

УДК 616-005.4:612.825:577.152.34

© Колектив авторів, 2012.

## ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ПРОТЕАСОМИ В ТКАНИНАХ МОЗКУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

**О.І. Савчук, Є.С. Ярмолюк, С.В. Гончаров, Д.О. Пашевін, В.Є. Досенко, Г.Г. Скибо**

*Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, відділ цитології (зав. – професор Г.Г. Скибо), м. Київ.*

**PROTEASOME ACTIVITY CHANGES IN BRAIN TISSUES IN MODELLING OF ISCHEMIC STROKE**  
**O.I. Savchuk, E. S. Yarmoluk, S.V. Goncharov, D.O. Pashevin, V.E. Dosenko, G.G. Skibo**

### SUMMARY

In this paper researches of three kinds of proteasome proteolytic activity in brain tissues were carried out and their changes under ischemic injury were demonstrated. It was revealed that the activity of intracellular proteasome proteolysis is significantly reduced in the brain tissue in the simulation of transient middle cerebral artery occlusion.

### ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМЫ В ТКАНЯХ МОЗГА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

**Е.И. Савчук, Е.С. Ярмолюк, С.В. Гончаров, Д.А. Пашевин, В.Е. Досенко, Г.Г. Скибо**

### РЕЗЮМЕ

В работе проведены исследования трех видов протеолитической активности протеасомы в тканях мозга и продемонстрированы их изменения в условиях ишемического повреждения. Выявлено, что активность внутриклеточного протеасомной протеолиза существенно снижается в тканях мозга при моделировании транзиторной окклюзии средней мозговой артерии.

**Ключові слова:** ішемічний інсульт, протеасома, фокальна ішемія.

Інсульт посідає друге місце серед хвороб з фатальними наслідками, а також є найбільш розповсюдженою причиною стійкої втрати працездатності.

За оцінками експертів, щорічно інсульт виникає у 10 млн людей [11]. Вплив його на життя пацієнтів, їхніх сімей та суспільства значний.

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 [2, 10].

За даними світової статистики інсульт є основним чинником інвалідизації населення. 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 [2].

Нормальне функціонування мозку неможливе без адекватної 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 [6, 7, 9].

Метою дослідження було визначення активності усіх трьох субодиниць протеасоми та проведення аналізу їх зміни у щурів із фокальною ішемією

головного мозку в місці локалізації пошкодження.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проведені на статевозрілих самцях щурів лінії Wistar, масою 280-320 г. Ішемічний інсульт моделювали шляхом транзиторної оклюзії середньої мозкової артерії по методиці Koizumi J., et al. (1986), що тривала 60 хв. [4]. Методика полягає в тому, що вводиться «оклюдер» – поліпропіленова нитка (4-00) з силіконовим кінцем довжиною 20-22 мм і діаметром 0,25 мм у внутрішню мозкову артерію на глибину 17-20 мм до місця відходження середньої мозкової артерії, гирло якої перекривається ввідним оклюдером. В результаті введення нитки виникає ішемізація мозку в басейні середньої мозкової артерії. Ішемію проводили протягом 60 хвилин, після чого нитка вилучалася, рана зашивалась [4,8]. Контролем слугували псевдооперовані тварини (sham operated), яким також вводили поліпропіленову нитку (4-00) з силіконовим кінцем довжиною 20-22 мм і діаметром 0,25 мм у внутрішню мозкову артерію на глибину 17-20 мм до місця відходження середньої мозкової артерії від внутрішньої сонної артерії. Після введення мікрофіламент витягали з судини, накладали лігатуру та зашивали рану.

Оцінка ішемічного пошкодження проводилась через 72 години після відновлення кровотоку. Для визначення розміру інфаркту головного мозку в експериментах *in vivo* використовували загальноновживаний метод, що дозволяє на макроскопічному рівні відокремити пошкоджену (некротизовану) ділянку мозку від тканини мозку, яка зберегла життєздатність, та обґрунтований на

фарбуванні зрізів мозку 1,2,3-трифенілтетразолію хлориду (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. Центральну зону ішемізованої території позначали як «ядерну зону» ішемії, зону «ішемічної напівтіні» чи пенумбри позначали як «зону ризику», ділянку мозку, що знаходиться контралатерально від ішемізованої ділянки позначали як «ліва півкуля». У псевдооперованих тварин ділянку мозку, що зазнала впливу після проведення уявної операції (sham operation) позначали як «sham R», а контралатеральну ділянку позначали як «sham L».

Для визначення активності протеасоми зразки мозку гомогенізували в скляному гомогенізаторі з додаванням Трис-НСІ буферу (pH 7.4) (0,1 мкл буферного розчину на міліграм тканини). Отриманий гомогенат тканини центрифугували (5000g протягом 5хв), після чого відібраний супернатант використовували для подальших біохімічних досліджень. В супернатантах тканин 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-АМС, LSTA-АМС, або LLG-АМС) і визначали трипсиноподібну, хімотрипсиноподібну, та пептидилглютаміл пептидгідролазну 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 на Hitachi-4000 (довжина хвилі збудження/емісії (Ex/Em) - 360/440) при температурі 37 С. Для підтвердження специфічності протеасомального гідролізу в проби додавали селективні інгібітори протеасоми – класто-лактацистин бета-лактон або MG-132 в концентрації 5 мкМ [1,5]. Відсоток зменшення активності гідролізу відповідних субстратів під дією вказаних інгібіторів трактували як активність протеасоми і виражали в мкМ 7-аміно-4-метилкумарину на 1 гр. білку за 1 хвилину.

Отримані результати обробляли статистично з використанням програми Origin 7.0 та Excel 2000. При цьому вірогідність відмінностей визначали за t-критерієм Стьюдента [3]. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виміряно три види протеолітичної активності протеасоми (трипсиноподібна, хімотрипсиноподібна та пептидглютамілпептидгідролазна) в тканинах мозку і продемонстровані їх зміни за умов ішемічного пошкодження.

Активність різних активностей протеасоми змінюється різноспрямовано. Так, трипсиноподібна активність ішемізованої ділянки мозку зменшувалась в 2 рази порівняно з контролем ( $P=0,045$ ), а порівняно з зоною ризику зменшувалась у 1,6 рази ( $P=0,039$ ), хімотрипсиноподібна активність зменшувалась в 1,2

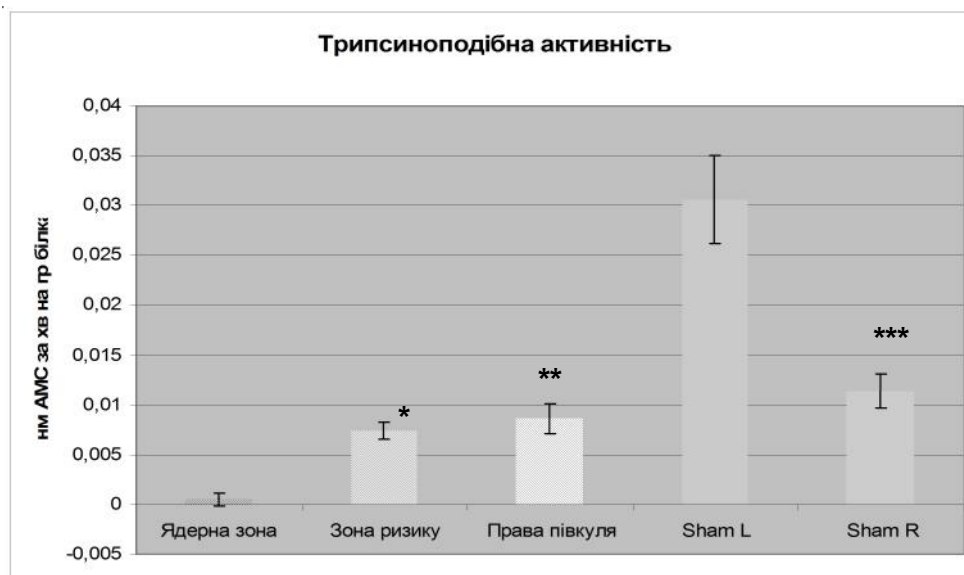


Рис. 1. Динаміка трипсиноподібної активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного інсульту. АМС - 7-аміно-4-метилкумарин. \*  $P < 0,05$  ядерна зона порівняно з зоною ризику, \*\*  $P < 0,05$  ядерна зона порівняно з контролем, \*\*\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

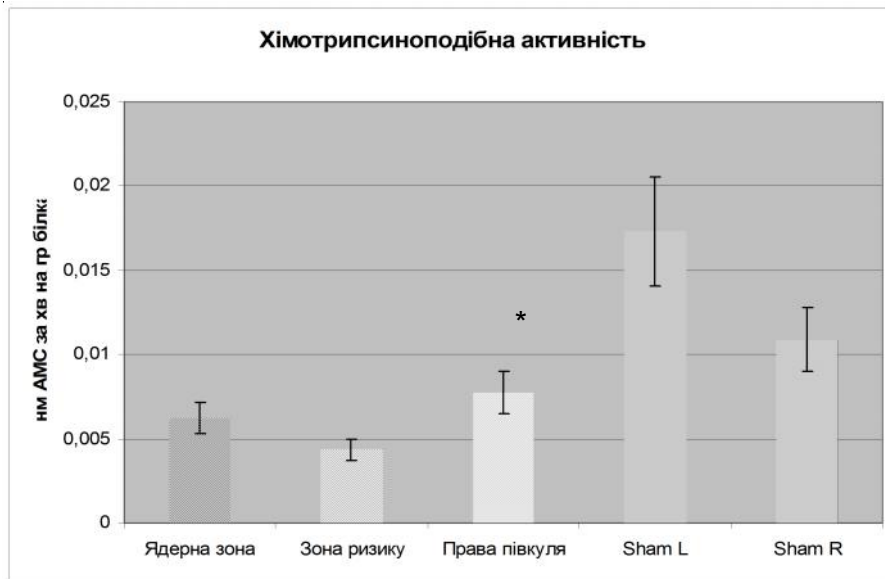


Рис. 2. Динаміка хімотрипсиноподібної активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного інсульту. АМС - 7-аміно-4-метилкумарин. \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

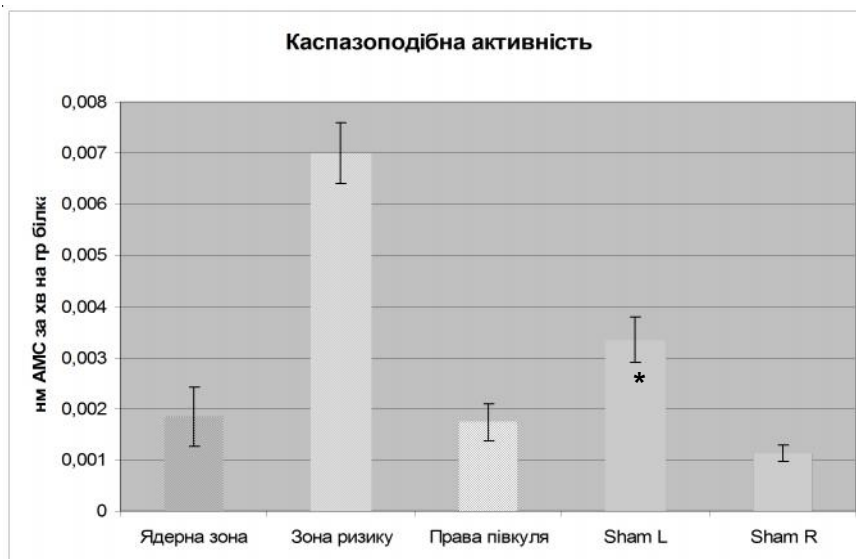


Рис. 3. Динаміка каспазоподібної активності протеасоми в тканинах мозку при моделюванні ішемічного інсульту. АМС - 7-аміно-4-метилкумарин. \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

рази порівняно з контролем ( $P=0,037$ ), а в порівнянні з зоною ризику достовірно не змінювалась, пептидглутамілпептидгідролазна активність достовірно не змінювалась ні з контролем, ні з зоною ризику.

Що ж до псевдооперованих тварин, то трипсиноподібна активність тканин мозку з лівої півкулі, яка зазнала впливу, вища у 2 рази від правої (контрольної) ( $P=0,0015$ ), хімотрипсиноподібна активність тканин мозку з лівої півкулі в порівнянні з правою достовірно не змінювалась, пептидглутамілпептидгідролазна активність в свою чергу збільшувалась в 2,3 рази ( $P=0,001$ ) (рис. 1, рис. 2, рис. 3).

#### ВИСНОВКИ

1. Детально досліджені зміни протеасомного протеолізу при транзиторної оклюзії середньої мозкової артерії за методикою Koizumi J., et al. (1986) тривалістю 60 хвилин та проведено співставлення між змінами різних видів активностей протеасоми і вираженістю ішемічного ураження, а також показано зниження двох видів протеолітичної активності (трипсиноподібної у 2 рази, хімотрипсиноподібної в 1,2 рази) у тканинах мозку. У псевдооперованих тварин спостерігається підвищення двох активностей (трипсиноподібної у 2 рази та пептидглутамілпептидгідролазної в 2,3 рази).

2. Активність внутрішньоклітинного протеасомного протеолізу суттєво знижується у тканинах мозку при моделюванні транзиторної оклюзії середньої мозкової артерії і може мати патогенетичне значення. Який характер – адаптаційний чи власне патологічний лежить у зміні активності протеасоми в тканинах мозку при ішемії дозволить з'ясувати подальші етапи із застосуванням інгібіторів протеасоми.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Досенко В.Є., Пашевін Д.О., Биць Ю.В., Мойбенко О.О. Зміни активності протеасоми в тканинах аорти при пролонгованому іммобілізаційному стресі // Клінічна та експериментальна патологія.-2005.-Т.4, № 2.-С.32-36.
2. Мищенко Т.С. Лечение мозгового инсульта: на пути к полному использованию возможностей терапевтического окна //Здоров'я України.— 2009.— № 1—2.— С. 12—15.
3. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологии. /П.Ф. Рокицкий // Минск. 1961. – 221 с.
4. Скворцова В.И., Ярыгин В.Н., Ярыгин К.Н., Пирогов А.Ю., Губский Л.В., Р.Т. Таирова, Учваткин А.А., Глушкова Т.Т. «Экспериментальная модель фокальной ишемии мозга у крыс на основе эндоваскулярной микрохирургии» // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. 109, №2, -С. 62-69.
5. Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaia LV, Zagorii Vlu, Moibenko AA: The influence of quercetin on the activity of purified 20S, 26S proteasome and proteasomal activity in isolated cardiomyocytes (Russian). // Biomed Khim, 2006, 52, 138–145.
6. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82:373–428.
7. Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. //Circulation Research. – 2007. – Vol.100. – P.1276–1291.
8. Hu BR, Janelidze S, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon M, Sick TJ, Siesjo BK, Liu CL. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. // J Cereb Blood Flow Metab. – 2001. – Vol.21. – P.865– 875.
9. Liu CL, Ge P, Zhang F, Hu BR. Co-translational protein aggregation after transient cerebral ischemia. // Neuroscience. – 2005. – 134. – P.1273–1284.
10. Pulsinelli W. A. Pathophysiology of acute ischemic Stroke// Lancet. – 1992. – Vol. 339. – P. 533–536.
11. Talelli P., Greenwood R.J. Recurrent stroke: where do we stand with the secondary prevention of noncardioembolic ischaemic stroke? // Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.— 2008.— Vol. 2, N. 5.— P. 387—405.