

**КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА**

Губкіна

На правах рукопису

ГУБКІНА Олена Анатоліївна

**Вплив стресорних факторів на вміст
нейроспецифічних білків у мозку щурів**

03.00.13. - фізіологія людини та тварин, 03.00.04. - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1997



Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біофізики та біохімії
Дніпропетровського державного університету

Наукові керівники: доктор біологічних наук, професор
В. О. Березін
кандидат біологічних наук, доцент
Є. О. Лепьохін

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор
Неруш П. О.

Офіційні опоненти.

1. Доктор біологічних наук
Масюк А. І.
2. Доктор біологічних наук
Федоров О. М.

Провідна установа: Інститут фізіології
ім. О. О. Богомольця НАН України

Захист дисертації відбудеться "17" березня 1997 р. о 14.00
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.01.10 при Київському
університеті імені Тараса Шевченка за адресою: 252022, м. Київ,
пр. Глушкова, 2, НДІ фізіології Київського університету імені
Тараса Шевченка, кімн. 503.

Відгуки на автореферат дисертації надсилати за адресою:
252022, м. Київ, вул. Володимирська, 64.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Київського
університету імені Тараса Шевченка за адресою: 252033, Київ-33,
вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий Всього 1997 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Гушинець Г. П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В межах сучасної теорії стресу будь які фактори, які загрожують гомеостазу організму, розглядаються як стресори, а сукупність процесів, які ініціюються стресорами в організмі, визначають як стрес (Johnson E. O., 1992). В комплексі факторів стресорного впливу на організм людини особливе місце займають хронічні низькодозові радіаційні дії, які стали невід'ємним компонентом довкілля в багатьох регіонах внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, а також емоційно напружені ситуації, які набувають хронічного характеру внаслідок глобальних соціально-економічних перетворень в СНД.

Ситуація, що склалася, значною мірою вимагає дослідження механізмів дії малих доз іонізуючого випромінювання та емоційного стресу на організм, а також пошуку засобів ефективного захисту від вищезгаданих факторів (Кекелідзе З. И., 1996; Коган Б. М., 1996; Горбань Є. М., 1996; Кудяшева А. Г., 1996; Гончаренко Е. Н., 1996).

На наш погляд, особливий інтерес становить дослідження дії стресорів на організм, який розвивається, оскільки погроза гомеостазу на певних, так званих, "критичних" етапах онтогенезу, значною мірою змінює компенсаторні можливості дорослої особини (Науменко Е. В., 1990). Одним з прикладів такого роду ефектів є дія підвищеної концентрації фенілаланіну на мозок, що розвивається.

Центральною ланкою регуляції гомеостазу є центральна нервова система (ЦНС). Її реакція на згадані вище стресорні дії супроводжується зміною збудливості окремих утворень мозку (Неруш П. А., 1991; Liang C. L., 1992), обміну медіаторів в різних ділянках мозку (Gogman A. L., 1993; Hommes F. A., 1991; Masuda M., 1993), модифікацією спорідненості або зміною кількості рецепторів до нейротрансмітерів (Hommes F. A., 1991; Липшиц Р. Х., 1989; Тайц М. Ю., 1992), змінами на рівні поведінки (Неруш П. А., 1991; Lou H. C., 1985). Будь який з визначених вище феноменів може супроводжуватись кількісними змінами нейроспецифічних білків, зокрема молекули адгезії нервових клітин (МАНК), оскільки для неї вказана участь в регуляції активності ферментів медіаторного обміну (Acheson A., 1988), виникненні тимчасової погеніації (Luthi A., 1994), фор-

муванні умовних рефлексів (Сретер Н., 1994; Doyle E., 1992). Важливо відзначити, що функціональні зрушення в ЦНС відбуваються не лише внаслідок міжнейрональних взаємодій. Функціональна активність нейронів в більшості випадків визначається їхньою взаємодією з гліальними клітинами, зокрема з астроцитами (Ройтбак А. И., 1993). Участь останніх у різного роду фізіологічних та патологічних процесах в ЦНС пов'язана з реорганізацією проміжних філаментів цих клітин, що супроводжується кількісними змінами нейроспецифічного білка, який утворює ці філаменти - гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) (Eddleston M., 1994; Liu W., 1994). Стан МАНК-залежної міжклітинної адгезії та проміжні філаменти астроглії при стресах різного генезу практично не досліджені.

За нашим припущенням зміни в системі МАНК-залежної міжклітинної адгезії та реорганізація проміжних філаментів астроглії є ланками в низці реакцій центральної нервової системи на різні за природою та механізмом дії на організм стресори. Ми припускаємо також, що у мозку тварин, в різному ступені стійких до стресу, закономірності зміни вмісту МАНК та ГФКБ повинні різнитися, якщо не якісно, то, до певної міри, кількісно.

В плані модифікації ефектів іонізуючої радіації певний інтерес становить електромагнітне випромінювання надзвичайно високочастотного діапазону (ЕМВ НВЧ). У деяких випадках ЕМВ НВЧ сприяє дотриманню або відновленню гомеостазу організму, зокрема знижує пошкодуючу дію іонізуючого випромінювання (Беляев И. Я., 1989; Девятков Н. Д., 1983). В той же час вплив довготривалого опромінення в цьому діапазоні на нервову систему, як центральну ланку регуляції гомеостазу, практично не досліджений. Тому оцінка дії ЕМВ НВЧ на нервову систему є надзвичайно актуальною.

Емоційний стан організму може бути значною мірою модифікований різними фармакологічними засобами. До останніх належить нейролептик рисперидон, який успішно застосовується для усунення різних психотичних станів (Keck P. E., 1995; Lombroso P. J., 1995).

Мета роботи - оцінити впливи низькодозового рентгенівського випромінювання, емоційно напруженої ситуації та підвищеної концентрації феніланіну у крові на кількісні зміни ней-

роспецифічних білків, а саме ГФКБ і МАНК, а також оцінити можливості корекції викликаних стресором змін за допомогою нейролептичного засобу респеридону та ЕМВ НВЧ.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

1) виділити та очистити нейроспецифічні білки ГФКБ та МАНК з мозку людини та щура;

2) отримати моноспецифічну антисироватку до ГФКБ для імунохімічного визначення цього білка в екстрактах тканини мозку;

3) вивчити вплив рентгенівського випромінювання у малих дозах та ЕМВ НВЧ на вміст ГФКБ у мозочку, середньому і довгастому мозку щурів;

4) дослідити особливості зміни вмісту ГФКБ та МАНК у смугастому тілі, гіпокампі і середньому мозку щурів з високою та низькою руховою активністю у "відкритому полі" при емоційному стресі та дії респеридону;

5) вивчити динаміку вмісту ГФКБ та МАНК під час постнатального розвитку мозку щурів за умов експериментальної гіперфенілаланінемії.

Основні положення, які виносяться на захист.

1. Доведена придатність поліклональної антисироватки до ГФКБ, отриманої в результаті імунізації кролів препаратом очищеного білка, для використання в імунохімічних методах аналізу.

2. Встановлена схожість ефектів ЕМВ НВЧ та рентгенівського випромінювання у малих дозах на обмін проміжних філаментів астроглії при роздільному опроміненні та антагонізм дії цих видів випромінювання при їх послідовній дії ЕМВ НВЧ - рентген.

3. Показана залежність ефектів емоційного стресу і нейролептика респеридону на вміст ГФКБ і МАНК у смугастому тілі, гіпокампі і середньому мозку щурів від рухової активності цих тварин у "відкритому полі".

4. Встановлено порушення експресії ГФКБ та МАНК під час постнатального розвитку мозочка щурів в умовах експериментальної гіперфенілаланінемії.

Наукова новизна та практичне значення роботи.

1. Вперше показано, що зміни в системі МАНК-залежної міжклітинної адгезії та реорганізація проміжних філаментів астроглії є компонентами реакції організму на дію стресорів різної природи.

2. Вперше продемонстрована подібність ефектів низькоінтенсивного ЕМВ НВЧ та низькоінтенсивного рентгенівського випромінювання на метаболізм білка проміжних філаментів астроглії ГФКБ.

3. Встановлено модифікуючий вплив ЕМВ НВЧ на ефекти низькодозового рентгенівського випромінювання.

4. Вперше показано, що ефект емоційного стресу і рisperidonу на вміст нейроспецифічних білків ГФКБ та МАНК у смугастому тілі, середньому мозку і гіпокампі шурів залежить від їх рухової активності у "відкритому полі".

5. Вперше встановлено, що підвищення концентрації фенілаланіну на ранніх етапах постнатального розвитку приводить до зміни постнатальної динаміки ГФКБ та МАНК в мозочку шурів.

Практичне значення роботи.

1. Одержана антисироватка до ГФКБ може бути використана у клініці для імунохімічної діагностики захворювань ЦНС;

2. Дані відносно впливу ЕМВ НВЧ та рентгенівського випромінювання на проміжні філаменти астроцитів та глюкозу сироватки крові можуть бути використані при розробці комплексних заходів щодо захисту населення від хронічних радіаційних впливів, а також мають бути враховані при плануванні роботи з джерелами ЕМВ НВЧ на радіаційно забруднених територіях.

3. Вивчення впливу емоційного стресу та психотропного засобу рisperidonу на ГФКБ та МАНК у мозкові було проведено у відповідності з угодою на дослідження з підрозділом Janssen research Foundation фірми Janssen Pharmaceutica NV (Бельгія).

Апробація роботи. Основні положення дисертації були представлені та обговорені на: підсумкових наукових конференціях ДДУ (1993-1995), 1-му Міжнародному з'їзді "Гормони, мозок і нейропсихофармакологія" (Родос, 1993), спеціальній конференції ФЕБС з біологічних мембран (Хельсінки, 1994), 15-

й конференції Міжнародного нейрохімічного товариства (Киото, 1995), 2-му з'їзді радіобіологів України (Дніпропетровськ, 1995).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 наукових праць.

Об'єм та структура роботи. Дисертація викладена на 124 сторінках машинописного тексту і складається з вступу, трьох розділів (огляд літератури, методики, результати дослідження та їх обговорення), узагальнення та висновків. Список літератури вміщує 249 назв російською, українською та іноземною мовами. Дисертація ілюстрована 12 таблицями і 19 малюнками.

Всі результати, які представлено і обговорено, отримані автором безпосередньо.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на щурах лінії Вістар масою 170-200 г, а також статеві незріліх щурах тієї ж лінії віком 5, 14, 22, 28 і 35 днів після народження.

Рентгенівське опромінення здійснювали на установці РУМ -17 за умов: напруга 150кВ, сила струму 6мА, фільтр Al 3.0 мм, опромінюване поле 20*20 (см²). Тварин опромінювали протягом 8 діб по 0.774 мКл/кг при потужності дози 0.64 *10⁻⁴ мА/кг. Су-марна доза складала 6.192 мКл/кг (24Р).

Джерелом ЕМВ НВЧ був стандартний генератор сигналів Г-141, який працював у режимі частоти, що коливається, (діапазон 38-53 ГГц), середня щільність потоку потужності - 70 Вт/м². Опромінення ЕМВ НВЧ проводили локально і починали за 15 діб до рентгенівського опромінення. У наступні 8 діб здійснювали комбіноване опромінення у послідовності ЕМВ НВЧ-рентген.

Емоційно-стресовий стан (ЕСС) формували згідно з моделлю Ведяєва (Ведяев Ф. П., 1983). Для оцінки інтегративної діяльності ЦНС використовували тест "відкритого поля" (Воронина Т. А., 1982) та методику вироблення умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) (Bures J., 1963)

Моделювання гіперфенілаланінемії проводилося згідно Matsuo K. (Matsuo K., 1988).

Нейролептик рисперидон був наданий фірмою Janssen Research Foundation (Бельгія). Ін'єкції рисперидону починали на фоні емоційно-стресового стану, що сформувався, і здійснювали

протягом 14 діб у дозі 0.4мг/кг маси тіла. Дозу було обрано таким чином, щоб блокувати серотонінергічні рецептори другого типу (5HT₂) та практично не зачіпати дофамінергічні рецептори (D₂) (Schotte H., 1989)

Антисироватку до ГФКБ одержували шляхом імунізації кролів препаратом очищеного згідно з методикою (Недзвецкий В. С., 1986) ГФКБ з мозку людини (аутопсійний матеріал жертв нещасних випадків через 8-12 годин після загибелі). Використовували схему імунізації, яка є модифікацією методу Харбоу та Інгільд (Аксельсен Н., 1977). Специфічність одержаної сироватки тестували методами перехресного імуноелектрофорезу (Березин В. А., 1987) та імуноблотингу (Stott D. J., 1989).

Для кількісного визначення ГФКБ і МАНК спочатку проводили послідовну екстракцію тканини мозку буферами такого складу: розчинна форма ГФКБ - буфер А (25 мМ трис-НСІ, рН 7.4, 1 мМ етілендіамінтетраацетат (ЕДТА), 2 мМ 2-меркаптоетанол, 0.2 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ); МАНК - буфер А, який вміщує 2% Тритон Х-100; філаментна форма ГФКБ - буфер А, який вміщує 4М сечовину. ГФКБ та МАНК у одержаних екстрактах визначали методами ракетно-лінійного імуноелектрофорезу (Березин В. А., 1987) та імуноферментного аналізу (Ibsen S., 1983)

Для кількісного визначення ГФКБ використовували антисироватку, одержану як було вказано вище. МАНК визначали за допомогою моноспецифічної антисироватки, охарактеризованої раніше (Krivko I. M., 1993).

Вміст загального білка в екстрактах мозку шурів проводили за методом Bredford M. (Bredford M., 1976). Концентрацію глюкози в сироватці крові визначали глюкозооксидазним методом (Trinder P., 1969) з використанням діагностичних наборів фірми "Коhe" (Фінляндія).

Оцінку статистичної вірогідності даних проводили на основі U-критерію (Вілкоксона-Манна-Уїтні) (Гублер Е. В., 1973), а також τ -критерію (Колодяжний В. І., 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристика антисироватки до гліального фібрилярного кислого білка

Антисироватку до ГФКБ тестували методом перехресного імуоелектрофорезу та імуноблотінгу. При застосуванні перехресного імуоелектрофорезу антисироватка, яка тестується, дає один преципітат при використанні в якості антигену як екстракту мозку людини, так і екстракту мозку щура, одержаних внаслідок екстракції тканини мозку буфером, що містить 4М сечовину. На блотограмі ця антисироватка інтенсивно фарбує поліпептид, який за молекулярною масою відповідає недеградованому ГФКБ.

Таким чином, одержана антисироватка високо специфічна до ГФКБ і може бути застосована в імунохімічних методах аналізу.

Вплив стресорних факторів на ГФКБ та МАНК у мозку.

Перш ніж перейти до викладення результатів дослідження впливу різних стресорів на ГФКБ та МАНК у мозку, ми вважаємо за необхідне зупинитися на нашому підході до оцінки отриманих даних. Відомо, що стресори значно впливають на обмін білків у мозку (Палладин А. В., 1973) та модифікують властивості біомембран (Барабой В. А., 1982). Останнє позначається на екстрагуванні мембранних білків (МАНК) та асоційованих з мембранами цитоскелетних структур (ГФКБ). А тому в тих випадках, коли в екстрактах тканини мозку тварин, які підлягали дії стресогенних чинників, змінювалась концентрація загального білка, оцінка зміни вмісту індивідуального білка проводилась у мкг/мл відповідного екстракту. Якщо кількість загального білка була на рівні контрольних величин, оцінювали зміну питомої концентрації досліджуваного білка (мкг індивідуального білка/мг загального білка). Останнє дозволяє згладити флуктуації концентрації індивідуального білка, які виникають через складність відтворення процедури екстракції від зразка до зразка.

Вміст загального білка в тканині мозку значно зростає впродовж постнатального розвитку. Щоб ліквідувати артефакти, пов'язані із зміною вмісту відмінних від ГФКБ та МАНК білків у

процесі онтогенезу, ми аналізували паралельно зміни питомої концентрації (мкг/мг загального білка) цих білків із змінами їх концентрації (мкг/мл).

Положення рівноваги біосинтез ГФКБ \rightleftharpoons деградація ГФКБ оцінювали на основі визначення змін вмісту розчинної та філаментної форм цього білка у відповідних екстрактах.

ГФКБ у мозку щурів при опроміненні ЕМВ НВЧ та рентгенівському опроміненні

Вміст ГФКБ досліджували у відділах мозку, які відповідальні за рівень збудливості ЦНС, а також беруть участь у регуляції вегетативних функцій організму: середньому і довгастому мозку та мозочку.

Для оцінки стресогенності ЕМВ НВЧ та рентгенівського випромінювання ми визначали концентрацію глюкози у сироватці крові. Збільшення концентрації глюкози було відзначено тільки при рентгенівському опроміненні.

Фракціоноване опромінення ЕМВ НВЧ впродовж 23 діб (38-53 ГГц) знижує питому концентрацію розчинної форми ГФКБ у всіх досліджених відділах мозку і не впливає на вміст філаментної форми. В умовах фракціонованого рентгенівського опромінення (сумарна доза 27Р) у мозочку знижується вміст філаментної форми ГФКБ, а в довгастому мозку - обох форм цього білка (рис. 1).

Таким чином, обидва фактори зсувають рівновагу біосинтез ГФКБ \rightleftharpoons деградація ГФКБ в бік останньої. Але рентгенівське випромінювання в порівнянні з ЕМВ НВЧ викликає більш значні зміни метаболізму ГФКБ у мозочку і особливо в довгастому мозку, який бере участь у регуляції вмісту глюкози в крові. При цьому за умов рентгенівського опромінення кількісні зміни ГФКБ супроводжуються зростанням концентрації глюкози в сироватці крові, в той час як за умов дії ЕМВ НВЧ такий зв'язок відсутній.

При комбінованому опроміненні ЕМЧ НВЧ+рентген має місце збільшення вмісту філаментної форми ГФКБ не тільки по відношенню до його вмісту при рентгенівському опроміненні, але й по відношенню до контролю.

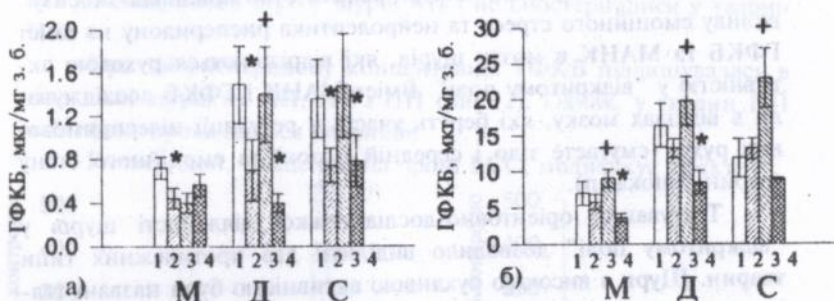


Рис. 1 Питома концентрація ГФКБ ($M \pm m$; $n=4$) у різних відділах мозку щурів при опроміненні ЕМВ НВЧ та рентгенівському опроміненні: а) розчинна форма ГФКБ, б) філаментна форма ГФКБ; М - мозочок, Д - довгастий мозок, С - середній мозок; 1-контроль, 2-ЕМВ НВЧ, 3-ЕМВ НВЧ+рентгенівське випромінювання, 4-рентгенівське випромінювання; * - вірогідно відрізняється від 1 ($p < 0.05$) + - вірогідно відрізняється від 4 ($p < 0.05$)

Визнано, що збільшення вмісту ГФКБ у мозку свідчить про активацію астроцитів у відповідь на різного роду пошкодження (Chiu F. C., 1985; Hatten M., 1991; Chiang C. S., 1993; Eddleston M., 1994). Остання, в багатьох випадках, сприяє компенсації дії пошкоджуючих факторів (Eddleston M., 1994). Оскільки при комбінованому опроміненні вміст глюкози у сироватці крові не змінюється, ми вважаємо, що зростання концентрації ГФКБ є наслідком деяких функціональних зрушень, які були ініційовані в ЦНС опроміненням ЕМВ НВЧ.

Таким чином, опромінення ЕМВ НВЧ, яке передуює рентгенівському опроміненню, модифікує ефекти останнього на проміжні філаменти астроглії та вміст глюкози у сироватці крові: спостерігається антагонізм дії цих видів випромінювання.

Взагалі наведені нами дані свідчать, що реорганізація проміжних філаментів астроглії є часткою відповіді мозку на ЕМВ НВЧ, рентгенівське випромінювання та комбінацію цих видів випромінювання.

Кількісні зміни ГФКБ та МАНК у різних відділах мозку щурів при емоційному стресі та дії рисперидону

Основну увагу в цій частині роботи було приділено аналізу впливу емоційного стресу та нейролептика рисперидону на вміст ГФКБ та МАНК в мозку щурів, які відрізняються руховою активністю у "відкритому полі". Вміст МАНК і ГФКБ досліджували в відділах мозку, які беруть участь у регуляції цілеспрямованих рухів (смугасте тіло і середній мозок) та емоційного стану тварин (гіпокамп).

Тестування орієнтовно-дослідницької діяльності щурів у "відкритому полі" дозволило виділити два протилежних типи тварин. Щури з високою руховою активністю були названі тваринами активної поведінки (АП), протилежний тип - тваринами пасивної поведінки (ПП). Критерієм формування невротичного стану служили прискорене згасання умовної реакції пасивного уникнення та пригнічення орієнтовно-дослідницької діяльності.

Необхідно підкреслити, що згідно одержаних даних порушення орієнтовно-дослідницької діяльності сильніше проявляється у щурів АП у порівнянні з тваринами ПП, що свідчить про різну реактивність в умовах ЕСС.

Вміст ГФКБ і МАНК у середньому мозку, смугастому тілі і гіпокампі щурів з АП не відрізняється значно від такого в відповідних відділах мозку тварин з ПП.

Концентрація філаментного ГФКБ в умовах ЕСС змінюється у середньому мозку щурів ПП (знижена) та гіпокампі тварин АП (підвищена) (рис. 2). Перше, очевидно, є наслідком зміщення рівноваги біосинтез ГФКБ \rightleftharpoons деградація ГФКБ в бік деградації. Крім аналізу філаментних властивостей ГФКБ (Mallock D. A., 1987; Paetau A., 1986), це припущення зроблене на одержаних раніше іншими дослідниками даних про збільшення кількості низькомолекулярних дериватів ГФКБ за умов емоційного стресу (Недзвецкий В. С., 1991; Ушакова Г. А., 1991).

Збільшення вмісту ГФКБ в гіпокампі щурів АП при ЕСС свідчить про наявність пошкоджень в цьому відділі мозку (Hatten M., 1991; Eddleston M., 1994). Одержані нами дані узгоджуються з опублікованими раніше даними про наявність дегенеративних змін у нейронах гіпокампу при емоційному стресі

(Sapolsky R. M., 1987; Uno H., 1989) Важливо відзначити, що зміни вмісту ГФКБ у гіпокампі, котрий бере участь в регуляції емоційного стану тварини, спостерігалися лише у більш чутливих до емоційного стресу шурів АП і не спостерігалися у тварин ПП.

При дії рисперидону концентрація ГФКБ підвищувалась в гіпокампі шурів як АП, так і ПП (рис. 2). Однак, у тварин ПП цей ефект проявляється сильніше.

Рисперидон, уведений на фоні ЕСС, модифікує ефекти

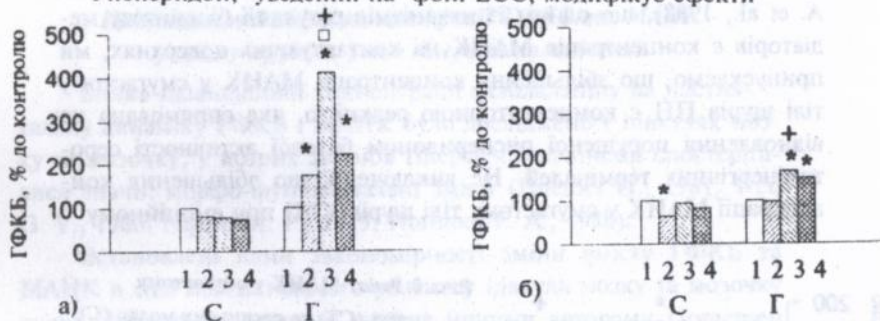


Рис. 2. Вміст ГФКБ у середньому мозку (С) і гіпокампі (Г) шурів за умов емоційного стресу (ЕСС) та дії рисперидону

а) шури активної поведінки, б) шури пасивної поведінки, 1-контроль, 2-ЕСС, 3-ЕСС+рисперидон, 4-рисперидон

*-вірогідно відрізняється від 1 ($p < 0.05$)

+ -вірогідно відрізняється від 2 ($p < 0.05$)

□ -вірогідно відрізняється від 4 ($p < 0.05$)

останнього на метаболізм ГФКБ у середньому мозку шурів ПП: концентрація філаментного ГФКБ збільшується і досягає контрольних величин (рис. 2). Таким чином, у середньому мозку тварин з ПП препарат сприяє відновленню порушеного стресом балансу між біосинтезом та деградацією ГФКБ.

У гіпокампі шурів АП спостерігається синергічна дія стресу та рисперидону. У шурів ПП цей ефект не відмічено (рис. 2).

Вміст МАНК в умовах емоційного стресу зростає в смугастому тілі шурів АП (рис. 3). У тварин цього типу ЕСС викликає також значне зниження рухової активності у "відкритому полі". У шурів ПП не відзначено пригнічення рухової активності за

умов стресу, не виявлено також змін вмісту МАНК у смугастому тілі.

Таким чином, збільшення вмісту МАНК у смугастому тілі є нейрохімічним відображенням зниження рухової активності за умов емоційного стресу.

Введення рisperидону щурам, які не підлягали дії емоційного стресу, приводить до підвищення вмісту МАНК у смугастому тілі тільки щурів ПП. У тварин АП зміни вмісту МАНК у цьому відділі мозку відсутні. Враховуючи відомі дані (Acheson A. et al., 1988), що одним із механізмів регуляції біосинтезу медіаторів є концентрація МАНК на контактуючих поверхнях, ми припускаємо, що збільшення концентрації МАНК у смугастому тілі щурів ПП є компенсаторною реакцією, яка спрямована на відновлення порушеної рisperидоном базової активності серотонінергічних терміналей. Не виключено, що збільшення концентрації МАНК у смугастому тілі щурів з АП при емоційному

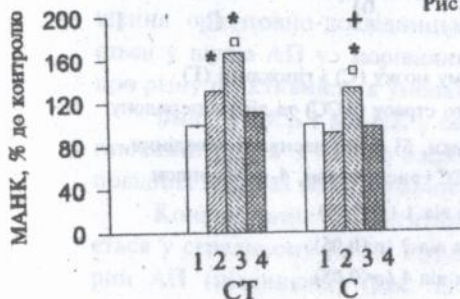


Рис. 3 Вміст МАНК у смугастому тілі (СТ) та середньому мозку (С) щурів активної поведінки при емоційному стресі (ЕСС) та дії рisperидону: 1-контроль, 2-ЕСС, 3-ЕСС+рisperидон 4-рisperидон; * - вірогідно відрізняється від 1 ($p < 0.05$) + - вірогідно відрізняється від 2 ($p < 0.05$) □ - вірогідно відрізняється від 4 ($p < 0.05$)

стресі також є наслідком зміни активності певних провідних шляхів мозку.

В той час, як вміст МАНК у середньому мозку щурів з АП залишається на рівні контрольних величин і при ЕСС, і при введенні рisperидону нестресованим тваринам, дія препарату на фоні емоційного стресу викликає підвищення вмісту МАНК у цьому відділі мозку (рис. 3). Оскільки відомо, що кількість серотонінових 5HT₂-рецепторів у середньому мозку відносно незначна (Абрамянц И. И., 1991), ми припускаємо, що зміна вмісту МАНК у цьому відділі мозку при введенні препарату на фоні

сформованого неврозу може бути пов'язана із зміною чутливості нейронів середнього мозку до серотоніну за умов емоційного стресу (Судаков К. В., 1992).

Таким чином, одержані результати свідчать, що емоційний стрес та рисперидон впливають на вміст МАНК і ГФКБ у різних відділах мозку шурів, а вплив емоційного стресу та рисперидону на ці білки є диференційованим в залежності від рухової активності тварини у "відкритому полі".

Постнатальні зміни концентрації ГФКБ та МАНК у мозку шурів за умов гіперфенілаланінемії

Вплив підвищеної концентрації фенілаланіну на постнатальну динаміку ГФКБ і МАНК було досліджено у півкулях мозку та мозочку, у котрих за умов гіперфенілаланінемії спостерігалися значні морфо-функціональні зміни (Huether G., 1981; Wen G. Y., 1980; Nigam M. P., 1979; Hommes F. A., 1988).

Встановлені нами закономірності зміни вмісту ГФКБ та МАНК в ході постнатального розвитку півкуль мозку та мозочку шурів аналогічні описаним раніше іншими авторами (Jorgensen O. S., 1981; Landry C. F., 1990; Mallock D. A., 1987). Підвищення концентрації фенілаланіну в крові шурів, починаючи з 5-го дня постнатального розвитку, впливає на вміст ГФКБ та МАНК тільки у мозочку. У цьому відділі мозку спостерігається зміна постнатальної динаміки МАНК (рис. 4) та збільшення вмісту ГФКБ на 35-й день постнатального розвитку.

Оскільки дозрівання великих півкуль по відношенню до мозочка відбувається в онтогенезі у більш ранньому віці, ми вважаємо, що критична фаза онтогенезу, в якій фенілаланін впливає на метаболізм ГФКБ і МАНК у півкулях мозку, завершилася або майже завершилася до початку гіперфенілаланінемічного режиму.

Значне збільшення вмісту МАНК, яке припадає на 5-й день постнатального розвитку мозочку контрольних тварин, співпадає у часі з періодом найбільш інтенсивної міграції гранулярних клітин (Jorgensen O. S., 1981; Werz W., 1985). У мутантів *reeler*, які характеризуються значним порушенням міграції клітин, МАНК в онтогенезі з'являється дещо пізніше, ніж у нормальних особин

(Godfraind C., 1988). Тому ми припускаємо, що зростання вмісту МАНК у мозочку при гіперфенілаланінемії проходить у більш

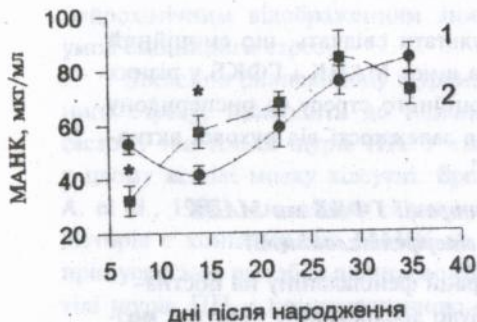


Рис. 4 Постнатальні зміни вмісту МАНК ($M \pm m$, $n=4-6$) у мозочку шурів:
1-контроль,
2-гіперфенілаланінемія,
* - вірогідно відрізняється від контролю ($p < 0.05$)

пізній час у зв'язку з порушенням міграції гранулярних клітин.

Оскільки відомо, що участь МАНК у морфогенезі ЦНС не обмежена тільки регуляцією міграції клітин (Linneman D., 1989; Rutishauser U., 1988), не виключено, що зміна динаміки концентрації МАНК у мозочку, що розвивається за умов гіперфенілаланінемії, може бути пов'язана також з порушенням інших МАНК-залежних процесів. Подібні зміни в системі міжклітинної адгезії цілком можуть приводити до характерного для гіперфенілаланінемії зниження числа синапсів у дорослому мозкові (Bauman M. L., 1982; Nigam M. P., 1979).

Збільшення концентрації ГФКБ на 35-й день постнатального розвитку мозочку в умовах гіперфенілаланінемії, на нашу думку, відображає активацію певних популяцій астроцитів у відповідь на пошкодження хімічним агентом (O'Callagan J. P., 1988). Ми припускаємо, що активація астроглії пов'язана з деструкцією мієліну, оскільки, по-перше, демієлінізація нервових волокон є одним з типових пошкоджень мозку при гіперфенілаланінемії (Alvord E. C., 1950; Vechar M., 1965; Crome L., 1962) і, по-друге, у мутантів жітру, практично позбавлених мієліну, характер постнатальних змін концентрації ГФКБ подібний встановленому нами при гіперфенілаланінемії (Jasie C., 1980).

Таким чином, одержані дані свідчать, що кількісні зміни ГФКБ і МАНК є компонентами реакції мозку, що розвивається, на підвищення концентрації фенілаланіну.

ВИСНОВКИ

1. Поліклональна антисироватка до ГФКБ, одержана в результаті імунізації кролів препаратом очищеного білка, є моноспецифічною і придатна для використання в імунохімічних методах аналізу.

2. Як рентгенівське випромінювання в малих дозах, так і ЕМВ НВЧ викликають зміщення рівноваги біосинтезу ГФКБ \rightleftharpoons деградація ГФКБ в бік деградації, внаслідок чого знижується концентрація розчинної і/або філаментної форми цього білка у середньому, довгастому мозку і мозочку шурів. При цьому у довгастому мозку і мозочку рентгенівське випромінювання, у порівнянні з ЕМВ НВЧ, викликає більш значні зміни метаболізму ГФКБ.

3. Зміни метаболізму ГФКБ при комбінованому опроміненні у послідовності ЕМВ НВЧ+рентген мають протилежну спрямованість у порівнянні із змінами, які викликаються кожним з видів опромінення окремо, а саме відбувається посилення біосинтезу ГФКБ.

4. Емоційний стрес і нейролептик рисперидон диференційовано в залежності від активного чи пасивного типу рухової активності шурів у "відкритому полі" впливають на обмін ГФКБ та МАНК у мозку.

5. Збільшення вмісту МАНК у смугастому тілі є нейрохімічним відображенням порушення рухової активності шурів при емоційному стресі.

6. Нейролептик рисперидон при уведенні інтактним шурам змінює вміст ГФКБ у гіпокампі тварин активної та пасивної поведінки, а також вміст МАНК у смугастому тілі останніх. Однак цей препарат на фоні емоційного стресу регулює обмін ГФКБ у середньому мозку шурів пасивної поведінки, сприяючи відновленню вихідного рівня цього білка.

7. Розвиток мозочка шурів за умов гіперфенілаланінемії супроводжується зміною постнатальної динаміки МАНК. Останнє може бути причиною порушення морфогенезу цього відділу мозку при гіперфенілаланінемії. На відносно пізніх етапах постнатального розвитку у цьому відділі мозку збільшується концентрація ГФКБ, можливо, внаслідок порушення процесу мієлінізації.

8. Зміна метаболізму ГФКБ і МАНК є однією з ланок низки регуляторних процесів, які відбуваються в ЦНС при компенсації зрушень, викликаних стресом у дорослому організмі. Однією з причин незворотніх морфо-функціональних змін у мозку дорослої тварини, які виникли внаслідок стресу на ранніх етапах постнатального розвитку, може бути порушення в системі МАНК-залежної міжклітинної адгезії.

СПИСОК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Е. А. Губкина, А. Е. Кушнир, С. К. Березюк, В. А. Потапов, Е. А. Лепехин. Воздействие низкоинтенсивного электромагнитного излучения в диапазоне крайне высоких частот на животный организм на фоне общего рентгеновского излучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиозекология. - 1996. - Т. 36, № 5. - С. 722 - 726.

2. G. A. Ushakova, H. A. Gubkina, V. A. Kachur, E. A. Lepkhin. Effect of Experimental Hyperphenylalaninemia on the Postnatal Rat Brain// Intern. J. Devel. Neurosci. - 1997 - V 15, № 1. - P. 23-36.

3. G. A. Ushakova, H. A. Gubkina, V. A. Kachur, E. A. Lepkhin. Quantification of NCAM, GFAP and hyaluronate-binding activity in postnatal rat brain during experimental hyperphenylalaninemia // J. Neurochem. - 1995. - V. 65, Suppl. - S. 182.

4. Ushakova G., Gubkina H., Nerush P. NCAM levels in brain of rats subjected to stress and some drugs // 1st International Congress on Hormones, Brain and Neuropsychopharmacology: Abstr. - Rodos, 1993. - 0352.

5. Gubkina H. A., Lepkhin E. A. NCAM and GFAP quantification in experimental rat hyperphenylalaninemia // FEBS Special Meeting Biological Membranes : Abstr. - Helsinki, 1994. - 391.

Губкина Е. А. Влияние стрессорных факторов на содержание нейроспецифических белков в мозге крыс.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.13. - физиология человека и животных, 03.00.04. - биохимия, Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1997.

Защищаются результаты экспериментальных исследований, изложенные и обобщенные в диссертации и 5 опубликованных научных работах. Установлено, что количественные изменения глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) и молекулы адгезии нервных клеток (МАНК) являются звеньями в цепи реакций центральной нервной системы на различные по природе и механизму действия на организм стрессоры. Показано, что влияние эмоционального стресса на ГФКБ и МАНК в мозге крыс зависит от двигательной активности этих животных в "открытом поле". Выдвинуто предположение, что одной из причин необратимых морфофункциональных изменений в мозге взрослых животных, возникших вследствие стресса на ранних этапах постнатального развития, может быть нарушение в системе МАНК-зависимой межклеточной адгезии.

Gubkina H. A. Influence of stressors on the content of some neurospecific proteins in rat brain

Thesis to obtain the candidate of biological sciences on the specialties 03.00.13. - physiology of man and animals, 03.00.04. - biochemistry, Taras Shevchenko Kiev University, Kiev, 1997.

5 Scientific papers and the thesis are defended. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neural cell adhesion molecule (NCAM) quantitative alterations are proved to be the links in the succession of central nervous system reactions on the stressors, differentiated by their nature and mechanism effect on the living organism. Effect of emotional stress on GFAP and NCAM in rat brain is shown to depend on the behavioural activity of the animal in the "open field". The data also suggest that the alterations in NCAM-dependent intercellular adhesion, produced by early postnatal stress, may result in permanent brain dysfunction in adults.

Ключові слова: молекула адгезії нервових клітин (МАНК), гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ), рентгенівське випромінювання, електромагнітне випромінювання надзвичайно високої частоти (ЕМВ НВЧ), емоційний стрес, гіперфенілаланінемія, нейролептик рисперидон.

441073

AB 36.936