

## **ПОВ'ЯЗАНІ ЗІ СТАРІННЯМ ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ОСНОВНОГО БІЛКА МІЄЛІНУ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПІЩАНОК**

Надійшла 25.05.14

З використанням методики непрямого імуноферментного аналізу вивчали вміст основного білка мієліну (ОБМ) у різних структурах мозку молодих дорослих (шість місяців) та старих (24 місяці) особин монгольських піщанок. Середнє значення вмісту ОБМ у мозочку старих піщанок було більш ніж вдвічі меншим, ніж аналогічний показник у молодих тварин ( $1.04 \pm 0.10$  та  $2.20 \pm 0.50$  мкг на 100 мг тканини відповідно). В той же час середні значення вмісту ОБМ у таламусі та гіпокампі старих піщанок не тільки не демонстрували істотного зменшення, але й навіть дещо перевищували відповідні величини у молодих особин (відмінності, проте, не були вірогідними). Таким чином, залежні від віку зміни вмісту ОБМ у різних структурах головного мозку піщанок виявляють значну специфічність; є підстави вважати, що пов'язані зі старінням процеси демієлінізації відбуваються насамперед у мозочку.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** основний білок мієліну, монгольські піщанки, структури головного мозку, старіння.

### **ВСТУП**

Процеси старіння мозку пов'язані тією або іншою мірою з процесами демієлінізації [1, 2]. Формування мієлінових оболонок базується на спіральному обвиванні аксонів нейронів відростками спеціалізованих гліальних клітин – олігодендроцитів у ЦНС і шванівських клітин у периферичній нервовій системі [3, 4]. Мієлін формує своєрідні мембранні структури, що складаються з ліпідного бішару та білків, пов'язаних з ним [5]. Однією з біохімічних характеристик, яка відрізняє мієлін від інших білково-ліпідних комплексів, є високе співвідношення ліпідів/білки. Останні становлять від 25 до 30 % маси сухої речовини мієлінової оболонки. Серед них розрізняють два типи – білки, розташовані на поверхні, і білки, котрі занурені в ліпідні шари або пронизують мембрану наскрізь [2, 6]. У складі мієліну описано близько 30 видів білків. Основний білок мієліну (ОБМ), протеоліпідний білок (ПЛП), конексин 32, мієлінасоційований глікопротеїн (МАГ) склада-

ють до 80 % маси всіх мієлінових білків. Ці протеїни реалізують структурні, стабілізуючі та транспортні функції. Для ОБМ характерні певні специфічні властивості. Цей білок формує комплекси з більшістю аніонних фосфоліпідів, причому в перебігу такого формування гідрофобні та електростатичні взаємодії відіграють приблизно однакову роль. ОБМ є імуногенним білком; він представлений не тільки в ЦНС, але й у ПНС [4]. У ЦНС цей білок складає приблизно 30 % сухої маси мієліну. В разі руйнування мієліну ОБМ вивільнюється, і наявність його в цереброспінальній рідині та крові є одним із найбільш очевидних показників процесу демієлінізації; у подібних умовах рівень ОБМ знаходиться в прямій залежності від ступеня деструкції мієліну [7].

Захворювання, у перебігу котрих відбувається руйнування мієліну, складають одну з найактуальніших проблем клінічної медицини, насамперед неврології. В останні роки кількість випадків нейродегенеративних захворювань, що супроводжуються пошкодженням мієліну, збільшується [8]. Безпосередньою причиною такого захворювання, як розсіяний склероз (РС), є руйнування мієліну клітинами власної імунної системи (тобто РС є аутоімунним нейроде-

<sup>1</sup>Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара (Україна).  
Ел. пошта: yulka.kovalchuk.5868152@mail.ru (Ю. П. Ковальчук).

генеративним захворюванням) [8, 9]. Подібні процеси характерні й для синдрому Гієна–Барре, коли клітини власної імунної системи проникають через шар мієліну і пошкоджують нервові волокна, іноді аж до повного переривання останніх [10].

Вірогідність виникнення більшості нейродегенеративних захворювань істотно підвищується в процесі старіння. Ми досліджували особливості розподілу ОБМ в різних відділах головного мозку піщанок різного віку.

## МЕТОДИКА

Було досліджено головний мозок 24 монгольських піщанок (*Meriones unguiculatus*, маса тіла 82–95 г), з яких було сформовано дві вікові групи по 12 тварин у кожній – дорослі молоді, шестимісячні, та старі, 24-місячні. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі та води. Декапітацію проводили під слабким наркозом (ізофлуран). З мозку виділяли три відділи – мозочок, таламус і гіпокамп, тканини яких у подальшому використовували для отримання мембранної фракції білків. Використовували диференційне центрифугування гомогенату відповідного відділу мозку в гіпотонічному буфері А наступного складу: трис-НСІ – 25 мМ (рН 7.4), ЕДТО – 1.0 мМ, β-меркаптоетанол – 2.0 мМ, ФМСФ – 0.2 мМ і мертиолят – 0.01 %, у співвідношенні 1:10. Мембранні білки екстрагували за допомогою тритону X-100 (2 %-вий розчин у буфері А). Кількісне визначення ОБМ проводили згідно зі стандартною методикою непрямого імуноферментного аналізу, вказаною виробником, із використанням козячих моноспецифічних поліклональних антитіл щодо ОБМ та вторинних антикозячих анти-IgG, мічених пероксидазою („Santa Cruz Biotechnology”, США), та високоочищеного ОБМ („Sigma”, США) як стандарту. Отримані результати вимірювали за допомогою ІФА-ридера „Anthos 2010” (Фінляндія) при довжині хвилі 492 нм. Кількість ОБМ виражали в мікрограмах на 1 мл досліджуваного екстракту, що відповідає кількості ОБМ у 100 мг тканини. Статистична обробка результатів була проведена з використанням програми “Excel”; середні значення порівнювали за *t*-критерієм Ст’юдента. Вірогідними вважали різниці при  $P < 0.05$ .

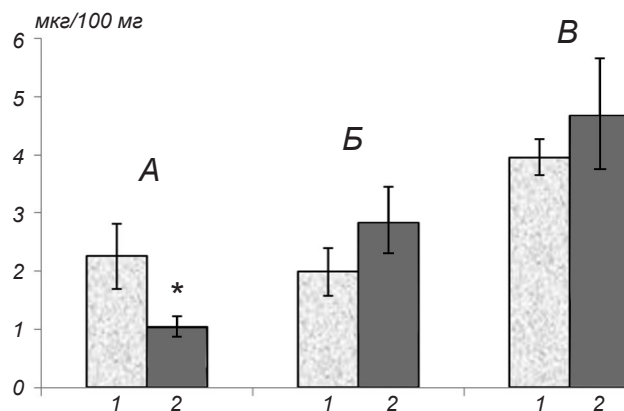
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені виміри показали, що рівень ОБМ у мозочку старих (24-місячних) піщанок дорівнював

менш ніж половині такого в мозочку молодих дорослих тварин (шестимісячних). Відповідні середні значення становили  $1.04 \pm 0.10$  та  $2.20 \pm 0.50$  мкг на 100 мг тканини (див. рисунок, А).

У той же час в інших досліджених структурах головного мозку піщанок (гіпокампі та таламусі) спостерігалася певна тенденція до збільшення вмісту ОБМ з віком. Відповідні міжгрупові відмінності, проте, не були вірогідними через досить велику варіабельність індивідуальних значень (див. рисунок, Б, В). Відповідні значення середніх для шести- та 24-місячних піщанок у гіпокампі становили  $1.9 \pm 0.4$  та  $2.8 \pm 0.6$  мкг на 100 мг тканини, а в таламусі –  $3.9 \pm 0.3$  та  $4.6 \pm 0.9$  мкг на 100 мг тканини. Отже, отримані результати дають певні підстави вважати, що вікові (пов’язані зі старінням) зміни вмісту ОБМ у різних структурах головного мозку піщанок характеризуються істотною специфічністю. Якщо в мозочку спостерігається драматичне зниження кількості ОБМ, то в гіпокампі та таламусі такого зрушення як мінімум не відбувається (проявляється навіть деяка тенденція до підвищення вмісту цього білка). Таким чином, певні процеси демієлінізації під час старіння здійснюються насамперед у мозочку.

Загальновідомо, що нейронні механізми в мозочку є відповідальними за тонку регуляцію та координацію різних моторних феноменів; ці аспекти регуляції рухової активності, як правило, зазнають помірних змін у процесі старіння. Була показана певна кореляція рівня насиченості мієліном мозкових структур та характеристик ритмічних рухів у людини (за даними тепінг-тесту). Показники таких рухів дещо погіршувалися після до-



Середні значення вмісту основного білка мієліну (мкг/100 мг тканини) в мозочку (А), гіпокампі (Б) та таламусі (В) шести- (1) та 24-місячних (2) піщанок.

Зірочкою позначений випадок вірогідної міжгрупової відмінності ( $P < 0.05$ ).

сягнення тестованими віку близько 40 років; це й дало підстави для припущення, що старіння мозку може бути безпосередньо пов'язане із зменшенням кількості мієліну в мозку [11]. Такі уявлення узгоджуються з даними про порушення процесів мієлінізації та зменшення вмісту білка Klotho в перебігу нормального старіння головного мозку. У нокаутуваних по гену *klotho* мишей значно знижені експресія ОБМ і кількість зрілих олігодендроцитів та порушена мієлінізація аксонів у низці структур головного мозку [12].

Причина істотної специфіки вікових змін кількості найважливішої складової білків мієліну – ОБМ – у різних структурах головного мозку піщанок поки що незрозуміла. Додаткового дослідження, мабуть, потребує і питання видоспецифічності спостережуваної картини (чи є такі особливості характерними тільки для піщанок, або аналогічна специфіка має місце і в інших видів тварин). Необхідність глибшого вивчення особливостей розподілу ОБМ у головному мозку та впливів змін кількості мієліну на моторні функції організму є цілком очевидною; отримання відповідних даних може допомогти в побудові адекватних інтерпретацій механізмів старіння мозку та (в перспективі) в розробці методик уповільнення цього процесу.

Всі стадії роботи відповідали положенням Європейської Конвенції щодо захисту тварин, використаних у досліджах (86/609 ЄС, 1986, Страсбург), а також нормативам Комітету з біоетики Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара.

Автори статті – Ю. П. Ковальчук, А. Є. Жданкін та Г. О. Ушакова – підтверджують, що під час дослідження були відсутні конфлікти, котрі стосуються комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особа-

ми, будь-яким чином пов'язаними з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. E. D. Buttermore, C. L. Thaxton, and M. A. Bhat, "Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons," *J. Neurosci. Res.*, **91** No. 5, 603-622 (2013).
2. P. L. Poliani, Y. Wang, E. Fontana, et al., "TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination," *J. Clin. Invest.*, **125**, No. 5, 2161-2170 (2015).
3. G. Harauz and J. M. Boggs, "Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms," *J. Neurochem.*, **125**, No. 3, 334-361 (2013).
4. N. Kazakova, H. Li, A. Mora, et al., "A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes," *Dev. Biol.*, **297**, No. 1, 1-13 (2006).
5. S. Aggarwal, L. Yurlova, and M. Simons, "Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly," *Trends Cell Biol.*, **21**, No. 10, 585-593 (2011).
6. G. W. Brady, N. S. Murthy, D. B. Fein, et al., "The effect of basic myelin protein on multilayer membrane formation," *Biophys. J.*, **34**, No. 2, 345-350 (1981).
7. Y. Yamazaki, K. Yada, and S. Morii, "Diagnostic significance of serum neuron-specific enolase and myelin basic protein assay in patients with acute head injury," *Surg. Neurol.*, **3**, No. 3, 267-270 (1995).
8. T. A. Pivneva, E. V. Kolotushkina, and G. G. Skibo, "Myelination and demyelination processes in the rat cerebellum cell culture: an electron microscopic study," *Fiziol. Zh.*, **49**, No. 5, 105-111 (2003).
9. J. Y. Lee and S. Petratos, "Multiple sclerosis: Does Nogo play a role?" *Neuroscientist*, **19**, No. 4, 394-408 (2013).
10. M. Samukawa, Y. Hamada, and M. Kuwahara, "Clinical features in Guillain-Barré syndrome with anti-Gal-C antibody," *J. Neurol. Sci.*, **337**, Nos. 1/2, 55-60 (2014).
11. G. Bartzokis, "Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown," *Neurobiol. Aging*, **32**, No. 8, 1341-1371 (2011).
12. C. D. Chen, "The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS," *J. Neurosci.*, **5**, 1927-1939 (2013).