

tumor tissues: tPA and uPA. The largest player among the inhibitors of fibrinolysis is the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), involved in the pathogenesis of many cardiovascular diseases, as well as in cancer. The purpose of this study was to detect changes in the content of plasminogen activator tissue type tPA and PAI-1 in the blood plasma of patients with BC at different stages of the disease. The study involved 40 men who were verified with a diagnosis of BC. The content of tPA and PAI-1 in preoperative blood plasma was determined by enzyme immunoassay in ELISA modification. In our study, changes in the tPA and PAI-1 content of the blood plasma at different stages were identified, which can characterize tumor growth and invasion and can supplement existing disease information.

Keywords: bladder cancer, tPA, PAI-1, plasminogenactivation system.

УДК 616.8-003.98; 57.571.27

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.19-25

Ж. Олійник, асп.,
Н. Сенчило, канд. біол. наук,
Т. Довбинчук, канд. біол. наук,
С. Степаненко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
М. Гузик, канд. біол. наук,
Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна НАН України, Київ, Україна

РЕАКТИВНИЙ АСТРОГЛІОЗ У ЩУРІВ ІЗ ЛПС-ІНДУКОВАНОЮ ХВОРОБОЮ ПАРКІНСОНА

Розвиток астрогліозу тривалий час пов'язували із процесами захисту нейронів та реконструкції тканин мозку після його травматичного ураження або перенесеного інсульту. Однак на сьогоднішній день отримані численні докази того, що за певних умов реактивні астроцити можуть посилювати нейрозапалення і брати участь у процесах нейродегенерації. Хвороба Паркінсона (ХП) – одне з найбільш поширених нейродегенеративних захворювань, що становить важливу медико-соціальну проблему. Прогресивний перебіг захворювання потребує безперервної терапії, на пізніх стадіях викликає інвалідизацію пацієнта, що спричиняє необхідність постійного догляду й обумовлює значні економічні втрати. Патолофізіологічні основи ХП залишаються до кінця не з'ясованими, що унеможливило ранню діагностику хвороби, прогнозування її перебігу і розробку патогенетичних методів лікування. Провідним патогенетичним чинником ХП на сьогоднішній день вважається нейрозапалення поліетіологічного генезу, у розвитку якого залучені клітини мікро- та астроглії. При цьому функціональний стан астроглії в умовах розвитку нейропатології залишається найменш вивченим. Метою роботи було дослідження функціонального стану астроглії головного мозку щурів за умов розвитку ХП, індукованої бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС-ХП). Установлено, що розвиток ЛПС-ХП у щурів супроводжується реактивним астрогліозом із надекспресією гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та продуктів його дегградації астроцитами гіпокамальної ділянки головного мозку. Надекспресія GFAP асоційована зі збільшенням рівня основного протеїну мієліну (MBP) у гомогенатах мозку та зниженням рівня нейрональної NO-синтази.

Ключові слова: хвороба Паркінсона, астрогліоз, фібрилярний кислий протеїн, основний протеїн мієліну, нейрональна NO-синтаза.

Вступ. Хвороба Паркінсона (ХП) – прогресуюче мультисистемне захворювання, що залучає дофамінергічну, норадренергічну, серотонінергічну та холінергічну системи, із широким спектром як рухових, так і нерухових (вегетативних, сенсорних, нервово-психічних) проявів [22]. Нині кількість хворих на ХП у світі налічує близько 6 млн осіб. За прогнозами експертів ВООЗ до 2030 року очікується зростання кількості хворих до 9 млн осіб, а до 2050 року – збільшення кількості хворих у чотири рази [2]. Соціальна значущість ХП визначається неухильним прогресуванням хвороби і неминучою інвалідизацією хворих [11].

У зв'язку з таким станом справ привертається увага до необхідності своєчасної діагностики захворювання та ефективного лікування пацієнтів із ХП. При цьому патогномічних симптомів ХП немає. Діагноз встановлюється за сукупністю клінічних проявів, а проведення лікування є виключно симптоматичним [34]. Механізми нейрональної дегенерації в умовах ХП залишаються нез'ясованими, що унеможливило створення патогенетичних лікувальних засобів і розробку патогенетичних методів терапії цієї хвороби. Ключовим аспектом патолофізіології ХП є нейрозапалення, у яке залучена активація астроцитів [15]. Було показано, що позаклітинний α -синуклеїн у високих концентраціях, характерних для ХП, індукує TLR4-залежну запальну відповідь у первинних культурах астроцитів [21].

Астроцити є найбільш численною популяцією гліальних клітин у центральній нервовій системі (ЦНС). Вони становлять близько 60 % нейроглії та є одними із ключових елементів у фізіології нервової системи. Дослідження останніх двох десятиліть переконливо наводять докази щодо значної функціональної гетерогенності астроцитів, локалізованих у різних ділянках мозку

[25]. Виділяють плазматичні астроцити – клітини з короткими, але товстими відростками, які містяться в сірій речовині головного мозку, і волокнисті (фіброзні) астроцити – клітини з тонкими довгими відростками, що містяться в білій речовині ЦНС. Волокнисті астроцити розташовуються між тілом нейрона і кровоносною судиною, а плазматичні – між нервовими волокнами [5, 9]. Функції астроцитів полягають у секреції трофічних факторів, забезпеченні енергетичної підтримки нейронів, регуляції іонного та водного обміну, підтримці гематоенцефалічного бар'єру та участі у синаптогенезі, регуляції функціональної активності інших клітин центральної нервової системи тощо [3, 29, 30].

З'ясування факту функціональної гетерогенності астроцитів дозволяє по-новому поглянути на патогенез захворювань нервової системи. В умовах нейродегенеративних процесів відбуваються реактивні зміни в астрогліальній популяції, які є частиною гліозу – одного з ключових компонентів патогенезу нейродегенеративних захворювань, у тому числі й ХП [6]. Астрогліоз розглядається як тригерний чинник ХП і активно вивчається з використанням численних експериментальних моделей цієї патології [29]. Однак, незважаючи на визнання факту асоціації астрогліозу з розвитком даної патології, його роль у патогенезі захворювання залишається остаточно нез'ясованою. Використовуючи дані, отримані на тваринних моделях ХП, частина дослідників вважають, що активовані астроцити є джерелом медіаторів запалення й у такий спосіб беруть участь у загибелі дофамінергічних нейронів [6, 26, 30]. Інші вважають, що активовані астрогліальні клітини виконують нейропротекторну функцію, забезпечуючи локалізацію запалення, ініційованого запальною активацією мікроглії [26]. При цьому звертається увага на те, що характер акти-

вації астроцитів при нейрозапаленні залежить від типу обраного індуктора хвороби і може відрізнятися залежно від використовуваної моделі хвороби [10].

Особливий інтерес у дослідженнях α -синуклеїнопатій викликають ЛПС-індуковані моделі ХП, оскільки дозволяють найбільш адекватно оцінити запальну компоненту в розвитку захворювання. Ці моделі використовуються у дослідженнях, що стосуються етіології та патогенезу ХП, а також пошуку патогенетичних терапевтичних підходів [13].

Метою даної роботи було дослідження функціонального стану астроглії головного мозку щурів за умов розвитку хвороби Паркінсона, індукованої бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС-ХП).

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар (220-250 г) розведення віварію ДУ "Інститут екології і токсикології ім. Л. І. Медведя НАМНУ". Після рандомізації тварин за вагою вони були поділені на три групи по 10 тварин у кожній: інтактні, хібнооперовані (ХО) та тварини із ЛПС-ХП. Геміпаркінсонізм моделювали шляхом стереотаксичних мікроін'єкцій 10 мкг ЛПС (Sigma, США), розчиненого у 2 мкл стерильного 0,9 % NaCl (ЗАТ "Інфузія", Україна) [18]. Хібнооперованим тваринам вводили 2 мкл стерильного 0,9 % NaCl. Автопсію тварин проводили на 28 добу після моделювання ХП. Розвиток ХП визначали за результатами поведінкових тестів та імуногістохімічного дослідження ступеня руйнування дофамінергічних нейронів substantia nigra за рівнем тирозинової гідроксилази [37]. Фіксацію тканин мозку у щурів для імуногістохімічних досліджень виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації (whole body perfusion) під легким ефірним наркозом. Для цього використовували транскардіальну перфузію гепаринізованим фізіологічним розчином (8 од гепарину/мл 0,9 % розчину NaCl, рН 7,2) об'ємом близько 50-70 мл. Далі проводили перфузію 4 % розчином параформальдегіду у фізіологічному розчині (120-150 мл/щура вагою 200 г). Після перфузії видаляли мозок та фіксували його у 10 % нейтральному формаліні (на фосфатному буфері, PBS, рН 7,2). Фіксовані фронтальні тканини зневоднювали і заключали у парапласт (Leica Surgipath Paraplast Regular). Дегідратацію здійснювали послідовно за допомогою етанолу (від 70 до 100 % розчину етанолу), діоксану, ксилолу, ксилол/парапласту (1 : 1; 37 °С), парапласту (56 °С). Парафінові зрізи головного мозку товщиною 6 мкм виготовляли на мікромомі Thermo Microm HM 360 [8].

Для детекції маркеру астрогліозу – гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) – зразки промивали 4 рази PBS та інкубували 60 хв за кімнатної температури з додаванням FITC-кон'югованих специфічних антитіл (Abscam, Великобританія). Додатково зрізи фарбували флуоресцентним барвником Hoechst-33342 (Sigma) для візуалізації ядра клітин. Оцінку імунофлуоресценції проводили мікроскопіюванням з використанням мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), після чого дані обробляли з використанням програмного забезпечення ImageJ.

Визначення вмісту протеїнів (GFAP, основного протеїну мієліну (MBP, myelin basic protein) та нейрональної NO-синтази, nNOS) у зразках проводили методом Вестерн блот аналізу [23]. Блотинг протеїнів із поліакриламідного гелю (ПААГ) на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Bioscience) проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, Швеція) у буфері для перенесення, що містив: 25 ммоль/л Трис-НСl, рН 8,3, 20 % метанол, 192 ммоль/л гліцин, 0,1 % ДСН (додецилсульфат натрію). По закінченні мембрани промивали дистильованою водою та фарбували 1 % розчином барвника Ponceau S, приготованого на 3 % ТХО (три-

хлороцтовій кислоті) 5-10 хв. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували впродовж 1 год 5 % розчином сухого знежиреного молока (Genesee Scientific Inc., США) у PBS із додаванням 0,1 % Твін 20. Мембрани інкубували по чергову із цільовими первинними антитілами (Abscam, Великобританія), а потім – вторинними антитілами у буфері для блокування протягом ночі при 4 °С із наступним промиванням PBS. Як вторинні антитіла (АТ) використовували антивидові АТ, кон'юговані з пероксидазою хрому (Abscam, Великобританія). Візуалізацію активності пероксидази проводили кольоровою реакцією, використовуючи 3-діамінобензидинтетраглюрид (ДАБ) (Dako Cytomation, Данія). Денситометричний аналіз робили програмним забезпеченням TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), де вміст протеїнів, нормований за рівнем тубуліну, представляли в умовних одиницях (ум. од.). Концентрацію білка у зразках визначали із використанням комерційного набору Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) згідно з інструкцією виробника [24].

Статистична обробка даних проведена відповідно до вимог ДФУ [1]. Для статистичної обробки даних використано програму Statistica v. 10. Результати денситометричного аналізу блотограм представлені у вигляді середнього значення (М) та середнього квадратичного відхилення (\pm SD). Статистична обробка даних виконана з використанням непараметричного U-критерію Манна – Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Введення ЛПС супроводжувалося розвитком геміпаркінсонізму, який реєстрували за прогресивним зростанням швидкості ротаційних рухів тварин в апоморфіновому тесті, що відображає зростаюче ушкодження нейронів чорної субстанції. Шляхом аналізу гістологічних мікропрепаратів фронтальних зрізів головного мозку виявлено дегенерацію нейронів чорної субстанції у дослідних тварин, яку оцінювали за допомогою імуногістохімічного забарвлення антитілами до тирозинової гідроксилази (дані не представлені). За результатами імуногістохімічного аналізу та денситометричного аналізу блотограм у зразках мозку щурів групи ХП встановлено збільшення вмісту GFAP [12]. GFAP є головним імуноцитохімічним маркером астроцитарної глії [14]. Вміст GFAP використовується як специфічний і чутливий молекулярний маркер функціонального стану центральної нервової системи [19]. Кількісне визначення GFAP входить до переліку обов'язкових тестів на нейротоксичність при проведенні доклінічних випробувань лікарських препаратів.

Порівняно з хібнооперованими та інтактними тваринами вміст недеградованого GFAP збільшився у 2 рази при ЛПС-індукованому геміпаркінсонізмі в експериментальних тварин (рис. 1). Вміст низькомолекулярних деградованих поліпептидів GFAP у тварин групи ХП був більшим в 11 разів, ніж у групі ХО щурів, і у 2,2 рази вищим за показник інтактних тварин. Слід зазначити, що рівень деградованих форм GFAP у ХО тварин був значно нижчим, ніж у інтактних щурів. З літератури відомо, що деградація GFAP відбувається в умовах оксидативного стресу і підвищеного рівня реактивних форм кисню, завдяки чому розглядається як ознака запалення і нейродегенеративних процесів, асоційованих із реактивним астрогліозом [4]. Отримані нами результати підтверджують ці літературні дані. Знижений порівняно з інтактними тваринами рівень деградованих форм GFAP у ХО тварин може бути наслідком активації репаративних процесів, викликаних хірургічним втручанням, і пов'язаного з цим посилення процесів скавенджингу (scavenging). Однак підтвердження висловленого припущення потребує додаткових досліджень.

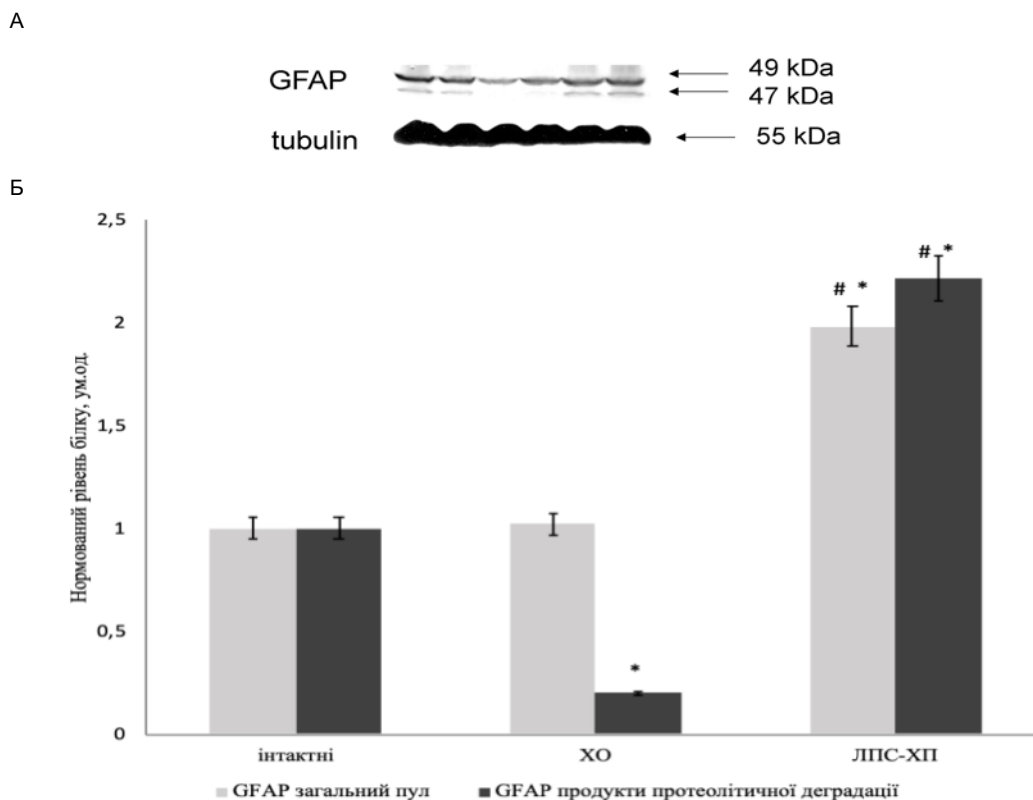


Рис. 1. Вміст GFAP та продуктів його протеолітичної деградації в гомогенатах головного мозку щурів із ЛПС-ХП. А – репрезентативні блотограми; Б – результати денситометрії блотограм ($M \pm SD$), $n = 10$ у кожній групі тварин

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; # – $p \leq 0,05$ порівняно із XO тваринами.

У цілому слід зазначити, що істотне зростання кількості астрогліального маркера запалення та низькомолекулярних поліпептидів GFAP свідчить про перебіг реактивного астроцитозу внаслідок розвитку запальних процесів, індукованих введенням ЛПС. Астрогліоз є характерною патологічною ознакою ХП, важливим підтвердженням розвитку нейрозапальних процесів та адекватності створеної експериментальної моделі [28].

Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку щурів із ЛПС-ХП виявив переважну локалізацію реактивних астроцитів у гіпокампі (рис. 2), у той час як в інших ділянках мозку істотних змін виявлено не було. Отримані дані вказують на те, що саме астроцити гіпокампальної ділянки залучені у розвиток реактивного астрогліозу, асоційованого з розвитком ЛПС-індукованої ХП. З огляду на те, що гіпокамп є важливим органом лімбічної системи і залучений у консолідацію пам'яті [7], можна зробити припущення, що астрогліоз у гіпокампі є важливим компонентом патофізіології когнітивних розладів за умов розвитку ЛПС-ХП.

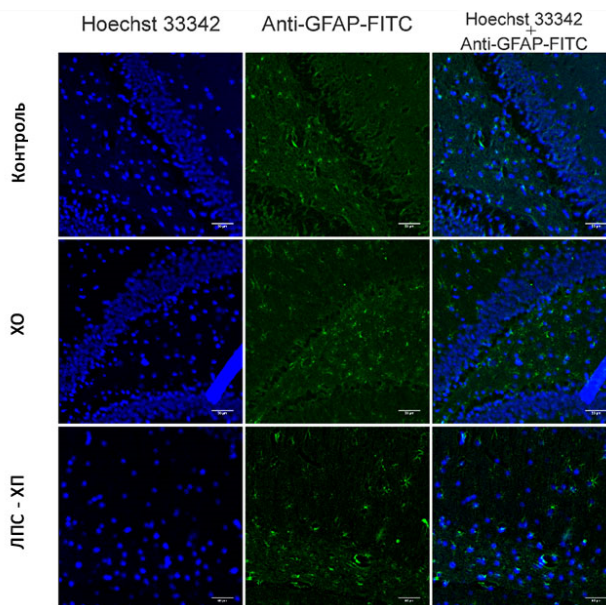


Рис. 2. Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку щурів із ЛПС-ХП (гіпокампальна ділянка), $n = 10$ у кожній групі тварин. Контроль – інтактні тварини; XO – хібнооперовані тварини; 3 – ЛПС-ХП – ЛПС-індукований геміпаркінсонізм. Зрізи оброблені антитілами проти GFAP додатковим фарбуванням ядер Hoechst-33342, конфокальна мікроскопія (шкала масштабу – 50 мкм)

Для оцінювання стану мієлінізації нервових волокон за експериментальних умов розвитку ЛПС-ХП у щурів методом Вестерн-блот аналізу проведено дослідження МВР. МВР відіграє важливу роль в організації, зборці та підтримці структурної цілісності мієліну. Властивості МВР дозволяють пов'язати порушення його метаболізму з розвитком процесу демієлінізації. Визначення кількісного вмісту МВР та його поліпептидного складу у тканині головного мозку використовується для оцінювання ступеня демієлінізації нейронів [36]. Розвиток альфа-синуклеїнопатії супроводжується руйнуванням МВР і процесами демієлінізації [16].

МВР мозку щурів представлений двома функціонально важливими формами, які відрізняються за фізико-хімічними властивостями: високомолекулярними поліпептидами у діапазоні молекулярних мас 95-110 кДа, які є складовими мембран шванівських клітин, і мономерною формою 17 кДа, яка має переважно цитозольну локалізацію. Імунохімічна детекція МВР показала збільшення рівня високомолекулярних поліпептидів у 1,8 раза у тварин із ЛПС-ХП порівняно з інтактними тваринами і в 1,5 раза – порівняно із ХО щурами (рис. 3).

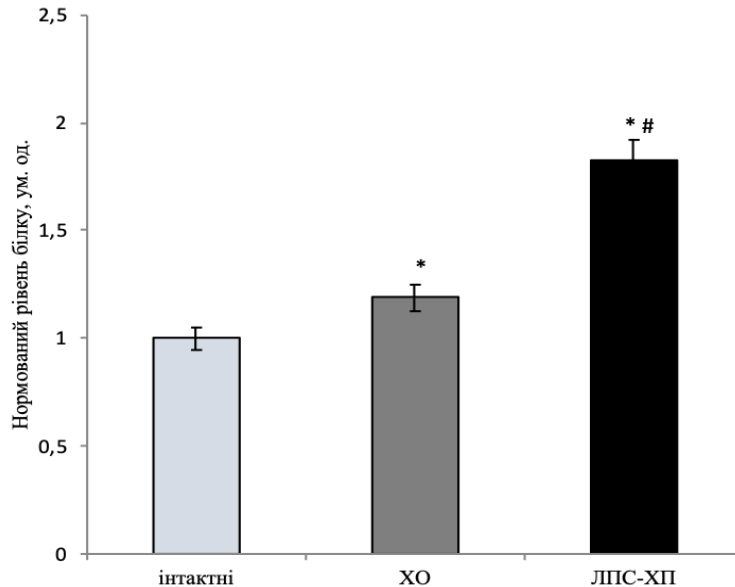


Рис. 3. Результати денситометрії блотограм вмісту МВР у зразках гомогенатів головного мозку щурів із ЛПС-ХП (M ± SD), n = 10 у кожній групі тварин.

Примітки: * – p ≤ 0,05 порівняно з інтактними тваринами; # – p ≤ 0,05 порівняно з хибнооперованими тваринами

Демієлінізація властива пізнім стадіям розвитку ХП. Також доведена здатність МВР викликати проліферацію астроцитів [32]. З огляду на це збільшення вмісту МВР можна розглядати як один із тригерних чинників реактивного астрогліозу в умовах нейрозапалення, викликаного введенням ендотоксину.

NO-синтаза та продукований у результаті її активації NO мають важливе значення у фізіології головного мозку і патофізіології нейродегенеративних процесів. З одного боку, нітрозативний стрес, разом з оксидативним

стресом, є потужними чинниками руйнування дофамінергічних нейронів чорної субстанції. Поліморфізм цього ферменту пов'язують із генетично детермінованою схильністю до розвитку синуклеїнопатій, у т. ч. ХП [38]. З іншого боку, нещодавно виявлена протективна роль NO в умовах розвитку нейрозапалення та його нейротрансміттерна функція, що відіграє важливу роль у когнітивних процесах [6]. Розвиток астрогліозу у тварин із ЛПС-ХП супроводжувався зниженням показника вмісту нейрональної nNOS у 1,2 раза порівняно з інтактними тваринами (рис. 4).

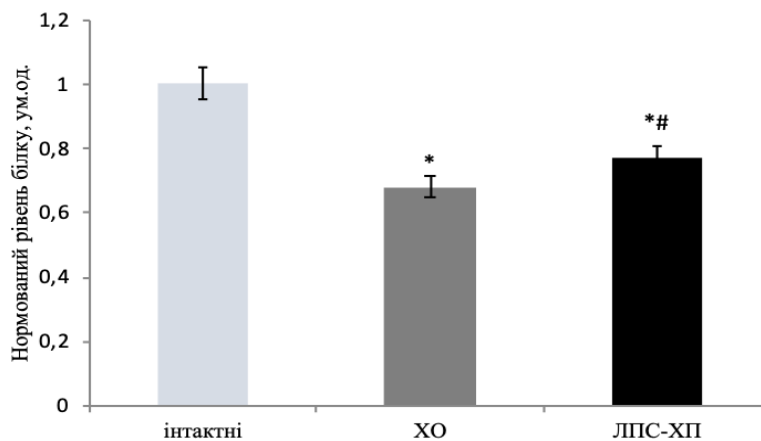


Рис. 4. Результати денситометрії блотограм за показником nNOS у гомогенатах головного мозку щурів із ЛПС-ХП (M ± SD), n = 10

Примітки: * – p ≤ 0,05 порівняно з інтактними тваринами; # – p ≤ 0,05 порівняно з хибнооперованими тваринами

Багато дослідників наголошують на тому, що в нервовій тканині продукований у результаті активації нейрональної NO-синтази NO виконує, перш за все, функції нейромедіатора і відіграє важливу роль у контролі осциляторної активності нейронів та контролі тону судин [39]. З огляду на це зниження вмісту nNOS може бути причиною й ознакою порушення нервової діяльності, властивого розвитку ХП.

Висновок. Розвиток ЛПС-ХП супроводжується реактивним астрогліозом з надекспресією GFAP та продуктів його деградації у головному мозку, найбільше виразним у ділянці гіпокампу. Це явище підтверджує характерну патологічну ознаку перебігу ХП і вказує на виключну роль гіпокампальних реактивних астроцитів у патофізіології ЛПС-ХП. Виразний процес демієлінізації у тварин із ЛПС-ХП корелює зі збільшенням рівня GFAP і засвідчує участь мієліну в астрогліозі.

Список використаних джерел:

1. Статистичний аналіз біологічних випробувань і кількісних визначень // Державна Фармакопея України : у 3 т. / Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – 2-ге вид. – Харків : Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – 2015. – Т. 1. – Розд. 5.3. – С. 840-910.
2. Таппахов А. А. Современные представления об этиологии и патогенезе болезни Паркинсона (обзор) / А. А. Таппахов, Т. Я. Николаева // Вестник Северо-Восточного университета им. М. К. Аммосова. Серия "Медицинские науки". – 2016. – № 2 [03]. – С. 19-27.
3. Andres M. M. Modified western blot technique in fast detection of hemeoxygenase (ho-1/ho-2) in various tissues and organs of experimental animals / M. M. Andres, J. J. Luszczki // *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D. Medicina.* – 2004. – Vol. 59, № 2. – P. 298-302.
4. Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin / G. Baydas, R. J. Reiter, V. S. Nedzvetskii et al. // *J. Pineal Res.* – 2002. – Vol. 33, № 3. – P. 134-139.
5. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures / A. M. Benediktsson, S. J. Schachtele, S. H. Green, M. E. Dailey // *J. Neurosci. Methods.* – 2005. – № 141. – P. 41-53. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.013.
6. Booth H. D. E. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis / H. D. E. Booth, W. D. Hirst, R. Wade-Martins // *Trends Neuroscience.* – 2017. – Vol. 40, № 6. – P. 358-370. doi: 10.1016/j.tins.2017.04.001.
7. Broadbent N. J. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus / N. J. Broadbent, L. R. Squire, R. E. Clark // *PNAS.* – 2004. – Vol. 101, № 40 – P. 14515-14520.
8. Buesa R. J. Complete elimination of xylene in practice of a histology laboratory / R. J. Buesa, M. V. Peshkov // *Arkh Patol.* – 2001. – Vol. 1, № 73. – P. 54-60.
9. Bushong E. A. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development / E. A. Bushong, M. E. Martone, M. H. Ellisman // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2004. – № 22. – P. 73-86. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008.
10. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli / P. A. Carpentier, W. S. Begolka, J. K. Olson et al. // *Glia.* – 2005. – Vol. 49. – P. 360-374.
11. DeMaagd G. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis / G. DeMaagd, A. Philip. – 2015. – Vol. 40, № 8. – P. 504-32.
12. Eng L. F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) / L. F. Eng, R. S. Ghimikar, Y. L. Lee // *Neurochem Res.* – 2000 – Vol. 25, № 9-10. – P. 1439-51.
13. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide / Y. M. Flores-Martinez, M. A. Fernandez-Parrilla, J. Ayala-Davila et al. // *J. Immunol Res.* – 2018. – 2018:1838921. doi: 10.1155/2018/1838921].
14. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role / C. J. Garwood, L. E. Ratcliffe, J. E. Simpson et al. // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2017. – Vol. 43, № 4. – P. 281-298.
15. Gelders G. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease / G. Gelders, V. Baekelandt, A. Perren der van // *J. Immunol Res.* – 2018 – P. 47842-68.
16. Higher Levels of Myelin Phospholipids in Brains of Neuronal α -Synuclein Transgenic Mice Precede Myelin Loss / J. Grigoletto, R. Pukař, A. Gamliel et al. // *Acta Neuropathol Commun.* – 2017 – Vol. 5, № 1. – P. 37.
17. Halliday G. M. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease / G. M. Halliday, C. H. Stevens // *Movement Disorders.* – 2011. – Vol. 26, № 1. – P. 6-17.
18. Hoban D. B. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat / D. B. Hoban // *Brain Behav Immun.* – 2013. – Vol. 27, № 1. – P. 91-100.
19. Hol E. M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system / E. M. Hol, M. Pekny // *Curr Opin Cell Biol.* – 2015. – № 32. – P. 121-30.
20. An Update on the Role of Nitric Oxide in the Neurodegenerative Processes of Parkinson's Disease / F. J. Jiménez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, M. Trinidad Herrero et al. // *Curr Med Chem.* – 2016. – Vol. 23, № 24. – P. 2666-2679.
21. Koprach J. B. Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development / J. B. Koprach, L. V. Kalia, J. M. Brotchie // *Nat Rev Neurosci.* – 2017. – № 18. – P. 515-529.
22. Kordower J. H. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease / J. H. Kordower // *Brain.* – 2013. – № 136. – P. 2419-2431.
23. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.
24. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent / O. H. Lowry et al. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 267-75.
25. Matias I. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease / I. Matias, J. Morgado, F. Carvalho Alcantara Gomes // *Front Aging Neurosci.* – 2019. – № 11 – P. 59.
26. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model / I. Morales, A. Sanchez, C. Rodriguez-Sabate, M. Rodriguez // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 10. e0185989. doi: 10.1371/journal.pone.0185989.
27. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson // Sydney : Academic Press, 1982.
28. Rappold P. M. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease / P. M. Rappold, K. Tieu // *Neurotherapeutics.* – 2010. – Vol. 7, № 4. – P. 413-423.
29. Rappold P. M. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease / P. M. Rappold, K. Tieu // *Neurotherapeutics.* – 2010. – Vol. 7, № 4. – P. 413-423.
30. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury-single cell gene expression / V. Rusnakova, P. Honsa, D. Dzamba et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – 8:e69734. DOI:10.1371/journal.pone.0069734.PMID:23940528.
31. Sofroniew M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // *Acta Neuropathol.* – 2010. – № 119. – P. 7-35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID: 20012068.
32. Myelin basic protein (MBP) and MBP peptides are mitogens for cultured astrocytes / S. A. South, G. E. Deibler, S. F. Tzeng et al. // *Glia.* – 2000. – Vol. 29, № 1. – P. 81-90.
33. Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin / K. Sugaya, S. Chou, S. J. Xu, M. McKinney // *Brain Research Molecular Brain Research.* – 1998. – Vol. 58, № 1-2. – P. 1-9.
34. Effectiveness of multidisciplinary care for Parkinson's disease: a randomized, controlled trial / M. A. Marck der van, B. R. Bloem, G. F. Borm et al. // *Mov. Disord.* – 2013. – № 28 – P. 605-611.
35. Verkhaty A. Physiology of astroglia / A. Verkhaty, M. Nedergaard // *Physiol. Rev.* – 2018. – Vol. 98, № 1. – P. 239-389.
36. Loss of myelin basic protein function triggers myelin breakdown in models of demyelinating diseases / M. T. Weil, W. Möbius, A. Winkler et al. // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 16, № 2. – P. 314-322.
37. Delayed increase of tyrosine hydroxylase expression in rat nigrostriatal system after traumatic brain injury / H. Q. Yan, X. Ma, X. Chen et al. // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 1134, № 1. – P. 171-179.
38. Zhang L. Role of nitric oxide in Parkinson's disease / L. Zhang, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2006. – Vol. 109, № 1-2. – P. 33-41.
39. Zhou L. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications / L. Zhou, D. Y. Zhu // *Nitric Oxide.* – 2009. – Vol. 20, № 4. – P. 223-30.

Reference (Scopus)

1. Статистичний аналіз біологічних випробувань і кількісних визначень. Derzhavna Farmakopeya Ukrainy: v 3-h t. Derzhavne pidpriemstvo "Ukrayinskij naukovij farmakopejnij centr yakosti likarskih zasobiv". – 2-e vid. – Har'viv: Derzhavne pidpriemstvo "Ukrayinskij naukovij farmakopejnij centr yakosti likarskih zasobiv". 2015;1(5.3): 840-910.
2. Tappahov A. A., Nikolaeva T. Ya. Sovremennye predstavleniya ob etiologii i patogeneze bolezni Parkinsona (obzor). Vestnik Severo-Vostochnogo universiteta im. M. K. Amosova. Seriya "Medicinskie nauki". 2016; 2 (03):19-27.
3. Andres M. M., Luszczki J. J. Modified western blot technique in fast detection of hemeoxygenase (ho-1/ho-2) in various tissues and organs of

experimental animals. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina*. 2004; 59 (2): 298–302.

4. Baydas G., Altered, Reiter R. J., Nedzvetskii V. S., Nerush P. A., Kirichenko S. V. Glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin. *J.Pineal Res.* 2002; 33(3):134–139.

5. Benediktsson A. M., Schachtele S. J., Green S. H., Dailey M. E. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci. Methods*. 2005; 141:41–53. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.013.

6. Booth H. D. E., Hirst W. D., Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neuroscience*. 2017; 40(6): 358–370. doi:10.1016/j.tins.2017.04.001.

7. Broadbent N. J., Squire L. R., Clark R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS*. 2004; 101(40):14515–14520.

8. Buesa R. J., Peshkov M. V. Complete elimination of xylene in practice of a histology laboratory. *Arkh Patol.* 2001; 1(73):54–60.

9. Bushong E. A., Martone M. E. and Ellisman M. H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2004;(22):73–86. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008.

10. Carpentier P. A., Begolka W. S., Olson J. K., Elhofy A., Karpus W. J., Miller S. D. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*. 2005; 49:360–374.

11. DeMaagd G., Philip A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis P T. 2015; 40(8): 504–32.

12. Eng L. F., Ghimikar R. S., Lee Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res*. 2000; 25 (9–10):1439–51.

13. Flores-Martinez Y. M., Fernandez-Parrilla M. A., Ayala-Davila J., Reyes-Corona D., Blanco-Alvarez V. M., Soto-Rojas L. O., Luna-Herrera C., Gonzalez-Barrios J. A., Leon-Chavez B. A., Gutierrez-Castillo M. E., Martinez-Davila I. A., Martinez-Fong D. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. *J Immunol Res*. 2018:1838921. doi: 10.1155/2018/1838921].

14. Garwood C. J., Ratcliffe L. E., Simpson J. E., Heath P. R., Ince P. G., Wharton S. B. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017;43(4):281–298.

15. Gelders G., Baekelandt V., Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res*. 2018:47842 – 68.

16. Grigoletto J., Pukaš R., Gamlie A., Davidi D., Katz-Brull R., Richter-Landsberg C., Sharon R. Higher Levels of Myelin Phospholipids in Brains of Neuronal α -Synuclein Transgenic Mice Precede Myelin Loss. *Acta Neuropathol Commun*. 2017; 5(1): 37.

17. Halliday G. M., Stevens C. H. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2011;26(1): 6–17.

18. Hoban D. B. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. *Brain Behav Immun*. 2013;27 (1): 91–100.

19. Hol E. M., Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 32:121–30.

20. Jiménez-Jiménez F. J., Alonso-Navarro H., Trinidad Herrero M., García-Martín E., Agúndez J. A. G. An Update on the Role of Nitric Oxide in the Neurodegenerative Processes of Parkinson's Disease. *Curr Med Chem*. 2016; 23(24): 2666–2679.

21. Koprach J. B., Kalia L. V., Brotchie J. M. Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18: 515–529.

22. Kordower J. H. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*. 2013; 136: 2419–2431.

23. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–685.

24. Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 267–75.

25. Matias I., Morgado J., Carvalho Alcantara Gomes F. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:59.

26. Morales I., Sanchez A., Rodriguez-Sabate C., Rodriguez M. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. *PLoS One*. 2017; 12, (10):0185989. doi: 10.1371/journal.pone.0185989.

27. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press. 1982: 1480.

28. Rappold P. M., Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2010; 7(4): 413–423.

29. Rappold P. M., Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2010; 7(4): 413–423.

30. Rusnakova V., Honsa P., Dzamba D. et al. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury-single cell gene expression. *PLoS ONE*. 2013;8:e69734. doi:10.1371/journal.pone.0069734.PMID:23940528.

31. Sofroniew M. V., Vinters H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119:7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID: 20012068.

32. South S. A., Deibler G. E., Tzeng S. F., Badache A., Kirchner M. G., Muja N., De Vries G. H. Myelin basic protein (MBP) and MBP peptides are mitogens for cultured astrocytes. *Glia*. 2000; 29(1): 81–90.

33. Sugaya K., Chou S., Xu S. J., McKinney M. Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin. *Brain Research Molecular Brain Research* 1998; 58(1-2): 1–9.

34. Van der Marck M. A., Bloem B. R., Borm G. F. et al. Effectiveness of multidisciplinary care for Parkinson's disease: a randomized, controlled trial. *Mov. Disord*. 2013;28:605–611.

35. Verkhtsky A., Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol. Rev*. 2018; 98(1):239–389.

36. Weil M. T., Möbius W., Winkler A., Ruhwedel T., Wrzoc C. et al. Loss of myelin basic protein function triggers myelin breakdown in models of demyelinating diseases. *Cell Rep*. 2016; 16 (2): 314–322.

37. Yan H. Q., Ma X., Chen X., Shao Y., Li L., Dixon C. E. Delayed increase of tyrosine hydroxylase expression in rat nigrostriatal system after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2007; 1134(1):171–179.

38. Zhang L., Dawson V. L., Dawson T. M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;109(1-2): 33–41.

39. Zhou L., Zhu D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 2009; 20(4): 223 – 300.

Надійшла до редколегії 17.01.2019
Отримано виправлений варіант 17.02.2019
Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 17.01.2019
Received a revised version on 17.02.2019
Signed in the press on 17.02.2019

Ж. Олійник, асп.,
Н. Сенчило, канд. биол. наук,
Т. Довбинчук, канд. биол. наук,
С. Степаненко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
М. Гузик, канд. биол. наук
Інститут біохімії ім. А. В. Палладина НАН України, Київ, Україна

РЕАКТИВНЫЙ АСТРОГЛИОЗ У КРЫС С ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

Развитие астроглиоза длительное время связывали с процессами защиты нейронов и реконструкции тканей мозга после его травматического поражения или перенесенного инсульта. Однако на сегодняшний день получены многочисленные доказательства того, что при определенных условиях реактивные астроциты могут усиливать нейровоспаление и участвовать в процессах нейродегенерации. Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое представляет собой важную медико-социальную проблему. Прогрессивное течение заболевания требует непрерывной терапии, на поздних стадиях вызывает инвалидизацию пациента, а также необходимость постоянного ухода и обуславливает значительные экономические потери. Патфизиологические основы ХП остаются до конца не выясненными, что делает невозможным раннюю диагностику болезни, прогнозирование ее течения и разработку патогенетических методов лечения. Основным патогенетическим фактором ХП на сегодняшний день считается нейровоспаление полиэтиологического генеза, в развитие которого вовлечены клетки микро- и астроглии. При этом функциональное состояние астроглии в условиях развития нейропатологии остается наименее изученным. Целью работы было исследование функционального состояния астроглии головного мозга крыс в условиях развития ХП, индуцированной бактериальным липополисахаридом (ЛПС-ХП). Установлено, что развитие ЛПС-ХП у крыс сопровождается реактивным астроглиозом

с надэкспрессией глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и продуктов его деградации астроцитами гипокампального участка головного мозга. Надэкспрессия GFAP ассоциирована с увеличением уровня основного протеина миелина (MBP) в гомогенатах мозга и снижением уровня нейрональной NO-синтазы.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, астроглиоз, фибриллярный кислый протеин, основной протеин миелина, нейрональная NO-синтаза.

Zh. Oliynyk, Ph.D.,
N. Senchylo, Ph.D.,
T. Dovbynchuk, Ph.D.,
S. Stepanenko, stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
M. Guzik, Ph.D.
Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU)

REACTIVE ASTROGLIOSIS IN RATS WITH LPS-INDUCED PARKINSON'S DISEASES

The astrogliosis was considered as a beneficial process to protect neurons and repair the tissue after CNS insult for a long time. However, numerous study indicate that under some specific conditions, reactive astrocytes can exacerbate neuroinflammation and tissue damage. Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases that is a major medical and social problem. The progressive course of the disease requires continuous therapy, in the later stages it causes a disability of the patient, which entails the need for constant care and causes significant economic losses. The pathophysiological bases of CP remain unclear, making it impossible to diagnose the disease early, predict its course, and develop pathogenetic treatments. Neuroinflammation of polyetiological genesis, whose development involves micro- and astroglial cells, is considered to be a leading pathogenetic factor of CP. However, the functional state of astroglia in the conditions of development of this neuropathology remains the least studied. The aim of the study was to investigate the functional state of astroglia in rats with PD induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS-PD). It has been established that the development of LPS-PD in rats is accompanied by reactive astrogliosis with overexpression of glial fibrillar acidic protein (GFAP) and products of its degradation by astrocytes of the hippocampal region of the brain. Overexpression of GFAP is associated with an increase in the level of myelin basic protein (MBP) in brain homogenates and a decrease in the level of neuronal NO synthase.

Keywords: Parkinson's disease, astrogliosis, glial fibrillary acidic protein, myelin basic protein, neuronal NO synthase.

УДК 577.352+57.085.23

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.25-30

К. Чернишенко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Колесник, канд. біол. наук,
М. Веселовський, д-р біол. наук
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ЗАКОНОМІРНОСТІ СПОНТАННОГО КВАНТОВОГО ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ В СИНАПСАХ НЕЙРОНІВ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ ГІПОКАМПА ПРИ ДОВГОТРИВАЛІЙ ДЕПРЕСІЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ

Представлені результати електрофізіологічних досліджень, присвячених аналізу особливостей квантового вивільнення глутамату в синапсах нейронів гіпокампа при довготривалій депресії синаптичної передачі.

Для проведення досліджень використовували первинну культуру гіпокампа щура. За допомогою методики "петч-клемп" у режимі фіксації потенціалу було визначено частоти й амплітуди збуджуючих спонтанних постсинаптичних струмів (сПСС), проаналізовано їхні розподіли та розраховано основні квантові параметри в контролі й за умов довготривалої депресії синаптичної нейропередачі.

Довготривала депресія синаптичної передачі досягалася тетанічною стимуляцією аксона пресинаптичної клітини протягом 5 хв із частотою стимуляції 5 Гц. Спонтанний струм при депресії ресструвався через 20-30 хв після тетанічної стимуляції.

Показано, що при довготривалій депресії синаптичної передачі зменшуються показники амплітудних розподілів сПСС, зареєстрованих у нейронах гіпокампа. Виявлено, що в контролі зазвичай вивільнюються дві везикули нейромедіатора одночасно, а під час довготривалої депресії синаптичної передачі – одна, тобто зменшується кількість спонтанно вивільнених везикул. До того ж зменшилися показники середньої величини кванта та квантового вмісту. Це вказує на вплив пресинаптичних механізмів у експресії довготривалої депресії синаптичної нейропередачі між нейронами гіпокампа в культурі. За умов довготривалої депресії достовірно не було виявлено змін у частоті сПСС.

Аналіз квантових показників при довготривалій депресії глутаматергічної синаптичної передачі між нейронами є важливим для формування більш повних уявлень про механізми, які відіграють фундаментальну роль у нормальному функціонуванні ЦНС і розвитку нейрональних мереж.

Ключові слова: нейрони гіпокампа, синаптична передача, глутамат, квантовий аналіз, довготривала депресія.

Вступ. Синаптична пластичність вважається основним механізмом, що забезпечує процеси пам'яті та навчання, це властивість, яка або збільшує, або зменшує синаптичну силу у відповідь на попередню стимуляцію [1, 2]. Ця властивість виявляється в кожному з глутаматергічних синапсів трисинаптичного шляху гіпокампа і є переважно двонаправленою: якщо в результаті подразнення відбувається зниження синаптичної сили відносно

контрольного значення, то вона називається довготривалою депресією (ДТД) синаптичної нейропередачі. Навпаки, якщо відбувається збільшення синаптичної сили, то це довготривала потенціація (ДТП), яка є функціональною протилежністю ДТД. Крім того, функціональна синаптична пластичність може бути не тільки довготривалою, а й короткотривалою. Короткотривала пластичність може тривати від мілісекунд до декількох