



УДК 577.152+577.345

## Вплив гемічної гіпоксії на динаміку концентрацій ГФКБ у структурах мозку та сироватці крові щурів

Т.І. Дука<sup>1</sup>, В.І. Чорна<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Університет Джорджа Вашингтона, Вашингтон, США

<sup>2</sup>Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено ефекти дії гемічної гіпоксії на розподіл філаментної та розчинної форм ГФКБ у різних відділах та структурах головного мозку щурів (кора головного мозку, мозочок, гіпокамп, смугасте тіло, середній мозок, вароліїв міст) і сироватці крові щурів. На основі кількісного аналізу вмісту ГФКБ у структурах головного мозку гіпоксичних щурів установлено, що гемічна гіпоксія викликає зміни внутрішньоклітинного вмісту двох форм білка, а також модифікацію їх співвідношення. Це дозволяє припустити не тільки виникнення змін кількості астрогліальних клітин, а й перебудову системи проміжних філаментів астроцитів. Рівень ГФКБ істотно змінювався в усіх мозкових утворах, що досліджуються вже в ранні терміни постгіпоксичного періоду. Спостереження показали, що гемічна гіпоксія неоднаково впливає на експресію нейроспецифічного білка в різних структурах головного мозку щурів. Відмінності в експресії ГФКБ можуть бути викликані регіональними відмінностями астроцитарної клітинної популяції, а також їх внутрішніми особливостями, які визначають вірогідні відповіді на гіпоксичне пошкодження в різних функціонально та морфологічно структурах мозку. Підвищення експресії досліджуваних форм білка можна пояснити посиленням астрогліальної реактивності – особливістю мозку, що виявляється за різноманітних видів патологій ЦНС. Реактивні астроцити в таких випадках зазнають гіпертрофії та характеризуються підвищеним рівнем ГФКБ, що є раннім та вірогідним індикатором астрогліозу. Вміст ГФКБ у сироватці крові статевозрілих щурів, які зазнали гіпоксичного впливу, може свідчити про вихід із пошкоджених астроцитів у кров'яне русло.

*Ключові слова:* астроцитарні проміжні філаменти; імуноферментний аналіз; сироватка крові

## Effect of hemic hypoxia on dynamics of GFAP concentrations in the structures of the brain and blood serum of rats

T.I. Duka<sup>1</sup>, V.I. Chorna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The George Washington University, Washington, USA

<sup>2</sup>Dnipropetrovsk State Agrarian-Economy University, Dnipropetrovsk, Ukraine

This article clarifies the questions on study of hypoxic influence on distribution of filament and soluble forms of GFAP in various structures of the brain (neocortex, cerebellum, hippocampus, striatum, middle brain, pons) and blood of the rats. Quantitative analysis of the contents of GFAP in the brain structures of hypoxic rats has established that hemic hypoxia results in changes in intracellular levels of GFAP forms and also in updating their ratio, which allows one to assume not only a change in astroglial cells, but also testifies to reorganization in the system of intermediate filaments of astrocytes. The level of GFAP substantially changed in all cerebral formations, which was already investigated in the early terms of hypoxic period. Observations showed that hemic hypoxia exerted a varied influence on expression of neurospecific protein in the different structures of cerebrum of rats. Differences in expression of GFAP can be caused by the regional differences in astroglial cellular population, and also their internal features that define the possible answers to hypoxic damage in different functional and morphological structures of the brain. An increase in expression of the investigated form of protein can explain strengthening

Університет Джорджа Вашингтона, 21106 St. NW, Вашингтон, DC 20052, США  
The George Washington University, 21106 St. NW, Washington, DC 20052, USA  
E-mail: tatyana\_duka@gmail.com

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ, 49600, Україна  
Dnipropetrovsk State Agrarian-Economy University, Voroshilov Str., 25, Dnipropetrovsk, 49600, Ukraine  
Tel.: +38-056-374-24-41. E-mail: v-ch-49a@mail.ru

of astroglial reactivity, a feature of the brain that appears in various types of pathologies of the CNS. Reactive asters in such exhibit hypertrophy and are characterized by an increased level of GFAP, which is an early and reliable indicator of astroglial pathology. An increase in expression of the investigated form of protein may be explained by strengthening of astroglial reactivity, a feature of the brain that appears in various types of pathologies of the CNS. The contents of GFAP in the blood of adult rats, as a result of the hypoxic influence received from it, can indicate a release of GFAP from damaged astrocytes in the blood flow.

*Keywords:* astroglial intermediate filaments; ELISA; blood

## Вступ

Гіпоксія як неспецифічний процес супроводжує патологічні стани головного мозку та може вносити значний вклад у їх розвиток. Радіаційна поразка головного мозку також викликає гіпоксичні ефекти, порушує кровопостачання мозку (Moskalev, 1991). Результати експериментів із вивчення впливу іонізуючого випромінювання (дія рентгенівських квантів на гемопротейни та модельні порфірини) свідчать про те, що активні радикали, які утворюються за дії іонізації, впливають на високоспрямлене порфіринове кільце, електронну структуру атома заліза гему, білкову глобулу (Erastov et al., 1991).

Гемічна гіпоксія розвивається, як відомо, в результаті порушення процесу перенесення  $O_2$  кров'ю внаслідок зменшення в ній вмісту гемоглобіну або зниження його спроможності служити переносником  $O_2$ . Характерна особливість гемічної гіпоксії – зменшення кисневої ємності крові. Найменше вивчений тип гемічної гіпоксії, за якого частина гемоглобіну (Hb) перетворюється на метгемоглобін (MetHb). Основна причина розвитку гіпоксії за метгемоглобінемії – зменшення кількості активного Hb, що бере участь у процесі перенесення  $O_2$  від легень до тканин. Дану форму гіпоксії не можна вважати «чистою», оскільки метгемоглобінотворювач не тільки впливає на зниження кисневої ємності крові (що є основною ознакою гемічної гіпоксії), а також може виявляти дію, що пригнічує біологічне окиснення, гальмує синтез дихальних ферментів, викликає зміни дихального ланцюга, у процесах окиснення та фосфорилювання (Gerginova et al., 1979).

Дія гемічної гіпоксії, передусім, проявляється на стані ЦНС, серцево-судинної та дихальної систем, а також на багатьох біохімічних процесах в організмі, що уражають ферментні системи, які захищають гемоглобін від окиснення або каталізують відновлення метгемоглобіну. Реакція організму на гіпоксію, що при цьому розвивається, забезпечується також адренергічною та гіпофізарно-адреналовою системами, які реалізують, неспецифічну відповідь на цей вплив. За гіпоксії в організмі розвивається досить типова картина стадії «тривоги» – загального адаптаційного синдрому, в результаті чого мобілізуються різноманітні механізми захисту, мета яких – посилення неспецифічної резистентності клітин, тканин, організму в цілому до несприятливого впливу на них.

З усіх тканин організму найчутливіші до кисневої недостатності – тканини головного мозку. Пошкодження енергетичного метаболізму, надлишкове вильнення амінокислот, послідовна активація NMDA і K/Q рецепторів на клітинній мембрані, колапс мембранного іонного насоса, збільшення обміну мембран фосфоліпідів – це неповний перелік реакцій, що входять до складу метаболічного каскаду, який індукується гіпоксією мозку (Shimada, 1994). За дії гемічної гіпоксії відзначають високий рівень пероксидації ліпідів, причому з усіх видів гіпоксій за гемічної форми ці процеси відбуваються найінтенсивні-

ше, їх пов'язують із помітною акумуляцією катехоламінів, дефіцитом антиоксидантної системи, зниженням цитохром С активності. Гемічна гіпоксія викликає нейрологічний дефіцит і розлади мнестичних функцій. Астроцити відіграють ключову роль у нормальному функціонуванні мозку, необхідні для активних нейрон-гліальних взаємодій у підтриманні гомеостазу (Miller et al., 2012). Ці функції стають помітними за умов відповіді ЦНС на пошкодження, у тому числі на гіпоксичне (Bakhot et al., 1991). Високий рівень глутамін синтетази виявлений в астроцитах, її ферментативна активність пов'язана зі специфічним глутаматним транспортером, працюючи у комплексі як частина глутамат/глутамін циклу, вони вилучають і проводять детоксикацію надлишкового глутамату, забезпечують нейрональні клітини глутаміном (Sonnwald et al., 1997). Астроцити зберігають глікоген і потенційно можуть забезпечувати лактатом у результаті альтернативного енергетичного субстрату для нейронів у період відновлення для підтримання осмотичного оточення (Schurt et al., 1997). Астроглія продукує різноманітні цитокіни та фактори росту, що функціонують як медіатори імунної та запальної відповіді, можуть супроводжувати як нейротоксичний, так і нейропротекторний ефект. Високий рівень глутатіону, важливого антиоксиданта в ЦНС, виявлений в астроцитах, але не в нейронах. Таким чином, ці астроцитарні можливості та властивості можуть сприяти функціонуванню нейронів або, навпаки, загострювати нейрональну дисфункцію.

Активізація астроцитів характеризується гіперплазією та гіпертрофією клітин із посиленою ГФКБ імунореактивністю, що показано для церебральної ішемії мозку щурів (Kindy et al., 1996). Однак інші дані показують раннє падіння ГФКБ реактивності в областях важкого ішемічного інсульту. Хоча відмінності серед ішемічних моделей, що використовували у багатьох дослідженнях, сприяють розбіжностям і надто суперечливі у виявлених астроцитарних відповідях.

Посилення експресії ГФКБ в областях, які прилягають до області інфаркту, первісно розглядалося винятково як частина формування гліального рубця, що стримує та ізолює інфарктні тканини від непошкоджених тканин мозку та природно інгібує нейритний ріст. Ця точка зору була модифікована у зв'язку зі сприятливими нейропротекторними та детоксикувальними властивостями реактивних астроцитів (Houle, 1992). Проте деякі дослідники вивчали астроцитарні модифікації у період ранньої відповіді (години) ішемічного інфаркту та взаємозв'язок із нейрональною смертю. Yamashita et al. (1996) продемонстрували, що швидка втрата ГФКБ мРНК у центральних ішемічних ділянках прямо відповідає втраті АТР. Таким чином автори досліджень припускають, що зниження експресії ГФКБ може бути результатом астроцитарної дисфункції. Результати застосування моделі реперфузії гіпоксії у мозку щурів і дослідження Martin et al. (1997), проведені з використан-

ням гіпоксі-ішемічної моделі на неонатальних порослятах, показують, що первісно відбувається зниження ГФКБ імунозабарвлення всередині області інфаркту після 10–12 годин відновлення.

Проте точний тимчасовий інтервал зниження ГФКБ імунореактивності не вказаний. Пониження ГФКБ імунореактивності зумовлене реорганізацією ПФ, що відбувається паралельно зниженню мРНК ГФКБ (Duka et al., 2002). Точні механізми між деполімеризацією ГФКБ і наступною втратою імунореактивності, астроцитарною дисфункцією та остаточною смертю астроцитарних клітин ще не відомі. Одна із швидких постішемічних подій – набряк клітин, названий цитотоксичною едемою (Narigi, 1994), що відбувається у перші декілька годин після інсульту та залежить від тяжкості інсульту. Астроцитарний набряк – осмотичний наслідок споживання глутамату, лактату, гідрогену та іонів калію, вивільнених із некротичних клітин – це причина деполімеризації ПФ і втрати ГФКБ імунореактивності. Це доведено із використанням антитіл до епітопів зібраних філаментів. Petito and Halaby (1993) пропонували подібне пояснення для зниження знов синтезованого ГФКБ в активованих астроцитах.

Роль астроцитів, що сприяють нейрональному виживанню та відновленню після мозкового інсульту, позитивна, оскільки вони захищають нейрони від апоптичної / некротичної загибелі в інфарктних ділянках мозку (Duka et al., 2009). Роль нейроглії у процесі набряку цікавить багатьох дослідників. Йдеться, в першу чергу, про відростки астроцитів, що беруть участь у формуванні ГЕБ. За гіпоксичного набряку мозку збільшується обсяг ядер гліальних клітин, збільшується кількість периваскулярних гліоцитів, кількість перинейрональних гліоцитів, навпаки, зменшується. Прийнято вважати, що, порівняно з нейронами, астроцити менш чутливі до гіпоксії. Проте існують також інші дані. За циркуляторної гіпоксії модифікації нейрональних клітин мають вогнищевий характер, а найлабільніші астроцити набрякають уже на третій хвилині (Dong et al., 1999). Розглядаючи патолого-анатомічну картину інфаркту головного мозку, зважають на те, що гліальні клітини в осередку гинуть раніше, ніж нейрони.

Увагу дослідників привертають особливості та реакції елементів астроглії на різноманітні види кисневого голодування. З'ясувалося, що зупинка серця спричинює гіперплазію астроглії у мозку загиблих (Sharma et al., 1992). Давучи морфогістохімічну характеристику ішемічних інфарктів мозку в гострій стадії інсульту у хворих атеросклерозом, відмічали гіпертрофію астроцитів навколо осередку, появу дренажних форм. У підданих гіпобаричній гіпоксії щурів в астроцитах помічали збільшення кількості та розмірів мітохондрій, підвищення вмісту гранул глікогену.

Сигнали, що ведуть до стимуляції синтезу мРНК ГФКБ у пошкодженому мозку – характерна ознака нейронального пошкодження або збудження NMDA рецепторів. Дослідженнями (Steward et al., 1991; Sherwood et al., 2010) доведений зв'язок між гліальною генною експресією та аномальною нейрональною активністю. Гіпоксія-ішемія може також прямо пошкоджувати астроцити та сприяти астроцитарній дисфункції або посилювати активацію ішемічного мозкового пошкодження. Нині це питання залишається невирішеним. Розуміння молекулярних сигналів, що регулюють експресію ГФКБ, удоско-

налеє наші можливості модифікувати астроцитарну відповідь зрілого мозку та мозку, що розвивається, на гіпоксичне пошкодження.

Мета цієї статті – з'ясувати вплив експериментальної гемічної гіпоксії на вміст і перерозподіл філаментної та розчинної форм гліального фібрилярного кислого білка в морфофункціональних структурах головного мозку та сироватці крові щурів.

## Матеріал і методи досліджень

**Об'єкт досліджень** – головний мозок і сироватка крові білих лабораторних щурів і щурів лінії Вістар різного віку. Після декапітації з головного мозку контрольних і дослідних щурів виділяли такі структури: кору великих напівкуль, гіпокамп, смугасте тіло, мозочок, середній мозок і вароліїв міст. Із них отримували білкові фракції для визначення концентрації ГФКБ. Усі операції в роботі з мозком виконували за 0 °С.

Для отримання очищеного препарату ГФКБ використовували білу речовину мозку (аутопсійний матеріал жертв нещасних випадків). Кров відстоювали одну годину за кімнатної температури та центрифугували 20 хв за 3 000 об./хв. Сироватку крові використовували для визначення вмісту ГФКБ.

**Експериментальне моделювання гемічної гіпоксії.** Гемічну гіпоксію моделювали, використовуючи нітрит натрію – класичний метгемоглобінотворювач. Нітрит натрію вводили інтраперитонально у вигляді 2% NaNO<sub>2</sub>, приготовленого на фізіологічному розчині (Duka et al., 2000). Загальна кількість NaNO<sub>2</sub> складала 900 мкг/кг ваги тварини. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі. Ступінь гіпоксії тестували за концентрацією метгемоглобіну в крові щурів методом Евелліна та Меллоя.

**Методи виділення та очищення ГФКБ.** Для виділення та очищення ГФКБ використовували аутопсійний матеріал жертв нещасних випадків через 8–12 годин після загибелі. Перший етап очищення полягав у отриманні фракції збагаченої розчинною формою ГФКБ мозку шляхом диференційного центрифугування (Drozdov et al., 2009). Отриману фракцію, збагачену розчинною формою ГФКБ, використали для подальшого очищення ГФКБ. Наступний етап очищення ГФКБ включав адсорбційну хроматографію, яку проводили з використанням гідроксилапатиту (Sigma, USA) та осадження 30% сульфатом амонію. Хроматографію проводили на колонці об'ємом 10 мл. Збагачену фракцію наносили зі швидкістю V = 8 мл/год. на колонку, урівноважену 0,05 М натрій-фосфатним буфером (pH = 8,0). Після цього колонку промивали 8–10 об'ємами 0,05 М натрій-фосфатного буфера (pH = 8,0). Елюцію ГФКБ проводили 0,1 М калій-фосфатним буфером (pH = 8,0). Вихід білків контролювали спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм. Результати очищення розчинної форми ГФКБ наведено в таблиці.

**Методи ідентифікації молекулярних форм ГФКБ.** Отриману антисироватку до ГФКБ перевіряли на специфічність за допомогою перехресного імуоелектрофорезу та імуноблотингу після електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності додецилсульфату натрію (ДСН).

Таблиця

## Результати очищення розчинної форми ГФКБ

Фракція	Об'єм фракції, мл	Вміст загального білка, мг/мл	Вміст ГФКБ у фракціях, мг/мл
Гомогенат білої речовини мозку людини	45	15,50	0,65
S1 після першого центрифугування	40	5,17	0,64
S2 після центрифугування підкисленого S1	55	1,39	0,00
S3	20	1,89	0,39
Фракція ГФКБ після хроматографії на гідроксил-апатиті та осадження 30% сульфатом амонію	2	0,48	0,41

**Електрофорез у ПААГ за присутності ДСН.** Електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності додецилсульфату натрію ДСН проводили за Леммлі на пластині 180 x 160 x 1 мм. Склад диференціального гелю: 5% Т і 2% С, або 20% Т і 2% С; 0,375 М трис-НСІ буфер (рН = 8,8), 0,1% SDS; 0,025% персульфату амонію, 0,025% ТЕМЕД. У гель із високою концентрацією акриламиду вводили гліцерин в остаточній концентрації 5% для запобігання нерівномірного розбухання гелю під час забарвлення та знебарвлення. Використали диференціальний гель із лінійним градієнтом акриламиду 5–17, 5% і зшивкою 2%. Градієнт створювали за допомогою змішувача. Після заливання обережно нашаровували воду. Полімеризували гель не менше 60 хвилин. По завершенні полімеризації шар води обережно видаляли, промивали поверхню гелю буфером для концентрувального гелю та заливали його. Відстань між нижньою межею концентрувального гелю та дном «кишені» для нанесення зразка складала не більше 15 мм. Склад концентрувального гелю: 3% Т, 2,6% С, 125 мМ трис-НСІ (рН = 6,8), 0,1% ДСН, 0,025% ТЕМЕД, 0,025% персульфат амонію. Після закінчення полімеризації проби вносили в лунки (загальна концентрація білка на одну лунку не перевищувала 100 мкг). Зразки розчиняли у буфері такого складу: 62,5 мМ трис-НСІ буфер (рН = 6,8), 2,3% ДСН, 10% гліцерин, 0,05% бромфенолового синього, 100 мМ дитіотрейтолу. Як електродний буфер використано розчин, що містить 0,025 М трис-НСІ (рН = 8,3), 0,192 М гліцин, 0,1% ДСН. Електрофорез проводили за 15 мА до проходження барвником гелю з метою зниження можливої конвекції під час входження білка в гель; після цього – за 25–30 мА до підходу зони барвника до нижнього краю гелю. Після закінчення електрофорезу гель фіксували 12,5% ТХУ. Забарвлення проводили розчином Кумассі R-250 за загальноприйнятою методикою.

**Імуноблотинг.** Імуноблотинг (різновид імуноферментного аналізу) вперше запропонований Towbin, як метод, що дозволяє проводити реєстрацію антигенів, поділених ДСН-електрофорезом у поліакриламідному гелі (ПААГ), за допомогою мічених антитіл. Після розподілу білків електрофорезом у ПААГ за присутності ДСН гелі обережно поміщали у прилад для блотингу з графітовими електродами на заздалегідь змочені буфером для перенесення на листи хроматографічного паперу. Для електроперенесення використали буферний розчин такого складу: 0,025 М трис, 0,192 М гліцин, 20% мета-

нол та 4М сечовина. Для поліпшення перенесення високомолекулярних поліпептидів до буфера вносили ДСН (до 0,1%). Перенесення здійснювали на нітроцелюлозний папір за умов струму 250 мА, напруги – 60 V, протягом 1,5 години.

Для визначення молекулярної маси ділянку з маркерними білками після розподілу в ПААГ і перенесення на нітроцелюлозну мембрану (НЦМ) забарвлювали 0,1% спиртовим розчином амідно-чорного. Після закінчення електрофорезу нітроцелюлозну мембрану промивали чотири рази по 10 хв забуферним фізіологічним розчином (ЗФР) (рН = 7,2) для вилучення надлишку ДСН і метанолу. Вільні місця зв'язування блокували 5% БСА (Sigma, USA) або 10% розчином сухого молока.

Виявлення антигенів на нітроцелюлозній репліці проводили непрямим методом. Нітроцелюлозу упродовж 12 годин за 4 °С інкубували з антисироваткою проти ГФКБ у розведенні 1 : 500. В інкубаційне середовище вводили твін-20 до 0,1% і 1% альбумін для ослаблення неспецифічного зв'язування. Після ретельного промивання (6 разів по 10 хв) НЦМ інкубували з антитілами проти імуноглобулінів кролика, мічених пероксидазою хрому (у розведенні 1 : 3000) за 37 °С упродовж 1,5 години. Після промивання репліку блота поміщали у розчин субстрату: 5 мг 3,3-діамінобензидину (ДАБ) (Sigma, USA) в 0,1 М трис-НСІ (рН = 7,4, 20 мл) із 70 мкл 3% перекису водню на 5–10 хвилин. Після проявлення смуг реакцію зупиняли, ретельно промиваючи НЦМ водою. Для посилення пероксидазної активності в субстрат вводили іони кобальту. Це сприяло також зміні кольорів пофарбованих смуг із коричневого на чорний або синій.

Антисироватку до ГФКБ тестували методом імуноблотингу.

**Отримання фракції цитоскелетних білків методом диференціального центрифугування.** Мозок після декапітації шурів ділили на кору великих півкуль, гіпокамп, смугасте тіло, мозочок, середній мозок, вароліїв міст. Фракції цитоскелетних білків отримували методом диференціального центрифугування.

**Методика непрямого неконкурентного імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення ГФКБ у фракціях мозку.** Імуноферментне визначення форм ГФКБ у фракціях мозкових структур проводили у два етапи. Перший етап – інгібування антигеном антитіл у рідкому середовищі. Другий – взаємодія суміші, що прореагувала на першому етапі, із сорбованим на твердій фазі антигеном. Анти-ГФКБ імуноглобуліни, які зв'язалися, виявляються після цього за допомогою вторинних протидивових антитіл, кон'югованих пероксидазою хрому.

Планшети для імуноаналізу (Медполімер, Санкт-Петербург) сенсibiliзували 18 годин за 4 °С фракцією, збагаченою розчинною формою ГФКБ після хроматографії на гідроксилапатиті в 0,05 М Na-карбонатному буфері (рН = 9,6). Після триразового промивання 0,01 М Na-фосфатним буфером з 0,15 М NaCl і 0,05% твін-20 (рН = 7,4, ЗФР + Тв), вільні центри зв'язування, що залишалися, блокували 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в ЗФР упродовж однієї години за 37 °С, а після цього планшети тричі промивали ЗФР + Тв. Усі реагенти у цих і наступних операціях вносили в об'ємі 100 мкл у кожен лунку. Екстракти відділів мозку, що досліджено, у кінцевому розведенні інкубували про-

тягом години за 37 °С у пробірках із моноспецифічною антисироваткою до ГФКБ. Після цього суміш із пробірок переносили в лунки сенсibilізованого планшета та інкубували 18 годин за +4 °С. Після триразового промивання планшета ЗФР + ТВ у лунки вносили вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому (Sigma, США) у розведенні 1 : 4 000 та інкубували 1,5 години за 37 °С.

Досліджено екстракти антисироватки до ГФКБ і пероксидазні кон'югати розводили забуференим фізіологічним розчином, що містить 0,05% твін-20. Після інкубації планшети промивали ЗФР + ТВ і додавали в кожну лунку по 100 мкл 0,05% розчину ортофенілендіаміну (Sigma, США) з 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,1 М цитратно-фосфатному буфері (рН = 5,0).

Реакцію зупиняли через 15 хв додаванням 50 мкл 40% сірчаної кислоти. Оптичну щільність продуктів реакції вимірювали на мікроридері «Діагност» за довжини хвилі 492 нм. Калібрувальну криву будували, використовуючи як стандарт збагачену розчинну форму ГФКБ (Берингер Манхейм, Німеччина). Вміст ГФКБ виражали в мкг/г тканини та мкг/мг загального білка.

**Умови проведення ІФА для визначення ГФКБ у сироватці крові.** Планшети для ІФА (Costar, USA) сенсibilізували очищеним ГФКБ у 0,05 М натрій-карбонатному буфері (рН = 9,6) у розведенні 1/80 об'ємом 100 мкл у кожну лунку упродовж 18 годин за +4 °С. Від білка, який не зв'язався, звільнювались триразовим промиванням сольовим 0,1 М натрій-фосфатним буфером (рН = 7,2), що містив 0,05% Твін-20 (промивний буфер). Незайняті активні центри зв'язування на планшеті блокували бичачим сироватковим альбуміном у 0,1 М натрій-фосфатному буфері (рН = 7,2) і знову тричі промивали.

Проби сироватки крові в кінцевому розведенні 1/16 інкубували упродовж години за 37 °С у пробірках із моноспецифічною антисироваткою до ГФКБ у кінцевому розведенні 1/2 000.

Суміш проби, що досліджували, з антисироваткою до ГФКБ після попередньої інкубації вносили в лунки сенсibilізованого антигеном планшета та інкубували упродовж 2 годин за 37 °С. Після триразового промивання планшетів у лунки вносили по 100 мкл антитіл до імуноглобулінів кролика, кон'югованих із пероксидазою хрому у розведенні 1 : 500 та інкубували протягом години за 37 °С. Після триразового промивання у лунки вносили по 100 мкл субстратної суміші для пероксидази: 0,05% ортофенілендіамін з 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у цитратно-фосфатному буфері (рН = 5,0). Через 15 хвилин реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 40% сірчаної кислоти. Оптичну щільність вимірювали на мікроридері КАИ-Ц-01 за довжини хвилі 492 нм. Для побудови калібрувального графіка використовували очищений нами ГФКБ, а також ГФКБ із мозку бика (Берингер Манхейм, Німеччина). Чутливість методу – 1 нг/мл.

**Метод визначення вмісту метгемоглобіну в крові шурів.** Концентрацію метгемоглобіну (MetHb) визначали методом Евелліна та Меллой. До 10 мл фізіологічного розчину додавали 0,2–0,3 мл крові, взятої на цитраті натрію, центрифугували за 3 000 об./хв упродовж 20 хв. До отриманого відстою додавали 6 мл дистильованої води та залишали на 30–60 хв для гемолізу еритроцитів. Після цього до отриманого гемолізату додавали 4 мл

0,1 М фосфатного буфера (рН = 6,8) та центрифугували за 6 000–7 000 об./хв упродовж 20 хв.

Прозорий гемолізат зливали та ділили на дві рівні порції, в одну з яких відразу ж додавали 5 мг сухого K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] і залишали на 10 хв. Кожну з порцій фотометрували за довжини хвилі 630 нм до і після додавання до них розчину ціаніду. Як контрольний розчин використано дистильовану воду та дистильовану воду, яка містила 5 мг сухого K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. У результаті одержували величини E<sub>1</sub> (оптична щільність проби, що містить MetHb у тій концентрації, в якій він був у крові), E<sub>2</sub> (оптична щільність проби, в якій весь наявний MetHb перейшов у форму MetHbCN), E<sub>3</sub> (оптична щільність проби, в якій вміст MetHb складає 100%) і E<sub>4</sub> (оптична щільність проби, в якій весь MetHb перейшов у форму MetHbCN). Розрахунок відносної кількості MetHb проводили за формулою:

$$\frac{E_1 - E_2}{E_3 - E_4} 100: \text{MetHb}\%.$$

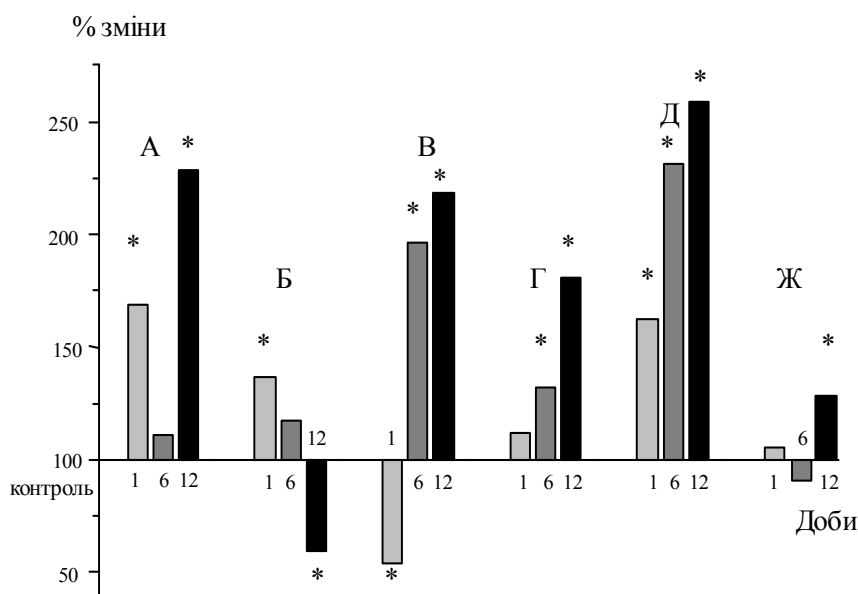
Визначення загального білка у фракціях мозку проводили методом Лоурі (Lowry et al., 1951) і Бредфорд (Gotham et al., 1988). Як стандарт використали сироватковий альбумін бика на відповідному буфері.

Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням програми Statistica 8.0. Відмінності між вибірками вважали вірогідними за P < 0,05.

## Результати та їх обговорення

**Вплив гемічної гіпоксії на розподіл філаментної та розчинної форм ГФКБ у структурах головного мозку шурів.** Із метою визначення впливу експериментальної гемічної гіпоксії на систему проміжних філаментів астроцитів проведено імуноферментне дослідження форм ГФКБ у структурах головного мозку гіпоксичних шурів. Викликана в результаті уведення нітриту натрію гемічна гіпоксія спричинювала підвищення вмісту у крові метгемоглобіну. Його рівень склав 25–28%, що свідчить про розвиток у шурів гемічної гіпоксії середньої тяжкості.

Аналізуючи дані про вміст філаментної форми ГФКБ у результаті дії гемічної гіпоксії в головному мозку дорослих шурів, слід зазначити, що рівень досліджуваного білка істотно змінювався в усіх досліджуваних мозкових утвореннях. Особливо чітко це виявилось на 12-ту добу (рис. 1). Привертає увагу те, що встановлені зрушення в цілому мають подібний характер у різних структурах головного мозку. Закономірність змін експресії даного нейроспецифічного білка у динаміці постгіпоксичного періоду виявляється у вірогідному та планомірному збільшенні концентрації ГФКБ, починаючи з перших етапів спостережень (через 24 години) при зіставленні з контролем. Привертає увагу той факт, що найвиразніші зрушення виявлені у тканині кори головного мозку, в мозочку та середньому мозку. У цитоскелетній фракції фронтальної кори вміст ГФКБ збільшувався через 24 години з 10,6 ± 1,38 мкг/г тканини до 17,9 ± 0,71 (Δ +69,3%), згодом на 12-ту добу – до 24,0 ± 1,18 (Δ +128,8%). Зміни концентрації досліджуваного білка в середньому мозку, мозочку та смугастому тілі згодом на 6-ту добу були дещо більшими, ніж у корі головного мозку. Приріст вмісту ГФКБ у цей період спостережень складав 31,9, 131,3 та 96,3% відповідно.



**Рис. 1. Вплив гемічної гіпоксії на зміни філаментної форми ГФКБ (% від контролю) в головному мозку щурів:**  
 А – кора головного мозку, Б – гіпокамп, В – смугасте тіло, Г – середній мозок, Д – мозочок, Ж – варолієв міст;  
 \* – вірогідна відмінність від контрольних значень ( $P < 0,05$ )

Зміни рівня гліального фібрилярного кислого білка у смугастому тілі та гіпокампі мали інший характер. Особливість для смугастого тіла полягала у зниженні концентрації ГФКБ через 24 години на 46,1% із наступним його істотним підвищенням через 6 діб з  $37,9 \pm 1,24$  до  $74,4 \pm 2,74$  ( $\Delta +96,3\%$ ), через 12 діб з  $43,1 \pm 3,66$  до  $94,6 \pm 6,60$  ( $\Delta +119,1\%$ ). Особливість зрушень концентрації білка, що досліджується, для гіпокампа полягала у тому, що за умов підвищення його вмісту через одну добу постгіпоксичного періоду на 36,6%, у подальшому відбувалося вірогідне зниження концентрації ГФКБ і через 12 діб цей показник знизився на 40,2%.

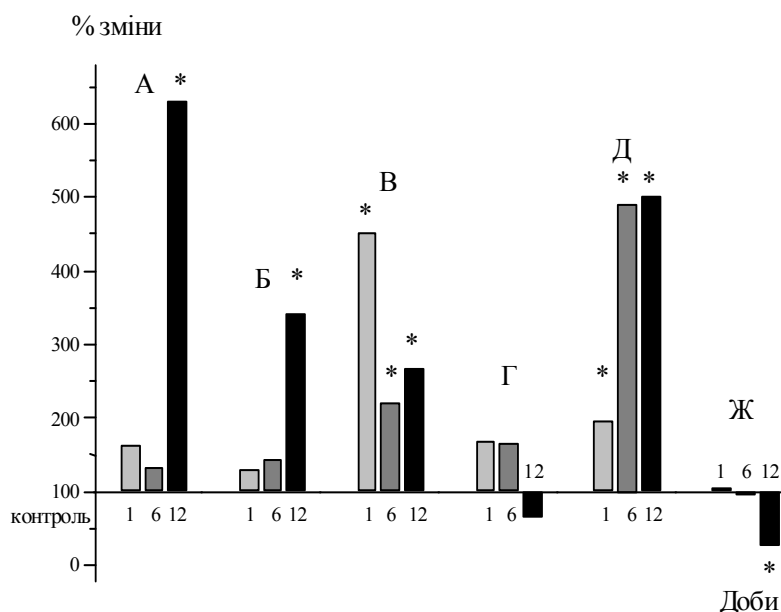
Закономірність змін концентрації розчинної форми ГФКБ мала дещо інший характер (рис. 2). Оцінюючи її, необхідно підкреслити, що в різних структурах головного мозку вона була неоднаковою. Подібний характер із філаментною формою ГФКБ мали зміни розчинної форми білка в гіпокампі та мозочку гіпоксичних щурів. У мозочку (рис. 2) через 24 години вміст розчинного ГФКБ достовірно підвищувався з  $6,3 \pm 0,46$  до  $12,4 \pm 1,50$  мкг/г тканини ( $\Delta +96,5\%$ ). На 6-ту добу постгіпоксичного періоду параметр істотно зростав порівняно з контрольними значеннями (приріст склав 391,1%). У пізні терміни (через 12 діб) рівень ГФКБ зростав із  $10,0 \pm 1,63$  до  $50,3 \pm 2,76$  ( $\Delta +400,2\%$ ). Аналогічні зміни виявлені в гіпокампі гіпоксичних щурів, де приріст вмісту ГФКБ на 12-ту добу постгіпоксичного періоду склав 240,6%. Зміни вмісту розчинного ГФКБ у смугастому тілі через 24 години були дещо чіткішими, ніж у всіх інших досліджених структурах мозку. Приріст вмісту ГФКБ склав 350,0% у цей період спостережень. Через 12 діб зміни були менш вираженими порівняно з гіпокампом і мозочком.

Особливість зміни рівня ГФКБ у розчинній фракції тканини кори головного мозку гіпоксичних щурів – його істотне збільшення тільки на 12-ту добу спостережень з  $4,5 \pm 0,39$  мкг/г тканини до  $28,5 \pm 1,30$  ( $\Delta +529,5\%$ ) ( $P < 0,001$ ). У варолієвому місті рівень розчинного ГФКБ мав тенденцію до зниження, на 12-ту добу постгіпо-

ксичного періоду концентрація ГФКБ складала  $7,7 \pm 0,64$  ( $\Delta -74,3\%$ ). Аналогічні зміни спостерігали в розчинній фракції, отриманій із тканини середнього мозку. Однак вони, порівняно з варолієвим мостом, були не настільки виражені. Зниження вмісту ГФКБ до 12-ї доби постгіпоксичного періоду досягало  $15,8 \pm 1,49$  мкг/г тканини, що було вірогідно нижче за контрольні показники (на 34,3%).

**Вплив гемічної гіпоксії на вміст ГФКБ у сироватці крові щурів.** Визначення антигенів мозку має практичне значення для оцінки деяких ланцюгів патогенезу пошкодження нервової системи. В організмі в нормі відсутня імунологічна толерантність до мозкової тканини, яку гематоенцефалічний (ГЕБ) бар'єр захищає від імунологічного конфлікту. У патогенезі низки критичних станів за впливу різних факторів може порушуватись захисна функція ГЕБ, внаслідок чого виникає фізіологічна неадекватність проникливості бар'єрних утворень, що сприяє проникненню НСБ у кров. Цікавий і той факт, що гіпоксичні ефекти порушують кровопостачання мозку та можуть сприяти порушенню проникності ГЕБ. У зв'язку із цим ми встановили вміст ГФКБ у сироватці крові щурів у динаміці постгіпоксичного періоду.

Аналізуючи дані кількісного визначення нейроспецифічного білка ГФКБ у сироватці крові контрольної групи щурів і щурів, які зазнали дії гемічної гіпоксії (рис. 3), слід відзначити вірогідну різницю в концентрації цього білка. В нормі нейроспецифічні білки практично не виявляються або виявляються у слідовій кількості у сироватці крові. У контрольній групі щурів вміст ГФКБ у сироватці крові складав  $4,25$  нг/мл. Це узгоджується з літературними даними, які зазначають, що у сироватці крові інтактної групи щурів концентрація ГФКБ складає близько  $4$  нг/мл. Вміст досліджуваного астрогліального білка через одну добу після експерименту підвищувався до  $18,5 \pm 0,97$  нг/мл, через 6 діб цей показник складав  $17,3 \pm 0,85$ , через 12 діб рівень ГФКБ продовжував залишатися підвищеним, але не відрізнявся від попередніх досліджуваних строків ( $18,5 \pm 0,93$  нг/мл).



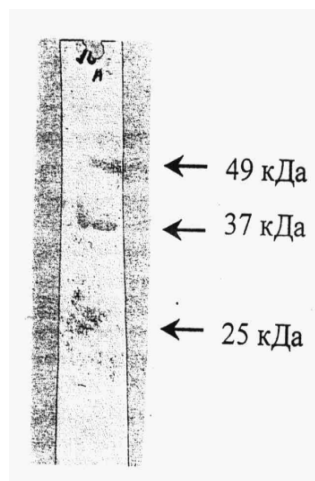
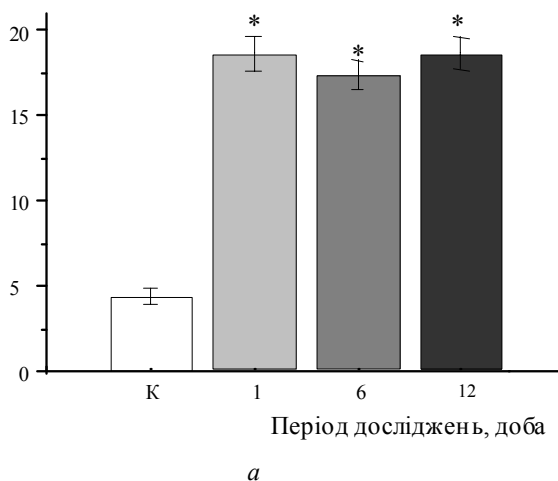
**Рис. 2. Вплив гемічної гіпоксії на зміни розчинної форми ГФКБ (% від контролю) в головному мозку щурів:** А – кора головного мозку, Б – гіпокамп, В – смугасте тіло, Г – середній мозок, Д – мозочок, Ж – варолів міст; \* – вірогідна відмінність від контрольних значень ( $P < 0,05$ )

Іншими словами, аналізуючи дані імуноферментного визначення ГФКБ у сироватці крові щурів, які зазнали впливу гемічної гіпоксії, встановили, що концентрація ГФКБ була підвищеною, а динаміка змін вмісту цього білка не відрізнялася залежно від тривалості постгіпоксичного періоду.

Визначений нами підвищений рівень ГФКБ у сироватці крові гіпоксичних щурів може вказувати на те, що

дія гемічної гіпоксії може бути основним порівняно з іншими фактором у формуванні порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Різний ступінь підвищення концентрації ГФКБ у сироватці крові може бути результатом деструктивних процесів у тканинах мозку; порушення стану центральних нейротрансмітерних систем та зміна функціонування гематоенцефалічного бар'єру може також сприяти елімінації НСБ до кров'яного русла.

Вміст ГФКБ, нг/мл



**Рис. 3. Вміст ГФКБ у сироватці крові щурів (а) та імуноблотинг сироватки крові щурів-самок (б), які зазнали дії гемічної гіпоксії: \* – вірогідна відмінність від контрольних значень ( $P < 0,05$ )**

Розглянемо дві причини, в результаті яких астроцитарний маркер може еліминувати в кров. По-перше, посилення астрогліальної реактивності – особливість мозку, що виявляється також за різноманітних видів патологій ЦНС. У головному мозку неонатальних і дорослих тварин ГФКБ-імунореактивність – надійний маркер астрогліозу, який корелює з ультраструктурними проявами реактивних астроцитів. По-друге, деградація цього білка внаслідок посилення неспецифічного  $Ca^{2+}$ -

залежного протеолізу, в результаті якого утворюються низькомолекулярні деривати, імовірність проходження яких через ГЕБ значно вища, ніж у інтактної форми ГФКБ. Визначено вищу проникність ГЕБ у ембріонів і новонароджених порівняно з дорослим організмом.

Проте підвищений вміст ГФКБ у крові вказує не тільки на модифікацію функціонування ГЕБ і збільшення його проникності, а і на можливі порушення розвитку ЦНС, оскільки астрогліальні клітини модулюють нейро-

нальну диференціацію. Отримані результати підвищеного вмісту ГФКБ у сироватці крові нащадків від опромінених та гіпоксичних щурів свідчать про модифікацію функцій ГЕБ і можливі порушення нервової системи в результаті дії гемічної гіпоксії.

### Висновки

Нітритна метгемоглобінемія середньої тяжкості спричиняє зміни концентрації філаментної та розчинної форм ГФКБ, а також їх співвідношення у структурах головного мозку дослідних щурів. Установлено збільшення філаментної форми ГФКБ у корі головного мозку, в мозочку та середньому мозку в 2,3, 2,6, 1,8 раза відповідно. Зміни концентрації розчинної форми ГФКБ спостерігали в усіх відділах і структурах мозку гіпоксичних щурів.

Установлено наявність ГФКБ у сироватці крові статевозрілих щурів, які зазнали гіпоксичного впливу, що може свідчити про зміни проникності ГЕБ в експериментальних тварин. Отримані результати дозволяють розглядати даний нейроспецифічний білок як маркер оцінки ступеня тяжкості та спрямованості перебігу патологічних станів у головному мозку.

Динаміка змін концентрації ГФКБ у сироватці крові у постгіпоксичний період можливо відбувається або за рахунок посилення експресії цього білка в мозку за дії гемічної гіпоксії, або за рахунок протеолітичної деградації, у результаті якої утворюються низькомолекулярні деривати. Імовірність проходження останніх через ГЕБ значно вища, ніж імовірність проходження через ГЕБ інтактною недеградованою формою ГФКБ. Відмічене зростання вмісту розчинної форми ГФКБ за дії гемічної гіпоксії може бути підтвердженням даної гіпотези.

Аналізуючи дані імуноферментного визначення ГФКБ у сироватці крові щурів, які зазнали впливу гемічної гіпоксії, слід підкреслити, що концентрація ГФКБ була підвищеною, а динаміка змін вмісту цього білка не відрізнялася залежно від тривалості постгіпоксичного періоду. Як показано в низці експериментальних та клінічних досліджень, визначення ГФКБ у сироватці крові та в СМЖ може мати діагностичний характер у випадках пошкодження мозку, в тому числі в разі пошкодження ЦНС плоду та новонародженого.

### Бібліографічні посилання

- Bakhot, C., Armanini, M., Benett, G.L., Wong, W.L., Hansen, S.E., Tavior, R., 1991. Increase in glia-derived nerve growth following destruction of hippocampal neurons. *Brain Res.* 560, 76–83.
- Dong, L., Carolyn, L., Frank, C., Ellison, J.A., Lysko, P.G., Li, K., Simpson, A., 1999. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 68, 29–41.
- Duka T.I., Leshchins'ka, I.A., Chornaya, V.I., 2002. The characteristics of glial fibrillary acidic protein – component of astroglial intermediate filaments. *Biopolym. Cell* 18(3), 179–185.
- Duka, T., Duka, V., Joyce, J.N., Sidhu, A., 2009. Alpha-Synuclein contributes to GSK-3 beta-catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *FASEB J.* 23(9), 2820–2830.
- Duka, T.I., Leschinskaya, I.A., Chernaya, V.I., 2000. Vliyanie gemicheskoy gipoksii sredney tyazhesti na sodержanie NCAM i GFКB v razvivayushchetsya mozge i mozge vzroslykh zhiivotnykh. *Reports of the National Academy of Sciences Ukraine* 4, 164–170 (in Russian).
- Erastov, A.A., Vasin, A.L., Ostrovskiy, A.V., Vainer, E.A., Kadamtseva, M.B., Ponomarev, V.N., 1991. Yzmenenye elektronnykh spektrov porfyrinovykh system pry obluchenyy ymпульsnym elektronnym puchkom. *Radyobyolohiya* 31(6), 900–904 (in Russian).
- Gerginova, M., Hucev, D., Ovanesian, M., 1979. Blood gas. Erythropoietic and pathohistological changes in rat chronic methemoglobinemia models. *Folia Med.* 21(2), 39–43.
- Gotham, S.M., Fryer, P.J., Patterson, W.R., 1988. The measurement of insoluble proteins using a modified Bradford assay. *Anal. Biochem.* 173(2), 353–358.
- Hariri, R.J., 1994. Cerebral edema. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 5(4), 687–706.
- Houle, J., 1992. The structural integrity of glial scar tissue associated with a chronic spinal cord lesion can be altered by transplanted fetal spinal cord tissue. *J. Neurosci. Res.* 31(1), 120–130.
- Kindy, M.S., Bhat, A.N., Bhat, N.R., 1990. Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 13(3), 199–206.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.I., Farr, Z.A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–275.
- Martin, L.J., Brambrink, A.M., Lehmann, C., Portera-Caillau, C., Koehler, R., Rothstein, J., Traystman, P.J., 1997. Hypoxia-ischemia cause abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann. Neurol.* 42(3), 335–348.
- Miller, D.J., Duka, T., Stimpson, C.D., Schapiro, S.J., Baze, W.B., McArthur, M.J., Fobbs, A.J., Sousa, A.M., Sestan, N., Wildman, D.E., Lipovich, L., Kuzawa, C.W., Hof, P.R., Sherwood, C.C., 2012. Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(41), 16480–16485.
- Moskalev, J.I., 1991. Otdalennye posledstviya vozdeystviya yoniziruyushchego izlucheniya [Long-term effects of ionizing radiation]. *Medityna, Moscow* (in Russian).
- Petito, C.K., Halaby, I.A., 1993. Relationship between ischemia and ischemic neuronal necrosis to astrocytes expression of glial fibrillary acid protein. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11, 237–239.
- Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1997. Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: Further *in vitro* validation. *J. Neurochem.* 69(1), 423–426.
- Sharma, H.S., Kretschmar, R., Cervos-Navarro, J., Ermisch, A., Ruhle-H.J., Dey, P.K., 1992. Age-related pathophysiology of the blood-brain barrier in heat stress. *Prog. Brain Res.* 91, 189–196.
- Sherwood, C.C., Duka, T., Stimpson, C.D., Schenker, N.M., Garrison, A.R., Schapiro, S.J., Baze, W.B., McArthur, M.J., Erwin, J.M., P.R., Hof, P.R., Hopkins, W.D., 2007. Neocortical synaptophysin asymmetry and behavioral lateralization in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Eur. J. Neurosci.* 31(8), 1456–1464.
- Shimada, M., 1994. Pathogenesis of hypoxic encephalopathy during pre- and perinatal periods. *No To Hattatsu* 26(2), 111–112.
- Sonnwald, U., Westergaard, N., Schousboe, A., 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21(1), 56–63.
- Steward, O., Torre, E.R., Tomasuo, R., Lothman, E., 1991. Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(15), 6819–6823.
- Yamashita, K., Vogel, P., Fritze, K., Back, T., Hossmann, K.A., Wiessner, C., 1996. Monitoring the temporal and spatial activation pattern of astrocytes in focal cerebral ischemia using *in situ* hybridization to GFAP mRNA: Comparison with *sgp-2* and *hsp70* mRNA and the effect of glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 735(2), 285–297.

Надійшла до редколегії 02.03.2016