм поодиноких нуклеотидів

TNF-α – фактор некрозу пухлин альфа (Ub)

## ВСТУП

### Актуальність теми

Ішемічний інсульт є однією з найважливіших причин інвалідизації та смертності населення у розвинених країнах [1, 2]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), щорічно від інсульту помирає близько 5 млн людей (1 випадок на 1000 населення) [3, 4]. Інсульт є мультифакторним та полігенним захворюванням, що спричинюється взаємодією негативних факторів навколишнього середовища та генетичних варіацій. Численні епідеміологічні обстеження сімей, а, особливо, з близнюками вказують на наявність факторів, які зумовлюють схильність до розвитку інсульту в поєднанні з іншими факторами ризику [5].

За показниками захворюваності та смертності від інсульту Україна посідає одне з перших місць у Європі, що створює велике навантаження не лише на систему охорони здоров'я, а й на все суспільство в цілому.

В структурі загальної смертності в Україні мозкові інсульти займають друге місце, поступаючись лише онкологічним захворюванням, однак дистанція між ними щорічно скорочується. Згідно з офіційною статистикою щороку виникають понад 100 тисяч мозкових інсультів, третина з яких розвивається в осіб працездатного віку, а 30-40 % хворих помирають впродовж перших 30 днів [6, 7].

Вивчення механізмів розвитку ішемічного інсульту складає найактуальнішу проблему сучасної неврології. Дослідженнями останніх років показано, що ймовірність розвитку та важкість перебігу як серцево-судинних захворювань, так і переважної більшості інших хронічних патологій значною мірою залежить від генотипу хворого, що визначає функціональну придатність тих чи інших ендогенних ферментативних систем. У відповідь на дію екзогенних ушкоджуючих факторів в організмі людини одночасно розгортаються дві програми, що складаються із

компенсаторних реакцій, з одного боку, та патологічних, з іншого. Індивідуалізація реакцій організму на ушкодження визначається переважно генетичними варіаціями певних генів – так званим алельним поліморфізмом [8]. Величезна кількість описаних поліморфізмів поодиноких нуклеотидів (single nucleotide polymorphism, SNP) – більше 5 мільйонів – робить кожну людину унікальною як в генетичному відношенні, так і фенотипових особливостях реалізації генетичної програми. Певний набір алельних варіантів генів визначає, в деяких випадках, стійкість індивідууму до певного захворювання, а в інших, схильність до виникнення патології, в тому числі і серцево-судинної.

Пошук в геномі і встановлення патофізіологічного значення алельних варіантів генів, що збільшують ймовірність розвитку захворювань людини є складною і кропіткою роботою одночасно багатьох колективів дослідників. Відомо близько 100 генів, алельний поліморфізм яких має відношення до формування схильності до серцево-судинних захворювань – ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарду, інсульту. Більшість з описаних алельних поліморфізмів генів прямо або опосередковано зумовлюють прискорений розвиток атеросклерозу, який є основним фактором ризику інфаркту міокарду та ішемічного інсульту. Також вивчається роль поліморфізму генів ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, генів системи зсідання крові, генів, що відповідають за формування імунного захисту, генів протеолітичних ферментів та їх інгібіторів, та інших генів. Останнім часом увагу дослідників привертають клітинні процеси, що пов'язані із деградацією білків шляхом протеасомного протеолізу, та можлива роль алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми, в розвитку серцево-судинної патології [9 - 12].

Протеасомний протеоліз має виключне значення в функціонуванні будь-якої клітини нашого організму. Вважається, що більш ніж 90% внутрішньоклітинних протеїнів розщеплюються саме протеасомами, а решта зазнає деградації в лізосомах [13]. Через протеасомний протеоліз клітина

звільняється від ушкоджених, окиснених, „зношених” протеїнів і забезпечує білок-синтезуючі системи вільними амінокислотами [14]. Протеасомний протеоліз має важливе значення в апоптозі незалежно від шляху його реалізації – мембранного, мітохондріального чи ядерного.

В генах LMP2 та PSMA6, що кодують субодиниці протеасоми, описано (SNP) - Arg60→His та C<sup>-8</sup>→G, відповідно. Тривають пошуки асоціації між генетичними варіантами цих генів та ймовірністю розвитку певних захворювань [15]. Зокрема встановлено, що менш розповсюджений алельний варіант гена LMP2 значно частіше зустрічається у хворих на деякі аутоімунні захворювання [16]. В роботі Mishto M. et al. було показано зв'язок між Arg60→His поліморфізмом LMP2 та чутливістю моноцитів до TNFα-індукованого апоптозу [17]. В наступній роботі ці автори встановили факт експресії субодиниць імунопротеасоми в клітинах мозку та показали, що активність протеасоми в тканинах мозку вища при генотипі Arg/Arg порівняно з Arg/His [18]. Визначити активність протеасоми у осіб з генотипом His/His дослідникам не вдалося внаслідок низької частоти алелю His в італійській популяції [19].

Відомо, що ризик виникнення серцево-судинних захворювань значно збільшується з віком. Убіквітин-залежний протеасомний протеоліз – це одна із внутрішньоклітинних систем організму, що зазнає характерних вік-залежних змін. Доведено, що при старінні та при захворюваннях пов'язаних із віком в різних тканинах, передусім, в тканинах головного мозку накопичуються білкові агрегати, що є прямим свідченням порушення шляхів їх утилізації.

За нормальних умов саме протеасомній деградації підлягають білки, що накопичуються в тканинах різних органів при старінні. Це стосується і пресеніліну, амілоїдного білка і його попередника (APP), тау-протеїна та інших. Саме тому порушення протеасомного протеолізу становить важливий ланцюжок в патогенезі багатьох нейродегенеративних захворювань (хвороба Альцгеймера, Гентингтона, амілоїдоз та ін.) [20]. Показано, що активність

протеасоми в гіпокампі та спинному мозку у 28-місячних щурів порівняно з 3-місячними знаходиться на більш низькому рівні, однак, в тканинах стовбура мозку та мозочка таких змін не спостерігалось [21]. При цьому накопичення убіквітинізованих білків у мозку старих тварин є загальновизнаним фактом. Зокрема, в роботах Ohtsuka H. et al. встановлено, що у 37-місячних мишей у довгастому мозку та стовбурі мозку спостерігається підвищення рівня убіквітинових кон'югатів разом із зменшенням кількості вільного убіквітину та активності деубіквітинізації [22]. Ці відомості підкреслюють визначне значення убіквітинізації та деубіквітинізації білків в регуляції протеасомного протеолізу. Порушення цих процесів може призвести до накопичення аномальних білків в клітинах, навіть без змін активності протеасоми.

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 [23]. За оцінками експертів щорічно інсульт виникає у 10 млн людей [24].

Показник смертності від мозкового інсульту в Україні є досить високим: 91,3 випадку 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 [25].

Ішемічний інсульт становить 80-87% випадків у структурі гострих порушень мозкового кровообігу [26].

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. Останніми роками з'явилися поодинокі роботи присвячені ролі порушень протеасомного протеолізу в патогенезі ішемічного пошкодження мозку [ 27, 28]. Видається актуальним дослідження внутрішньоклітинних протеолітичних ферментів (зокрема, 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.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «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» (2012-2016рр.)» (№ держреєстрації 0112U001475).

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

Для досягнення зазначеної мети було поставлено наступні **завдання**:

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 пептидилглютамін пептидгідролазну (ПГПГ) 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 – спектрофлуориметричний метод; генетичні методи – полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі; статистичні методи аналізу.

### **Наукова новизна одержаних 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 пептидглютаміл пептидгідролазна) в нервовій тканині щурів і визначено їх зміни за умов моделювання ішемічного інсульту. Одержані дані дозволяють робити висновки стосовно порушень функції протеасоми при ішемічному інсульті та відповідно їх ролі у патогенезі даної патології.

Вперше проведено комплексні дослідження нервових клітин кори та стріатума головного мозку на світлооптичному та електронно-мікроскопічному рівнях з вивченням динаміки їх структурних змін після фокальної церебральної ішемії у щурів.

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.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

З'ясування ролі протеасомного протеолізу в розвитку ушкодження головного мозку при моделюванні 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 спрямовані 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 урахуванням генотипу певного хворого та проводити запобіжні заходи для попередження виникнення важких ускладнень зазначеного захворювання. Генотипування людей за алельними варіантами гена, що кодує субодиницю конституційної імунопротеасоми PSMA6 може бути використано для скринінгу хворих на ішемічний інсульт та його ранньої діагностики.

### **Особистий внесок здобувача.**

Здобувачем проведено: аналіз літературних джерел, поставлено задачі дослідження, виконано необхідні експериментальні дослідження, відпрацьовано експериментальне моделювання фокальної ішемії, отримано тканини головного мозку, було вимірено 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 д.м.н., професором, чл.-кор. НАН України Г.Г. Скибо. 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:

1. VI Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю “Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології”. Ялта, Україна (3-5 жовтня, 2012);
2. World Congress of Neuroscience. Barcelona, Spain (17 - 19 June 2013);
3. 7th International Symposium On Experimental And Clinical Neurobiology. Kosice, Slovak Republic (23-27 June, 2013);
4. X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications”, Bogomoletz Institute of Physiology. Kyiv, Ukraine (10-13 October, 2013);
5. III conference "Physiology: from molecules to the body" at Bogomoletz Institute of Physiology. Kyiv, Ukraine (24-25 October, 2013);
6. Засідання сектору нейронаук Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Україна, Київ (17 січня 2014 р.);
7. Засідання сектору вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Україна, Київ (28 лютого 2019 р.).

## **Публікації**

Результати дисертації викладені в 14 публікаціях: статті – 7, тези 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.

## РОЗДІЛ І

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Убіквітин-залежний протеасомний протеоліз

Першопочатково деградація внутрішньоклітинних білків представлялася доволі примітивним процесом, що здійснювався за допомогою лізосомальних ферментів. Однак, у 1978 році під час дослідження процесів диференціації ретикулоцитів виявилось, що вже після втрати лізосом в цих клітинах продовжується руйнування білків, зокрема дефектних молекул гемоглобіну [29]. Саме це явище вказувало на наявність нелізосомного шляху деградації білків, що проходить з залученням АТФ. А вже у 1980 роках було відкрито убіквітин - кон'югуючу систему і доведено її роль у протеасомній деградації білку [30]. З присудженням Нобелівської премії групі вчених А. Hershko (Ізраїль), А. Ciechanover (Ізраїль) та I. Rose (США) в галузі хімії за 2004 рік стрімко прискорилося вивчення фізіологічного та патофізіологічного значення протеасомного протеолізу.

Протеасомний протеоліз має виключне значення в функціонуванні будь-якої клітини нашого організму. Вважається, що більш ніж 90% внутрішньоклітинних протеїнів розщеплюються саме протеасомами, а решта зазнає деградації в лізосомах [31].

Характерною особливістю всіх ядерних клітин незалежно від виду організму виявляється те, що процеси протеасомної деградації білку майже не мають відмінностей. Показано, що амінокислотні послідовності протеасоми людини більш ніж на 40% повторюють амінокислотні послідовності протеасоми дріжджів, а у ключових компонентах ( АТФ-ази 19 S протеасоми, тощо) ця схожість сягає 70% [32]. Ця висока консервативність без сумніву пов'язана з природним добром, бо можливі мутації, що призводять до порушення структури чи функцій протеасомного апарату, можуть бути летальними [33].

Деградація білків має і надзвичайно важливе регуляторне значення. Наприклад, під час поділу клітини цикліни швидко убіквітинізуються та розщеплюються протеасомами, і саме цим забезпечується перехід до наступної стадії клітинного циклу та односпрямованість усього процесу. На разі отримано переконливі дані про роль протеасоми в деградації рецепторів багатьох біологічно активних речовин (глутамата, інозитол-3-фосфата, ацетилхоліна, епідермального фактору росту), таких білків як кальмодулін, пріонний білок, субодиниці іонних каналів (потенціал-залежні калієві та натрієві канали епітеліальних клітин) [21, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45]. Адекватна робота системи протеасомної деградації для клітини є вкрай необхідною, а порушення його функціонування може стати причиною її загибелі безпосередньо чи опосередковано. Ця особливість прямо пов'язана з великою кількістю внутрішньоклітинних процесів, в яких протеасома бере участь. Таким чином протеасома звільняє клітину від ушкоджених, окиснених, „зношених” білків і забезпечує білок-синтетичний апарат необхідним субстратом для синтезу нових протеїнів [14]. Крім того, протеасомний протеоліз опосередковано бере участь в реалізації більшості внутрішньоклітинних процесів, серед яких регуляція клітинного циклу і поділу, процесів репарації ДНК, процеси біогенезу мітохондрій і рибосом у клітинах [46], формування рецепторного поля клітини [47, 48].

Також протеасомний протеоліз приймає участь у апоптозі, оскільки механізми розвитку останнього реалізуються у взаємодії з протеасомною деградацією білків. Щодо рецептор-опосередкованого апоптозу, з одного боку, протеасома необхідна для активації процесів рецептор-індукованого апоптозу у культурі пухлинних клітин [49], з іншого боку, пригнічення активності протеасоми за допомогою специфічних інгібіторів (класто-лактацистин бета-лактон) попереджує апоптоз, який опосередковано викликається активацією Fas-рецептору, в Т-лімфоцитах та епітеліальних клітинах [50]. Наглядним прикладом є те, що в гладеньком'язових клітинах судинної стінки інгібітор протеасоми MG-132, навпаки, індукував апоптоз

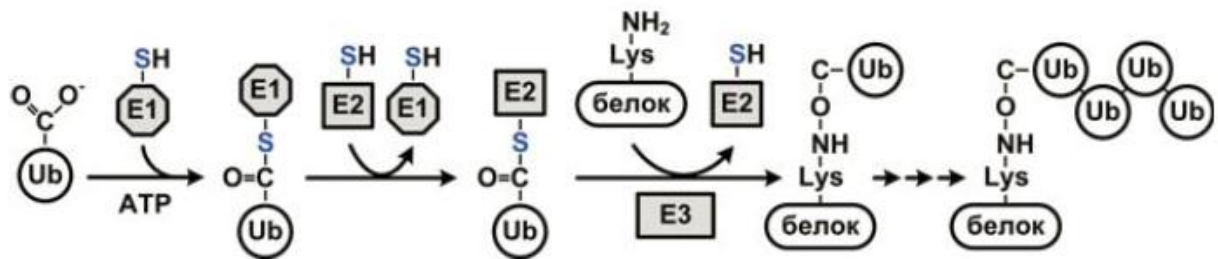
при наявності TNF- $\alpha$  [51]. Мітохондріальний шлях апоптотичної загибелі клітини також залучає убіквітин-залежний протеоліз.

Для здійснення адекватного протеолізу необхідне існування системи, що не просто руйнує білок-мішень, як це відбувається при лізосомному протеолізі, а робить це специфічно, тобто тільки при наявності відповідного сигналу з боку самого білка-субстрату. І саме цим сигналом-міткою, що направляє білок у процес протеасомного протеолізу, виявилися молекули білку убіквітину [52].

Убіквітин – це невеликий 76-амінокислотний поліпептид масою близько 8,6 кДа. Він високо консервативний серед еукаріот, але відсутній у бактерій та архей. Убіквітин, утворюючи ковалентний зв'язок між своєю карбоксигрупою та аміногрупою лізину білку-мішені, „мітить” субстрат, і робить його доступним для протеасомного розщеплення. Процес деградації внутрішньоклітинних протеїнів є вибірконим, бо білки, що не з'єднані з убіквітином, не можуть деградувати протеасомним шляхом. Хоча не завжди приєднання молекул убіквітину веде до деградації білку: приєднання убіквітину до залишку лізину у 48 або 29 позиції веде до деградації білку, тоді як приєднання убіквітину через лізин-68 виконує активуючу або сигнальну функцію (наприклад, активує фактори транскрипції), можливе приєднання до лізину-6 та -11, біологічне значення якого залишається нез'ясованим [53].

Приєднання убіквітину відбувається в кілька етапів. На першій стадії молекула убіквітину зв'язується з так званим убіквітин-активуючим ферментом (E1) у АТФ-залежний спосіб. Цей фермент не є специфічним, тобто він активує убіквітин для усіх реакцій убіквітинізації, і передає активований убіквітин до всіх видів убіквітин-транспортуючих ферментів (E2) [54]. Саме ферменти групи E2 каталізують ковалентне приєднання молекул убіквітину до білку-мішені, до того ж вони у деякій мірі роблять більш специфічними майбутні реакції убіквітинізації, бо реагують не з усіма ферментами групи E3. Для стабілізації поліубіквітинового ланцюга іноді

необхідна участь ферменту E4, також у деяких випадках для взаємодії убіквітинильованих протеїнів і 26S протеасоми залучаються допоміжні білкові структури (HSP70, валозин-вмісний протеїн). Поетапний процес убіквітинізації є досить консервативним; зокрема, при нокауті гену ферменту E1 у дослідях на культурі дріжджів спричинювалася повна летальність у популяції [55], проте самі по собі вони не здатні забезпечити необхідну специфічність деградації протеїнів. Для убіквітин-кон'югуючої системи основною задачею слугують процеси диференціювання протеїнів, їх поділу на білки, що необхідні для подальшої життєдіяльності, та ті, що вже не можуть виконувати свої функції, і виконується вона за допомогою убіквітин-протеїн лігаз (E3) (Рис. 1.1).

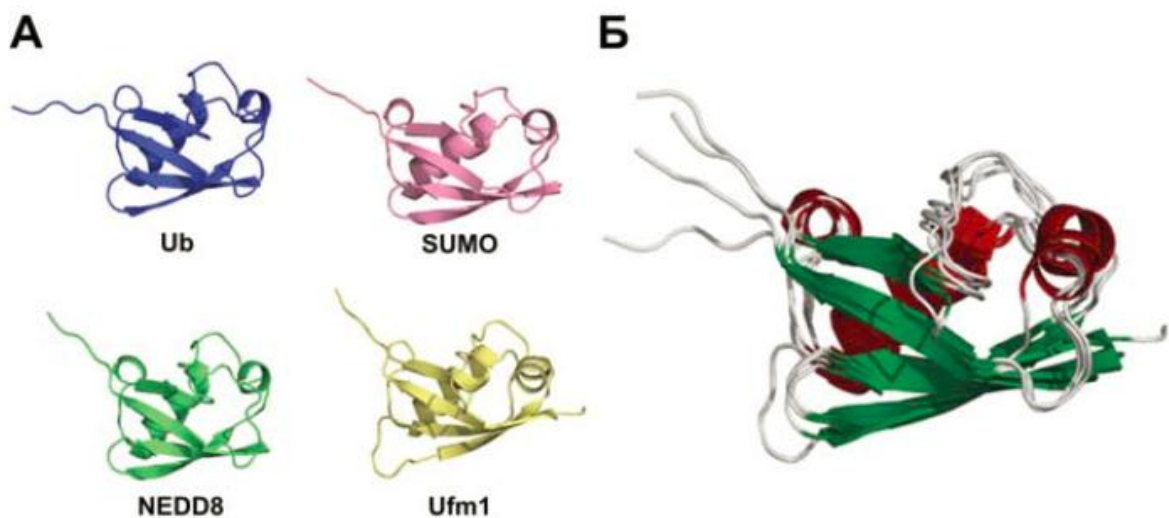


**Рис 1.1. Етапи поліубіквітинізації білку-субстрату (за Glickman, 2002 [66]). Ub – убіквітин, E1, E2, E3 – убіквітин-активуючі ферменти .**

Зустрічаються варіанти, коли активований убіквітин перед приєднанням до субстрату переноситься безпосередньо на залишок цистеїну E3, і в цих випадках E3 приймає на себе ще й функції приєднання убіквітину. Але найхарактернішою властивістю білків групи E3 є їх специфічність, тобто вони можуть взаємодіяти з обмеженою кількістю видів субстратів. Останніми роками з'явилися дослідження, що показали наявність інших білкових систем, що виконують функції, подібні до системи убіквітинових міток. Це група убіквітиноподібних білків, які мають загальну назву SUMO [56, 57], протеїн Nedd-8, що приблизно на 60% повторює структуру убіквітину [58]. Існує інший убіквітиноподібний білок ISG15, який складається з двох доменів, кожен з яких на 30 % ідентичний з убіквітином і має схожу з ним



просторову структуру. Також цей модифікатор залучений до регуляції імунної відповіді, клітинного росту [59, 60] та модифікатор Ufm1, який має схожість з убіквітином лише на 16 % (Рис.1.2) [61]. Їх роль у системі протеасомного протеолізу також полягає у взаємодії з каскадом E1-E3х [62]. Вищенаведені приклади демонструють наявність альтернативних шляхів мічення білків-мішеней для протеасомного протеолізу, проте ці шляхи певною мірою дублюють один одного, бо в результаті всі вони використовують одну систему ферментів [63]



**Рис. 1.2. Структура убіквітину (Ub) та білків Ubl.**

А. Стрічкова діаграма Ub, NEDD8, SUMO, Ufm1. Всі вони мають схожу вторинну структуру  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  і  $\beta$ -grasp (убіквітин-подібну) просторову конформацію. Б. Накладання стрічкових діаграм Ub та білків Ubl ( за На, 2008 [64]).

Добре вивчена класична система убіквітин-залежної протеасомної деградації, що потребує поліубіквітування білкового субстрату. Ці процеси здійснюються з використанням енергії АТФ, а кінцевими продуктами є короткі пептиди. Проте останніми роками накопичилось багато експериментальних даних про відхилення від цього класичного шляху деградації. По-перше, білки можуть зазнавати впливу убіквітин-незалежної

деградації [65], АТФ-незалежної деградації [66], деградації не 26S протеасомним комплексом, а кóровою частиною 20S протеасомним комплексом [67] та неповною деградацією до коротких пептидів, а процесингу [68]. Найчастіше при деградації окремого субстрату спостерігається лише одне з вказаних відхилень, рідше два (наприклад, незалежність від убіквітину та АТФ) та зовсім рідко – коли відразу всі перераховані відхилення спостерігаються при протеолізі одного білку [69].

З іншого боку, в клітині функціонує система ферментів деубіквітинізації протеїнів (DUB). Ці цистеїнові протеїнази, що володіють пептидгідролазною та ізопептидазною активністю, здатні відщеплювати убіквітин від молекули білка або іншого убіквітину, що вже приєднався до протеїну. Таким чином, DUB можуть попереджувати протеасомне розщеплення білків чи вивільняти убіквітин з поліубіквітинових ланцюжків в процесі протеасомної деградації білків [70].

Звідси випливає важливість нормального функціонування убіквітин-протеасомної системи для підтримання життєдіяльності як на рівні однієї клітини, так і всього організму.

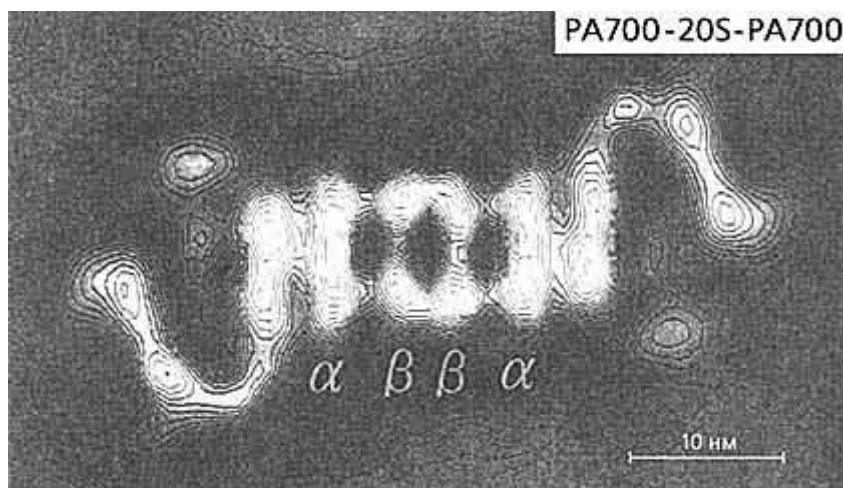
## **1.2. Протеасома та її структура**

Протеасома є внутрішньоклітинним мультикаталітичним макромолекулярним протеолітичним комплексом, який є основним компонентом убіквітин-залежної системи деградації клітинних білків [131, 72, 73, 74]. Назва „протеасома”, запропонована Аріго et al.. [75], визначає два молекулярні різновиди: 26S-протеасому, яка деградує убіквітиновані білки, та її каталітичне ядро - 20S-протеасому. Остання сама не може деградувати клітинні білки, однак може розщеплювати короткі пептиди і розгорнуті білки [76].

Протеасоми присутні в клітинах всіх організмів від археобактерій до вищих еукаріот, що свідчить про їх абсолютну значимість для нормальної

життєдіяльності клітини [77]. В порівнянні з іншими клітинними протеїнами концентрація протеасом досить велика і в залежності від тканини може складати від 1 до 20  $\mu\text{g}/\text{mg}$  загального білку. Розташування їх у внутрішньоклітинному просторі не є специфічне: більшість протеасомних комплексів розповсюджена дифузно у цитоплазмі та нуклеоплазмі, є групи, що асоційовані з ендоплазматичним ретикулумом та компонентами цитоскелету, крім того, у багатоклітинних організмах спостерігаються відмінності у концентрації протеасом та активності протеасомного протеолізу в залежності від тканини чи органу. Як було показано у дослідях на щурах, проведених Farout та співавт. (2003), різні види активності протеасомного протеолізу можуть мати різні показники у нормі навіть у одному виді тканини [78], більше того, показано, що рівень пептидазної активності та кількість протеасомних комплексів не корелюють при дослідженні окремих видів тканин.

26S протеасома є АТФ-залежним протеолітичним комплексом вагою близько 2,5 мільйонів дальтон, що складається з 20S каталітичного ядра або 20S протеасоми, і регуляторних субодиниць PA700 або 19S комплексів, які приєднуються з однієї або двох сторін кóрової частини (Рис. 1.3). Основною функцією 26S протеасоми є специфічна деградація білкових субстратів, що мають приєднані молекули убіквітину, з утворенням коротких амінокислотних послідовностей. В залежності від обставин після протеолізу залишаються фрагменти, що включають від 3 до 15 амінокислотних залишків (найчастіше наявні послідовності у 6-9 залишків).



**Рис 1.3. Комп'ютерна томографія конституційної протеасоми [81].**

20S субодиниця протеасоми або кóрова частина, має молекулярну вагу близько 750 кДа і представляє собою циліндр довжиною 15-17 нм і діаметром 11-12 нм, який утворений чотирма гептамерними кільцями. Кожне з двох зовнішніх кілець складається з семи гомологічних субодиниць  $\alpha$ -типу, а кожне внутрішнє кільце - з семи схожих консервативних субодиниць  $\beta$ -типу, їх функції полягають у контролюванні активності центрів  $\beta$  – кілець та запобіганні неспецифічному протеолізу. Цей контроль реалізується наступним чином : вхід, що сформований  $\alpha$  – кільцями і веде у центральну камеру, закритий їхніми ж гідрофобними ділянками, залишаючи лише невеликий отвір у 13 Å. Тому за нормальних умов 20S протеасома здатна на руйнування лише невеликих амінокислотних ланцюжків, а для того, щоб проявити свої протеолітичні можливості у повній мірі, 20S протеасома повинна з'єднатися з іншими субодиницями – 19S або так званими регуляторними частинами, і утворити 26S протеасому. Приєднуються регуляторні частини також саме до  $\alpha$  – кілець кóрової частини.

Кожне  $\beta$  - кільце також складається з семи білкових субодиниць, але, на відміну від  $\alpha$ -кілець, ці субодиниці не є однорідними: у 20S протеасомі кількість протеолітично активних субодиниць  $\beta$ -типу скоротилась з семи пар у бактерій до трьох пар у еукаріот, вони мають треонінові протеолітичні сайти, а саме: субодиниця  $\beta 1$  відповідає за пост-глютамілпептид гідролазну

активність,  $\beta 2$  - субодинаця руйнує протеїни подібно до трипсину, а  $\beta 5$  - субодинаця подібно до хімотрипсину. Активні центри усіх трьох каталітичних субодинаць спрямовані всередину утвореного циліндру, і таким чином, у центральній камері протеасоми, що утворена двома  $\beta$ -кільцями, наявні одразу шість активних центрів протеолізу (по три в кожному  $\beta$ -кільці), які власне і виконують безпосереднє розщеплення амінокислотних послідовностей. Дана структура характерна для так званої конституційної 20S протеасоми (Рис.1.3).

Окрім конституційної протеасоми, в клітинах можуть утворюватися імунопротеасоми, що мають виняткове значення в імунній відповіді організму. Завдяки функціонуванню імунопротеасоми, що утворюється при  $\gamma$ -інтерфероніндукованій заміні трьох конституційних каталітичних субодинаць ( $\beta 1$ ,  $\beta 5$  та  $\beta 2$ ) у внутрішньому кільці протеасоми на три індукцибельні субодинаці - великі мультифункціональні протеїнази (LMP2, LMP7 та LMP10 відповідно) [80, 81, 82, 83], стає можливою презентація антигенів у складі головного комплексу гістосумісності першого класу (МНС-I), таким чином, стан протеасомного протеолізу може впливати і на якість імунної відповіді організму. В результаті заміни конституційних субодинаць на індукцибельні змінюється гідролітична активність протеасоми: зростає трипсиноподібна (забезпечується  $\beta 2$  або LMP10) і хімотрипсиноподібна (забезпечується  $\beta 5$  або LMP7) та зменшується пептидилглютаміл пептидгідролазна (забезпечується  $\beta 1$  або LMP2) [84].

Нещодавно було відкрито ще один вид протеасомного комплексу – тимус-специфічну протеасому, яка відрізняється від вище перерахованих видів наявністю раніше невідомої субодинаці –  $\beta 5t$  [85]. Експресується вона в складі протеасомного комплексу епітеліальних клітин кіркової зони тимусу і її наявність є необхідною для розвитку CD-8 позитивних лімфоцитів, як показано у дослідях на  $\beta 5t$ -дефіцитних мишах. Характерною особливістю є те, що приєднання даної субодинаці знижує хімотрипсиноподібну активність

комплексу, хоча відомо, що саме цей вид активності є важливим для презентації високоафінних пептидів в комплексі з МНС І типу. Існує припущення, що використовуються такі комплекси на ранніх етапах розвитку Т-лімфоцитів, коли вони повинні „довести” свою здатність взаємодіяти з МНС І класу, а зниження активності протеолізу необхідне для отримання і розміщення в МНС І пептидів, на які не буде перехресної імунної відповіді (без внутрішньоклітинного пептиду МНС на мембрані не з’являється).

Корова частина сама по собі нездатна до повноцінного протеолізу; для забезпечення адекватного руйнування білків необхідна наявність регуляторного комплексу PA700 або 19S субодиниці. Саме за участі цієї частини 26S протеасоми реалізуються такі процеси, як вибіркове розпізнавання субстратів, підготовка їх до деградації, відщеплення молекул убіквітину і переміщення протеїнів у корову частину чи протеолітичну камеру.

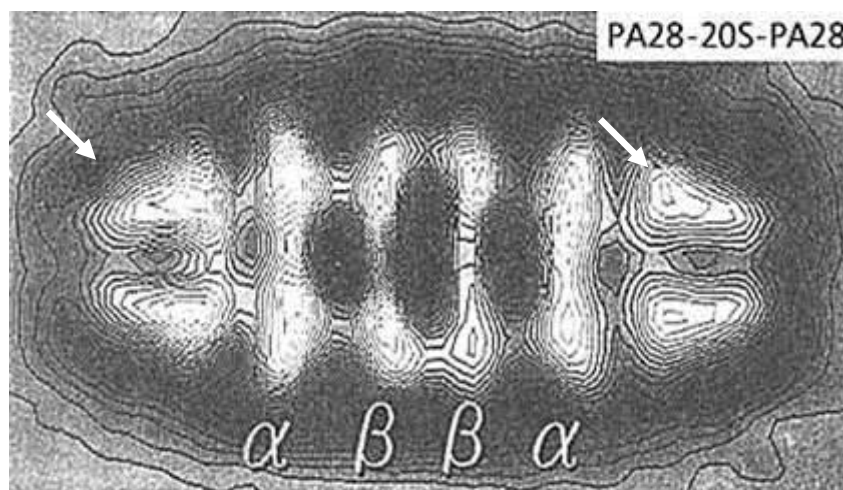
19S субодиниця протеасомного комплексу являє собою комплекс протеїнів з загальною масою близько 1 млн. Да, і складається з двох локусів, так званої базової частини (base) та кришки (lid); поєднані вони між собою протеїном Rpn10 (S5a), який крім механічного з’єднання частин 19S субодиниці виступає ще й як білок, що розпізнає поліубіквітинові ланцюги. Базова частина 19S протеасомної субодиниці складається з шести гомологічних АТФ-аз родини AAA, а також білків Rpn1, Rpn2 та Rpn10, що не мають АТФ-азної активності. АТФ-азна активність базової частини 19S протеасомної субодиниці необхідна для виконання анфолдингу протеїнів, що підлягають руйнуванню, тобто 19S комплекс виступає в ролі реверс-шаперону [68]. Крім того, АТФ-ази базової субодиниці взаємодіють з  $\alpha$  – кільцями корової частини і забезпечують доступ субстрату до протеолітичної камери.

Кришка (lid) 19S протеасоми ( $\approx$  400 кДа) має дископодібну форму і складається з восьми протеїнів. Вона може бути як приєднаною до базової частини за допомогою Rpn10, так і знаходитись у вільному стані [68]. Жоден

з білків, що входять до складу кришки, не має АТФ-азної активності, і їх функції залишаються не вивченими, проте їх важливість у регуляції протеасомного протеолізу не викликає сумніву. Так, показано, що процес протеолізу убіквітинованих протеїнів потребує неодмінного приєднання цієї субодиниці до протеасоми, в той же час деякі неубіквітиновані білки можуть руйнуватися у протеасомах еукаріот, кришки з яких були видалені [66]. З цього випливає припущення, що виникнення цієї субодиниці протеасоми йшло паралельно з появою системи убіквітинових міток, і кришка є елементом специфічного розпізнавання білків, що підлягають знищенню. Крім цього, ця субодиниця формує ще один бар'єр на шляху до протеолітичної камери, а також слугує для приєднання ферментів деубіквітинізації.

Крім 19S протеасоми факторами протеолітичної активації кóрової частини можуть бути і інші комплекси, наприклад  $\gamma$ -інтерферон-індукована PA28 (11S активатор) REG субодиниця [86, 87], наявність якої характерна для імунопротеасом (Рис 1.4), або протеасомний активатор PA26. Комплекс 20S протеасоми з активатором PA28 здатен до протеолізу невеликих пептидів, але не може гідролізувати білки, навіть якщо вони вже денатуровані або убіквітинізовані [88].

Проте, дані активатори знову ж таки здатні викликати повноцінне руйнування лише невеликих поліпептидних ланцюгів для презентації у комплексі з білком МНС-I. Виявлені гібридні протеасоми вказують на необхідність складного процесу відбору субстратів регуляторною частиною PA700 і регуляції продуктів PA28 для ефективного продукування антигенних пептидів.



**Рис 1.4. Комп'ютерна томографія імунопротеасоми [73]. Стрілками відмічені два протеасомні активатори (PA28(11S)REG), що приєдналися до субодиниці 20S (в центрі). Літерами показані  $\alpha$  і  $\beta$  кільця 20S протеасоми. Протеасомний протеоліз та його роль в патології**

Як відомо, протеасомний протеоліз є невід'ємним процесом нормального функціонування клітини і організму загалом, приймає участь в процесах регуляції метаболізму, апоптозі, експресії молекул клітинної адгезії. За рахунок участі у неповній чи повній деградації протеїнів протеасома є важливим регулятором таких клітинних процесів як диференціювання і розмноження клітин, транскрипція генів, апоптоз, рецепція позаклітинних сигналів та інші важливі ланки життєдіяльності клітини. І саме зміни активності або регуляції протеасоми повинні бути важливим фактором патогенезу багатьох захворювань. Після відкриття механізму убіквітин-залежного протеасомного протеолізу розпочалося дослідження в даному напрямку.

При дослідженнях тканин кришталика [89], шкіри та епітелію [90], серця [91], лімфоцитів та фібробластів тканин нирки та легень були виявлені вік-асоційовані зміни протеасомної активності, які можуть бути пов'язані зі зменшенням абсолютної кількості протеасом у старих клітинах [92] і зниженням експресії мРНК субодиниць протеасоми [93], з порушеннями



приєднання регуляторних частин PA28 або 19S до кóрової частини і, таким чином, обмеження її протеолітичної активності [94].

В 1998 році Такаока М. et al. встановили антигіпертензивний ефект інгібітору протеасоми (N-benzyloxycarbonyl-Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-leucinal, PSI) при дезоксикортикостерон ацетат - сольовій моделі артеріальної гіпертензії у щурів [95]. Було показано, що зростання артеріального тиску у тварин співпадало з підвищенням активності та вмісту протеасоми в артеріальній стінці, а призначення PSI протягом чотирьох тижнів експерименту попереджувало зростання артеріального тиску та вказані зміни у протеасомному протеолізі. У 2008 році при проведенні клінічних досліджень було доведено, що вміст та активність протеасоми в атеросклеротичних бляшках коронарних судин жінок, що отримували в постменопаузальному періоді гормонозамісну терапію, значно менші ніж у тих жінок, що не отримували цього лікування; крім того спостерігали стабілізацію артеріального тиску при застосуванні терапії, що може вказувати на зв'язок активності протеасомного протеолізу із патогенезом артеріальної гіпертензії асоційованої з віком у жінок [96].

Досліджуючи м'язову тканину старих щурів, було виявлено, що з віком в організмі кількість окремих субодиниць протеасоми підвищується в декілька разів, а хімотрипсиноподібна активність нижча, ніж у молодих тварин. Автори роботи приходять до висновку не про кількісні, а про функціональні порушення імунопротеасом з віком. Так, кількість  $\gamma$ -інтерферон - індукованих субодиниць  $\beta 1i$  та  $\beta 5i$  була вищою у 3-6 разів в м'язах старих тварин порівняно з молодими, також ці зміни були характерними для нейронів та астроцитів [97]. Характерно, що вплив нетоксичних доз перекису водню на нервові клітини також призводив не тільки до збільшення рівня окислених протеїнів, а й до збільшення синтезу субодиниць протеасоми [80]. Зміни співвідношення між конституційними, змішаними та імунопротеасомами також можуть бути причетними до вік-асоційованих змін в активності протеасоми.

У роботі французьких дослідників [98] було показано, що хімотрипсиноподібна активність у лімфоцитах людей похилого віку (у середньому 63 роки) вірогідно нижча, ніж у осіб віком 20 років. Автори пояснюють вказані зміни посттрансляційними модифікаціями субодиниць протеасоми (глікозування, кон'югація з продуктами перекисного окиснення ліпідів та убіквітином). Ці данні також підтверджують припущення щодо функціональних порушень у протеасомному протеолізі при старінні [99].

У тканинах серця також спостерігається вік-залежне зниження активності протеасоми. Keller et al. встановили, що хімотрипсиноподібна активність протеасоми прогресивно знижується з віком в серці, легенях, нирках та печінці у 12-, 24- та 28-місячних щурів порівняно з 3-тижневими та 3-місячними тваринами [21]. Ці зміни пояснюються, в першу чергу, зниженням експресії субодиниць протеасоми. У роботі Bulteau A.-L. et al. (2002), проведеної на щурах віком 8-, 21-, та 26 місяців, було показано, що активність усіх трьох каталітичних субодиниць протеасоми в тканинах серця значно знижується з віком [100].

Зміни протеасомної активності також є і в патогенезі пухлинного процесу, як це було доведено в багатьох експериментах. В основному ці зміни полягають у збільшенні активності, бо активація деградації білків за участі конституційної протеасоми при цьому має виражений антиапоптотичний ефект, а впливаючи на імунопротеасому пухлина знижує ефективність презентації антигенних епітопів в комплексі МНС-I, що дозволяє уникати імунної відповіді. Клітини меланому, наприклад, експресують нефункціональний варіант  $\beta 5i$  імунопротеасомної субодиниці -  $\beta 5i$ -E2, що перешкоджає її формуванню [101]. Вірус ВІЛ, зв'язуючи транскрипційний фактор Stat-1, також знижує синтез субодиниці  $\beta 2i$  і, таким чином, зменшує кількість функціонально активних імунопротеасом [102].

Прогресуюче зниження протеасомної активності також причетне до накопичення аномальних внутрішньоклітинних протеїнів при нейродегенеративних захворюваннях. Доведена участь цієї системи у

патогенезі хвороби Альцгеймера та хвороби Паркінсона, бокового аміотрофічного склерозу, хореї Гентінгтона: щодо останньої, показано, що білок гентінгтин, накопичуючись у клітинах викликає їх загибель за апоптотичним механізмом, а убіквітинилування цього протеїну без наступного протеасомного протеолізу значно пришвидшує цей процес [103, 104].

Взагалі, зміни активності протеасоми і, зокрема, імунопротеасоми можуть мати суттєве значення в патогенезі ряду захворювань, в тому числі і інфекційної етіології, пов'язаних із віком. В свою чергу, в гомогенатах тканин головного мозку у старих тварин хімотрипсиноподібна активність протеасоми дещо підвищується в корі головного мозку (в 1.5 рази порівняно з контролем,  $P > 0.05$ ) і не змінюється в тканинах мозочка. ПГПГ активність протеасоми була більшою у старих тварин в 1.72 рази ( $P > 0.05$ ) в корі головного мозку і на 14.1 % ( $P > 0.05$ ) в мозочку [78].

Отримані дані, свідчать про те, що в тканинах кори головного мозку і в мозочку ХТП і ПГПГ активність протеасоми у старих щурів істотно не змінюється порівняно з контролем – є лише тенденція до підвищення. Ці дані в цілому узгоджуються з літературними [91]. Показано, що активність протеасоми у 28-місячних щурів порівнянні з 3-місячними в гіпокампі, спинному мозку знаходиться на більш низькому рівні, проте, в тканинах стовбура мозку і мозочку змін не спостерігалось [78]. При цьому накопичення убіквітинізованих білків в мозку старих тварин є загальновизнаним фактом. Зокрема, в роботах Ohtsuka H. et al. [22] встановлено, що у 37-місячних мишей в довгастому мозку і стовбурі мозку спостерігається збільшення рівня убіквітинових кон'югатів разом із зменшенням кількості вільного убіквітину і активності деубіквітинізації. Ці відомості підкреслюють визначальне значення убіквітинізації та деубіквітинізації білків в роботі протеасомного протеолізу. Порушення цих процесів може призвести до накопичення аномальних білків в клітині і без змін активності самої протеасоми.

Досить неоднозначні результати були отримані при дослідженні протеасомного протеоліза і в інших тканинах і клітинах – печінці, кришталику, фібробластах та інших. Так, в роботі [98] показано, що в м'язовій тканині у старих тварин кількість окремих субодиниць протеасоми підвищується у декілька разів, а хімотрипсиноподібна активність нижче, ніж у молодих тварин. Автори роботи роблять висновок не про кількісні, а про функціональні порушення протеасомного протеолізу з віком. Більшість білків, що нагромаджуються при старінні – тау-протеїн, пресенилін, синуклеїн, APP – є субстратами саме убівітин-залежного протеасомного протеолізу. Можливо, що зниження активності лізосомних ферментів при старінні є вторинним по відношенню до дефектів убівітин-залежного протеоліза, які, вочевидь, пов'язані з порушеннями убівітинізації, а не з власно каталітичною активністю протеасоми. У цьому випадку може відбуватися „перевантаження” лізосом білками, які не зазнали протеасомного гідролізу. Непрямим підтвердженням вказаного припущення є той факт, що зміни протеасомного і лізосомного протеолізу при старінні мають різноспрямований характер – протеасомна активність має тенденцію до підвищення, а активність нейтральних протеїназ дещо знижується. Передбачається взаємна регуляція цих двох найважливіших внутрішньоклітинних протеолітичних систем. В роботі Cuervo A.M et al. [17] з використанням вестерн-блотінга в лізосомах було знайдено фрагменти протеасоми, що прямо вказує на можливість розщеплення протеасоми в лізосомах. З іншого боку, в роботі [21] показано, що при дії на культуру нейронів низьких доз інгібітору протеасоми підвищується рівень аутофагії, яка є одним з основних шляхів лізосомної деградації білків.

При таких процесах як голодування, метаболічний ацидоз, пухлинний процес, денерваційна атрофія та інших явищах, пов'язаних з активацією руйнування протеїнів, рівень мРНК субодиниць протеасоми та активність протеасомного протеолізу зростає [105, 106], і ці зміни призводять до порушення білкового обміну, зокрема, посилене руйнування протеїнів у

щурів, які зазнали опіків, а також при моделюванні септичного ураження, попереджується введенням протеасомних інгібіторів [107]. Також показано, що і система убіквітинізації відповідає на такі патогенні чинники як хронічна ниркова недостатність, пухлинний процес, діабет, збільшенням рівнів мРНК убіквітин-лігаз [108].

### **1.3. Протеасомний протеоліз та його роль в патології**

#### ***1.2.1. Протеасомний протеоліз в патогенезі ішемічного інсульту***

Як відомо, протеасомний протеоліз є невід'ємним процесом нормального функціонування клітини і організму загалом, приймає участь в процесах регуляції метаболізму, апоптозі, експресії молекул клітинної адгезії, тобто в процесах, що мають принципове значення в нейрогенезі.

На разі немає загальновизнаного погляду на роль протеасомного протеолізу у виникненні патології серцево-судинної системи та інсультів зокрема. Дослідники по-різному оцінюють його вплив на ураження судин, іноді висловлюючи прямо протилежні гіпотези відносно участі протеасоми в цій патології. Навіть щодо направленості самих змін протеасомної активності в атерогенезі немає чіткого висновку – одна група дослідників вважає зміни активності патологічним явищем, інша група – пристосувальним, а деякі вважають, що зміни протеасомного протеолізу, хоча і відбуваються одночасно з процесами атерогенезу, але не грають суттєвої ролі в патогенезі останніх [109]. Нижче розглянуто основні роботи, присвячені даній проблемі.

Атеросклероз (АС) є тим патологічним процесом, що зумовлює розвиток переважної більшості найбільш розповсюджених серцево-судинних захворювань та інсультів в тому числі. Протягом останніх десятиріч активно вивчалася роль запрограмованої клітинної смерті в атерогенезі. Існують суперечливі погляди щодо ролі апоптозу в патогенезі АС [110, 111, 112].

Досліджуючи протеасомний протеоліз при патології серця та, особливо, при ішемічно-реперфузійному ушкодженні цього органу,

Bulteau A.-L. et al. довели, що оклюзія коронарної артерії із наступною реперфузією призводить до зменшення активності протеасоми в ішемізованій зоні [100].

В роботах Zhang L. et al. показано, що інгібітори протеасоми значно зменшують розмір інфаркту при емболії середньої церебральної артерії у щурів [113]. У цих досліджах вчені порівнювали ефективність застосування інгібітору протеасоми PS-519 із тканинним активатором плазміногену при фокальній ішемії мозку. Виявилося, що пригнічення активності протеасоми ефективно зменшувало розмір інфаркту та прискорювало відновлення порушених функцій нервової системи. Ефект тканинного активатору плазміногену був менш вираженим, а найбільшу ефективність було встановлено для комбінації зазначеного активатору фібринолізу та інгібітору протеасоми – розмір інфаркту мозку зменшувався більш, ніж у 2 рази. Asai A. et al. [114] показали, що транзйєтна ішемія мозку призводить до зниження активності протеасоми майже на 40% та її відновлення до вихідного рівня протягом 2 годин реперфузії у більшості мозкових структур. Проте, у СА1 зоні гіпокампу активність протеасоми залишалася на зниженому рівні навіть через 48 годин після ішемії. Активність протеасоми відновлювалась значно швидше у тканинах переднього мозку, ніж гіпокампа, при інкубації тканин мозку із АТФ-регенеруючою системою. Крім того, було показано, що в ранньому реперфузійному періоді в тканинах мозку накопичуються убіквітинові кон'югати, що є логічним наслідком пригнічення активності протеасоми.

За деяких патологічних умов можливе роз'єднання 20S протеасоми і регуляторних комплексів, наприклад, показано, що при ішемічному ушкодженні клітин кори головного мозку знижується хімотрипсиноподібна активність 26S протеасоми, проте підвищується ця ж активність 20S протеасоми, а реперфузія ушкодженої ділянки відновлює цілісність і активність 26S комплексу, хоча й не повністю [115].

Згідно з теорією „відповідь на ушкодження” на початкових стадіях атерогенезу, як однієї з передумов розвитку інсульту, значну роль грають запальні реакції судинної стінки у відповідь на фактори ушкодження [116], серед яких окремо виділяють зміни ліпопротеїдного складу плазми крові, гіпертензію, паління і цукровий діабет. Спільною для всіх цих факторів рисою є здатність викликати або ускладнювати прояви оксидативного стресу, який, в свою чергу, призводить до змін структури внутрішньоклітинних ліпідів, білків та ДНК. Такі зміни призводять до компенсаторної активації системи протеасомного протеолізу, але в ході розвитку атерогенних змін поряд з компенсаторно-пристосувальними явищами (утилізація окислених білків субстратів) відбувається і поява патогенетичних ланцюгів, де підвищена активність протеасомного протеолізу виступає вже у ролі пускового фактору. Класичним механізмом є протеоліз-залежна активація транскрипційних факторів з родини Rel, які більш відомі під загальною назвою ядерний фактор каппа В (NFκB). Його найбільш розповсюджена внутрішньоклітинна форма – димер p65/p50, що за нормальних умов знаходиться у цитозолі у зв’язаному стані з інгібітором NFκB (IκB) і не може проникати у ядро. За умов дії деяких факторів, наприклад IL-1, ліпополісахаридів бактеріального походження, оксидативного стресу тощо, відбувається фосфорилування з подальшим убіквітинуванням IκB і його деградація за участі протеасоми [117]. У разі відсутності IκB відбувається швидке переміщення активного NFκB у ядро, де він індукує експресію багатьох прозапальних генів (TNF-α, циклооксигеназа-2, iNOS, селектини, тощо) [118]. Крім того, субодиниця p50 також утворюється в результаті обмеженого протеасомного протеолізу з попередника p105. Нормальна робота і регуляція даної системи грає дуже важливу роль у реалізації адекватної запальної відповіді, а її порушення є фактором патогенезу великої кількості хвороб, зокрема і атеросклеротичного ураження судин, що доведено великою кількістю досліджень. Наприклад, було показано, що у культивованих моноцитах людей, хворих на інсулінонезалежний цукровий

діабет (який, як відомо є одним з факторів ризику атеросклерозу), рівень NFκB і активність убіквітин-протеасомної системи були значно вищими порівняно із здоровими людьми [119]; такі ж зміни були характерні і для моноцитів людей, хворих на цереброваскулярну патологію [120]. Таким чином, підвищена протеасомна активність в макрофагах, яка є наслідком оксидативного стресу, може підвищувати кількість вільного NFκB і його біологічну дію, що, в свою чергу, може бути критичним кроком в ініціації атеросклеротичного процесу.

Про важливість протеасомного протеолізу в атеросклеротичному процесі свідчить те, що специфічні протеасомні інгібітори пригнічували антиапоптотичний ефект. До речі, схожий механізм використовує вірус людської папіломи: інактивація p53 відбувається внаслідок підвищеного продукування протеїну E6, який є медіатором убіквітинування p53; таким чином клітина, що інфікована вірусом, позбавлена можливості апоптотичної загибелі [121].

При цукровому діабеті, що супроводжується атеросклеротичними ушкодженнями, існує ще один патогенетичний ланцюг, пов'язаний з активністю протеасомного протеолізу. Інсулін впливає на регуляцію судинного тону, регулюючи рівень оксиду азоту (NO). Після з'єднання інсуліну з рецептором, в клітині активується сигнальний шлях, одним із результатів якого є активація ендотеліальної NO-синтази протеїнкіназою АКТ і збільшення синтезу NO.

Ще одним фактом, що свідчить про залучення убіквітиново-протеасомної системи в патогенез АС, є значна кількість досліджень в яких прямо вказано на велике накопичення убіквітинованих білків в клітинах і тканинах, що знаходяться в зоні ураження судинної стінки, і цей процес є специфічним [122]. Показано, що накопичення убіквітинових кон'югатів не є однорідним у атеросклеротичній бляшці, а залежить від її регіону: найвищі показники були характерними для ділянок навколо ліпідного центру,



”плечей” бляшки та фіброзної покривки. Крім цих ділянок, характерним було збільшення убіквітинової імунореактивності у Т-лімфоцитах [123].

Гіпертензія як фактор ризику АС та його ускладнень також може реалізовувати свій патогенетичний вплив через діяльність протеасомного протеолізу. У досліджах Marfella et al. (2007) досліджувалися атеросклеротично ушкоджені ділянки сонних артерій, отримані в результаті оперативної каротидної ендартеректомії [124]. Матеріал був отриманий від двох груп: групи з проявами симптомокомплексу вранішнього підвищення артеріального тиску і у групи без таких проявів. Показано, що у пацієнтів з проявами спонтанного підвищення артеріального тиску атеросклеротичні бляшки мали більшу кількість макрофагів, Т-лімфоцитів порівняно з контрольною групою. Крім того, у ділянках атеросклеротичних уражень виявлялася збільшена кількість нітритирозину (модифікована амінокислота, маркер оксидативного стресу), вищий рівень убіквітину та 20S протеасоми, а також значно підвищена активність протеасомного протеолізу у атеросклеротично змінених тканинах [125]. У цих же досліджах було показано, що макрофаги, виділені з атеросклеротичних уражень, взятих у пацієнтів зі спонтанними підвищеннями артеріального тиску також демонструють більш високий ступінь накопичення убіквітину та вищу протеасомну активність порівняно з матеріалом пацієнтів без даного симптомокомплексу, більше того, в дослідженнях було показане і збільшення рівню активного NF $\kappa$ B, а також TNF- $\alpha$ , що також вказує на підвищену активність протеасомного протеолізу.

В цілому ці дослідження дозволяють стверджувати, що теорія «відповіді на ушкодження» також залучає систему протеасомного протеолізу: вплив ушкоджуючого чинника у будь-якому разі буде викликати процеси прозапального характеру та оксидативний стрес судинної стінки, таким чином викликаючи і активацію убіквітин-протеасомної системи. А враховуючи, що прояви спонтанного підвищення артеріального тиску

великою мірою зумовлені впливом симпатичної нервової системи, можна казати і про активацію протеасомної системи і у складі стресорної відповіді.

Звісно, що протеасомний протеоліз, як система утилізації більшості внутрішньоклітинних білків, не може бути однонаправленим у патогенезі захворювань, зокрема інсульту. Пригнічення протеасомної активності, крім вказаних вище антиатерогенних впливів, може давати і збільшення активності деяких проатерогенних чинників. Наприклад, пригнічення протеасомного протеолізу може призводити до пригнічення деградації і збільшення кількості HIF-1 $\alpha$ , що є компонентом HIF (фактор транскрипції, що індукується гіпоксією) [126], між тим показано, що зменшення кількості HIF-1 $\alpha$  (за допомогою інтерферуючих РНК) має антиатерогенний ефект, зокрема зменшує формування „пінистих клітин” *in vitro*.

Найбільш неоднозначним результатом пригнічення протеасомного протеолізу, безумовно, є безпосередня індукція апоптотичної загибелі клітин (наприклад р53-опосередкований апоптоз), або збільшення їх чутливості до додаткових апоптотичних стимулів (TNF- $\alpha$ -залежний апоптоз). Даний вплив показано у великій кількості досліджень на різному матеріалі [127].

Вищеперераховані приклади дозволяють стверджувати, що наявність макрофагів та їх висока активність є прогностично несприятливими ознаками, а їх елімінація з осередку атеросклеротичного ушкодження могла б покращити перебіг цієї патології, віддалити чи усунути ускладнення. Намагання специфічного впливу на макрофаги з метою викликати їх загибель вже мали місце, зокрема в досліджах Martinet et al., (2006). Дослідники виходили з того, що речовина бензилоксикарбоніл-Вал-Ала-DL-Асп (О-метил)-флуорметилкетон (z-VAD-fmk) здатна до активації процесів аутофагії специфічно в моноцитах та макрофагах [128]. Взявши суміш макрофагів, намагалися показати можливість їх специфічної загибелі від аутофагії. Однак, результати не виправдали сподівань, бо виявилось, що після активації процесів аутофагії макрофаги вивільняють велику кількість цитокінів. Ці цитокіни в комбінації з z-VAD-fmk викликали некротичну

загибель гладеньком'язевих клітин, таким чином нівелюючи специфічність впливу. Цікавим є сам механізм впливу z-VAD-fmk: він має здатність до пригнічення каспази-8, що саме по собі може викликати аутофагію [129], тобто він не є специфічним, але є сильним інгібітором пептид-N-гліканази [47]. Цей фермент вибірково видаляє N-глікани з протеїнів перед їх протеасомною деградацією. Відсутність або пригнічення цього ферменту призводить до накопичення протеїнів з порушеною структурою і власне до „стресу” ендоплазматичного ретикулуму, який можливо і викликає загибель макрофагів. Остання гіпотеза підтверджується даними про високу чутливість макрофагів до „стресу” ER, що викликався тапсигаргіном і тунікаміцином [130]. Оцінюючи наведені факти, можна припускати, що пригнічення протеасомної активності в макрофагах також буде викликати подібні реакції, проте даних про вивільнення цитокінів при апоптотичній загибелі цих клітин сьогодні немає. Взагалі ж, незважаючи на дещо песимістичний результат досліджу, загальна його ідея, безумовно, заслуговує на увагу.

Велика кількість фармакологічних препаратів з ефектом впливу на протеасомну активність проходять клінічну стадію досліджень (препарат MLN-519, синтетичний аналог лактацистину, область застосування якого – запобігання реперфузійному ушкодженню після інсультів; препарати NPI-0052, PR-171, що використовуються в онкології), деякі вже застосовуються у клініці. Препарат Velcade (діюча речовина-бортезоміб) в 2003 році було рекомендовано для лікування множинної мієломи та солідних пухлин.

#### **1.4. Алельний поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми**

Вивчення механізмів розвитку ішемічного інсульту, як одного з найбільш розповсюджених захворювань в усіх цивілізованих країнах світу, складає найактуальнішу проблему патологічної фізіології. Дослідженнями

останніх років показано, що ймовірність розвитку та важкість перебігу як даного захворювання, так і переважної більшості інших хронічних патологій значною мірою залежить від генотипу хворого, що визначає функціональну придатність тих чи інших ендогенних ферментативних систем. У відповідь на дію екзогенних ушкоджуючих факторів в організмі людини одночасно розгортаються дві програми, що складаються із компенсаторних реакцій, з одного боку, та патологічних, з іншого. Певний набір алельних варіантів генів визначає, в деяких випадках, стійкість індивідууму до певного захворювання, а в інших, схильність до виникнення патології, в тому числі й ішемічного інсульту. Саме сукупність багатьох генів із дещо зміненою послідовністю, а отже і білків, функціональні властивості яких певною мірою відрізняються від типових, більш розповсюджених у популяції варіантів, спричинює збільшення ймовірності розвитку патології за дії несприятливих факторів оточуючого середовища. Цей факт не перешкоджає активному вивченню ролі алельного поліморфізму окремих генів у патогенезі інсультів з метою з'ясування тих генів, алельний варіантів яких є більш вагомим у формуванні схильності до зазначеної патології.

Пошук в геномі і встановлення патофізіологічного значення алельних варіант генів, що збільшують ймовірність розвитку захворювань людини є складною і копіткою роботою одночасно багатьох колективів дослідників.

Основними орієнтирами в цьому генетичному лабіринті є, з одного боку, дані про роль тих або інших функціональних систем організму в патогенезі певного захворювання, а з іншого - результати експериментального «виключення» (нокауту, нокдауну) певних генів у тварин, що спричинює розвиток даної патології. Саме цими двома шляхами проходили дослідження по з'ясуванню ролі генетичних чинників розвитку інсультів та серцево-судинних захворювань [131, 132].

Оскільки, як було розглянуто вище, протеасомний протеоліз грає важливу роль у патогенезі таких ускладнень атеросклерозу, як інфаркт міокарду, інсульт та пов'язаний з ним синдром ішемії-реперфузії [143], а

пригнічення протеасомної активності покращує перебіг ішемічного інсульту [134] і зменшує ступінь пошкодження міокарду при ішемії-реперфузії [135].

Однозначного пояснення цих явищ поки що немає, серед вірогідних ланок даної протекції називають попередження апоптотичної загибелі клітини [136], індукцію експресії білків теплового шоку [137], а також збереження щільних контактів між кардіоміоцитами [138], бо всі вищевказані процеси супроводжуються зниженням протеасомної активності. З іншого боку, показано, що частота виникнення інфаркту міокарда у людей, хворих на цукровий діабет II-го типу корелює з поліморфізмом PSMA6-гену, що кодує  $\alpha$ -6 субодиницю протеасомного комплексу [11], і у людей з цим поліморфізмом спостерігалася вища активність протеасоми та рівень убіквітину у тканинах міокарда [139]. Ці дані дозволяють пов'язати між собою порушення протеасомної активності, цукровий діабет та ризик виникнення інфаркту міокарда.

В генах, що кодують субодиниці протеасоми LMP2 та PSMA6, описано SNP - Arg<sub>60</sub>→His та (C<sup>8</sup>→G) відповідно [16, 140]. Тривають пошуки асоціації між генетичними варіантами цих генів та ймовірністю розвитку певних захворювань [141, 142]. Зокрема встановлено, що менш розповсюджений алельний варіант гена LMP2 значно частіше зустрічається у хворих на деякі аутоімунні захворювання. Проте досі невідомо, чи впливають заміни поодиноких нуклеотидів в LMP2 на функціональну активність імунопротеасоми або експресію відповідних генів. В роботі Mishto M. et al. було показано зв'язок між Arg<sub>60</sub>→His поліморфізмом LMP2 та чутливістю моноцитів до TNF $\alpha$ -індукованого апоптозу [17]. В наступній роботі ці автори встановили факт експресії субодиниць імунопротеасоми в клітинах мозку та показали, що активність протеасоми в тканинах мозку вища при генотипі Arg/Arg порівняно з Arg//His [18]. Визначити активність протеасоми у осіб з генотипом His/His дослідникам не вдалося внаслідок низької частоти алелю His в італійській популяції. Крім того, слід зауважити, що вимірювати активність імунопротеасоми в тканинах, в яких основний внесок в

протеасомну активність робить конституційна форма цього протеїназного комплексу не досить коректно.

Японськими дослідниками K. Ozaki, H. Sato et al. в 2006 році встановлено наявність цілого ряду SNP у гені, що кодує  $\alpha$ -6-субодиницю протеасоми (PSMA6), а один з найбільш розповсюджений у популяції ( $C^{+8} \rightarrow G$ ) частіше зустрічається у хворих на інфаркт міокарда та збільшує транскрипційну активність цього гена [11].

В 2009 році Liu X. et al., вивчаючи алельний поліморфізм гену PSMA6 в китайській популяції, встановили, він достовірно асоціюється з інфарктом міокарда і виступає фактором ризику в китайській популяції. Автори також показали, що даний SNP не має асоціацій з такими захворюваннями як гіпертензія, другий тип діабету, палінням та алкогольна залежність, які як відомо є факторами ризику розвитку інфаркту міокарда. Не спостерігалось взаємозв'язку між алельним поліморфізмом гену PSMA6 та рівнем ліпідів плазми крові. Хоча не вимірювалася концентрація таких маркерів запалення як фібриноген та С-реактивного білка, дослідники лише зазначили, що SNP даного гену не має асоціації з факторами запалення [143].

В іншому дослідженні D.A. Bennett et al. встановили, що у хворих на гострий інфаркт міокарду з G/G генотипом спостерігається підвищений рівень фібриногену ( $P=0,03$ ). Згідно з низькою частотою зустрічаємості G/G генотипу в європейській популяції (2.1%), виникнення цих асоціацій не є переконливим. Також в даному дослідженні була встановлена підвищена частота зустрічаності G алелю SNP PSMA6 у хворих на цукровий діабет та гострий інфаркт міокарду в порівнянні з хворими на цукровий діабет без інфаркту міокарда [16].

Досліджуючи протеолітичну активність протеасоми і її роль у хворих з миготливою аритмією, Tan L. et al. виявили збільшену активність кальпаїнів і протеасоми у хворих з пароксизмальною та перманентною миготливою аритмією в порівнянні з контролем [144]. Ці дані вказують, що активність протеасоми може виступати одним з факторів розвитку миготливої аритмії,

яка в свою чергу є одним з етіологічних чинників розвитку ішемічного інсульту. У 1995 році G.Y. Deng et al. встановлено залежність між цукровим діабетом та поліморфізмом гену, що кодує субодиницю імунопротеасоми LMP2 (Arg60→His) [15].

В дослідженнях українських вчених, було доведено, що поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми, має важливе значення у розвитку спадкової схильності до первинної артеріальної гіпертензії, яка в свою чергу є найбільш несприятливим чинником розвитку ішемічного інсульту та інфаркту міокарду [139].

E. Reiter E. et al. в 2009 році вивчаючи генетичні варіації лімфотоксину альфа та ризик розвитку ішемічного інсульту в європейській популяції, виявили, що лише один SNP був асоційований з ризиком розвитку ішемічного інсульту: мінорна алель SNP з PSMA6 (rs 1048990) асоціювалась з зменшенням ризику ішемічного інсульту, але ці асоціації не підтвердилися в популяції Великої Британії [145].

Дані свідчать, що rs1048990 SNP виступає фактором ризику схильності до інфаркту міокарду в китайській популяції за даними Xin Liu, а також підтверджені Ozaki et al. в японській популяції, проте суперечать даним, отриманими іншими дослідниками в японській популяції та європейській [11].

Цікавим фактом є те, що цукровий діабет виступає одним з основних факторів ризику розвитку кардіоваскулярних захворювань і подальшого виникнення інфаркту міокарда, регульованого убіквітин-протеасомним протеолізом в м'язах щурів [146] та атеросклеротичних бляшках у людей [147]. Присутність убіквітину і протеасоми 20S в діабетичних макрофагах, говорить про те, що убіквітин-протеасомний протеоліз має протизапальний ефект в діабетичних індивідуумів, що можливо визначає рушійний крок в патофізіології цукрового діабету [148].

Італійськими вченими в 2007 році були представлені дані про алельну частоту та генотипи всіх поліморфізмів PSMA6, розподіл яких не мав різниці

між інфарктом міокарда і контрольною групами. Потім був проведений рестрикційний аналіз з другим типом діабету та була виявлена різна частота rs1048990 C/G алелю і генотипів. У хворих на цукровий діабет з інфарктом міокарда (n=34) спостерігалася підвищена частота зустрічності G алелю в порівнянні з контролем (n=85), (P=0,02) [149]. Ці дані демонструють високе достовірне збільшення частоти G алелю PSMA6 rs1048990 у хворих на цукровий діабет з інфарктом міокарда в порівнянні з хворими на цукровий діабет без інфаркту міокарда.

Що до миготливої аритмії, то Lei Ke et al., досліджуючи протеолітичну активність і її роль у хворих з миготливою аритмією, виявили, що активність кальпаїнів і протеасоми збільшується в тканині у хворих з пароксизмальною та стійкою миготливою аритмією в порівнянні з контролем [149].

Таким чином, протеасомний протеоліз має важливе значення в підтриманні нормального функціонування серцево-судинної системи. Вивчення ролі протеасомного протеолізу знаходиться на початковому етапі, однак є вельми перспективним для вивчення як фундаментальних механізмів розвитку серцево-судинних захворювань, так і для розробки нових підходів у лікуванні найбільш розповсюджених та небезпечних захворювань. Особливе значення має дослідження зв'язку між протеасомним протеолізом та системою синтезу NO – системи, що має ключову роль в регуляції функцій судин та серця, вплив на яку відкриває шлях до терапії та профілактики найбільш розповсюджених серцево-судинних захворювань.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Об'єкти дослідження

##### *2.1.1. Характеристика експериментального матеріалу.*

Дослідження було проведено на 63-х щурах самцях лінії Wistar з масою тіла 280-320 г віком від 4 до 6 місяців, розподілених на 3 експериментальні групи ("Псевдооперовані тварини" – група, в якій здійснювали всі хірургічні маніпуляції, за винятком введення монофіламенту ( $n = 21$ ), "Короткотривала ОСМА" – тваринам цієї групи моделювали фокальну церебральну ішемію шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії за методикою J. Koizumi et al. з використанням монофіламентів із силіконовим покриттям тривалістю 2 хв. ( $n = 21$ ), "Довготривала ОСМА" – тривалість фокальної церебральної ішемії становила 60 хв. ( $n = 21$ ). Тварин отримували із віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вони утримувалися на стандартному харчовому раціоні. Догляд за тваринами здійснював досвідчений ветеринар. Усі експерименти проводили відповідно до "Правил виконання робіт з використанням експериментальних тварин", затверджених МОЗ України. Експериментальні процедури проводили у відділі цитології Інституту фізіології ім.О.О. Богомольця в першій половині дня.

Об'єктами дослідження були тканини мозку, венозна кров.

Фосфатний буфер, трифенілтетразолій, протеасомні інгібітори (класто-лактацистин бета-лактон (CLL), Z-Leu-Leu-Leu-al (MG 132)) та специфічні флюорогенні пептидні субстрати для вимірювання різних видів активності протеасоми (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амідо-4-метилкумарин для визначення ХТП активності протеасоми; Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-амідо-4-метилкумарин – для ТП активності, а CBZ-Leu-Leu-Glu-7-амідо-4-метилкумарин - для ПГПГ

активності) поставлені компанією Sigma Aldrich. Вимірювання флюоресценції проводилося на спектрофлюориметрі HITACHI 4000.

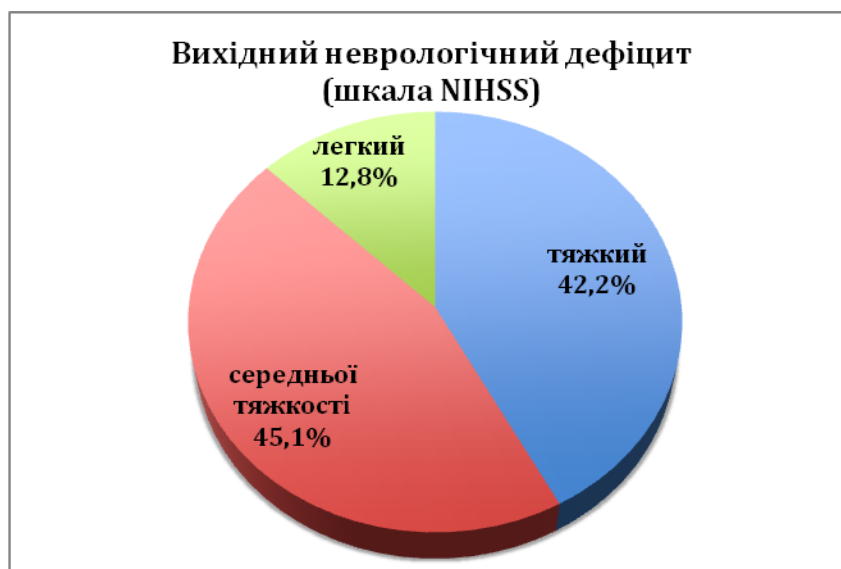
### ***2.1.2. Характеристика клінічного матеріалу.***

Основна група дослідження складалась з 102 пацієнтів з гострим ішемічним інсультом - 54 (52,9%) чоловіків та 48 (47,1%) жінок, середній вік яких на момент розвитку інфаркту мозку становив  $70,4 \pm 9,9$  роки. Група хворих на ішемічний інсульт проходила лікування у неврологічному відділенні №1 та №2 Київської міської лікарні №4. Діагноз ішемічного інсульту був верифікований за даними КТ або МРТ головного мозку. До дослідження залучали пацієнтів, в яких з моменту розвитку перших симптомів інсульту до надходження в приймальне відділення пройшло не більше 12 годин. Вогнище інфаркту локалізувалось: в басейні лівої передньої мозкової артерії – у 1 (1%); в басейні лівої середньої мозкової артерії - у 47 (46,1%) хворих; в басейні правої середньої мозкової артерії - у 37 (36,3%) хворих; в вертебрально-базиллярному басейні – у 17 (16,6%). Двадцять хворих в анамнезі вже перенесли ішемічний інсульт – 14 (13,7%) в тому ж басейні та 6 (5,9%) в іншому судинному басейні.

Обстеження хворих проводили за загальним алгоритмом зі створенням комп'ютерної бази даних для проведення статистичного аналізу.

Вираженість неврологічних розладів у хворих оцінювали за шкалою Національного Інституту здоров'я США (NIHSS – National Institute of Health Stroke Scale, USA).

Вихідний рівень неврологічного дефіциту в середньому дорівнював  $12,0 \pm 2,1$  бала: у 43 (42,2%) хворих порушення були тяжкими ( $13,8 \pm 0,7$  бала), у 46 (45,1%) — середньої тяжкості ( $11,5 \pm 1,5$  бала), у 13 (12,8%) — легкими ( $7,8 \pm 0,4$  бала) (Рис 2.1.).



**Рис. 2.1. Вихідний рівень неврологічного дефіциту у пацієнтів основної групи, шкала NIHSS.**

Контрольна група складалась з 92 осіб, що за основними показниками та факторами ризику інсульту не відрізнялися від пацієнтів із гострими порушеннями мозкового кровообігу (транзиторними ішемічними атаками, ішемічного або геморагічного інсульту) в анамнезі (Табл. 2.1.).

Таблиця 2.1.

Основні показники хворих на ішемічний інсульт та практично здорових осіб (контроль), яких було включено до дослідження

ПАРАМЕТР	Практично здорові особи (n = 92)	Пацієнти із гострими порушеннями мозкового кровообігу(n = 102)
Вік (роки)	71,3±10,2	70,4±9,9
Стать (ч/ж)	45 (48,9%)/47(51,1%)	54 (52,9%)/48 (47,1%)
Гіпертонічна хвороба	77 (83,7%)	84 (82,3%)
Миготлива аритмія	24 (26,1%)	25 (24,5%)
Інфаркт міокарда в анамнезі	11 (12,0%)	12 (11,8%)
Цукровий діабет	24 (26,1%)	19 (18,6%)

Як видно із таблиці, контрольна група та група хворих на ішемічний інсульт не відрізнялися за віком і співвідношенням чоловіків та жінок ( $P > 0.05$  за  $\chi^2$ -критерієм), що дозволило нам порівнювати ці групи за розподілом різних алельних варіантів досліджених генів.

Забір крові проводився кваліфікованими спеціалістами в клінічних умовах із використанням стерильних моновет виробництва фірми „Sarstedt” (Німеччина) із дотриманням усіх правил медичної асептики та антисептики. Усі особи підписали згоду на використання своєї крові для генетичних досліджень. Комітет з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця схвалив план дисертаційної роботи та дійшов до висновку, що робота повністю відповідає принципам біомедичної етики.

## **2.2. Експериментальне моделювання ішемічного пошкодження мозку**

Моделювання ішемічного ушкодження головного мозку є обов'язковим етапом для апробації методів лікування хворих з ІІ. Основою для визначення механізмів клітинної загибелі нейрональної репарації *in vivo* виступають моделі ІІ.

Для дослідження механізмів клітинної нейрональної альтерації та репарації використовують близько 10 моделей ІІ, які варіюють за подібністю до ІІ у людини. Проте, найпоширеніша модель фокальної церебральної ішемії – це ендovasкулярна оклюзія середньої мозкової артерії (ОСМА), яка передбачає введення монофіламентної нитки у просвіт внутрішньої сонної артерії, що блокує кровоплив у СМА [150]. Ця модель характеризується розвитком відтворюваних вогнищ інфаркту в басейні СМА, а також дає змогу дослідникам вивчати ефекти реперфузії на еволюцію зони ішемічного ушкодження. Монофіламентну оклюзію СМА, вперше здійснену J. Koizumi (1986) [151], використовують в багатьох лабораторіях у різних модифікаціях. Вона рекомендована SFES (Society for Experimental Stroke) для проведення до

клінічних випробувань лікарських речовин і генно-клітинних технологій при ІІ [152]. Ця модель відтворює умови, близькі до патофізіологічних при ІІ у людей.

Важливою особливістю моделі є відносна простота маніпуляцій і контрольоване відтворення як постійної, так і тимчасової ішемії, що дозволяє дослідникам вивчати ефекти реперфузії на розмір зони ішемічного ушкодження головного мозку [153].

Гризуни є вдалим об'єктом для моделювання інсульту завдяки наступним причинам: 1) анатомічні структури та фізіологічні процеси є добре вивченими та нагадують аналогічні у людини; 2) подібність судинної системи головного мозку до людської; 3) легке розведення і утримання в лабораторних умовах; 4) технічна доступність процедур забору матеріалу, зберігання і дослідження тканин; 5) можливість генетичних маніпуляцій, особливо у мишей; 6) етична прийнятність дослідів, на відміну від великих ссавців [154].

Рекомендації експертів вказують на необхідність моделювання інсульту у щурів (віком 6–12 міс.) з метою наближення патофізіологічних характеристик експериментальної гострої фокальної ішемії до інсульту в людини. Проте через загалом високий рівень летальності, який спостерігається в старих щурів при моделюванні ОСМА, і особливості моделі, у наших дослідках були використані щури віком 3–4 міс.

Тваринам проводили інтралюмінарну оклюзію СМА, час реперфузії становив 6 годин, 24 години та 72 години відповідно. Контролем слугували псевдооперовані тварини, з часом реперфузії 6, 24 та 72 годин відповідно, яким також вводили поліпропіленову нитку (4-00) з силіконовим кінцем довжиною 20-22 мм і діаметром 0,38 мм у внутрішню мозкову артерію на глибину 17-20 мм до місця відходження середньої мозкової артерії від внутрішньої сонної артерії.

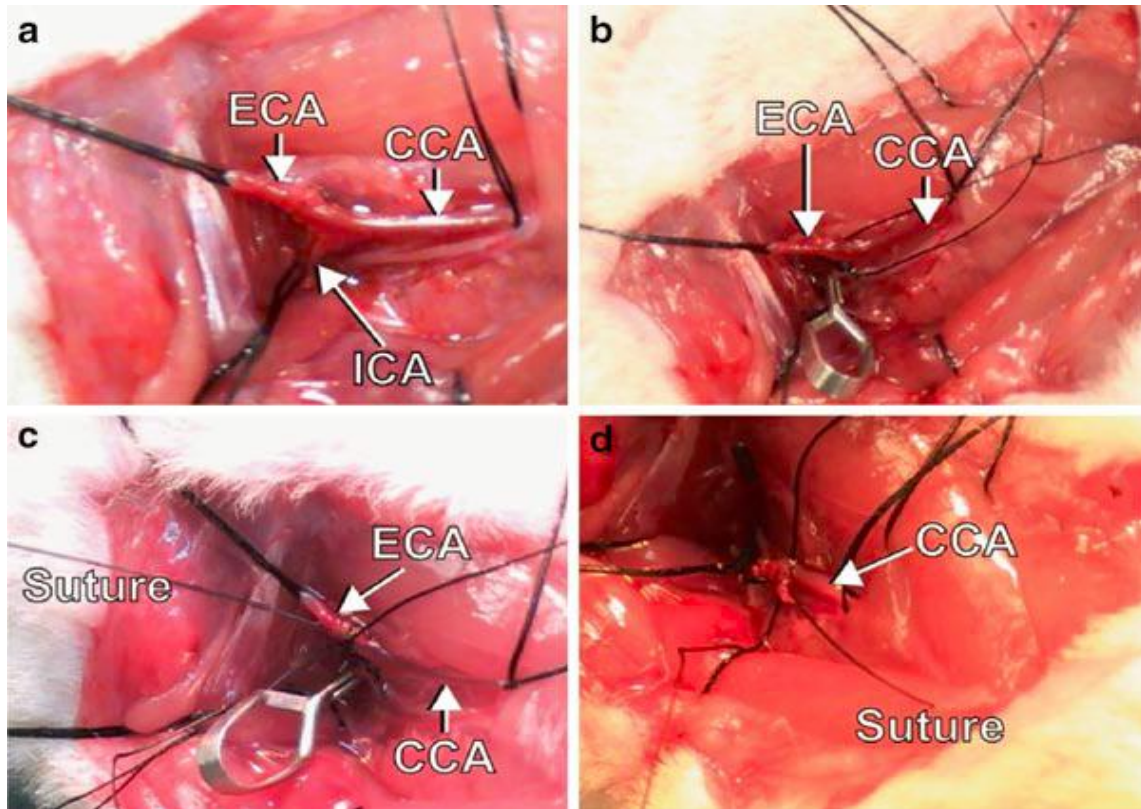
Самців лінії Wistar з масою тіла 280-320 г утримували в умовах віварію протягом 12 год. вночі без їжі, проте з вільним доступом до води.

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.

Щурів фіксували на операційному столі у положенні на спині. Після гоління шерсті в ділянці передньої поверхні шиї операційне поле обробляли розчинами антисептиків (бетадин, 70 % етиловий спирт) та ізолювали асептично. Шкіру та м'які тканини інфільтрували 0,5 % розчином новокаїну. Проводили лінійний розріз шкіри довжиною до 3 см по середній лінії від під'язикової кістки до яремної вирізки грудини. Шкіру по обидва боки відсепаровували та розводили за допомогою кровоспинних затискачів. Тупим шляхом виділяли вилочкову та щитоподібну залози, які відводили вгору. Мікrohrіургічний ранорозширювач встановлювали між грудинно-ключично-соскоподібним і двочеревцевим м'язами, а лопатково-під'язиковий м'яз коагулювали і розділяли дистально. За допомогою хірургічного мікроскопа під збільшенням  $\times 10$  виділяли праву загальну сонну артерію (ЗСА), зовнішню сонну артерію (ЗоСА) та внутрішню сонну артерію (ВСА). Шляхом гострої дисекції судини звільняли від сполучної тканини та нервів. Блукаючий нерв відділяли від ЗСА та ВСА. ЗоСА відводили за допомогою лігатур. Потім виділяли потиличну гілку ЗоСА, коагулювали та пересікали. Наступним кроком ізолювали верхню щитоподібну і висхідну глоткову артерії, які також коагулювали та пересікали. ЗоСА виділяли дистально і разом із кінцевими гілками (язикова та верхньо-щелепна артерія) коагулювали та пересікали.

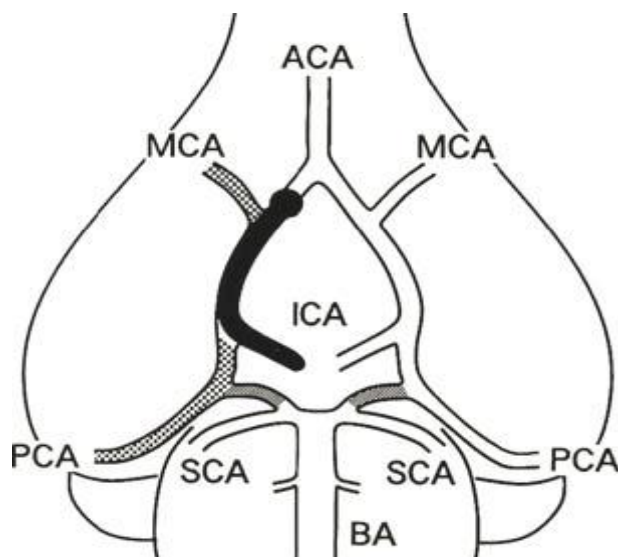
Перев'язували екстра краніальну гілку ВСА. Накладали мікро судинні тимчасові кліпси на ЗСА і ВСА. ЗоСА пересікали на відстані 1-2 мм від біфуркації ЗСА. В просвіт проксимального кінця ЗоСА вводили монофіламентний оклюдер (4-00) (Dossol corp., USA) довжиною 3 см із силіконовим покриттям довжиною 5-6 мм з діаметром дистального кінця

0,38 мм та позначкою на відстані 18-20 мм від дистального кінця, нанесеного за допомогою перманентного срібного маркера. Після введення дистального кінця оклюдера у ВСА, лігатуру на куксі ЗоСА щільно затягували, фіксуючи монофіламент у просвіті судини (Рис. 2.2).



**Рис. 2.2. Інтраопераційне фото: а – монофіламентну нитку введено у просвіт ВСА, б – накладено тимчасову кліпсу на ВСА, с – витягування монофіламентної нитки з просвіту ВСА, d – знімання тимчасової кліпси з ВСА і накладання лігатури на ВСА.**

Кліпси знімали, і оклюдер вводили інтракраніально до відчуття легкого опору, який зазвичай виникав при введенні 18-20 мм монофіламенту (срібна позначка) і свідчив про його потрапляння у просвіт передньої мозкової артерії та блокування СМА (Рис. 2.3).



**Рис. 2.3. Схема розташування оклюдера у просвіті внутрішньої сонної артерії: ACA – передня мозкова артерія; PCA – задня мозкова артерія; SCA – верхня мозочкова артерія; BA – основна артерія; MCA – середня мозкова артерія [152].**

Післяопераційну рану обробляли порошком стрептоциду, зашивали поліамідним шовним матеріалом і обробляли шкіру 5 % спиртовим розчином йоду. Після закінчення маніпуляцій тварин протягом 2-4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30-33) °С до повного пробудження, що є необхідною вимогою з огляду на застосування ксилазину. У подальшому прооперованих тварин утримували у спеціальних клітках, по 2 особини у кожній, при середній температурі у приміщенні 21-24 °С, з періодичною вентиляцією.

### **2.3. Методи морфологічного дослідження**

Оцінка ішемічного пошкодження проводилась через 6, 24 та 72 години після відновлення кровотоку. Для визначення розміру інфаркту головного мозку 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 трифеніл тетразоліум хлоридом (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. ТТХ є протонним акцептором для багатьох піридинових нуклеотид-зв'язаних дегідрогеназ (наприклад, сукцинат-дегідрогенази). Розчин ТТХ у 0,9% розчині натрію хлориду при температурі 37°C є безбарвним, проте у живій тканині мозку під впливом мітохондріальних дегідрогеназ ця речовина відновлюється до червоного ліпід-розчинного формагану, в той час як нежива тканина чи ділянка інфаркту залишається незабарвленою [154]. Це дає змогу легко відмежувати зону ішемії від інтактної мозкової речовини.

Оскільки збільшення об'єму інфарктної тканини за рахунок набряку та зменшення її об'єму за рахунок зморщування можуть призвести до переоцінки або недооцінки об'єму зони інфаркту, проводили розрахунок коригованої площі зони інфаркту на зрізі за формулою:

$$S1 = S1TC - S1NI,$$

де  $S1$  – коригована площа зони інфаркту;  $S1TC$  – загальна площа контрлатеральної (інтактної півкулі);  $S1NI$  – ділянка інтактної тканини в ураженій півкулі мозку.

Скориговану величину об'єму інфаркту одержували за допомогою формули:

$$V = \sum S1n1,$$

де  $S1$  - коригована площа зони інфаркту;  $n1$  – товщина зрізу;  $\sum$  - сума добутків коригованої площі інфаркту на товщину зрізу (залежно від кількості зрізів).

Статистичну обробку первинних цифрових експериментальних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

### **2.3.1. Підготовка препаратів для проведення світлооптичного та електронно-мікроскопічного аналізу.**

Для проведення структурних та ультраструктурних досліджень тканини головного мозку контрольних тварин та тварин з ішемією наркотизували внутрішньом'язовим введенням ксилазину (75 мг/кг) та інгаляційно – ефіром. Фіксацію тварин проводили методом транскардіальної перфузії фіксуєчим розчином, який містив 4 % параформальдегіду і 2,5 % глютаральдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ), рН 7,4. Після фіксації перфузією тварин декапітували, мозок яких обережно видаляли з черепної коробки та перекладали в попередньо охолоджений фіксуєчий розчин того ж складу.

Фронтальні зрізи головного мозку завтовшки 400 мкм отримували за допомогою вібротома (Ultracut-E («Reichert-Jung», Австрія)) і залишали їх дофіксуватися у тому ж розчині протягом ночі (12 годин) при температурі 4 °С. Наступного дня зрізи обробляли за таким протоколом:

- 1 – промивка у 0,1М ФБ, рН 7.4 тричі по 10 хвилин;
- 2 – фіксація в 1 % розчині OsO<sub>4</sub> на 0,1 М ФБ протягом 1 години при кімнатній температурі;
- 3 – промивка у 0,1 М ФБ, рН 7.4 – 3 рази по 10 хв.,
- 4 – поступова дегідратація у етилових спиртах висхідної концентрації (50%, 75%, 95%, 100%) по 10 хв. в перших трьох розчинах та тричі по 15 хв. в четвертому розчині;
- 5 – занурення в епоксидну смолу (kit 45359, Fluka: Epon 812 (Cat. 45345) – 52 % ; DDSA (Cat. 44160) – 18.5 %; MNA (Cat. 45347) – 29.3%; DMP-30 (Cat. 45348) – 0.2 %) проводили поступово: протягом півтори години у суміші 100% етилового спирту та епоксидної смоли у співвідношенні один до одного; півтори години у співвідношенні один до трьох;

6 – полімеризація епоксидної смоли між двома пластиковими листами (плоске заливання) при 60 °C протягом 48 годин;

7 – прикріплення заполімеризованих у смолі препаратів до плоскої поверхні блоків з епоксидної смоли за допомогою клею “Ціанопан” (Польща);

8 – виготовлення напівтонких зрізів товщиною 1-2 мкм;

9 – забарвлення напівтонких зрізів толуїдиновим синім і заключення в бальзам під покривне скло;

10 – перегляд зрізів у світлооптичному мікроскопі для визначення локалізації пошкодженої ділянки кори та стріатума головного мозку для виготовлення ультра тонких зрізів;

11 – виготовлення ультра тонких зрізів завтовшки 40-60 нм ультрамікромомі LKB Brooma 8800 (Швеція).

Контрастовані в уранілацетаті і цитраті свинцю зрізи головного мозку вивчали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-100 CX (Японія).

## **2.4. Біохімічні дослідження**

### ***2.4.1. Отримання гомогенатів тканин мозку щурів.***

Для визначення активності протеасоми зразки мозку зважували, а далі гомогенізували в скляному гомогенізаторі з додаванням Трис–HCl буферу (рН 7.4) (0,1 мкл буферного розчину на мг тканини). Отриманий гомогенат тканини центрифугували (5000g протягом 5хв), після чого відібраний супернатант використовували для подальших біохімічних досліджень.

### ***2.4.2. Визначення протеолітичної активності протеасоми в тканинах мозку.***

Визначення хімотрипсиноподібної (ХТП), трипсиноподібної (ТП) та пептидиглютаміл пептид-гідролазної (ПГПГ) активності протеасоми проводили в 0.025 М Трис HCl 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-AMC), бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину (LSTA-AMC) або N-Cbz-лейцин-лейцин-глутамін-амідо-4-метилкумарину (LLG-AMC) [160]. 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 (рис. 2.8).

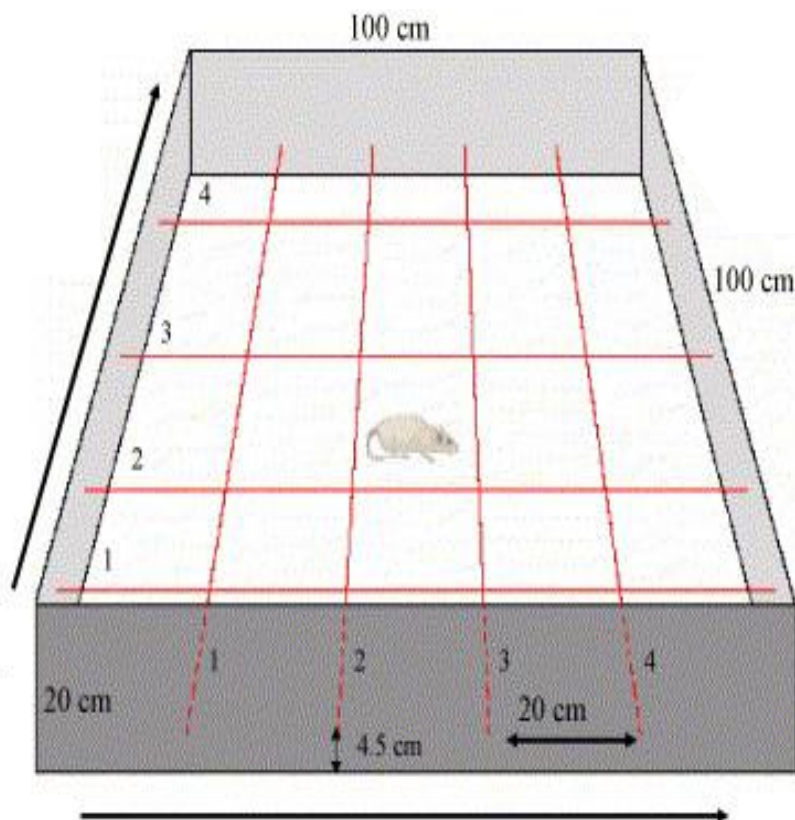
В супернатантах тканин мозку активність протеасомного комплексу визначали наступним чином: в кювету флуориметру вносили 20 мкл тканинного супернатанту та 280 мкл буферу, після чого додавали 3 мкл специфічного флуорогенного субстрату (LLVT-AMC, LSTA-AMC, або LLG-AMC) і визначали трипсиноподібну, хімотрипсиноподібну, та пептидилглютаміл пептид-гідролазну активності протеасоми у гомогенатах тканин за інтенсивністю приросту гідролізу цих специфічних флуорогенних субстратів через 30 хвилин (для трипсиноподібної активності) або 60 хвилин (для хімотрипсиноподібної та каспазоподібної активностей) на спектрофлуориметрі Hitachi-4000 (довжина хвилі збудження/емісії (Ex/Em) - 360/440) при температурі 37 °C. Для підтвердження специфічності протеасомального гідролізу в проби додавали селективні інгібітори протеасоми – класто-лактацистин бета-лактон або MG-132 в концентрації 5 мкМ [28]. 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.

## **2.5. Поведінкові тести**

Поведінкові тести є необхідною складовою доклінічних досліджень на експериментальних моделях ішемічного інсульту [155]. Детальна оцінка

неврологічних функцій і поведінкових реакцій може потребувати значної сукупності тестів, кожен з яких відповідає певному аспекту поведінки тварини. Оптимальний набір тестів повинен відповідати вимогам і завданням конкретного експерименту й бути чутливим до виду та вираженості дефіциту, передбачуваного після моделювання неврологічного ушкодження. Оскільки наслідками ішемічного інсульту в людини є переважно сенсорні, моторні порушення, експериментальні тести після ОСМА у тварин повинні бути спрямовані на кількісну оцінку даних порушень і бути незалежними від компенсаторної поведінки, зумовленої багаторазовим повторюванням процедури та навчанням [156].

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 [157, 158].



**Рис. 2.4 Тест «відкрите поле».**

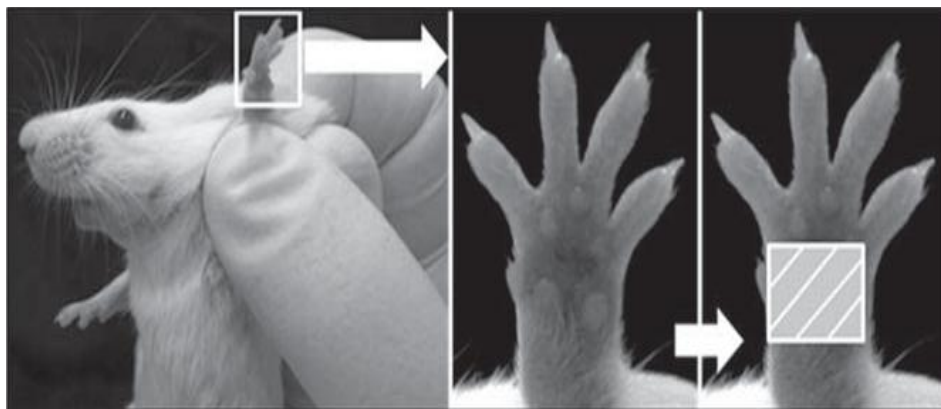
Тест «відкрите поле» проводили в тестовій камері з підлогою розміром 100х100см, обмеженою бортами висотою 40 см. Вся площа поля була розкреслена лініями на 25 квадратів зі стороною 20 см (Рис. 2.4). Камера освітлювалася лампою на 60 Вт, розташованою на відстані 1,5 м від підлоги. Спостереження за тваринами відбувалися за однакових умов освітлення і температури, за відсутністю сторонніх запахів і шуму. Час експозиції кожної тварини у «відкритому полі» становив 5 хв.

В індивідуальній поведінці тварин реєстрували їх горизонтальну рухову активність (локомоції); вертикальну активність (рерінг, підведення на задні лапки); грумінг (всі різновидності даної реакції, що проявлялись у актах вилизування та почісування) та фрізінг (кількість завмирань).

Тести для тварин з усіх трьох груп виконували протягом усього експериментального періоду тричі на день і підраховували середнє значення.

Наявність сомато-сенсорного дефіциту при ішемії визначали пробою на тактильну чутливість за допомогою адгезивно-видаляючого сомато-сенсорного тесту [159], який проводили до та після операції.

Соматосенсорний дефіцит визначали по збільшенню часу зняття твариною тестового стимулу. Для цього тварину виймали з клітки та наклеювали адгезивну стрічку Leofix розмірами 3х1 см на дистальну частину передньої лапи, позбавлену шерсті, по колу на 360° таким чином, щоб обидва кінці стрічки виступали та склеювалися один з одним, а передня лапа дещо виступала допереду від сформованої манжетки (Рис. 2.5).



**Рис. 2.5 Тест “адгезивна липка стрічка”**

Одразу після наклеювання стрічки тварину поміщали назад до клітки і починали спостереження. Щур використовує свої зуби та, меншою мірою, протилежну кінцівку для зняття стрічки. Перед початком спостереження запускали два таймери: один таймер був включений постійно, а другий - під час спроб тварини видалити стрічку. Кожна спроба тривала 30 с. Шукане співвідношення становить кількість секунд, які тварина реагує на стимул, поділених на 30 с. Даний тест повторювали з протилежною кінцівкою. Кожна сесія складалася з 5 спроб на кожну кінцівку. З 5 спроб обирали два найкращі результати. Після кожного тесту стрічку видаляли за допомогою теплої води та мила. Тварин, у яких не виявляли порушення вищенаведених поведінкових реакцій, не брали для подальшого дослідження.

Остаточний результат виражали у вигляді співвідношення за формулою:

$$x=[(x1+x2)/30)]-2/[(y1+y2)/30)]-2$$

де  $x$  - кінцевий результат,  $x1$  і  $x2$  - кількість секунд, витрачених твариною на зняття стрічки з ураженої (лівої) кінцівки у найкращих спробах,  $y1$  і  $y2$  - кількість секунд, витрачених твариною на зняття стрічки з інтактною (правою) кінцівкою, 30 – тривалість спроби (30 с), 2 - дві спроби із найкращим результатом.

При правильному виконанні даний тест чітко відображає фокальний характер ушкодження, демонструючи виражену різницю в балах ураженої та інтактною кінцівок протягом всього часу спостереження.

## **2.6. Визначення алельного поліморфізму**

Венозну кров у хворих на ішемічний інсульт та практично здорових осіб набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11.7 мМ) в якості антикоагулянту ("Sarstedt", Німеччина), заморожували та зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***2.6.1. Виділення ДНК з цільної крові.***

ДНК виділяли з цільної крові із використанням наборів (“NucleoSpin®Blood, USA”) згідно до рекомендацій виробника. Використаний метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За присутності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на *NucleoS<sup>TM</sup>*-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбента та переносять у стерильні вільні від ДНК мікропробірки. Отримана ДНК може безпосередньо використовуватися для проведення полімеразної ланцюгової реакції. Набір дозволяє виділяти із свіжого біологічного матеріалу високомолекулярну ДНК (40-50 тисяч пар нуклеотидів високої чистоти ( $OD_{260/280\text{ нм}}$  1.6 – 2.0). Вихід чистої ДНК з 100 мкл цільної крові становить 3 – 5 мкг. В процесі виділення ДНК ми дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно наступного протоколу.

#### **Протокол виділення ДНК.**

1. У пробірку об'ємом 1.5 мл внести 200 мкл венозної крові та додати 25 мкл протеїнкінази, з подальшим додаванням 200 мкл лізуючого розчину. Перемішати вміст пробірок обертанням 10 разів.
2. Термостатування суміші 10-15 хв при температурі 70°C.
3. Додавання 200 мкл етанолу (96-100%) до кожного зразка і та ретельне перемішування на вортексі.
4. Відмивання мембрани з додаванням 500 мкл специфічного буферу (“Wash Buffer”)
4. Центрифугування пробірок протягом 1 хв при 11 000 об/хв та додавання 600 мкл специфічного буферу (“B5”).



5. Центрифугування пробірок протягом 1 хв при 11 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту.

6. Висушування мембрани за допомогою центрифугування протягом 1 хв при 11000 x.g., під час якого видалявся залишковий етанол.

8. Центрифугування пробірок протягом 10 сек при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту із ДНК.

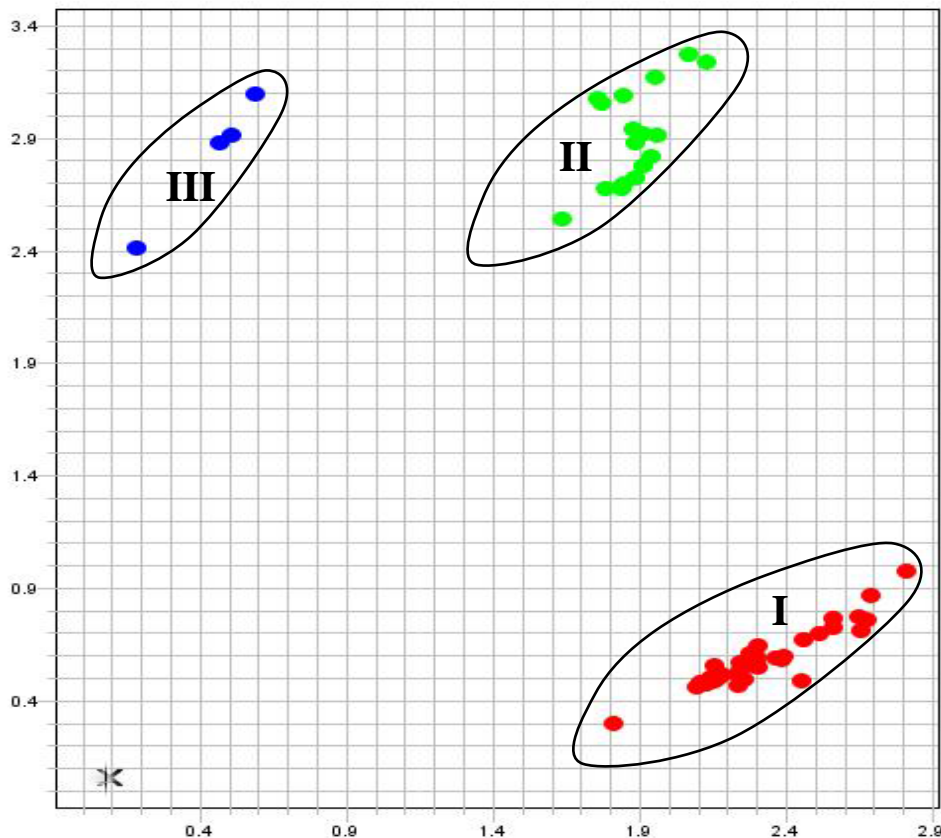
9. Додавання специфічного буферу BE(70°C) та інкубування при кімнатній температурі протягом 1 хв.

10. Центрифугування пробірок протягом 1 хв при 11 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту із ДНК.

11. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання при температурі -20°C.

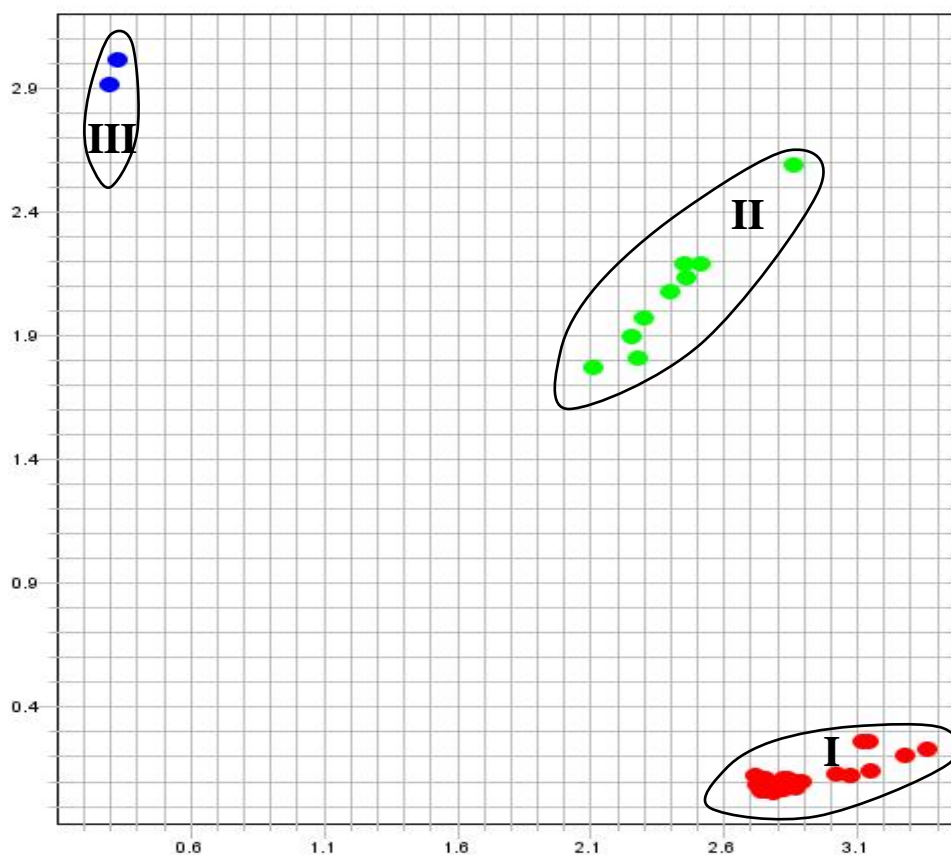
#### **2.6.2. Визначення алельного поліморфізму генів протеасоми LMP2 та PSMA6.**

Алельний поліморфізм генів LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His) та PSMA6 (C<sup>8</sup>→G) (rs 1048990) визначали із застосуванням методики Real Time PCR. Для ампліфікації ділянки зазначеного гена застосовували пару специфічних праймерів: прямий (forward) – PSMA6\_F 5'-TGAACCGAGTGTTTGACAAGCT-3' і зворотній (reverse) – PSMA6\_R 5'-CAGCAGCTGAACCAGAGAGT-3', а також флуоресцентні зонди до мажорного та мінорного алелю (PSMA6\_V VIC 5'-ACGAGCGCATCTAC-3', PSMA6\_M FAM 5'-CACGAGCACATCTAC-3'). Для ампліфікації брали 0,5 µl ДНК і додавали до суміші, що містила 10 µl 2-кратного TaqMan PCR Master Mix, 0,5 µl 40-кратної суміші специфічних праймерів та зондів, об'єм доводили до 20 µl деіонізованою водою (Рис. 2.6).



**Рис. 2.6. Результати дискримінаційного аналізу алелей гена LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His), із застосуванням 7500 Fast Real Time PCR, між здоровими людьми контрольної групи та хворими на ішемічний інсульт.**

Алельний поліморфізм гена PSMA6 (C<sup>-8</sup>→G) (rs 1048990) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C\_11599359\_10 та 7500 Fast Real Time PCR System (“Applied Biosystems”, USA) [15]. Для ампліфікації брали 0,5 μl ДНК і додавали до суміші, що містила 10 μl 2-кратного TagMan PCR Master Mix, 0,5 μl 40-кратного TaqMan® SNP Assay C\_11599359\_10, об’єм доводили до 20 μl деіонізованою водою. Програма ампліфікації складалася з 50 циклів (денатурація - 92 °C, 15 с, гібридизація та елонгація - 60 °C, 1 хв), після чого проводили аналіз з дискримінації алелей (Рис. 2.7).



**Рис. 2.7. Результати дискримінаційного аналізу алелей гена PSMA6 ( $C^8 \rightarrow G$ ) із застосування 7500 Fast Real-time PCR System між людьми з контрольної групи та хворими на ішемічний інсульт.**

## **2.7. Методи статистичного аналізу**

Аналіз та статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням програмного забезпечення: ImageJ, Exel, 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  $\chi^2$ . Поширення поліморфізмів перевіряли на відповідність закону Харді-Вайнберга

Для створення прогностичної моделі ризику виникнення інсульту була використана бінарна логістична регресія. В якості предикторів 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.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Визначення зони ішемічного пошкодження мозку після ОСМА

Ішемічний інсульт характеризується стабільним або частково регресуючим неврологічним дефіцитом. Поняття “ішемічний інсульт” означає розвиток гострого порушення мозкового кровотоку, із розвитком гіпоперфузії в певній ділянці мозку, що зумовлює формування зони некрозу – інфаркту [161]. Наприкінці 70-х років ХХ ст., коли було з’ясовано, що формування інфаркту мозку відбувається не миттєво, а триває кілька годин, перелік неврологічних термінів було доповнено ще одним — «penumbra» (з англ. «напівтінь») [162]. Новітні дані літератури свідчать про те, що стан перехідної ішемії в ділянці “пенумбра” є динамічним та нестабільним, і що навіть в експериментальних умовах точно визначити тривалість періоду можливого відновлення тканини неможливо. З клінічної точки зору значення цієї зони полягає в тому, що порушення функції нейронів у ній мають зворотній характер протягом 1-6 годин [163].

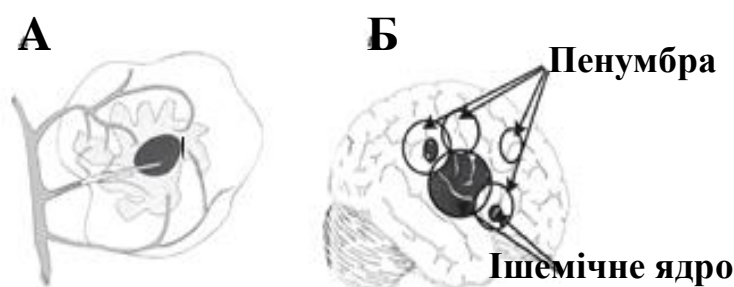
Ділянка мозку щурів з найбільш вираженим зниженням кровообігу (менше 10 мл/100г за 1 хв) стає незворотно пошкодженою дуже швидко, протягом 6-8 хв з моменту розвитку гострого пошкодження кровообігу («серцевина» або «ядерна» зона ішемії) [162].

Протягом декількох годин зона інфаркту оточена ішемізованою, але живою тканиною (з рівнем кровообігу вище 20 мл/100 г за 1 хв) – «ішемічною напівтіню» або пенумброю [164].

Ішемічна напівтінь може або зазнати незворотних пошкоджень і залучитися до інфаркту, або відновити нормальну життєдіяльність. Спочатку “пенумбру” схематично зображували як ділянку навколо ішемічного ядра (зона мозку, де відбулися незворотні зміни) (Рис. 3.1), але дослідження з використанням позитронно-емісійної томографії свідчили, що насправді ця

зона є неоднорідною й ділянки «ішемічної напівтіні» розташовані навколо різних за розміром островців із низьким рівнем перфузії — ішемічних ядер [162].

В зоні «ішемічної напівтіні» в цілому зберігається енергетичний метаболізм і присутні лише функціональні, але не структурні зміни. Ця ділянка характеризується зниженою нейрональною функцією, але клітини залишаються життєздатними.



**Рис. 3.1. Схематичне зображення ішемічного ядра і “пенумбри” (А – традиційна схема, Б – сучасні уявлення, які свідчать про гетерогенність зони ішемії мозку).**

За рахунок зони “пенумбри” виникає поступове збільшення розмірів інфаркту.

Функціонування клітин саме цієї ділянки мозкової тканини, власне, й намагаються зберегти, щоб зменшити вираженість неврологічного дефіциту [165].

Виходячи з цього, очевидна особлива значимість проблеми ішемії головного мозку, яка виникає внаслідок зниження мозкового кровотоку та обмеження надходження в нервову тканину кисню та глюкози, і є найбільш розповсюдженою причиною порушення функцій мозку [166].

### 3.2. Макроскопічні зміни при ішемічному пошкодженні мозку

Оцінка ішемічного пошкодження проводилась через 6, 24 та 72 години після відновлення кровотоку.

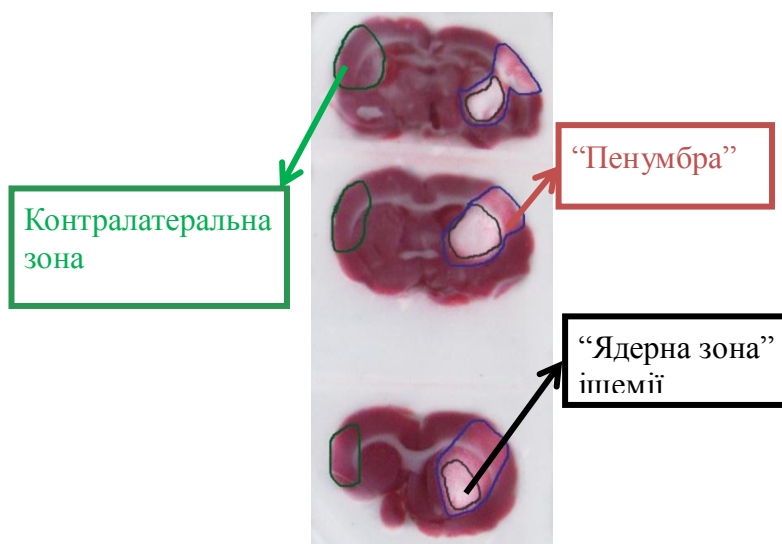
Для визначення розміру інфаркту головного мозку використовували загальноновживаний метод, що дозволяє на макроскопічному рівні відокремити пошкоджену (некротизовану) ділянку мозку від тканини мозку, яка зберегла життєздатність, та обґрунтований на фарбуванні зрізів мозку ТТХ (Рис. 3.2).

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.



**Рис. 3.2. Розподіл ішемічного пошкодження мозку (ділянки позначені чорним кольором) при моделюванні ОСМА.**

Це дає змогу легко відмежувати зону ішемії від інтактної мозкової речовини. В результаті моделювання ОСМА виникли значні зміни, які чітко можна спостерігати на рис.3.3, де чорною лінією обведена зона інфаркту, синьою – зона пенумбри та зеленою – контралатеральна ділянка мозку по відношенню до ішемізованої ділянки мозку.



**Рис. 3.3. Зрізи після фарбування ТТХ для для вивлення некротичних ділянок та зони пенумбри.**

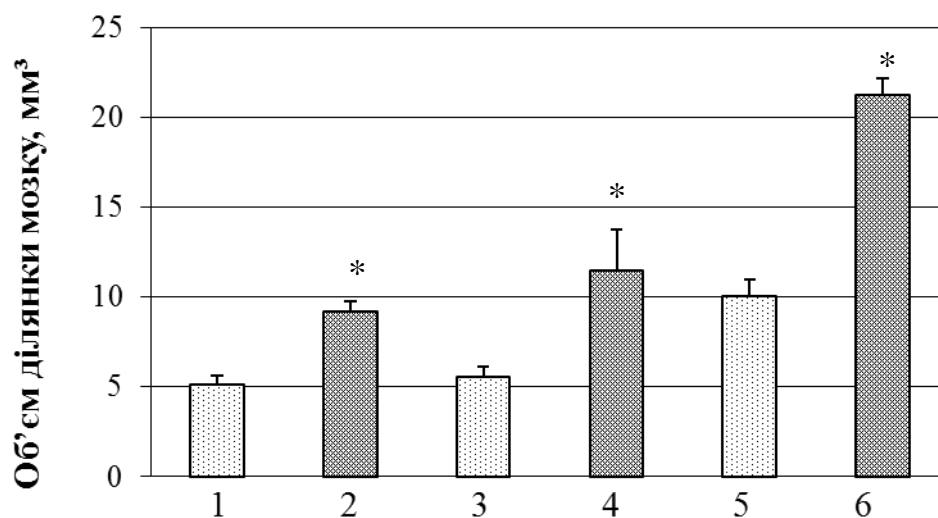
*Таблиця 3.1*

Об'єм ділянки (мм<sup>3</sup>) ішемічного ушкодження у тварин при різних періодах реперфузії після ОСМА (\* - P<0.05)

Об'єм ділянки ішемічного пошкодження мозку		Загальний об'єм мозку, мм <sup>3</sup>	Пенумбра, мм <sup>3</sup>	Зона інфаркту, мм <sup>3</sup>
<b>6 годин реперфузії</b>	Тривалість оклюзії (2 хв) (n=14)	5,11±1,25		
	Тривалість оклюзії (60 хв) (n=14)	9,18±1,43*	7,24±1,13	1,95±0.31
<b>24 години реперфузії</b>	Тривалість оклюзії (2 хв) (n=14)	5,52±1,47		
	Тривалість оклюзії (60 хв) (n=14)	11,47±5,41*	5,16±2,43	6,32±2,97
<b>72 години реперфузії</b>	Тривалість оклюзії (2 хв) (n=14)	10.01±2,34		
	Тривалість оклюзії (60 хв) (n=14)	21,27±2,07*	2,77±0.27	18,50±1,80



За даними літератури, на 3-тю добу після ОСМА спостерігається чітко окреслена зона ішемічного ушкодження, при цьому зона перифокального набряку менш виражена, ніж на 1-шу – 2-гу добу [167]. В даних дослідженнях ми проводили морфометричну оцінку розмірів зони ураження через 6 годин, 24 години та 72 години з моменту оклюзії. Для визначення ішемічного об'єму ми підраховували кориговану площу інфарктної ділянки та множили її на товщину зрізів (Рис. 3.4).



**Рис. 3.4. Об'єм ділянки (мм<sup>3</sup>) 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.**

У псевдооперованих тварин не спостерігалось гістологічного пошкодження головного мозку. Об'єм пошкодження становив  $5.11 \pm 1.25$  мм<sup>3</sup>,  $5.52 \pm 1.47$  мм<sup>3</sup>,  $10.01 \pm 2.34$  мм<sup>3</sup> у групі тварин короткотривалої оклюзії СМА після 6, 24, 72 годин відповідно та  $9.18 \pm 1.43$  мм<sup>3</sup>,  $11.47 \pm 5.41$  мм<sup>3</sup>,  $21.27 \pm 2.07$

мм<sup>3</sup> у тварин групи довготривалої оклюзії ОСМА після 6, 24, 72 годин відповідно ( $P < 0.05$ ).

Фарбування TTC виявило значне переважання об'єму ділянки інфаркту в групі довготривалої оклюзії СМА з часом реперфузії 72 години ( $21.27 \pm 2.07$  мм<sup>3</sup>) над відповідними величинами в інших групах тварин (короткотривала ішемія з часом реперфузії 72 години -  $10.01 \pm 2.34$  мм<sup>3</sup>,  $P < 0.05$ ).

Розміри зони ураження в групі короткотривалої ішемії з періодом реперфузії 24 години - ( $11.47 \pm 5.41$  мм<sup>3</sup>) і в групі короткотривалої ішемії з періодом реперфузії 24 години -  $5.52 \pm 1.47$  мм<sup>3</sup> виявилися статистично значущими ( $P < 0.05$ ).

Розміри зони ураження в групі короткотривалої та довготривалої ішемії через 6 годин реперфузії виявилися також статистично значущими ( $9.18 \pm 1.43$  мм<sup>3</sup> та  $5.11 \pm 1.25$  мм<sup>3</sup> відповідно,  $P < 0.05$ ).

Отже, результати наших експериментів показали, що 60-хвилинна оклюзія СМА є адекватною моделлю фокального ішемічного пошкодження головного мозку щурів. Виявлено, що в дослідній групі з періодом реперфузії 72 години спостерігається чітке збільшення об'єму ішемізованої ділянки мозку. Це свідчить про те, що процес пошкодження мозку є динамічним з поступовим збільшенням площі пошкодження зі збільшенням періоду реперфузії.

### **3.3. Оцінка стану нервових клітин після ішемічного ушкодження**

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 оклюзії СМА та постішемічного періоду у щурів.

При мікроскопічному дослідженні встановлено, що зона ішемічного ураження анатомічно охоплює ділянки соматосенсорної (тім'яна ділянка) і, частково, моторної кори (лобна і префронтальна ділянки), мозолистого тіла, латеральних і, частково, медіальних відділів смугастого тіла, поширюючись

на піриформну кору і гіпокамп, і досягає стінки правого бічного шлуночка, що відповідає басейну кровопостачання правої СМА.

У корі контрлатеральної півкулі (контроль) ми спостерігали нормальну структуру нейропіля, синапси мали чітко окреслені пресинаптичні везикули, синаптичну щілину та постсинаптичну щільність (Рис. 3.5, А).

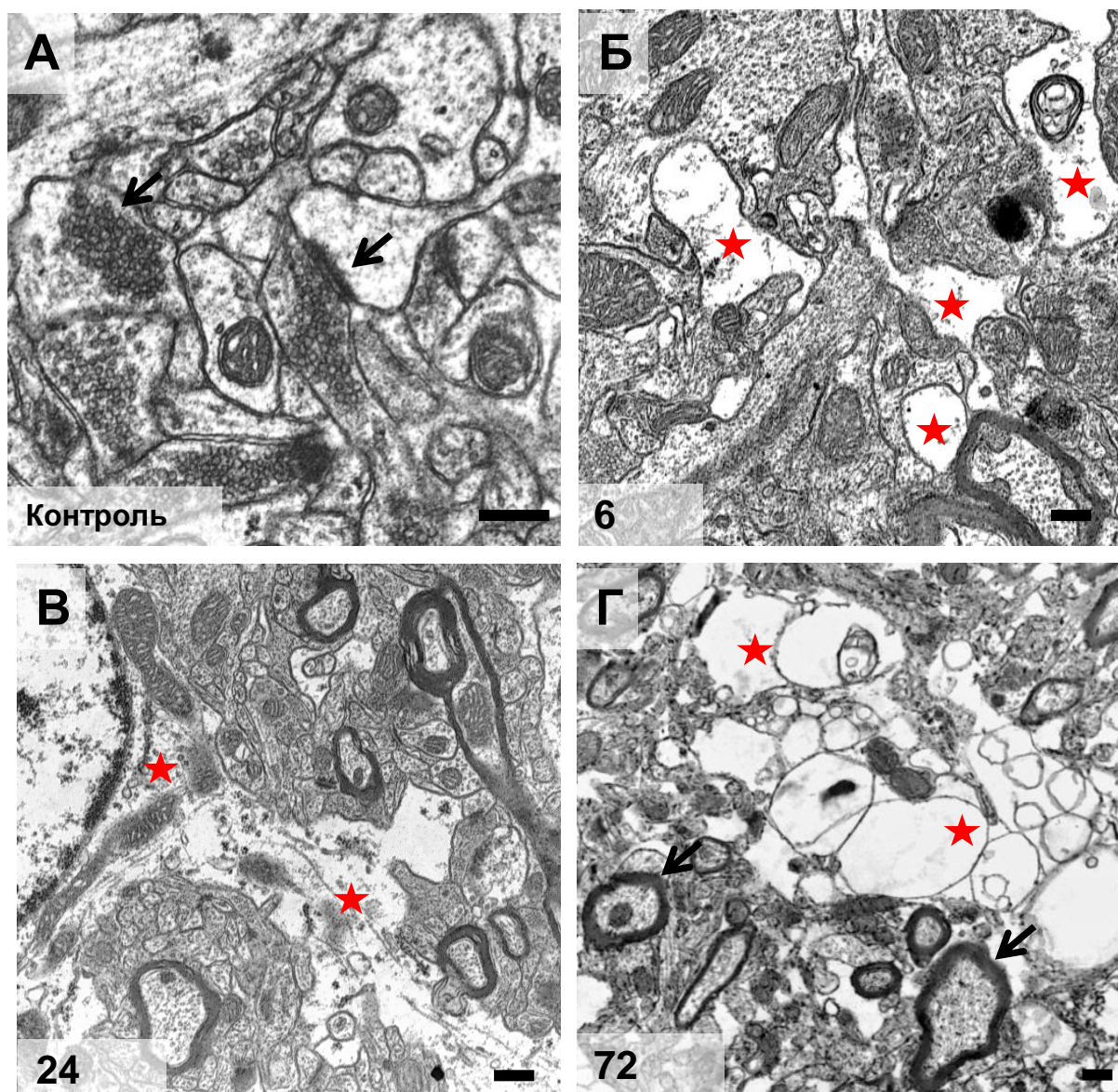
Найпершими на ішемічне ушкодження реагували мікрогліальні клітини – мікроглія та астроцити. Вже через 6 годин ми спостерігали набряк астроцитних відростків (Рис. 3.5, Б).

Зі збільшенням постоклюзійного періоду наростали деструктивні зміни в корі. Через 24 години ми спостерігали набряк не лише астроцитних відростків, а й соми астроцитів (вказано зірочкою, Рис. 3.5, В).

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. 3.5, Г).

У групі тварин з ішемією на 72 годину постоклюзійного періоду спостерігалися як некротично, так і апоптотично змінені нейрони. Гіперхромні зморщені тіла нейронів були оточені пустотами, нейропіль кори був сильно вакуолізований.

У мікросудинах спостерігався прогресуючий з часом периваскулярний набряк структур, з яких складається гематоенцефалічний бар'єр, головним чином, астроцитарних відростків.



**Рис. 3.5. Електронні мікрофотографії кори після ішемічного ушкодження у тварин при різних періодах реперфузії після ОСМА: А – контроль; Б – через 6 годин структурні зміни нейропіля 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 нейропіля, 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. 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 щілиною та постсинаптичною щільністю (Рис. 3.6, А).

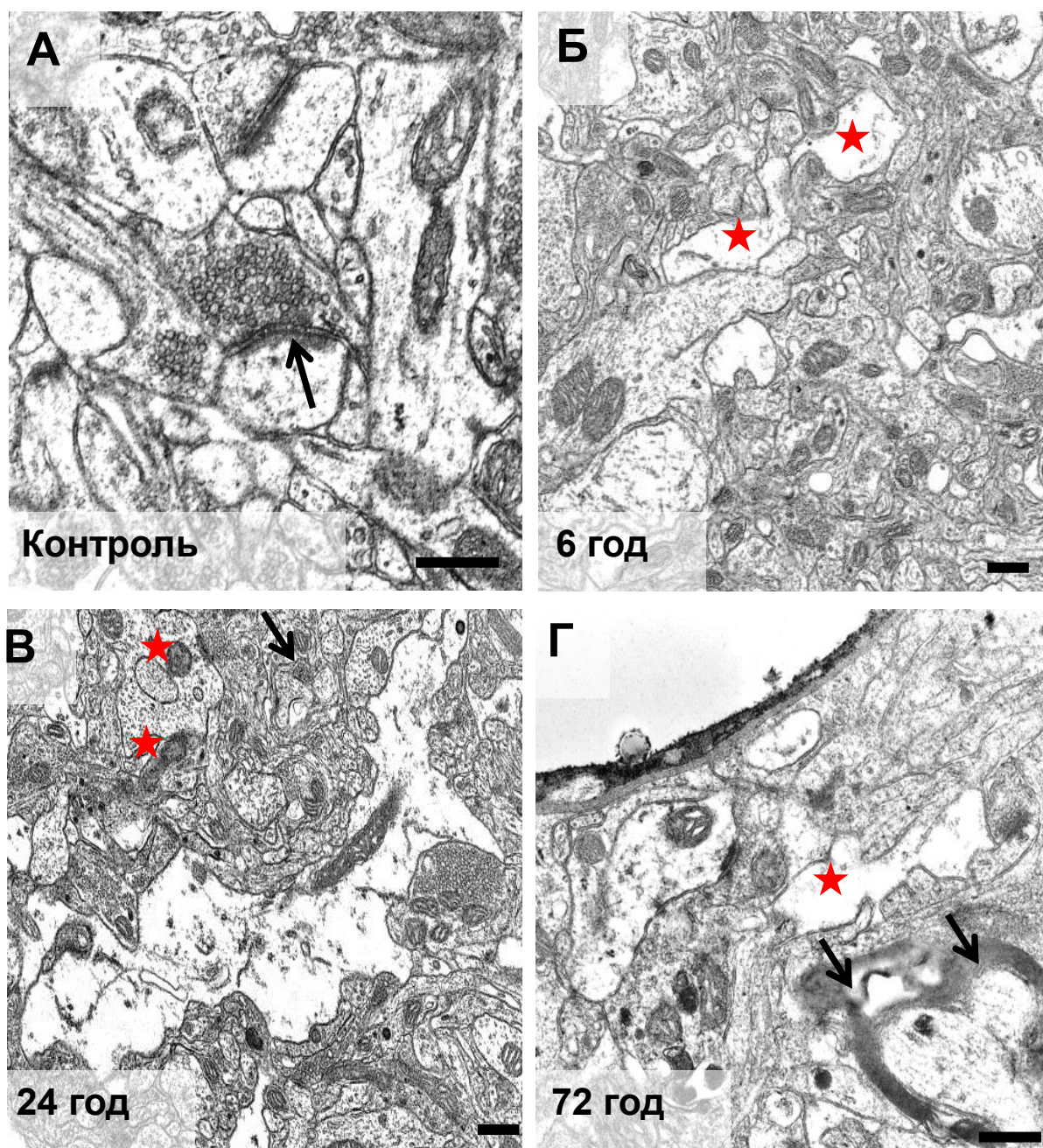
ОСМА через 6 годин реперфузії призводила до незначних структурних змін нейропіля, які проявлялися в просвітленні астроцитних відростків (Рис. 3.6, Б).

Через 24 години деструктивні зміни ставали більш вираженими, спостерігається деструкція мітохондрій (вказано зірочками), порушення структури синапсів (вказано стрілочкою, Рис. 3.6, В).

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. 3.6, Г).

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





**Рис. 3.6. Електронні мікрофотографії стріатума після ішемічного ушкодження у тварин при різних періодах реперфузії після 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.**

### **3.4. Зміни активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного пошкодження**

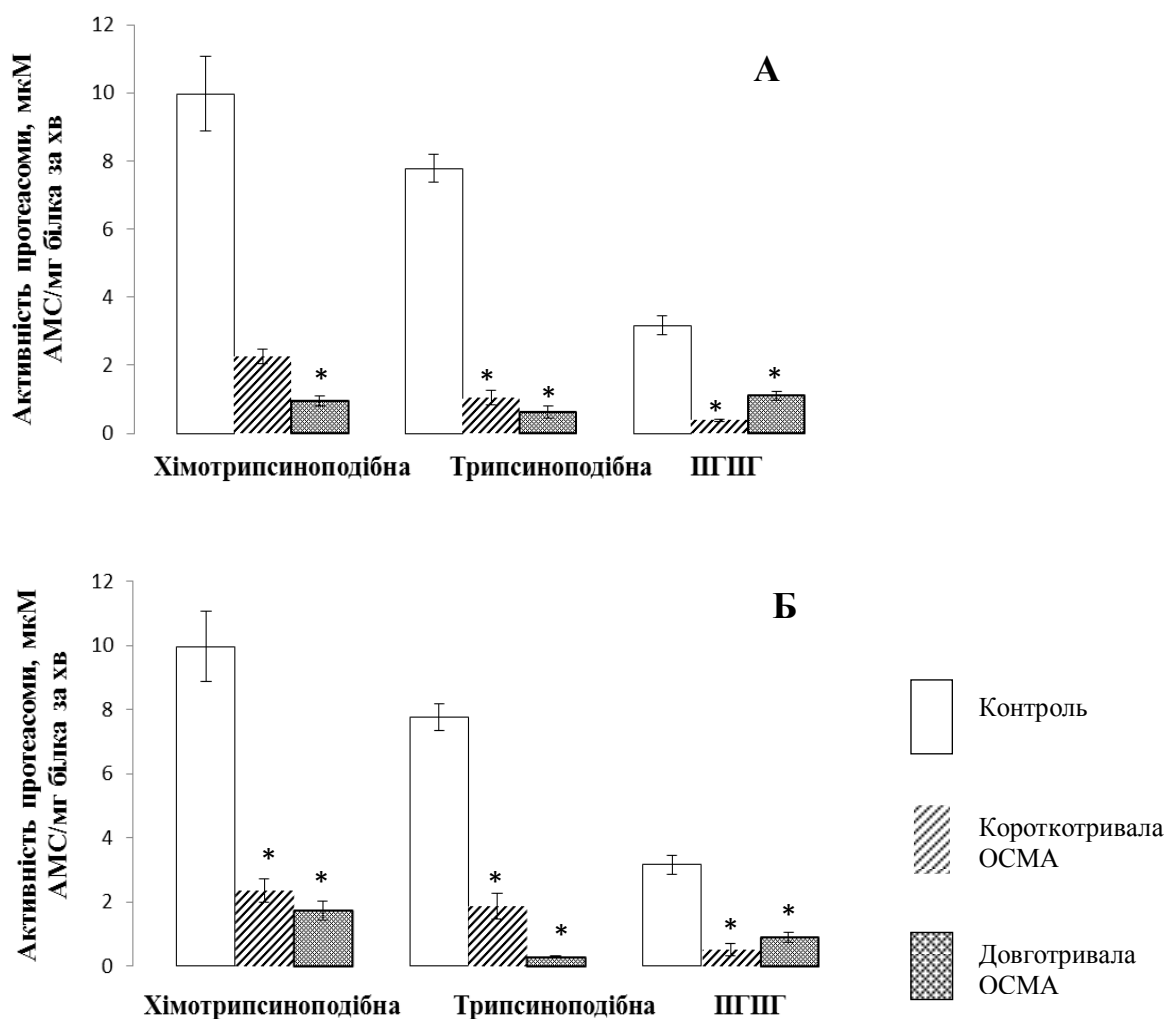
В результаті проведених досліджень були отримані дані стосовно змін протеасомного протеолізу при моделюванні ішемічного пошкодження мозку, зокрема вдалося встановити зміни всіх трьох протеолітичних активностей протеасоми (трипсиноподібної, хімотрипсиноподібної та пептидглютаміл пептидгідролазної) при відтворенні цього патологічного процесу.

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. 3.7, А).

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. 3.7, А). 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. 3.7, А).

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. 3.7, Б).



**Рис. 3.7.** Хімотрипсиноподібна, трипсиноподібна та пептидилглютамін пептидгідролазна активності протеасоми в “ядерній зоні” мозку (А) та зоні “пенумбри” (Б) після моделювання ОСМА з 6-годинним періодом реперфузії. N=7. \* –  $P<0.05$ .

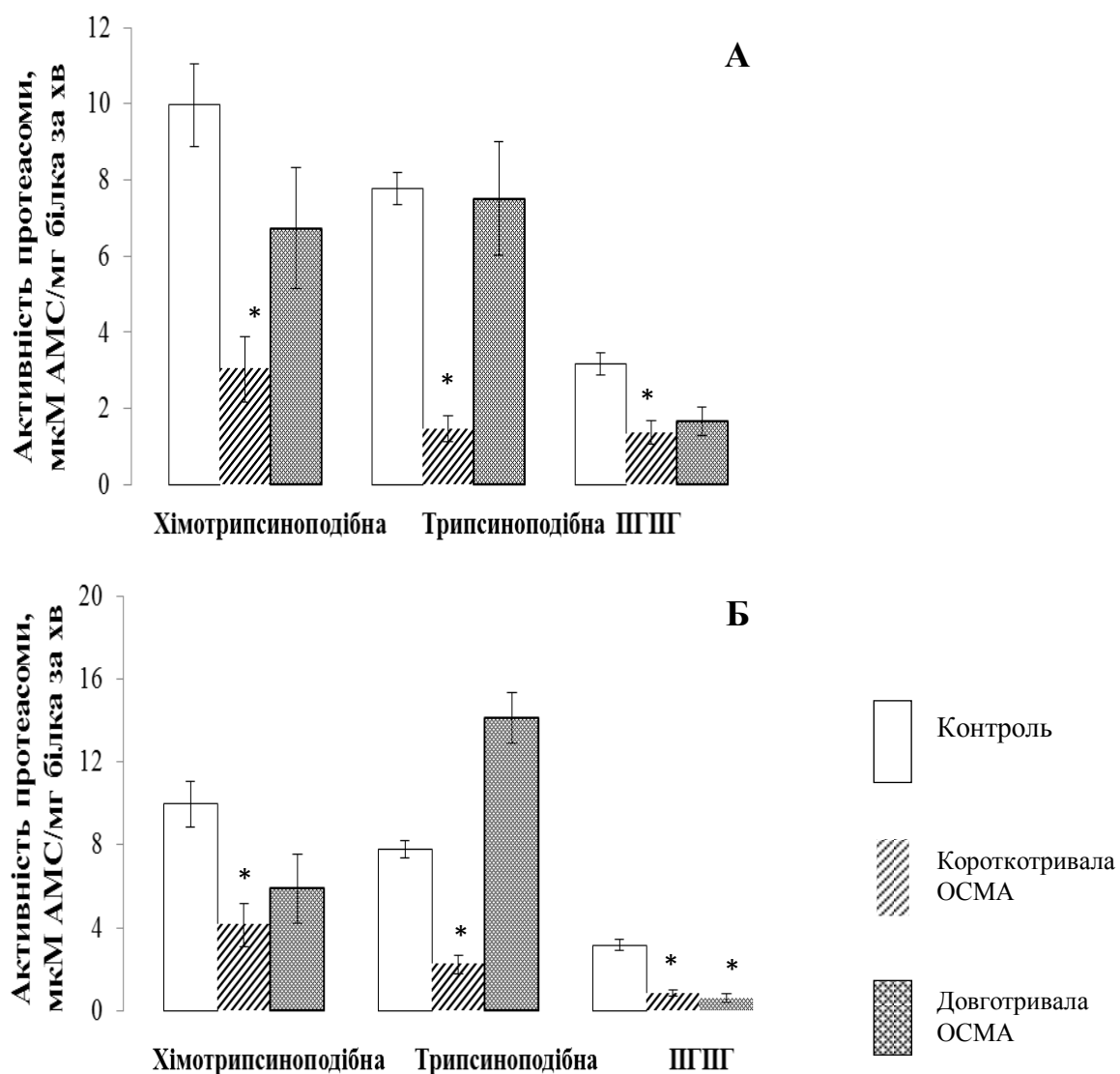
Хімотрипсиноподібна активність в зоні “пенумбри” для групи короткотривалої ішемії зменшилась в 4,3 рази порівняно з контролем ( $P<0.05$ ), для групи довготривалої ішемії зменшилась в 11 разів порівняно з контролем ( $P<0.05$ ) (Рис. 3.7, Б). ПГП активність в зоні “пенумбри” зменшилась в 6,3 рази порівняно 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. 3.7, Б).



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. 3.8, А). 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. 3.8, Б).

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. 3.8, А); в період 72-годинної реперфузії хімотрипсиноподібна активність збільшилась у 2,2 рази для “ядерної зони” порівняно з контролем ( $P>0.05$ ) (Рис. 3.9, А) і зменшилась в 1,5 рази для пенумбри порівняно з контролем ( $P<0.05$ ) (Рис. 3.9, Б).

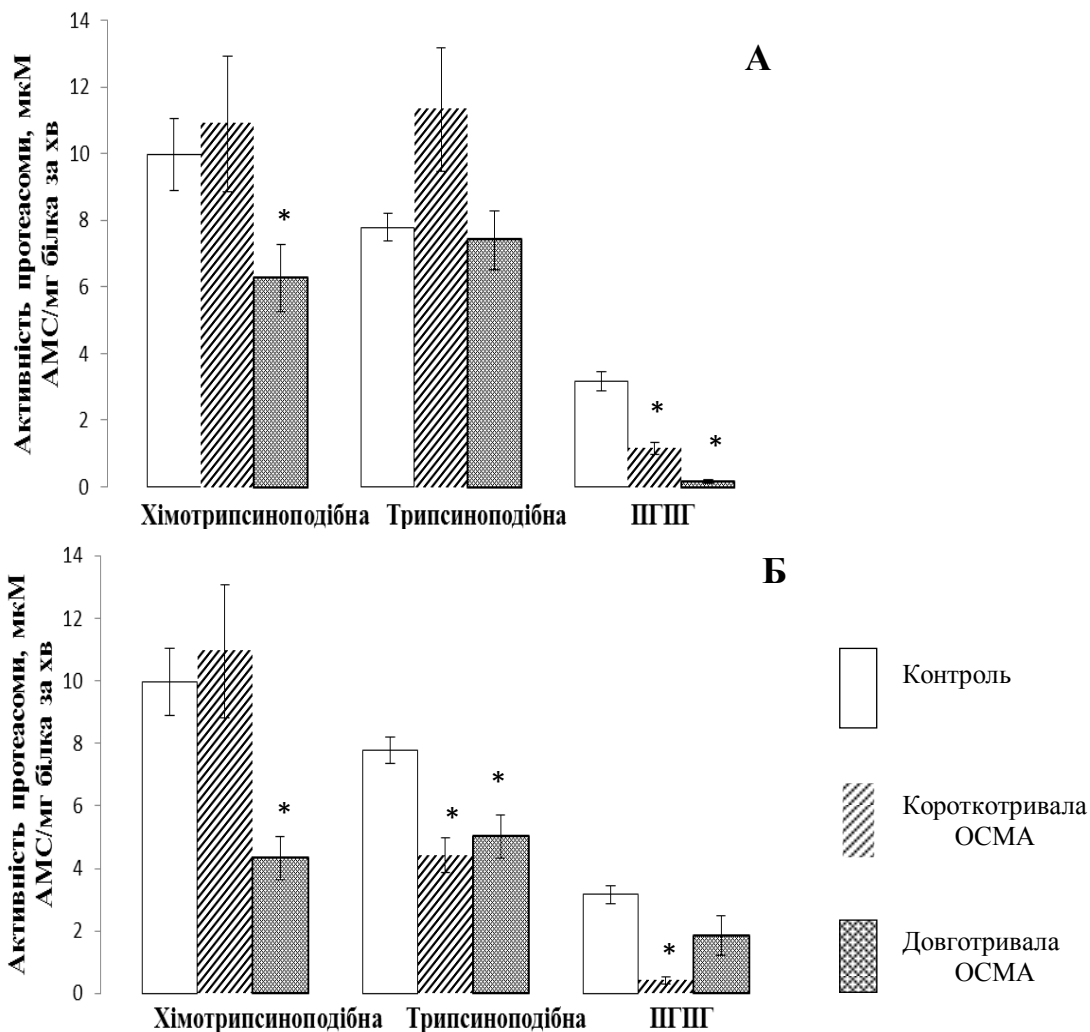
ПГПГ активність для “ядерної зони” групи короткотривалої ішемії в період 24-годинної реперфузії зменшилась в 2,3 рази порівняно з контролем ( $P<0.05$ ), для групи довготривалої ішемії – зменшилась в 1,9 разів порівняно з контролем ( $P>0.05$ ) (Рис. 3.8, А).



**Рис. 3.8.** 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. 3.9. А, 3.9.Б). Для групи довготривалої ішемії пік активації припадав на 24-годинний період реперфузії, а не на 72-годинний період. Активація виникала раніше для даної групи.

ППГ 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. 3.9, А).



**Рис. 3.9.** 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 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.

### **3.5. Оцінка поведінкових реакцій щурів**

Відомо, що після ішемічного ушкодження мозку спостерігається порушення неврологічних функцій у експериментальних тварин. Тому, крім дослідження морфологічних змін, що відбуваються у ішемізованому мозку, ми визначали локомоторну активність та проводили пробу на тактильну чутливість у щурів перед оклюзією та після реперфузії протягом постішемічного періоду різної тривалості.

Нами були проведені 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), та фризінгом (freezing, завмиранню).

Через 6 годин після ОСМА у щурів спостерігалася послаблена локомоторна активність, яка поступово збільшувалася з тривалістю постішемічного періоду; поодинокі спонтанні рухи мали обертальний характер (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Підрахунок кількості квадратів (**№**), 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. (\* -  $p<0,01$ ).

<b>Кількість квадратів</b>	<b>№</b>	<b>Псевдооперовані тварини</b>	<b>Короткотривала ОСМА</b>	<b>Довготривала ОСМА</b>
<b>6 годин</b>	7	41.2±6.94	22.6± 1.20*	16±1.73*
<b>24 години</b>	7	43.8±1.32	23.5±1.05*	19.8±2.85*
<b>72 години</b>	7	45.2±1.90	28.2±3.44*	24.4± 1.86*

Іншим показником, який аналізували протягом тесту «відкрите поле», було вимірювання кількості стійок (вертикальна рухова активність), що демонстрував дослідницьку активність. Група псевдооперованих тварин виявляла високий відсоток дослідницької активності, і в середньому він становив 86 % від загальної кількості стійок. У щурів, які мали ішемічне пошкодження мозку, в першу добу після оклюзії цей відсоток був значно менший (19 %), ніж у контрольних тварин і поступово зменшувався протягом постоклюзійного періоду (Табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Показник вертикальної рухової активності (кількість стійок) за тестом “відкритого поля”: в контрольній групі (Псевдооперовані тварини) та через 6, 24 та 72 години після ішемії (\* -  $p<0,01$ ).

<b>Кількість стійок</b>	<b>N</b>	<b>Псевдооперовані тварини</b>	<b>Короткотривала ОСМА</b>	<b>Довготривала ОСМА</b>
<b>6 годин</b>	7	12.2±7.16	1.6±0.51*	2.2±1.22*
<b>24 години</b>	7	11.2±4.87	2.2±0.79*	1.6±0.84*
<b>72 години</b>	7	10.2±4.47	1.4±0.51*	1.2±0.42*

Також у щурів з оклюзією СМА, починаючи з 6 годин після операції, спостерігалось наростання показників тривожності. Досліджуючи такий показник тесту «відкрите поле» як фризінг ми виявили, що тварини групи короткотривалої та довготривалої ішемії демонстрували високу тривожність, яка збільшувалася протягом постоклюзійного періоду (Табл. 3.4).

*Таблиця 3.4*

Показник підвищеного рівня стресу й тривожності за тестом “відкритого поля”: в контрольній групі (Псевдооперовані тварини) та через 6, 24 та 72 години після ішемії з тривалістю оклюзії 2хв (Короткотривала ОСМА) та 60 хв (Довготривала ОСМА) виражений в секундах (\* -  $p<0,01$ ).

<b>Час завмирання, с</b>	<b><i>N</i></b>	<b>Псевдооперовані тварини</b>	<b>Короткотривала ОСМА</b>	<b>Довготривала ОСМА</b>
<b>6 hours</b>	<b>7</b>	5±2.11	9±1.49*	18.8±4.49*
<b>24 hours</b>	<b>7</b>	6±2,49	18±4,8*	28.6±5,79*
<b>72 hours</b>	<b>7</b>	7,8±2,04	19.8±3.49*	31.20±5.30*

Інший показник тривожності тесту “відкритого поля” грумінг не виявився статистично значимим для тварин з жодної експериментальної групи (Табл. 3.5).

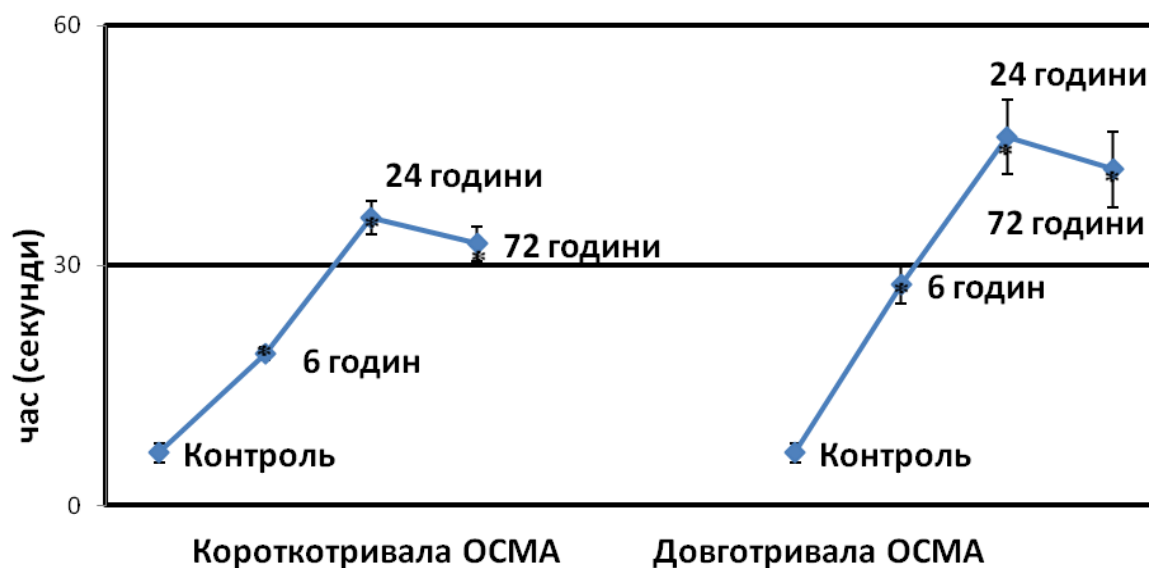
Таким чином, після проведення операції у всіх тварин виникало зниження дослідницької активності, що проявлялось в зменшенні кількості квадратів, які вони пересікали, кількості стійок, збільшенні актів грумінгу та тривалості актів фризінгу.

Таблиця 3.5

Кількість актів грумінгу (**N**): в контрольній групі (Псевдооперовані тварини) та через 6, 24 та 72 години після ішемії з тривалістю оклюзії 2хв (Короткотривала ОСМА) та 60 хв (Довготривала ОСМА)(\* -  $p<0,01$ ).

Кількість актів грумінгу	<b>N</b>	Псевдооперовані тварини	Короткотривала ОСМА	Довготривала ОСМА
6 hours	7	5 $\pm$ 1.49	5.6 $\pm$ 1.07	5.2 $\pm$ 2.34
24 hours	7	5.4 $\pm$ 1.42	5.6 $\pm$ 2.17	6.4 $\pm$ 2.45
72 hours	7	6 $\pm$ 1.33	6.6 $\pm$ 2.71	7.2 $\pm$ 2.04

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 (Рис. 3.10).



**Рис. 3.10.** Тривалість зняття щурами тестового подразника при тестуванні на тактильну чутливість до ішемії (Контроль) та через 6, 24 та 72 години після ішемії. (\* -  $p<0,01$ ).

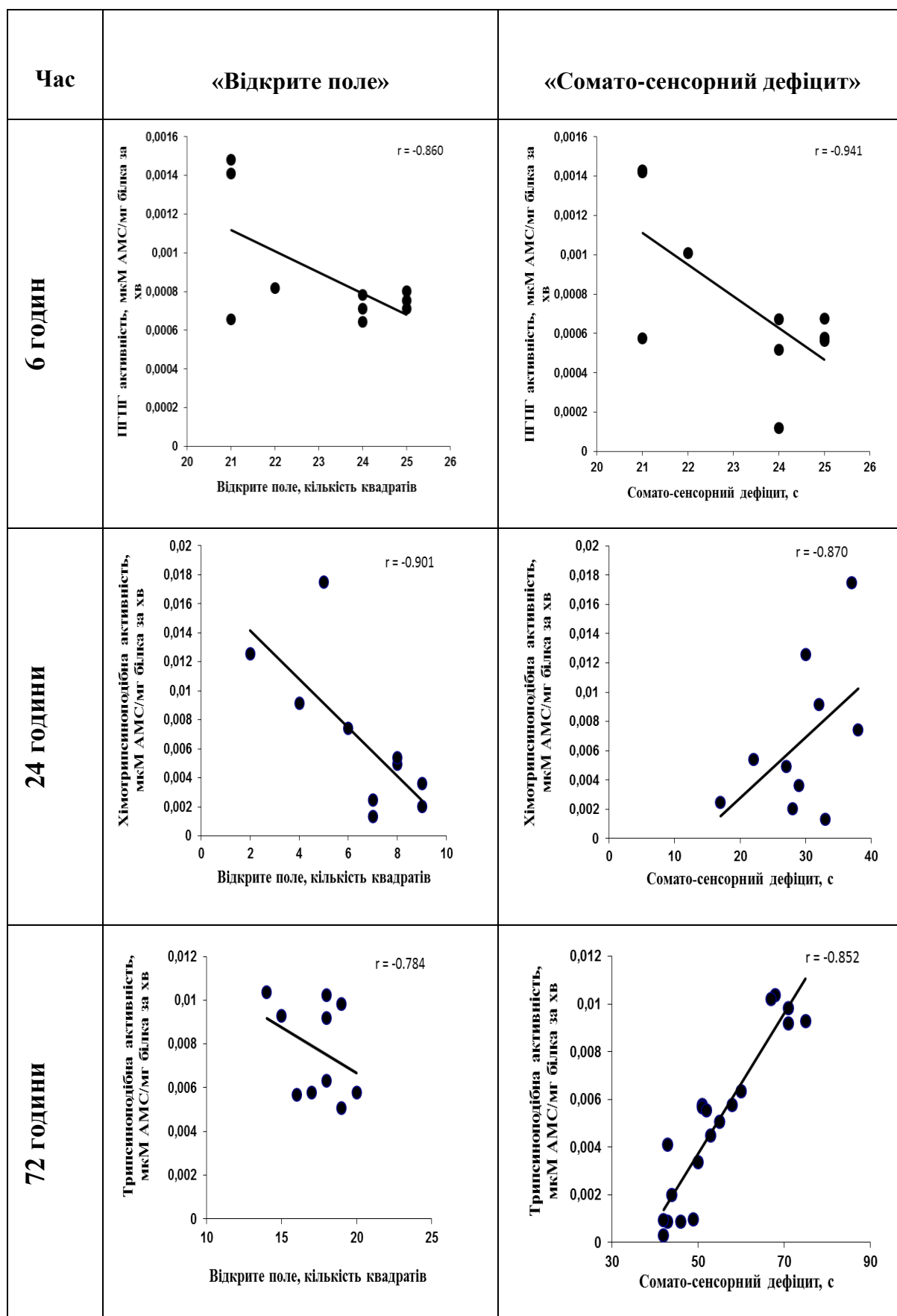
У ролі білатерального тактильного стимулу використовували адгезивні (липкі зі зворотньої сторони) паперові клаптики однакового розміру (діаметром 6 мм), які прикріплювали до обох передніх лап в дистально-радіальній ділянці зап'ясть. Реєстрували час до усунення (зняття) кожного подразника з передніх лап.

Тварин, у яких не виявилась жодна з поведінкових реакцій на ішемічну дію, не брали для подальшого дослідження.

Кореляційний аналіз підтвердив наявність сильних та середньої сили різноспрямованих зв'язків між поведінковими реакціями щурів після моделювання ОСМА та активностями протеасоми (Рис. 3. 11). 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 ( $r = +0,852$ ).

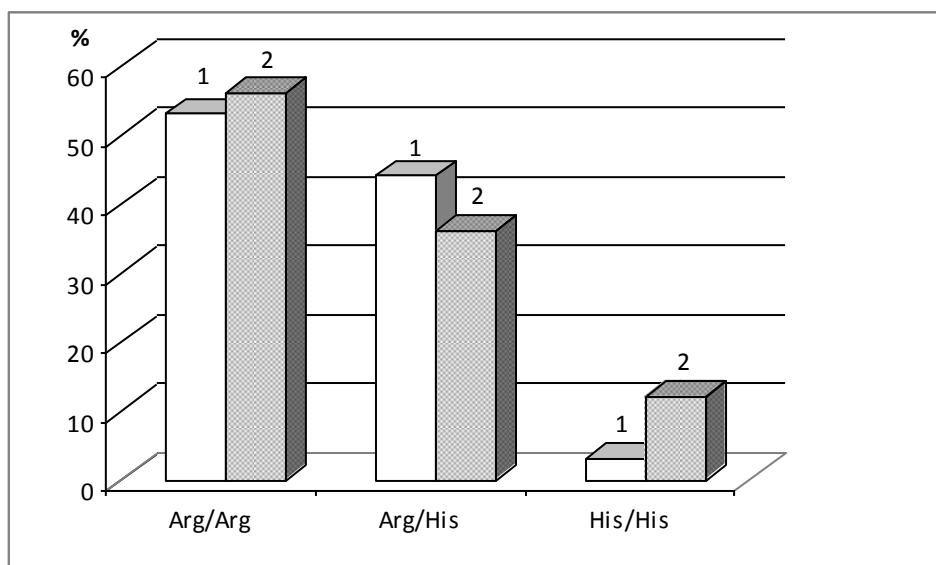




**Рис. 3.11. Кореляційний аналіз між поведінковими реакціями щурів після моделювання ОСМА та активностями протеасоми.**

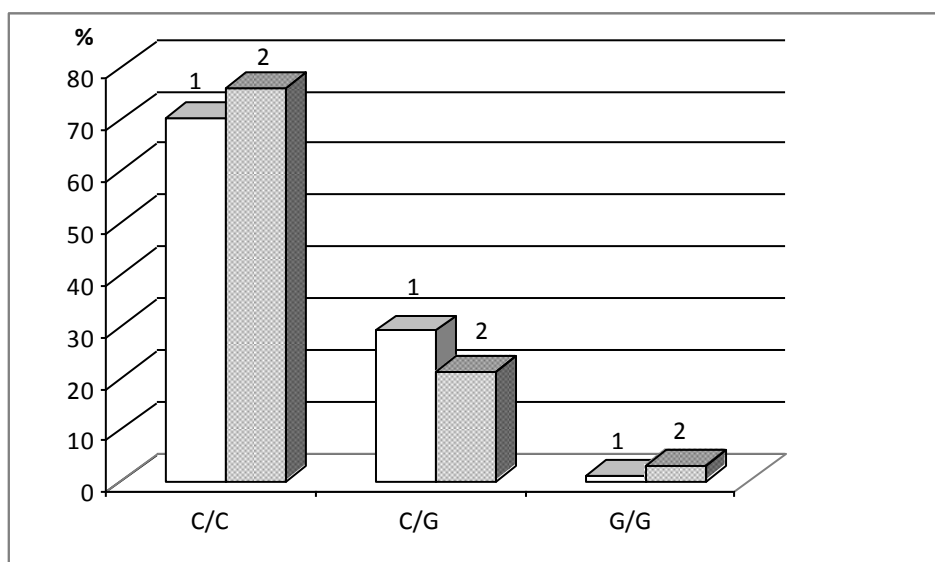
### 3.6. Визначення алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці протеасоми

При генотипуванні було встановлено, що частота різних алельних варіантів субодиниці 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. 3.12).



**Рис. 3.12. Частота алельних варіантів субодиниці імунопротеасоми LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His) серед осіб контрольної (1) та хворих основної груп (2) (%).**

В результаті генотипування було встановлено, що частота різних алельних варіантів гена протеасоми PSMA6 (C<sup>-8</sup>→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 – не зареєстровано ( $P=0,22$  за критерієм  $\chi^2$ ); (Рис. 3.13). 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.



**Рис. 3.13.** Частота алельних варіантів субодиниці гена протеасоми PSMA6 ( $C^8 \rightarrow G$ ) серед осіб контрольної (1) та хворих основної груп (2) (%).

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, а 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<sub>60</sub>→His) та гену PSMA6 (C<sup>-8</sup>→G) (Табл. 3.6).

При порівнянні частоти вищезгаданих факторів ризику у хворих з різними поліморфними варіантами гена PSMA6 (C<sup>-8</sup>→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 ( $P=0,056$ ). Поширеність цукрового діабету та миготливої аритмії достовірно не відрізнялися (Табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Поширеність цукрового діабету, фібриляції передсердь, перенесеного в минулому інфаркту міокарда та ішемічного інсульту серед пацієнтів з різними алельними варіантами субодиниць гену PSMA6 (C<sup>-8</sup>→G та LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His) (\* - p<0,05)

Генотипи	Цукровий діабет	Без цукрового діабету	Фібриляція передсердь	Без фібриляції передсердь	Інфаркт міокарда в анамнезі	Без інфаркту міокарда в анамнезі	Ішемічний інсульт в анамнезі	Без ішемічного інсульту в анамнезі
<b>Arg/Arg</b>	8 (14,0%)*	49 (86%)	11 (19,3%)	46 (80,7%)	4 (7%)	53 (93%)	12 (21,1%)	45 (78,9%)
<b>Arg/His</b>	11 (31,4%)*	24 (68,6%)	11 (31,4%)	24 (68,6%)	7 (20%)	28 (80%)	8 (22,9%)	27 (77,1%)
<b>His/His</b>	-	10 (100%)	3 (30%)	7 (70%)	1 (10%)	9 (90%)	-	10 (100%)
<b>C/C</b>	14 (18,9%)	60 (81,1%)	19 (25,7%)	55 (74,3%)	11 (14,9%)	63 (85,1%)	16 (21,6%)*	58 (78,4%)
<b>C/G</b>	4 (19%)	17 (81%)	6 (28,6%)	15 (71,4%)	-	21 (100%)	2 (9,5%)*	19 (90,5%)
<b>G/G</b>	-	3 (100%)	-	3 (100%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	2(66,7%)	1 (33,3%)

В результаті проведеного порівняння нами встановлено, що поширеність цукрового діабету серед хворих на гострий ішемічний інсульт з різними алельними варіантами гена LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His) достовірно відрізнялась ( $P=0,032$ ): найбільше поширеним цукровий діабет був серед пацієнтів з гетерозиготним варіантом (Arg/His) – зареєстрований у 11 (31,4%) з 36 хворих. Поширеність миготливої аритмії, перенесених в анамнезі інфаркту міокарда та ішемічного інсульту достовірно не відрізнялась у пацієнтів з різними варіантами субодиноць гена LMP2 ( див. таблицю 3.6).

Встановлено, що частота різних алельних варіантів гену субодиноці 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 субодиноці імунопротеасоми LMP2 та у осіб з мінорним гомозиготним алельним варіантом субодиноці 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).

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роль протеасомного протеолізу в патогенезі серцево-судинних захворювань та ішемічного інсульту активно вивчається останніми роками [168]. Доведено, що протеасомне розщеплення внутрішньоклітинних білків грає важливу роль в регуляції обміну ліпопротеїдів, експресії молекул клітинної адгезії, апоптозі гладеньком'язових та ендотеліальних клітин, іншими словами у процесах, що мають принципове значення в атерогенезі, як в патології, що може виступати однією з передумов розвитку ішемічного інсульту [73, 169]. Отримані дані про можливість застосування інгібіторів протеасоми для попередження формування неоінтимі після денудації артерій, ішемічно-реперфузійних ушкоджень та інсультів [20, 89].

Серед багатьох теорій виникнення атеросклерозу одними з найбільш актуальних вважаються автоімунна та інфекційна концепції патогенезу цього патологічного процесу [134]. Імунна відповідь як на власні антигени, так і на чужорідні передбачає презентацію антигенів в складі білків головного комплексу гістосумісності (МНС). Останній процес практично неможливий без участі імунопротеасоми, яка утворюється в результаті заміни трьох конституційних каталітичних субодиниць в кóровій частині протеасоми на три індукцйбельні субодиниці - великі мультифункціональні протеази (LMP2, LMP7 і LMP10) [172]. В результаті цієї субституції змінюється гідролітична активність протеасоми: зростає трипсиноподібна (забезпечується  $\beta 2$  або LMP10) і хімотрипсиноподібна (забезпечується  $\beta 5$  або LMP7) та зменшується пептидилглютаміл пептидгідролазна (забезпечується  $\beta 1$  або LMP2) [84]. За рахунок цього зростає ефективність продукції імуногенних пептидів. В генах, що кодують LMP2 і PSMA6, описано поліморфізм поодиноких нуклеотидів (SNP) - Arg<sub>60</sub>→His та (C<sup>-8</sup>→G) відповідно [82]. Даних про роль алельного

поліморфізма генів LMP2 та PSMA6 в патогенезі серцево-судинних захворювань нам знайти не вдалося, що визначило мету нашої роботи.

Отримані нами дані свідчать про те, що розподіл частот алельних варіантів генів LMP2 і LMP7 не відрізняється в контрольній групі та в групі хворих із II. Перед усім результати дослідження дозволяють зробити висновок про еволюційну консервативність генів, що кодують субодиниці імунопротеасоми. Попри те, що ген LMP2 розташований в надзвичайно варіабельній ділянці 6-ої хромосоми в комплексі з генами, які кодують білки MHC, описано тільки один SNP. Вони зустрічаються дуже рідко як в українській, так і в інших популяціях [15].

Не виключено також, що досліджені алельні варіанти генів імунопротеасоми взагалі не впливають на активність протеасоми, бо питання про функціональне значення поліморфізму генів LMP2 (Arg<sub>60</sub>→His поліморфізм) залишається відкритим.

Літературних відомостей про вивчення функціонального значення алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці імунопротеасоми надзвичайно мало. У роботі Mishto M. et al. було показано зв'язок між Arg<sub>60</sub>→His поліморфізмом LMP2 та чутливістю моноцитів до TNFα-індукованого апоптозу [17]. В наступній роботі ці автори встановили факт експресії субодиниць імунопротеасоми в клітинах мозку та показали, що активність протеасоми в тканинах мозку вища при генотипі Arg/Arg порівняно з Arg/His [18]. Визначити активність протеасоми у осіб з генотипом His/His дослідникам не вдалося внаслідок низької частоти алелю His в італійській популяції. Крім того, слід зауважити, що вимірювати активність імунопротеасоми в тканинах, в яких основний внесок в протеасомну активність робить конституційна форма цього протеїназного комплексу не досить коректно. Є клітини (моноцити, лімфоцити, спленоцити та ін.), які за нормальних умов експресують переважно імунопротеасому [172]. Тому адекватні дані про вплив поліморфізму субодиниць



імунопротеасоми на її активність можна отримати, визначаючи пептидазну активність цього макромолекулярного комплексу саме в таких клітинах. Виходячи з наведених даних, ми провели дослідження із визначення активності протеасоми в тканинах мозку щурів при моделюванні фокальної ішемії.

З іншого боку, протеасома бере участь в «дозвіванні» пептидів, що вбудовуються в головний комплекс гістосумісності I класу, а зниження її активності може спричинювати порушення експресії МНС I на поверхні клітин з розвитком клітинного імунодефіциту (протівірусного, протипухлинного і т.д.). Про це свідчать численні клінічні дані, отримані геронтологами [177]. При цьому слід зазначити, що саме імунопротеасома, яка містить індукцибельну субодиницю LMP2, становить переважну частину хімотрипсиноподібної активності протеасоми в моноцитах, бо саме ця активність значно зростає при заміні конститутивних субодиниць протеасоми на індукцибельні. Отже, можна вважати, що вік-залежне пригнічення активності протеасоми в моноцитах є саме наслідком зменшення активності імунопротеасоми. Необхідно зазначити, що гліальні клітини мають спільне походження із моноцитами. Тому можна очікувати в них ті ж зміни, що і в моноцитах. Відомо, що при пріонних захворюваннях накопичення патологічної ізоформи пріонного білка PrP<sup>Sc</sup> відбувається спочатку в клітинах глії з подальшим розповсюдженням на нейрони. Аналогічні дані отримані щодо накопичення попередника амілоїдного протеїну APP при старінні [178]. Можна передбачати, що при старінні це зумовлено саме зниженням активності протеасоми в гліальних клітках і нездатністю розщеплювати білки, що за нормальних умов зазнають протеасомної деградації. Надзвичайно важливими були б дослідження з визначення ролі алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці імунопротеасоми, в процесі зниження активності протеасоми в лейкоцитах крові при старінні та нейродегенеративних захворюваннях.

Пошук в геномі людини нових варіантів поліморфізму поодиноких нуклеотидів (SNP) та з'ясування їх клінічного значення складає важливу задачу сучасної медичної генетики. На разі описано більше 5 мільйонів SNP і на думку багатьох дослідників саме SNP визначає генетичну гетерогенність популяції та індивідуальні риси кожної людини [179]. Яскравим прикладом того, як алельний поліморфізм дозволяє популяції пристосовуватися до нових умов існування є наявність величезного різноманіття у генах, що кодують білки головного комплексу гістосумісності [169]. Чітко показано, що ефективність презентації антигенів різниться в залежності від генетичного варіанту білка головного комплексу гістосумісності і саме цим пояснюється різна чутливість до виникнення, а, скоріше, різна ймовірність хронізації певних інфекційних захворювань у різних осіб. Не важко передбачити, які наслідки могла потягнути за собою наявність тільки одного варіанту гена головного комплексу гістосумісності того чи іншого класу. За невдалого збігу обставин усі представники даного виду будуть позбавлені можливості презентувати антигени нового збудника, імунна відповідь виявиться неповноцінною, а інфекційне захворювання летальним для усіх представників цього виду. Одночасно, генетична гетерогенність молекул головного комплексу гістосумісності лежить в основі формування спадкової схильності до автоімунних захворювань (ревматоїдного артрити, системного червоного вовчаку, системної склеродермії, цукрового діабету I типу та багатьох інших) [180]. Отже, алельний поліморфізм забезпечує краще пристосування популяції до можливих змін оточуючого середовища, збільшуючи ймовірність розвитку важких захворювань у певних представників популяції за існуючих умов перебування.

Крім того, наявність великої кількості варіантів одного і того ж гена може свідчити про незавершеність пошуку оптимального для існуючих умов існування виду варіанту білка, що з'явився в процесі еволюції порівняно недавно [174]. Природа таким чином перевіряє новий алельний варіант на придатність. У генах, що з'явилися в процесі популяції дуже давно, і

відрізняються високою консервативністю, поліморфізм поодиноких нуклеотидів та інші варіанти алельного поліморфізму майже не зустрічаються. Це свідчить про завершення еволюційного пошуку та винайдення оптимальної для виконання свої функцій конформації білкової структури, і закріплення в геномі саме такої послідовності нуклеотидів. В чому ж полягає проблема алельного поліморфізму генів на сучасному етапі розвитку медичної генетики? На нашу думку, передусім, у з'ясуванні функціонального значення того чи іншого алельного поліморфізму. Найглобальніші популяційні дослідження не дають можливості з'ясувати значення поліморфізму, бо завжди знайдеться популяція, в якій цей поліморфізм зустрічається з іншою частотою, яка не відрізняється від частоти алелю в контрольній групі. З'ясувавши механізми впливу алельного варіанту на збільшення ймовірності захворювання, тобто роль поліморфного білку у формуванні того чи іншого метаболічного дефекту, ми можемо отримати інформацію, яка надасть можливість відпрацювати схему терапії чи профілактики захворювання для осіб із певним генотипом незалежно від того, до якої популяції він належить. Добір оптимальних індивідуалізованих фармакогенетичних схем лікування також є однією з найбільш важких і одночасно перспективних задач медичної генетики. Можна навести декілька прикладів, коли одночасно дослідникам вдалося вирішити вказані проблеми.

Генетична варіабельність генів LMP2 та PSMA6 при ішемічному інсульті вивчена надзвичайно мало. В результаті проведених досліджень нам не вдалося встановити різницю у розподілі різних алельних варіантів генів, що кодують каталітичні субодиниці протеасоми, у хворих на гострий ішемічний інсульт. Проте, нам вдалося встановити, 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 ( $C^{-8} \rightarrow G$ ): 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) ( $P > 0,05$ ).

Клітинні механізми розвитку ішемічного інсульту також активно вивчаються. Зокрема, велика увага приділяється дослідженню протеасомного протеолізу, що забезпечує як широке коло регуляторних внутрішньоклітинних процесів, так і контроль за якістю та утилізацію ушкоджених, різним чином модифікованих протеїнів [21]. При цьому незаперечними на сучасному етапі є факти того, що порушення в убіквітин-залежному протеасомному протеолізі є важливою патогенетичною ланкою розвитку найбільш поширених нейродегенеративних захворювань [20]. Проте, їх значення при ураженні ЦНС під час розвитку ішемічного інсульту не досить вивчені. Не вирішеним залишається і питання про вимірювання активностей протеасоми в нервових клітинах. В роботі Mishto M. et al. доведено експресію мРНК та білку однієї з субодиниць імунопротеасоми (LMP2) в мозку людини, проте в тканині гіпокампу експресія вказаної субодиниці спостерігається лише в осіб похилого віку, а у молодих людей визначити рівень мРНК LMP2 не вдається [17]. Автори роблять висновок, що збільшення експресії LMP2 та однієї з субодиниць конститутивної протеасоми (PSMB1) є характерною ознакою дегенерації мозку, в першу чергу гіпокампу, в процесі старіння. З іншого боку, накопичуються дані про спільні риси нейродегенерації при старінні, ішемічному інсульті та цукровому діабеті [31]. Зокрема, вони виявляються у вигляді апоптотичної загибелі нейронів, астрогліозу, змін архітекτονіки різних зон головного мозку [181]. Стосовно апоптотичної загибелі як добре відрегульованої машинерії самознищення клітини, особливий інтерес знов таки складають

процеси убівітин-залежного протеасомного протеолізу, що й забезпечують вибірккову деградацію як апоптотичних, так і протиапоптотичних білків [182].

Стійке підвищення вмісту мРНК PSMB9 може свідчити про те, що наприкінці першого тижня розвитку цукрового діабету продовжується пошкоджуючий вплив на нейрони гіпокампа, збільшення рівня білків із зміненою третинною структурою та зберігається необхідність в протеасомній деградації білкових молекул [93]. Проте, не виключено, що імунопротеасома в мозку має зовсім інші функції, ніж в інших органах. Можна припустити, що вона приймає безпосередню участь в процесах довготривалої потенціації та запам'ятовування. Підставою для такого сміливого припущення є робота James A.B. et al., яка наводить дані про роль транскрипційного фактору Zif268 (Egr1/Krox24/NGF-IA) в понижуючій регуляції експресії субодиниць протеасоми. Вказаний транскрипційний фактор має ключове значення в процесах запам'ятовування та навчання, бо його нокаут спричинює порушення цих процесів у експериментальних тварин [183]. Отже, супресія генів імунопротеасоми під впливом Zif268 є необхідним компонентом для формування довготривалої потенціації та запам'ятовування.

Значне підвищення експресії субодиниці імунопротеасоми співпадає із активацією апоптотичної та некротичної загибелі нейронів гіпокампа на ранніх стадіях цукрового діабету. Згідно з літературними даними, потужним стимулюючим впливом на експресію компонентів протеасоми володіють глюкокортикоїди [184]. В роботах Mitchell доведено, що процес кахектичного зменшення маси м'язів обумовлено збільшенням експресії субодиниць протеасоми під впливом глюкокортикоїдів, що підтверджувалося застосуванням антагоністів глюкокортикоїдних рецепторів, використання яких запобігло вказаному ефекту. Описано навіть специфічну протеасом-регулюючу сироваткову кіназу, що регулюється глюкокортикоїдами (proteasome-regulatory kinase serum/glucocorticoid-regulated kinase), яка опосередковує вплив глюкокортикоїдів на експресію генів протеасоми [185]. В роботах Лебедь Ю. показано, що моделювання пролонгованого

імобілізаційного стресу спричинювало збільшення активності протеасоми в тканинах гіпокампу, а найбільшою мірою, в синаптосомах нейронів цієї частини мозку, а також доведено, що введення блокатора синтезу глюкокортикоїдних гормонів метирапона призводило до зменшення загибелі нейронів гіпокампу в ранній період розвитку цукрового діабету [186]. Таким чином, є усі підстави вважати, що при цукровому діабеті збільшується рівень глюкокортикоїдів, що стимулюють експресію генів субодиниць протеасоми, зокрема в клітинах гіпокампу. До того ж показано, що експресія PSMB5 збільшується одночасно в нейронах та в астроцитах, що розташовані навколо них. Вважають, що нейрони збільшують продукцію PSMB5 та PSMB9 у відповідь на дію прозапальних цитокінів, зокрема  $\gamma$ -інтерферону, які продукуються клітинами активованої астроглії [21]. Припускається, що надмірна активація астроцитів та їхня проліферація в процесі нейродегенерації може негативно впливати на життєдіяльність нейронів, зокрема за рахунок синтезу протеогліканів, що обмежують надходження факторів росту, до нервових клітин. Нестача трофічних цитокінів є фактором запуску апоптотичної загибелі [15]. Також можливим механізмом запуску апоптозу в нейронах гіпокампу, що експресують надмірну кількість імунопротеасоми, є імунна відповідь локальних імуніцитів мозку на клітини, що презентують надлишок пептидів в комплексі з білками головного комплексу гістосумісності першого типу [53]. Відомо, що субодиниці імунопротеасом протеасом, які індукуються інтерфероном, приймають участь у процесингу білків та їх презентації молекулами ГКГС-I [113]. Збільшення створення пептидів для презентації ГКГС-I може впливати на нейрональну пластичність та електричні властивості нейронів, але питання щодо функціонального значення цього процесу залишаються не до кінця визначеними [15].

Дещо складніше пояснити розвиток некрозу нейронів кори та стріатума при моделюванні ішемічного пошкодження мозку. Лавиноподібний, нерегульований, незворотній характер розвитку некрозу нібито не надає

можливості протеасомі втрутитися в цей процес. Однак, в деяких дослідженнях показано, що протеасомний протеоліз приймає участь в деградації супероксиддисмутази та каталази — ключових антиоксидантних ферментів [97]. У багатьох дослідженнях показано, що активація гіпоталамо-гіпофізарної системи, що має місце і при моделюванні ішемічного інсульту, спричинює збільшення продукції вільних радикалів [187]. Таким чином, збільшення активності протеасоми із імовірним збільшенням експресії субодиниць протеасоми, може впливати на вміст антиоксидантних білків, і за рахунок цього збільшувати вразливість клітин до вільнорадикального ушкодження, наслідком чого є некротична загибель.

Узагальнюючи вищенаведені дані, можна дійти висновку про те, що порушення когнітивної сфери у щурів з експериментальним ішемічним інсультом, а можливо і людей, хворих на ішемічний інсульт, зумовлені змінами активності протеасоми та процесами апоптотичної та некротичної загибелі клітин кори та стріатума.

Наприклад, при старінні також спостерігається значне зростання активності протеасоми [188], а порушення запам'ятовування та навчання в старечому віці добре підтверджено.

Виходячи з того, що у процесах ушкодження головного мозку важливу роль грає порушення адекватного обміну білків, логічно було припустити, що системи, відповідальні за метаболізм протеїнів, також пошкоджуються. Серед інших систем утилізації білків, у якості об'єкту дослідження було обрано саме систему протеасомного протеолізу, бо, як вказано вище, ця система є основною в процесах утилізації внутрішньоклітинних протеїнів, отже, її зміни повинні бути найбільш значущими в патогенезі ішемічного інсульту.

Аналіз отриманих даних дозволяє дійти до ряду висновків про значення активності протеасоми, або її окремих каталітичних субодиниць у процесах ушкодження головного мозку, зокрема атеросклеротичного характеру.

Зв'язок між стресорним впливом на організм та виникненням патології головного мозку є давно відомим. З'ясована і велика кількість реакцій, що опосередковують цей вплив: підвищення рівня катехоламінів, вільнорадикальне ушкодження, порушення ліпопротеїдного обміну а також велика кількість інших факторів.

Роль протеолітичних ферментів в механізмах ушкоджуючої дії стресу вивчено недостатньо, хоча дослідження в цьому напрямку йдуть досить давно, проте основна увага приділяється позаклітинним ферментам протеолізу, зокрема ферментним системам згортання і протизгортання крові [188]. Даних досліджень щодо реакції внутрішньоклітинних ферментів на стресорний вплив на сьогодні немає.

Узагальнюючи результати, що були отримані в ході власних досліджень, можна говорити про тенденцію до підвищення протеасомної активності у нервовій тканині головного мозку при моделюванні фокальної ішемії, що досить чітко виявлялася у ТП та ПГПГ видах активності протеасомного комплексу в зоні “пенумбри” та контралатеральній зоні через 72-годинний період реперфузії в групі короткотривалої ОСМА та через 24-годинний період реперфузії в групі довготривалої ОСМА. Зважаючи на різну направленість процесів відповіді на стресорний вплив, встановлені зміни можуть трактуватися з одного боку, як пристосувальні, з іншого, як патологічні. Виходячи з вищенаведених даних про роль протеасомного протеолізу у таких процесах як активація NF $\kappa$ B, апоптоз змінених макрофагів, можна зробити висновок, що підвищення протеасомної активності у тканинах головного мозку при моделюванні фокальної ішемії має негативний вплив.

Для оцінки ролі протеасомного протеолізу при ішемічному інсульті використовувалась модель фокальної церебральної ішемії шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії за методикою J. Koizumi et al., з використанням монофіламентів із силіконовим покриттям. Дані, отримані в цій серії експериментів підтверджують висновки, що



стосувалися стресорної відповіді, і також вказують на підвищення протеасомної активності у нервових тканинах піддослідних тварин.

Зокрема, встановлено, що ліпополісахариди спричиняють підвищення ХТП та ППГ активності протеасоми в макрофагах, наслідком чого є збільшення експресії прозапальних генів (TNF- $\alpha$ , Toll-like receptor 2, 4, IL-6, IL-12, iNOS, COX2) [188]. Інгібітор протеасоми запобігав цьому ефекту ліпополісахаридів, що пов'язаний, зокрема, із активацією утворення транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B.

В нервових тканинах головного мозку зміни протеасомного протеолізу мали таке ж спрямування, що і в даних отриманих при визначенні протеасомної активності у сонних артеріях людей, хворих на атеросклероз – спостерігалось значне зниження ХТП активності протеасоми [188]. Пояснити цей факт можна тим, що активність протеасомного протеолізу, скоріш за все змінюється залежно від стадії атеросклеротичних змін судинної стінки, а також рівню оксидативного стресу [189].

За результатами роботи Herrmann et al [115], в якій атеросклероз моделювався у свиней (утримання на гіперхолестериновій дієті протягом 12 тижнів), ХТП активність мала тенденцію до збільшення, однак ППГ активність не змінювалась. Розбіжності в отриманих даних слід пов'язувати з вибором тварин для проведення експериментів. Крім того, відмінності можуть бути зумовлені регіональними особливостями судин, бо вищезгадані дослідники досліджували зміни протеасомної активності у вінцевих судинах.

Можливий варіант розвитку у такому випадку виглядає наступним чином: постійний надмірний вплив етіологічного чинника на тканини головного мозку призводить до утворення в них великої кількості модифікованих білків. Через деякий час компенсаторно підвищується рівень протеасомної активності для адекватної їх утилізації, проте, регуляторна її роль від цього страждає. Порушення регуляції внутрішньоклітинних процесів в умовах продовження дії етіологічного чинника може призводити до різних патологічних проявів, але у будь-якому разі кількість білків, що

потребують утилізації, буде наростати, а їх «час очікування»-збільшуватися. В ході „очікування” білки зазнають додаткових змін, що значно утруднює, а іноді й унеможлиблює їх протеасомну утилізацію. В результаті все більша і більша кількість модифікованих білків накопичується в цитоплазмі, і, в комплексі з позаклітинними уражуючими факторами викликає оксидативний стрес такої сили, що протеасомний протеоліз також виходить з ладу і настає стадія декомпенсації, яка, в залежності від обставин, завершується некротичною, аутофагічною чи апоптотичною загибеллю клітини.

В наших дослідках зміни активностей протеасоми в тканинах мозку на 6 та 24 години мали менш виражений характер, ніж на 72 годину - вірогідно змінювалася лише ПГПГ активність. Співставити отримані дані із результатами досліджень інших авторів ми не можемо, бо таких досліджень до сьогодні не проводилося. Проте, зміни в протеасомному протеолізі виявлені при різних патологічних процесах у серці. Так, в роботі Tsukamoto O. et al. [190] показано, що при відтворенні перевантаження серця у мишей в тканинах міокарда знижується активність протеасоми та накопичуються убіквітинізовані білки. Їх кількість вірогідно зростала в 2 рази через 2 тижні після оперативного втручання та у 2.8 рази - через 4 тижні. Такі самі зміни спостерігалися і міокарді людей із хронічною серцевою недостатністю [27]. Інгібітори протеасоми (MG 132 в концентрації 0.5 мкМ та лактацистин в концентрації 10 мкМ), за даними цих авторів, спричинювали порушення рівноваги між проапоптотичними і антиапоптотичними білками в бік перших у культурі неонатальних кардіоміоцитів. Зокрема, значно підвищувався рівень проапоптотичних білків p53 та bax. Введення в клітини малих інтерферуючих РНК (siRNA), які пригнічували процеси синтезу вказаних білків, запобігало апоптотичній загибелі кардіоміоцитів при дії інгібіторів протеасоми. В цілому автори роблять висновок, що пригнічення активності протеасоми є одним із механізмів розвитку серцевої недостатності, бо спричинює розвиток

апоптозу кардіоміоцитів і таким чином зменшує кількість функціонуючих клітин серця.

Добре відомо, що ймовірність розвитку захворювань мозку збільшується з віком, що деякі автори пов'язують із зниженням експресії субодиниць протеасоми [191]. Із використанням *microarray assay* (технологія генетичних матриць, мікрочипів) встановлено, що серед 6347 генів тільки в 2 % спостерігається вік-залежне зменшення експресії. І серед цих 2 % є гени, які кодують субодиниці 20S та 26S протеасоми [97]. Паралельно із зниженням експресії субодиниць протеасоми спостерігається і накопичення модифікованих окислених білків [93]. У роботі Bulteau A.L. (2002), проведений на щурах віком 8-, 21-, та 26 місяців, було показано, що активність усіх трьох каталітичних субодиниць протеасоми в тканинах серця значно знижується з віком [91]. Найбільшою мірою це стосується трипсиноподібної активності протеасоми. Виділена із тканин серця старих тварин 20S протеасома також відрізнялася меншою казеїнолітичною та пептидазною активністю. Поряд із цими змінами, звичайно, спостерігалось і накопичення убіквітинізованих, окиснених білків в тканинах серця старих тварин.

З іншого боку, в роботах Zhang L. et al., показано, що інгібітори протеасоми значно зменшують розмір інфаркту/інсульту при емболії середньої церебральної артерії у щурів [113]. В експериментах Campbell B. et al., проведених на ізольованому серці з перфузією його розчином, який містив нейтрофільні гранулоцити, використання інгібіторів протеасоми зменшувало ступінь ушкодження міокарда при ішемії-реперфузії [192]. Таким чином, питання про лікувальну стратегію щодо активності протеасоми при патології мозку залишається відкритим, невідомо зокрема, наскільки доцільно пригнічувати активність протеасоми, що зменшується з віком чи, навпаки, треба сприяти активації цього макромолекулярного комплексу, активність якого, за нашими даними, при моделюванні ішемічного інсульту, змінюється неоднозначно. На нашу думку, збільшення

активності протеасоми на 24 годинний період реперфузії, що спостерігається в зоні “пенумбри”, є результатом компенсаторної активації внутрішньоклітинного протеолізу внаслідок підвищення кількості модифікованих, окиснених, ушкоджених білків, які є субстратами протеасомної деградації. Звісно, з часом ці компенсаторні механізми виснажуються і активність протеасоми набуває значень, що характерні як для пізніх періодів ішемічного інсульту, так і вік-асоційованих захворювань мозку.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою сучасних молекулярно-генетичних методів проведено дослідження ролі протеасомного протеолізу при ішемічному інсульті, 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 (хімотрипсиноподібної в 1,2 рази, трипсиноподібної у 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 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, що може слугувати прогнозованим висновком для групи ризику.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pearte C.A. (2006). Characteristics and baseline clinical predictors of future fatal versus nonfatal coronary heart disease events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation*, 113(18), 2177-2185.
2. Mackay J., Mensah G. (2004). The atlas of heart disease and stroke. *Geneva: World Health Organization*, 112, 1 p.
3. Mozaffarian D., Benjamin E.J., & Go A.S. (2015). Heart Disease and stroke Statistics — 2015 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 13, 29—322. [doi.org/10.1161/CIR.000000000000152](https://doi.org/10.1161/CIR.000000000000152).
4. Nichols M., Townsend N., Scarborough P., Rayner M. (2014). Cardiovascular diseases in Europe 2014: epidemiological update. *European Heart Journal*, 35(42), 2950—2959.
5. Brass L.M., Isaacsohn J.L., Merikangas K.R., Robinette C.D. (1992). A study of twins and stroke. *Stroke*, 23(2), 221–223.
6. Mishchenko T.S. (2009). Treatment of stroke: towards full use of the opportunities of the therapeutic window. *Health Protection of Ukraine*, 1, 12—15.
7. Гандзюк В.А. (2014). Динаміка захворюваності та поширеності хвороб систем кровообігу серед населення України на сучасному етапі: національний та регіональний аспекти. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України*, 2(60), 74—78.
8. Cheng Y.C., Anderson C.D., Bione S., Keene K., & Mitchell B.D. (2012). Are myocardial infarction-associated single-nucleotide polymorphisms associated with ischemic stroke? *Stroke*, 43, 980 – 986.
9. Dosenko V.E., Mykhalchuk D.V., Zagoryi V.Y., & Moibenko A.A. (2005). Functional significance of allelic polymorphisms of genes encoding the catalytic subunit immunoproteasome. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 51(6), 3-10.
10. Goncharov S.V., Gurianova V.L., & Moibenko O.O. (2013). Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of 17 single nucleotide polymorphisms. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 59(6), 12-24.

11. Ozaki K., Sato H., Iida A. (2006). A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. *Natural Genetic*, 38(8), 921-925.
12. Sing C.F., Stengard J.H., Kardia S.L.R. (2003). Genes, environment, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 23, 1190-1196.
13. Goldberg A., Eledzh C., Harper Dzh.V. (2001). Mechanisms of cell death. *The world of science*, 2, 32-37.
14. Lockshin R.A., Zakeri Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal Biochemical Cell Biology*, 36, 2405-2419.
15. Deng G.Y., Muir A., Maclaren N.K., She J.X. (1995). Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *American Journal Human Genetic*, 56, 528-534.
16. Maksymowych W.P., Russell A.S. (1995). Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis. *Clinical Investigative Medicine*, 18, 42-46.
17. Mishto M., Bonafe M., & Salvioli S. (2002). Age dependent impact of LMP polymorphisms on TNFalpha-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Experimental Gerontology*, 37(2-3), 301-308.
18. Mishto M., Santoro A., Bellavista E., Sessions R., Textoris-Taube K. (2006). A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localisation and insight into regulatory mechanisms. *Biological Chemistry*, 387, 417-29.
19. Freilinger T., Bevan S., Ripke S., Gschwendtner A., & Dichgans M. (2009). Genetic variation in the lymphotoxin-alpha pathway and the risk of ischemic stroke in European populations. *Stroke*, 40, 970 – 972.
20. Layfield R., Carvey J.R., Lowe J. (2003). Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ageing Research Review*, 2(4), 343-356.



21. Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R. (2000). Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implication for oxidative stress // *Mechanisms of Ageing Development*, 113(1), 61-70.
22. Ohtsuka H., Takahashi R., Goto S. (1995). Age-related accumulation of high-molecular-weight ubiquitin protein conjugates in mouse brain. *Journal of Gerontology Series A Biological Sciences and Medicine*, 50(5), 277-281.
23. Котвіцька А.А., Лобова І.О. (2012). Дослідження соціально–епідеміологічних показників населення України внаслідок хвороб систем кровообігу на державному та регіональному рівнях. *Вісник фармації*, 4, 62—65.
24. Mukherjee D., Patil C.G. (2011). Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurgery*, 76(6), 85—90.
25. Зозуля І.С. Зозуля А.І. (2011) Епідеміологія цереброваскулярних захворювань в Україні. *Український медичний часопис*, 5(85), 38—41.
26. Kim A.S., Johnston C. (2011). Global variation in the relative burden of stroke and ischemic heart disease. *Circulation*, 124, 314-323.
27. Gonzalez M.A., Selwyn A.P. (2003). Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *American Journal of Medicine*, 115(99), 106 p.
28. Wojcik C., di Napoli M. (2004). Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: new strategy in Stroke therapy. *Stroke*, 35(6), 1506-1518.
29. Фогель Ф., Мотульски А. (1990). Генетика человека: В 3-х томах. *Мир*, 3, 1-366.
30. Boekholdt S.M., Sacks F.M., Jukema J.W. (2005). Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment. Individual patient meta-analysis of 13 677 subjects. *Circulation*, 111, 278-287.
31. Goldberg A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426, 895-899.
32. Benditt E.P., Benditt J.M. (1973). Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Academic Science.USA*, 70, 1753-1756.

- 33.Fukuo K., Nakahashi T., Nomura S. et al. (1997). Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis. *Gerontology*, 43(1), 35-42.
- 34.Jeffers M., Taylor G.A., Weidner M. et al. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular Cell*, 17(2), 799-808.
- 35.Lee B., Gai W., Laychock S.G. (2001). Proteasomal activation mediates down-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calcium mobilization in rat pancreatic islets. *Endocrinology*, 142(5), 1744-1751.
- 36.Saffitz J.E., Laing J.G., Yamada K.A. (2000). Connexin expression and turnover. Implication for cardiac excitability. *Circulation Research*, 86, 723-728.
- 37.Ma J., Lindquist S. (2001). Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Academic Science USA*, 98(26), 14955-14960.
- 38.Mackrill J.J. (1998). Possible regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by a polyubiquitin binding subunit of the 26S proteasome. *Biochememical Biophysical Research Communication*, 245(2), 428-429.
- 39.Moser M., Collelo R.J., & Pott U. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, 14(3), 509-517.
- 40.Staub O., Gautschi I., & Ishikawa T. (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO Journal*, 16(21), 6325-6336.
- 41.Tarcsa E., Szymanska G., & Lecker S. (2000). Ca<sup>2+</sup>-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *Journal Biological Chemistry*, 275(27), 20295-20301.
- 42.Vecchi M., Carpenter G. (1997). Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *Journal Cell Biology*, 139(4), 995-1003.

43. Zhu C.C., Wojcikiewicz R.J. (2000). Ligand binding directly stimulates ubiquitination of the inositol 1, 4,5-trisphosphate receptor. *Biochemistry Journal*, 348(3), 551-556.
44. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., & Шаповал Л.М. (1997). Роль ендотелію та біологічно-активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу та діяльності серця. *Фізіологічний журнал*, 43(1-2), 3-18.
45. Мойбенко О.О., Юзьків М.Я., & Коцюрuba А.В. (2000). Зміни системи оксиду азоту при гострій ішемії та реперфузії міокарда. *Фізіологічний журнал*, 46(6), 3-11.
46. Мустафина О.Е., Шагисултанова Е.И., & Насибуллин Т.Р. (2001). Микросателлитный полиморфизм гена ендотелиальной NO-синтазы: исследования популяций Волго-Уральского региона и анализ связи с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией. *Генетика*, 37(5), 668-674.
47. Arnet U.A., McMillan A., & Dinerman J.L. (1996). Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. *Journal Biological Chemistry*, 271(25), 15069-15073.
48. Bauriedel G., Schluckebier S., & Hutter R. (1998). Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 18(7), 1132-1139.
49. Goligorsky M.S., Li H., Brodsky S., Chen J. (2002). Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *American Journal of Physiology*, 283(1), 1-10.
50. Ярилин А.А. (1998). Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. *Патологическая физиология*, 38-48.
51. Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. (2004). Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*, 109, 1359-1365.

52. Breitschopf K., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2000). Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bcl-2. A functional consequence on apoptosis induction. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21648-21652.
53. Herrero C., Sebastian C., & Marques L. (2002). Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Experimental Gerontology*, 37, 389-394.
54. Heltianu C., Costache G., & Gafencu A. (2005). Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *Journal of Cell Molecular Medicine*, 9(1), 135-142.
55. Chase B.I., Zhou Y., & Xiang Y. (2003). Proteasome-mediated degradation of RNase L in response to phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) treatment of mouse L929 cells. *Journal Interferon Cytokine Research*, 23(10), 565-573.
56. Belloc F., Hourdille P., Boisseau M.R., Bernard P. (1982). Protein synthesis in human platelets correlation with platelet size. *Nouvelle Revue Francaise Hematologie*, 24(6), 369-73.
57. Feron O., Dessy C., & Opel D.J. (1998). Modulation of the endothelial nitric oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30249-30254.
58. Тавокин В.В., Прокопович Н.В. (1968). Динамика содержания пирокатехина в миокарде и крови при экспериментальном атеросклерозе и коронарной недостаточности, вызванной ограничением подвижности кроликов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 12(2), 63-64.
59. Chen M.S., Chen D., Dou Q.P. (2004). Inhibition of proteasome activity by various fruits and vegetables is associated with cancer cell death. *In Vivo*, 18(1), 73-80.
60. Malakhova O.A., Yan M., Malakhov M.P., & Zhang D.E. (2003). Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Development*, 17, 455-460.
61. Zhao C., Denison C., Huibregtse J.M., Gygi S., Krug R.M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins

- functioning in diverse cellular pathways. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10200-10205.
62. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., & Tanaka, K. (2004). A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO Journal*, 23, 1977–1986.
63. Sasakawa, H., Sakata, E., Yamaguchi, Y., & Kato, K. (2006). Solution structure and dynamics of Ufm1, a ubiquitin-fold modifier 1. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 343, 21-26.
64. Ha, B.H., Kim, E.E. (2008). Structures of proteases for ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *BMB Reporter*, 41, 435–443.
65. Orlowski M., Wilk S. (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415, 1-5.
66. Li X., Amazit L., Long W., Lonard D.M., & O'Malley B.W. (2007). Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by proteasome pathway. *Molecular Cell*, 26, 831–842.
67. Tofaris G.K., Layfield R., Spillantini M.G. (2001).  $\alpha$ -synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome, *FEBS Letters*, 509, 22–26.
68. Lin L., DeMartino G.N., Greene W.C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF- $\kappa$ B p50 by the 26S proteasome. *Cell*, 92, 819–828.
69. Фогель Ф., Мотульски А. (1990). Генетика человека, 2, 378 с.
70. Sone T., Saeki Y., Toh-e A., Yokosawa H. (2004). Intracellularly inducible, ubiquitin hydrolase-insensitive tandem ubiquitins inhibit the 26S proteasome activity and cell division. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 28807–28816.
71. Гольдберг А., Еледж С., Гарпер Дж.В. (2001). Механізми клітинної смерті. *Світ науки*, 2, 32-37.
72. Glickman M.H., Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Review*, 82, 373–428.

- 73.Hershko A., Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425-479.
- 74.Pickart C.M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB Journal*, 1, 1055-1066.
- 75.Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A.L., Welch W.J. (1988). Identity of the 19S «prosome» particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*, 331, 192—194.
- 76.Bochtler M., Ditzel L., Groll M., Hartmann C., Huber R. (1999). The proteasome. *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*, 28, 295— 317.
- 77.Maupin-Furlow J.A., Humbard M.A., Kirkland P.A., Li W., Reuter C.J., Wright A.J., Zhou G. (2006). Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea. *Current Topics in Developmental Biology*, 75, 125—169.
- 78.Farout L., Lamare M.C., Cardozo C., Harrisson M., Briand Y., Briand M. (2000). Distribution of proteasomes and of the five proteolytic activities in rat tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374, 207-212.
- 79.Hershko A., Genoth D., & Pehrson J. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extract. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16376-16379.
- 80.Cascio P., Hilton C., & Kisselev A.F. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO Journal*, 20(10), 2357-2366.
- 81.Craiu A., Akopian T., Goldberg A., Rock K.L. (1997). Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10850-10855.
- 82.Gaczynska M., Goldberg A.L., & Tanaka K. (1996). Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17275-17280.

83. Gaczynska M., Osmulski P.A., Ward W.F. (2001). Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging. *Mechanisms of Ageing Development*, 122, 235-254.
84. Gaczynska M., Rock K.L., Spies T., Goldberg A.L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), 9213-9217.
85. Eriksson P., Deguchi H., & Samnegard A. (2004). Human evidence that the cystatin C gene is implicated in focal progression of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 24(3), 551-557.
86. Fraser P.E., Levesque G., & Yu G. (1998). Presenilin 1 is actively degraded by the 26S proteasome. *Neurobiological Aging*, 19(1), 19-21.
87. Giulivi C., Davies K.J.A. (1993). Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. *Jornal of Biological Chemistry*, 268, 8752-4753.
88. Tanahashi N., Murakami Y., Minami Y., Shimbara N., Hendil K. B., Tanaka K. (2000). Induction by interferon- and contribution to ATP-dependent proteolysis. *Jornal of Biological Chemistry*, 275, 14 336—14 345.
89. Hibi K., Ishigami T., & Tamura K. (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*, 32(3), 521-526.
90. Horikoshi T., Page J., & Lei G. (1998). Proteasomal RNase activity in human epidermis. *In Vivo*, 12(2), 155-158.
91. Bulteau A.L., Szweda L.I., Friguet B. (2002). Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 298-304.
92. An B., Goldfarb R.H., Siman R., Dou Q.P. (1998). Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ*, 5(12), 1062-1075.

93. Jarrousse A.S., Petit F., & Kreutzer-Schmid C. (1999). Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay. *Jornal of Biological Chemistry*, 274(9), 5925-5930.
94. Nam S., Smith D.M., Dou Q.P. (2001). Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *Jornal of Biological Chemistry*, 276(16), 13322-13330.
95. Takaoka M., Okamoto H., & Ito M. (1998). Antihypertensive effect of a proteasome inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats. *Life of Science*, 63(4), 65-70.
96. Pashevin D.O, Dosenko B.Ie, Byts' Iu.V, Moibenko O.O. (2009). Antiatherogenic characteristics of korvutin: effect on proteasome activity of the aorta, heart, and blood cells. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 55(4), 50-57.
97. Arroyo-Espliguero R., Avanzas P., Jeffery S., Kaski J.C. (2004). CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart*, 90, 983–988.
98. Carrard G., Dieu M., & Raes M. (2003). Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *International Journal of Biochemistry*, 35, 728-739.
99. Burns E.A., Goodwin J.S. (1997). Immunodeficiency of aging. *Drugs Aging*, 11(5), 374-397.
100. Bulteau A.L., Lundberg K.C., Humphries K.M., & Szweda L.I. (2001). Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *Jornal of Biological Chemistry*, 276, 30057–30063.
101. Freedman J.E., Sauter R., & Battinelli E.M. (1999). Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circulation Research*, 84(12), 1416-1421.
102. Billcke S.S., Bender A.T., & Kanelakis K.C. (2002). Hsp90 is required for heme binding and activation of apo-neuronal nitric-oxide synthase: geldanamycin-mediated oxidant generation is unrelated to any action of Hsp90. *Jornal of Biological Chemistry*, 277(23), 20504-20509.



103. Di Castelnuovo A., de Gaetano G., Benedetta D.M., Iacoviello L. (2005). Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism and coronary artery disease: implications for clinical practice. *American Journal of Pharmacogenomics*.5(2), 93-99.
104. Mishto M, Bellavista Santoro A, Stolzing A, & Nacmias B. (2006). Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging*, 27, 54–66.
105. Dimmeler S., Breitschopf K., & Haendeler J. (1999). Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *Experimental Medicine*, 189(11), 1815-1822.
106. Fan X.M., Wong B.C., & Wang W.P. (2001). Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 93(4), 481-488.
107. Razani B., Engelman J.A., & Wang X.B. (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38121-38138.
108. Bacci S., Menzaghi C., & Ercolino T. (2004). The -276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 27, 2015–2020.
109. Bacon S.L., Ring C., Lip G.Y., Carroll D. (2004). Increases in lipids and immune cells in response to exercise and mental stress in patients with suspected coronary artery disease: effects of adjustment for shifts in plasma volume. *Biological Psychology*, 65(3), 237-250.
110. Bennett M.R., Evan G.I., Schwartz S.M. (1995). Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2266-2274.
111. Bennett M.R., Macdonald K., & Chan S.W. (1998). Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circulation Research*, 82(6), 704-712.

112. Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemistry Journal*, 351(1), 95-105.
113. Zhang L., Zhang Z.C., & Zhang R.L. (2001). Postischemic (6-Hour) treatment with recombinant human tissue plasminogen activator and proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction in a rat model of embolic focal cerebral ischemia. *Stroke*, 32, 2926-2931.
114. [Asai A.](#), [Tanahashi N.](#), & [Qiu J.H.](#) (2002). Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, 22(6), 705-710.
115. Herrmann J., Gulati R., & Napoli C. (2003). Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis. *FASEB Journal*, 17(12), 1730-1732.
116. Братусь В.В., Шумаков В.А., Талаева Т.В. (2004). Атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром: патогенез, диагностика, клиника, лечение. *Четверта хвиля*, 576 с.
117. Bratton S.B., Cohen G.M. (2001). Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *TRENDS in Pharmacological Science*, 22(6), 306-315.
118. Hegyi L., Hardwick S.J., Mitchinson M.J., Skepper J.N. (1997). The presence of apoptotic cells in human atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology*, 150(1), 371-373.
119. Cui H., Matsui K., & Omura S. (1997). Proteasome regulation of activation-induced T cell death. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7515-7520.
120. Galbiati F., Volonte D., & Minetti C. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGMD-1C mutant and rescues wild-type caveolin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 275, (48), 37702-37711.

121. Hara K., Kobayashi N., & Watanabe S. (2001). Effects of quinapril on expression of eNOS, ACE, and AT1 receptor in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 14(4), 321-330.
122. Brand K., Eisele T., & Kreusel U. (1997). Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 17(10), 1901-1909.
123. Ma Y., Chen B., Liu D., Yang Y., Xiong Z., Zeng J., Dong Y. (2011). MG132 treatment attenuates cardiac remodeling and dysfunction following aortic banding in rats via the NF- $\kappa$ B/TGF $\beta$ 1 pathway. *Biochemical Pharmacology*, 81(10), 1228-36.
124. [Marfella C.G.](#), [Ohkawa Y.](#), [Coles A.H.](#), [Garlick D.S.](#), [Jones S.N.](#), [Imbalzano A.N.](#) (2007). Mutation of the SNF2 family member Chd2 affects mouse development and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 212(2), 562-567.
125. Dallaporta B., Pablo M., & Maisse C. (2000). Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis. *Cellular Death Differences*, 7(4), 368-373.
126. Hasebe Y., Egawa K., & Yamazaki Y. (2003). Specific inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF)-1  $\alpha$  activation and of vascular endothelial growth factor (VEGF) production by flavonoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(10), 1379-1383.
127. Kim Y.M., Bombeck C.A., Billiar T.R. (1999). Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research*, 84, 253-256.
128. Martinet W., De Bie M., & Schrijvers D.M.. (2004). 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 12, 2296-2301.
129. Richardson C.J., Schalm S.S., Blenis J. (2004). PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15, 147-159.

130. Hipp M.S., Urbich C., & Mayer P. (2002). Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1. *European Journal of Immunology*, 32(8), 2208-2217.
131. Lusis A.J., Fogelman A.M., Fonarow G.C. (2004). Genetic basis of atherosclerosis: part I. New genes and pathways. *Circulation*, 110, 1868-1873.
132. Lusis A.J., Fogelman A.M., Fonarow G.C. (2004). Genetic basis of atherosclerosis: part II. Clinical implications. *Circulation*, 110, 2066-2071.
133. Cepinskas G., Lush C.W., Kvietys P.R. (1999). Anoxia/reoxygenation-induced tolerance with respect to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured endothelial cells. A nuclear factor-kappaB-mediated phenomenon. *Circulation Research*, 84, 103-112.
134. Hingorani A.D., Liang C.F., & Fatibene J. (1999). A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 100(14), 1515-1520.
135. Семенов Д.Е., Лушникова Е.Л., Непомнящий Л.М. (2001). Особенности антрациклиновой модели кардиомиопатии: снижение синтеза белка, нарушение внутриклеточной регенерации и безнекротическая элиминация кардиомиоцитов. *Бюлетень экспериментальной биологической медицины*, 131(5), 595-600.
136. Куличкова В.А., Миттенберг А.Г., & Евтеева И.Н. (2004). Селективный эффект эпидермального фактора роста на эндорибонуклеазную активность различных субпопуляций протеасом из клеток линии A431. *Цитология*, 46(6), 525-530.
137. Ghilardi G., Biondi M.L., & DeMonti M. (2002). Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene. *Clinical Chemistry*, 48(7), 989-993.
138. Мойбенко О.О., Павлюченко В.Б., & Даценко В.В. (2000). Дослідження ролі ендотелій залежних факторів у реалізації кардіогенних рефлексів за нормальних та патологічних умов. *Фізіологічний журнал*, 46(2), 19-32.

139. Гончаров С.В., Досенко В.Э., Хайтович М.В., Мойбенко О.О. (2009). Алельний поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми, та ймовірність розвитку артеріальної гіпертензії у підлітків. *Фізіологічний журнал*, 55, 3-8.
140. Kuzushita N., Sugimoto Y., Sasaki Y., Hayashi N. (2001). Involvement of TAP2 and LMP7 gene polymorphisms in HCV infection. *Nippon Rinsho*, 59, 1248-1253.
141. Pryhuber K.G., Murray K.J., & Donnelly P. (1996). Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 23, 747-752.
142. Vinasco J., Fraile A., & Nieto A. (1998). Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Annual Rheumatology Discussion*, 57, 33–37.
143. [Liu X.](#), [Long F.](#), [Peng H.](#), [Aerni S.J.](#), [Jiang M.](#), & [Kim SK.](#) (2009). Analysis of cell fate from single-cell gene expression profiles in *C. elegans*. *Cell*. 139(3), 623-633, doi:10.1016/j.cell.2009.08.044.
144. Tan L., Fu X.Y., & Li H.H. (2005). Expression of p28GANK and its correlation with RB in human hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 25(3), 667–676.
145. Reiter E., Tiefenthaler M., Freillinger M., Bernert G., Seidl R., Hauser E. (2000). Familial idiopathic West syndrome. *Journal of Child Neurology*, 15(4), 249-252.
146. Колчин Ю.Н., Максютин Н.П., & Баланда П.П. (1991). Кардиопротекторное действие кверцетина при экспериментальной окклюзии и реперфузии коронарной артерии у собак. *Фармакология и токсикология*, 54, 20-23.
147. Колчин Ю.Н., Попович Л.Ф., Грабовский Л.А., Луйк А.И., Мойбенко А.А. (1990). Эффект ингибитора 5-липоксигеназы кверцетина на

- функціональні і морфологічні прояви пошкодження міокарда при ішемії і реперфузії серця. *Кардіологія*, 30, 72-75.
148. Dubois R.N., Abramson R.N., Crofford S.B. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB Journal*, 12(12), 1063-1073.
  149. Schneck M.J., Lei Xu. (2015). Cardioembolic Stroke. *Medscape*, 1, 77-92.
  150. Chen C.J., Ding D., & Starke R.M. (2015). Endovascular vs medical management of acute ischemic stroke. *Neurology*, 85(22), 1980—1990.
  151. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazama T., Genju O. (1986). Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Stroke Journal*, 8, 1-8.
  152. Traystman R. (2003). Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR Journal*, 44(2), 85–95.
  153. Belayev L., Endres M., & Prinz V. (2010). Focal cerebral ischemia in the mouse and rat using the intraluminal suture-filament model. *Neuromethods Edition by Ulrich Dirnagl*, 286.
  154. Roger A.W., Grace L.C., Donna M.V. (2000). Propidium Iodide Compares Favorably with Histology and Triphenyl Tetrazolium Chloride in the Assessment of Experimentally-induced Infarct Size. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*, 32, 225–232.
  155. Mileson B.E., Schwartz R.D. (1991). The use of locomotor activity as a behavioral screen for neuronal damage following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, 128, 71–76.
  156. Modo, M., Stroemer, R.P., Tang, E. (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 194, 99-109, doi: [10.1016/S0165-0270\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00329-0).
  157. Tsupikov O., Kyryk V., Smozhanik E., Rybachuk O., Butenko G., Pivneva T., & Skibo G. (2014). Long-term fate of grafted hippocampal neural

- progenitor cells following ischemic injury. *Journal of Neuroscience Research*, 92(8), 964-974.
158. Katsumata N., Kuroiwa T., & Ishibashi S. (2006). Heterogeneous hyperactivity and distribution of ischemic lesions after focal cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropathology*, 26, – 283-292.
  159. Komotar R.J., Kim G.H., Sughrue M.E. (2007). Neurologic assessment of somatosensory dysfunction following an experimental rodent model of cerebral ischemia. *Nature Protocols*, 2(10), 2345-2347, doi:[10.1038/nprot.2007.359](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.359).
  160. Dosenko V.E, Nagibin V.S, Tumanovskaia L.V, Zagorii V.Iu, Moibenko A.A. (2006). The influence of quercetin on the activity of purified 20S, 26S proteasome and proteasomal activity in isolated cardiomyocytes (Russian). *Biomed Khimiya*, 52, 138–145.
  161. Hacke W. (2003). European Stroke Initiative (EUSI) Recommendations for Stroke management. *Cerebrovascular Discussion*, 16(4), 311–337.
  162. Pulsinelli W.A. (1992). Pathophysiology of acute ischemic Stroke. *Lancet*, 339, 533–536.
  163. Kojima T., Hirota Y., Ema M., Takahashi S., & Sawamoto K. (2010). Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*, 28(3), 545–548, doi:[10.1002/stem.306](https://doi.org/10.1002/stem.306).
  164. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. (1981). Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, 1, 53-60.
  165. Apple D.M., Solano-Fonseca R., & Kokovay E. (2017). Neurogenesis in the aging brain. *Biochemical Pharmacology*, 141, 77-85.
  166. Lindner M.D., Gribkoff V.K., Donlan N.A. (2003). Long-lasting functional disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts. *The Journal of Neuroscience*, 23(34), 10913-10922.

167. Modo M. (2009). Long-term survival and serial assessment of stroke damage and recovery practical and methodological considerations. *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine*, 2(22), 52-68, doi:[10.6030/1939-067X-2.2.52](https://doi.org/10.6030/1939-067X-2.2.52).
168. Herrmann J, Ciechanover A, Lerman L.O, Lerman A. (2004). The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases - a hypothesis extended. *Cardiovascular Research*, 61(1), 11-21.
169. Herrmann J., Gulati R., & Napoli C. (2003). Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis. *FASEB Journal*, 17(12), 1730-1732.
170. Kawaguchi Y., Ikegami H., & Fukuda M. (1994). Absence of association of TAP and LMP genes with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Life Science*, 54(26), 2049-2053.
171. Iacoviello L., Di Castelnuovo A., & Gattone M. (2005). Polymorphisms of the interleukin-1 $\beta$  gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 25, 222-227.
172. Incalcaterra E., Hoffmann E., Averna M.R., Caimi G. (2004). Genetic risk factors in myocardial infarction at young age. *Minerva Cardioangiology*. 52(4), 287-312.
173. Itoh M., Takaoka M., & Shibata A. (2001). Preventive effect of lactacystin, a selective proteasome inhibitor, on ischemic acute renal failure in rats. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*, 298, 501-507.
174. [Oka E.](#), [Ohtsuka Y.](#), [Yoshinaga H.](#), [Murakami N.](#), [Kobayashi K.](#), [Ogino T.](#) (2006). Prevalence of childhood epilepsy and distribution of epileptic syndromes: a population-based survey in Okayama. *Japaness [Epilepsia](#)*. 47(3), 626-630.
175. [Iwai N.](#), [Tamaki S.](#), [Ohmichi N.](#), [Kinoshita M.](#) (1997).The II genotype of the angiotensin-converting enzyme gene delays the onset of acute coronary syndromes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 17(9), 1730-1733.
176. Cuervo A.M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1-2), 55–72.



177. Jachymova M., Horky K., & Bultas J. (2001). Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 284(2), 426-430.
178. Li J., Schuler-Thurner B., & Schuler G. (2001). Bipartite regulation of different components of the MHC class I antigen-processing machinery during dendritic cell maturation. *International Immunology*, 13(12), 1515-1523.
179. Jeerooburkhan N., Jones L.C., & Bujac S. (2001). Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*, 38, 1054-1061.
180. Kane J.P., Havel R.J. (1999). Polymorphism of the lipopolysaccharide receptor (CD14) and myocardial infarction. New evidence for a role of gram-negative bacterial infection? // *Circulation*, 99(25), 3210-3212.
181. Wytenbach A., Carmichael J., & Swartz J. (2000). Effect of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2898-2903.
182. Kirshenbaum L.A. (2000). Bcl-2 intersects the NFkappaB signalling pathway and suppresses apoptosis in ventricular myocytes. *Clinical Investigative Medicine*, 23(5), 322-330.
183. James A.B, Conway A.M, Morris B.J (2005) Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor—Zif268. *Journal of Neurochemistry*, 95, 796 –810.
184. Kitagawa H., Tani E., & Ikemoto H. (1999). Proteasome inhibitors induce mitochondria-independent apoptosis in human glioma cells. *FEBS Letters*, 443(2), 181-186.
185. Karin N., Mitchell D. J., & Brocke S.. (1994). Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon gamma and

- tumor necrosis factor alpha production. *Journal of Experimental Medicine*, 180(6), 2227-2237.
186. Лебедь Ю. В., Орловский М. А., Лушникова И. В., Скибо Г. Г. (2008). Нейродегенеративные изменения в гиппокампе в ранний период развития экспериментального сахарного диабета. *Нейрофизиология*, 40(1), 30-37.
187. Martin L.J., Pardo C.A., & Cork L.C. (1994). Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques deposits in the ageing cerebral cortex. *American Journal of Pathology*, 145(6), 1358-1381.
188. Kisselev A.F., Garcia-Calvo M., & Overkleeft H.S. (2003). The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35869-35877.
189. Kisselev A.F., Akopian T.N., Castillo V., Goldberg A.L. (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molecular Cell*, 4(3), 395-402.
190. Tsukamoto O., Minamino T., & Okada K. (2006). Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 340, 1125-1133.
191. Knepper-Nicolai B., Savill J., Brown S.B. (1998). Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30530-30536.
192. Campbell B., Adams J., & Shin Y.K. (1999). Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(2), 467-476.