
... КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ ... BRIEF COMMUNICATIONS ...

УДК: 577:576:612.8

Зміна рівня S-100b протеїну у різних відділах мозку піщанок за умов старіння та дії альфа-кетоглутарату
Ю.П.Ковальчук, Г.О.Ушакова

*Дніпропетровський національний університет імені О.Гончара (Дніпропетровськ, Україна)
yulka.kovalchuk.5868152@mail.ru*

Протеїн S-100b найчастіше використовують в якості маркеру астроцитів, особливо за умов мозкового пошкодження (кортикального, ішемічного тощо). В роботі представлено динаміку концентрації протеїну S-100b у мозочку, гіпокампі та таламусі монгольських піщанок з метою визначення референтних даних щодо рівня цього протеїну в головному мозку протягом онтогенезу. Досягнення концентрації даного протеїну до рівня дорослих тварин у мозку піщанок відбувається вже на 30 добу постнатального розвитку (збільшення майже у 4 рази у порівнянні з новонародженими тваринами). В процесі старіння відбувається гіперактивація продукції S-100b у мозочку та гіпокампі, що може свідчити про активацію кальцій-залежних механізмів астрогліозу та гальмування нейрофізіологічних процесів, за які відповідають вказані відділи мозку (а саме координація руху, процеси навчання та пам'яті). Довготривала дієта із застосуванням 2% альфа-кетоглутарату протягом 6 місяців запобігала гіперпродукції S-100b у гіпокампі старих тварин.

Ключові слова: S-100b, мозочок, гіпокамп, таламус, старіння, альфа-кетоглутарат.

Изменение уровня S-100b белка в разных отделах мозга песчанок в условиях старения и действия альфа-кетоглутарата
Ю.П.Ковальчук, Г.А.Ушакова

S-100b белок чаще всего используют в качестве маркера астроцитов, особенно в условиях мозгового повреждения (кортикального, ишемического и т.д.). В работе представлена динамика концентрации S-100b в мозжечке, гиппокампе и таламусе монгольских песчанок с целью определения референтных данных по уровню этого белка в головном мозге в течение онтогенеза. Достижения концентрации данного протеина до уровня взрослых животных в мозге песчанок происходит уже на 30 сутки постнатального развития (увеличение почти в 4 раза по сравнению с новорожденными животными). В процессе старения происходит гиперактивация продукции S-100b в мозжечке и гиппокампе, что может свидетельствовать об активации кальций-зависимых механизмов астроглия и торможении нейрофизиологических процессов, за которые отвечают указанные отделы мозга (а именно координация движения, процессы обучения и памяти). Длительная диета с применением 2% альфа-кетоглутарата в течение 6 месяцев предотвращала гиперпродукцию S-100b в гиппокампе старых животных.

Ключевые слова: S-100b, мозжечок, гиппокамп, таламус, старение, альфа-кетоглутарат.

The S-100b protein level changes in the different brain areas of gerbils at aging and alpha-ketoglutarate effect
Yu.P.Kovalchuk, G.A.Ushakova

S-100b protein is often used as a marker of astrocytes, especially at brain damage (cortical, ischemic, etc.). The paper presents the dynamics of the concentration of S-100b protein in the cerebellum, thalamus and hippocampus of Mongolian gerbils to determine the reference data on the level of this protein in the brain during ontogenesis. The concentration of S-100b protein elevated in the brain to the level of adult animals at 30 days of postnatal development (increase was of almost 4 times compared to newborns animals). At aging hyperactivation of S-100b production was noted in the cerebellum and hippocampus, which may indicate the activation of calcium-dependent mechanism of astrogliosis that lead to inhibition of neurophysiological processes that are provided in these parts of the brain (the coordination of movement, learning and memory). The long-term diet with 2% of alpha-ketoglutarate for 6 months prevents overproduction of S-100b in the hippocampus in older animals.

Key words: S-100b, cerebellum, hippocampus, thalamus, aging, alpha-ketoglutarate.

Вступ

Нейроглія – важлива складова частина нервової тканини, яка пов'язана з нейронами генетично, морфологічно і функціонально. Це комплекс клітинних елементів, що виконують опорну, ізоляційну, трофічну, секреторну і захисну функції. Експериментальні результати підтверджують активну участь гліальних клітин у вищих функціях нервової системи (Ge, Jia, 2015). Астроцити мають фізіологічні та метаболічні властивості, які грають життєво важливу роль у підтриманні нормального гомеостазу та енантіостазу мозку (Kadala et al., 2015). Вони приймають активну участь у нейрональному розвитку та інтеграції мозкових функцій, включаючи напрям росту нейритів, структурну та функціональну підтримку нейронів (Bouzier-Sore, Pellerin, 2013). Астроцити тісно взаємодіють з нейронами, щоб забезпечити структурну, метаболічну та трофічну підтримку, а також беруть активну участь у модуляції збудливості нейронів і нервових імпульсів. Таким чином, функціональні зміни в астроцитах можуть формувати характер взаємодії з оточуючими клітинами, такими як нейрони і мікроглія (Pierozan et al., 2012; Débora et al., 2013). Дисфункція астроцитів сприяє розвитку психіатричних і нейродегенеративних розладів (Zhang et al., 2015). Одним із основних протеїнів астроцитів є S-100b, вперше виявлений Муром (Beharier et al., 2012). Протеїн S-100b розглядають як один із вузлових молекулярних компонентів складних внутрішньоклітинних систем, які забезпечують функціональний гомеостаз клітин мозку шляхом сполучення та інтеграції різних кальцій-залежних метаболічних процесів. Кількісні зміни S-100b на сьогодні розглядаються як маркер мозкового пошкодження (кортикального, ішемічного тощо), при впливі різноманітних факторів на організм, порушення обміну речовин у мозку (Beharier et al., 2012). Характерно, що коливання концентрації S-100b у мозку не завжди супроводжуються помітним погіршенням соматичного стану тварин, але одночасно можуть призводити до різноманітних порушень інтегративної функції мозку залежно від ступеню гіперпродукції цього протеїну. Відомо, що з віком кількість S-100b збільшується, але немає референтних даних стосовно динаміки його рівня в різних відділах мозку як лабораторних тварин, так і людини. Метою нашої роботи було дослідити кількісні показники астроцит-специфічного протеїну S-100b у різних відділах головного мозку піщанок протягом старіння та дії альфа-кетоглутарату.

Методика

Дослідження проводили на 36 піщанках (Mongolian Gerbil). Тварин було поділено на 6 груп за віком (n=6): 1 – новонароджені тварини (1 день), 2 – 30 днів, 3 – 90 днів, 4 – віком 180 днів, 5 – 2 роки, 6 – тварини віком 2 роки з додаванням до стандартного раціону 2% альфа-кетоглутарату протягом 6 місяців. Піщанки знаходилися в стандартних умовах з природною зміною освітлення і дотриманням загальновіварійного раціону. У всіх тварин був вільний доступ до їжі та води. Експеримент проводився згідно з «Положенням про використання тварин в біомедичних дослідках» (Етика лікаря та права людини ..., 2003). Наприкінці експерименту тварин декапітували під слабким наркозом (ізофлуран). З мозку виділяли три відділи: мозочок, таламус і гіпокамп, які в подальшому використовували для отримання білкових фракцій. З метою дослідження S-100b були отримані фракції, що містили цитозольні протеїни, за допомогою диференційного центрифугування (Фоменко та ін., 2011). Вихідний буфер містив трис – 0,25 мМ (pH 7,4), етилендіамінтетраоцет (ЕДТО) – 1 мМ, дитіотрейтол – 2 мМ, фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) – 0,2 мМ, азид натрію (NaN₃) – 3 мМ (вказані реагенти були придбані у Sigma, США). Рівень загального протеїну в отриманих фракціях визначали за методом Бредфорд та виражали у мг/мл (Bradford, 1985).

Вміст S-100b в отриманих фракціях визначали згідно з методикою конкурентного твердофазного інгібіторного імуноферментного аналізу з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл проти S-100b і відповідного високоочищеного стандарту (Sigma, США) (Нго и др., 1998). Отримані результати вимірювали за допомогою ІФА-рідера Anthos 2010 (Фінляндія) при 492 нм. Кількість S-100b виражали в мкг на 100 мг тканини.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакетів прикладних програм «Microsoft® Excel 2000» (Microsoft®), «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc.). Статистична обробка результатів була проведена за t-критерієм Стьюдента. Достовірними вважалися дані при p<0,05.

Результати та обговорення

Дослідження загального пулу протеїнів у цитозольних фракціях, отриманих з різних відділів мозку піщанок, показало зростання цього показника на 30 добу постнатального розвитку у мозочку та

таламусі, на відміну від гіпокампу (рис. 1). Це підтверджує дані про формування даних відділів мозку та активацію анаболічних процесів протягом раннього постнатального розвитку. У гіпокампі зазначено тенденцію до зменшення цього рівня в процесі постнатального розвитку до 90 днів, а на 180 день цей показник знову збільшився, але ці дані не були вагомо достовірними. У таламусі встановлено вірогідне збільшення загального пулу протеїнів протягом 30 днів постнатального розвитку, далі в процесі онтогенезу та старіння значних змін не спостерігалось. З 90 доби постнатального розвитку і до 2 років життя у мозку піщанок відбувається незначне коливання загального пулу цитозольних протеїнів у всіх досліджуваних відділах мозку.

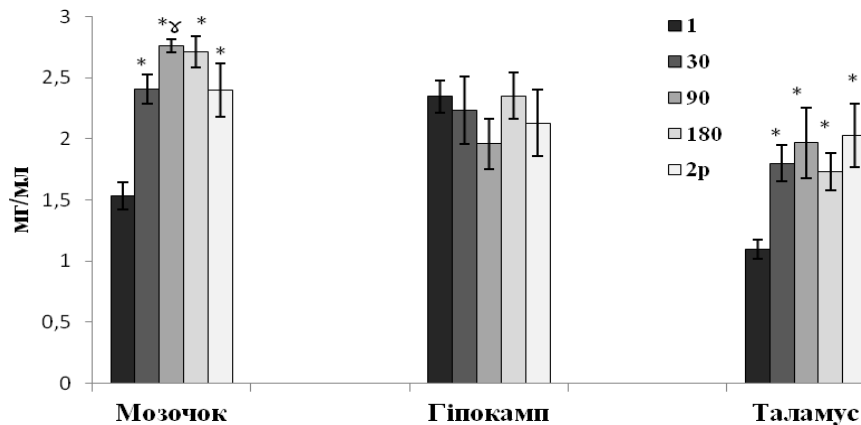


Рис. 1. Рівень загального пулу протеїнів у водорозчинних цитозольних фракціях, що отримані з різних відділів головного мозку піщанок протягом постнатального розвитку та старіння (1, 30, 90, 180 днів та 2 роки життя)

$n=6$, * – $p<0,05$ відносно 1 доби; # – $p<0,05$ відносно 30 доби.

Визначення кількості протеїну S-100b у мозочку, гіпокампі та таламусі піщанок в процесі онтогенезу та старіння показали, що його вміст збільшується майже у 4 рази на 30 день постнатального розвитку у всіх досліджуваних відділах головного мозку (рис. 2).

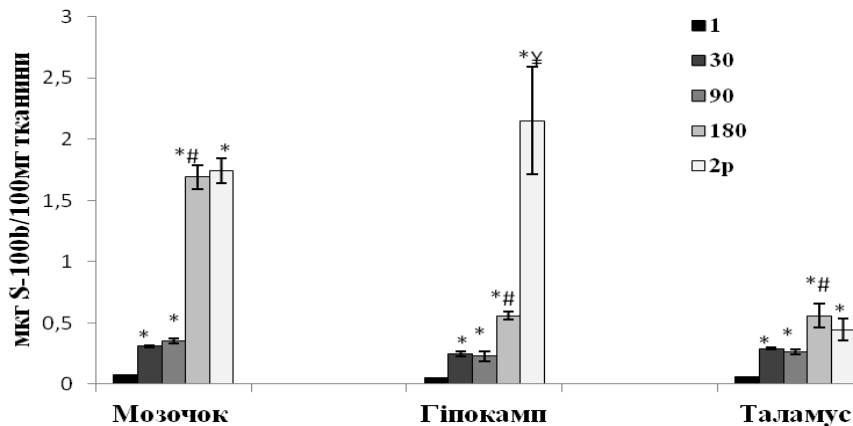


Рис. 2. Вміст протеїну S-100b у різних відділах головного мозку піщанок протягом постнатального розвитку та старіння (1, 30, 90, 180 днів та 2 роки життя)

$n=6$, * – $p<0,05$ відносно 1 дня; # – $p<0,05$ відносно 90 днів, ¥ – $p<0,05$ відносно 180 днів.

Вміст S-100b у мозочку новонароджених тварин становив $0,08\pm 0,003$ мкг/100 мг тканини, у гіпокампі $0,05\pm 0,001$ мкг/100 мг тканини, у таламусі $0,06\pm 0,005$ мкг/100 мг тканини. У тварин віком 30 днів рівень цього протеїну досяг у мозочку $0,31\pm 0,01$ мкг/100 мг тканини, гіпокампі $0,25\pm 0,02$ мкг/100 мг

тканини, таламусі $0,29 \pm 0,01$ мкг/100 мг тканини. Протягом наступних 30 днів онтогенезу у мозочку, гіпокампі та таламусі не виявлено значних змін концентрації даного протеїну. Але на 180 день життя встановлено вірогідне збільшення вмісту протеїну S-100b у всіх досліджуваних відділах головного мозку піщанок – у гіпокампі $0,56 \pm 0,03$ мкг/100 мг тканини, таламусі $0,56 \pm 0,1$ мкг/100 мг тканини, найбільше у мозочку – $1,69 \pm 0,1$ мкг/100 мг тканини. В процесі старіння зазначено вагоме збільшення вмісту S-100b у гіпокампі до $2,15 \pm 0,4$ мкг/100 мг тканини, що не реєструвалося в інших відділах мозку. Це може свідчити про активацію кальцій-залежних механізмів астрогліозу саме у гіпокампі, на відміну від інших відділів мозку піщанки, що в свою чергу має безпосередній вплив на інтегративну функцію мозку, процеси навчання та пам'яті, у забезпеченні та оптимізації яких важливу роль відіграє саме гіпокамп. У таламусі та мозочку старих піщанок (віком 2 роки) значних змін у рівні S-100b не спостерігалося у порівнянні з дорослими тваринами.

Кількісні дані, що стосуються S-100b в старіючому мозку, дуже суперечливі (Linnemann, Skarsfelt, 1994; Sheng et al., 1996). Старіння мозку асоціюється зі збільшенням експресії гену S-100b і його мРНК у щурів (Linnemann, Skarsfelt, 1994), а також в мозку неврологічно здорових осіб (Sheng et al., 1996). Проте за даними інших досліджень, вміст S-100b і його мРНК, а також щільність S-100b-позитивних астроцитів в гіпокампі мишей не змінюється з віком (Wu et al., 2005). За даними (Peskind et al., 2001), рівень S-100b в лікворі людини також не відрізняється у здорових осіб молодого та похилого віку.

Отримані дані вказують на варіацію концентрації S-100b у мозку піщанки залежно від відділу мозку та терміну постнатального життя.

З метою запобігання процесів старіння мозку нами було проаналізовано можливість використання альфа-кетоглутарату в якості нейропротектора протягом 6 місяців спеціальної дієти. Отримані дані вказують на те, що рівень S-100b у мозочку та таламусі старих піщанок не змінювався в залежності від дієти. Але, застосування 2% альфа-кетоглутарату у сухому кормі протягом 6 місяців гальмувало гіперактивацію астроцитів у гіпокампі старих тварин. У старих тварин вміст S-100b у гіпокампі становив $2,15 \pm 0,44$ мкг/100 мг тканини, а при додаванні 2% альфа-кетоглутарату до тривалої дієти призводило до зменшення його рівня до $1,22 \pm 0,18$ мкг/100 мг тканини (рис. 3).

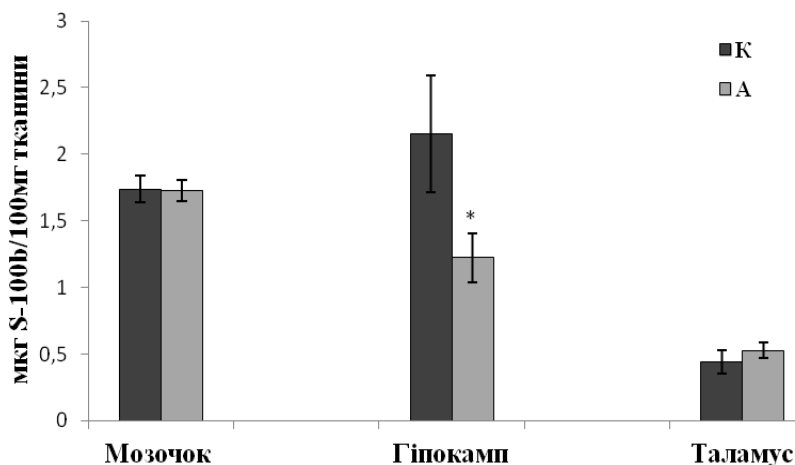


Рис. 3. Вміст протеїну S-100b у різних відділах головного мозку старих піщанок

*К – контроль (старі тварини, віком 2 роки зі стандартним раціоном), А – старі тварини (2 роки) із додаванням до стандартної дієти 2% альфа-кетоглутарату протягом останніх 6 місяців; * – $p < 0,05$ відносно контролю.*

Аналіз отриманих даних свідчить, що за нормальних умов є специфічність розподілу S-100b протеїну у різних відділах мозку монгольської піщанки залежно від терміну розвитку та життя. Використання 2% альфа-кетоглутарату в довготривалих дієтах на пізніх етапах онтогенезу може загальмувати розвиток астрогліозу в гіпокампі.

Список літератури

- Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2003. – Т.22 (2). – С. 108–109. /Etyka likarya ta prava lyudyny: polozhennya pro vykorystannya tvaryn u biomedychnykh doslidakh // Ekspyrymental'na ta klinichna fiziologiya ta biokhimiya. – 2003. – Т.22 (2). – С. 108–109./
- Нго Т.Т., Ленхофф Г.М., Яклич А. Иммуноферментный анализ. – М.: Мир, 1998. – С.444. /Ngo T.T., Lenkhoff G.M., Yaklich A. Immunofermentnyy analiz. – М.: Mir, 1998. – С.444./
- Фоменко О.З., Ушакова Г.О., Пієржиновський С.Г. Протеїни астроглії у мозку щурів в умовах експериментального хронічного гепатиту та дії 2-оксоглутарату // Укр. біохім. журн. – 2011. – Т.83 (1). – С. 69–75. /Fomenko O.Z., Ushakova G.O., Pieryzhynovskyy S.G. Proteiny astroglii u mozku shchuriv v umovakh eksperymental'nogo khronichnogo gepatytu ta dii 2-oksoglutaratu // Ukr. Biochem. J. – 2011. – Vol.83 (1). – P. 69–75./
- Beharier O., Kahn J., Shusterman E. S100B – a potential biomarker for early detection of neonatal brain damage following asphyxia // J. Matern. Fetal Neonatal. Med. – 2012. – Vol.25 (9). – P.1523–1528.
- Bouzier-Sore A.K., Pellerin L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes // Front. Cell Neurosci. – 2013. – Vol.11 (7). – P.179.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1985. – Vol.72. – P. 248–254.
- Débora G.S., Bruna B., Onofre D.S. et al. Characterization of adult rat astrocyte cultures // PLoS One. – 2013. – Vol.8 (3). – P.60282.
- Ge W.P., Jia J.M. Local production of astrocytes in the cerebral cortex // Neuroscience. – 2015. – pii: S0306-4522(15)00789-7.
- Kadala A., Verdier D., Morquette P. et al. Ion homeostasis in rhythmogenesis: the interplay between neurons and astroglia // Physiology (Bethesda). – 2015. – Vol.30 (5). – P. 371–388.
- Linnemann D., Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S 100 in aging rat brain // Neurobiol. Aging. – 1994. – Vol.15. – P. 651–655.
- Peskind E.R., Griffin W.S., Akama K.T. et al. Cerebrospinal fluid S100b is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease // Neurochem. Int. – 2001. – Vol.39. – P. 409–413.
- Pierozan P., Zamoner A., Soska B.K. et al. Signaling mechanisms downstream of quinolinic acid targeting the cytoskeleton of rat striatal neurons and astrocytes // Exp. Neurol. – 2012. – Vol.233 (1). – P. 391–399.
- Sheng J.G., Mrak R.E., Rovnaghi C.R. et al. Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. – 1996. – Vol.17. – P. 359–363.
- Wu Y., Zhang Ai-Qun, Yew D.T. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus // Neurochem. Internat. – 2005. – Vol.46. – P. 565–574.
- Zhang P.W., Haidet-Phillips A.M., Pham J.T. et al. Generation of GFAP::GFP astrocyte reporter lines from human adult fibroblast-derived iPS cells using zinc-finger nuclease technology // Glia. – 2015. – doi:10.1002/glia.22903.

Представлено: А.І.Шевцова / Presented by: A.I.Shevtsova

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 06.05.2015