

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**імені ОЛЕСЯ ГОНЧАРА**  
**КАФЕДРА БІОФІЗИКИ І БІОХІМІЇ**  
Дніпропетровське відділення Українського біохімічного товариства

**ТРЕТЯ МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ**  
**“АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ СУЧАСНОЇ БІОХІМІЇ**  
**ТА КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ”**  
Матеріали конференції

24-25 вересня, 2015  
Дніпропетровськ, Україна

**MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE**  
**OLEK HONCHAR DNEPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY**  
**DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY**

**THE 3rd INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE**  
**“CURRENT PROBLEMS OF BIOCHEMISTRY**  
**AND CELL BIOLOGY”**

Programme and abstracts  
24-25 September, 2015  
Dnepropetrovsk, Ukraine

migration. Angiostatin immunostaining intensities as well as levels of the two major angiostatin-like molecules, referring as plasminogen kringle-containing fragments K1-4 and K1-5, were dramatically decreased in diabetic retinas compared to control rats ( $1.35 \pm 0.06$  vs  $5.06 \pm 0.15$  and  $1.14 \pm 0.06$  vs.  $2.82 \pm 0.31$  a.u. respectively,  $p < 0.05$ ). It is likely that in hyperglycemia conditions, reactive glia promote "angiogenic shift" that is thought to occur in loss of angiogenesis inhibitors, and endothelium activation can give rise to pathological retinal neovascularization. Either 3-AB or NAM treatments were shown to restore angiostatin content near to baseline level.

**Conclusion.** We provide for the first time experimental evidence for beneficial effects of PARP-1 inhibitors, 3-AB and NAM, in ameliorating reactive gliosis and enhancing anti-angiogenic status through angiostatin up-regulation in retina of rats with diabetes mellitus. Thus, PARP-1 inhibition could represent a considerable option for diabetic retinopathy management.

## СТРЕСС КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ СКВОЗЬ ПРИЗМУ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

И.Ю. Письменецкая<sup>1</sup>, С.А. Островцова<sup>2</sup>, Т.Д. Баттерс<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Днепропетровская медицинская академия» ул. Дзержинского 9,  
Днепропетровск, 49044, Украина  
E-mail: [ip01589@gmail.com](mailto:ip01589@gmail.com)

<sup>2</sup>УО «Гродненский государственный медицинский университет»  
ул. Виленская 19, Гродно, 230023, Беларусь  
E-mail: [astr@grsmu.by](mailto:astr@grsmu.by)

<sup>3</sup>Институт гликобиологии Оксфордского университета, ул. Саус Парк  
Роуд, г.Оксфорд, OX1 3QU, Великобритания  
E-mail: [terry.butters@bioch.ox.ac.uk](mailto:terry.butters@bioch.ox.ac.uk)

Различные стрессовые факторы (свободные радикалы, ишемия, недостаток глюкозы и т.д.) приводят к нарушению структуры и функции клеточных органелл. Одним из проявлений стресса в эндоплазматическом ретикулеуме (ЭПР) является нарушение фолдинга белков. При избыточном накоплении в ЭПР неправильно свернутых или не собранных в нативные комплексы белков, трансмембранные белки-сенсоры инициируют так называемый отклик неструктурированных белков (unfolded protein response, UPR), направленный на восстановление протеостаза. Этот процесс обеспечивается за счет общего угнетения анаболизма белков на фоне активации синтеза тех из них, которые задействованы в фолдинге ассоциированной с ЭПР деградации (ER-associated degradation, ERA) протенинов с aberrантной конформацией. В случае невозможности восстановления протеостаза включаются проапоптотные пути.

развития процесса, что приводит к гибели клеток. В то же время ERAD является одним из главных источников свободных олигосахаридов (free oligosaccharides, FOS) - не связанных с белками или липидами структурных аналогов углеводной части гликопротеинов или гликолипидов, их биосинтетических предшественников и продуктов катаболизма. FOS также образуются на ранних этапах N-гликозилирования белков в ЭПР и распаде чреслых гликоконъюгатов в лизосомно-эндосомной системе. Доказано, что внутриклеточные FOS отражают состояние ЭПР. Свободные олигосахариды попадают из клеток в кровь, потом в мочу, поэтому, потенциально, свободные олигосахариды биологических жидкостей, отражая функциональный статус ЭПР и лизосом, могут являться внеклеточными маркерами стрессовых воздействий на эти органеллы. Для проверки данной гипотезы изучались FOS плазмы крови и мочи практически здоровых доноров и групп пациентов с миелопролиферативными заболеваниями крови и сердечно-сосудистой недостаточностью.

**Методы исследования.** Белки плазмы осаждали ТХУ с последующим центрифугированием. Остатки белков удаляли с помощью фильтра Millex-IH, 0.45  $\mu\text{m}$ . Очистку от моносахаридов проводили хроматографией на пористом графите. Свободные олигосахариды анализировались методом высокоскоростной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) после флуоресцентного маркирования. Пики ВЭЖХ- спектров характеризовали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с глюкозными олигомерами частично гидролизованного декстрана. Меченные гликаны дополнительно разделяли на нейтральные и кислые йонообменной хроматографией на QAE Sephadex (Q25-120). Для более детального исследования структуры гликанов их расщепляли сиалидазой и сравнивали с внешним стандартом – гликанами трансферрина. Кроме того, с этой же целью использовались международные электронные базы данных GlycoBase и EUROCarbDB.

**Результаты.** Исследования показали постоянно ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов плазмы крови в норме и выявили характерные изменения нейтральной и заряженной фракций у больных миелопролиферативными заболеваниями (МЗ) и пациентов с сердечно-сосудистой недостаточностью (ССН). В спектрах FOS в моче не удалось выявить подобных закономерностей. Детальный анализ строения FOS в ВЭЖХ-спектрах позволил определить, что основной источник гликанов нейтральной фракции является ЭПР, а заряженной – лизосомно-эндосомная система. При хронических МЗ групповые изменения спектра наблюдались в заряженной фракции, а индивидуальные – в нейтральной. При острых МЗ изменения в заряженной фракции носили такой же характер, как и при хронических МЗ, но, кроме того, существенно изменялась нейтральная фракция. При ССН наблюдалась высокая микрогетерогенность нейтральной фракции на фоне незначительных изменений заряженных гликанов. Стандартная терапия ССН отражалась на динамике спектров

нейтральной фракции и не влияла на спектры заряженных гликанов.

**Выводы.** Стрессовые факторы миелопролиферативных процессов сердечно-сосудистой недостаточности вызывают дифференцированные изменения ВЭЖХ-спектров свободных олигосахаридов плазмы крови. Анализ строения гликанов показал их связь с ЭПР и лизосомно-эндосомной системой. Таким образом, свободные олигосахариды плазмы крови могут рассматриваться как перспективные внеклеточные биомаркеры статус клеточных органелл в норме и при патологиях.

**Благодарности.** Работа проводилась в Институте гликобиологии Оксфордского университета (Оксфорд, Великобритания) при поддержке международных грантов EMBO (ASTF209-2007, ASTF201.00-2010) International Union against Cancer (ICR/09/044).

## ПЕРЕРОЗПОДІЛ АСТРОЦИТ-СПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ У РІЗНИХ ВІДДІЛАХ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПАНКРЕАТИЧНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ

Вікторія Макарчук<sup>1</sup>, Галина Ушакова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України»,

пр. імені Газети «Правда», 96, Дніпропетровськ 49074, Україна,

<sup>2</sup>Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,

пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна

E-mail: [viktoriam7@gmail.com](mailto:viktoriam7@gmail.com)

Дія ендотоксинів при розвитку панкреатиту направлена на нейрони астроцитарні клітини, викликаючи біохімічні та морфологічні зміни в них. Потребує дослідження розподіл астрогліального  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого білка 100b та гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП) у відділах мозку за умов розвитку енцефалопатії при хронічному панкреатиті.

**Мета дослідження** – визначити розподіл астроцит-специфічних білків при енцефалопатії за умов експериментального панкреатиту.

**Методи дослідження.** Дослідження проводили на 6-місячних щурів самцях (190–210 г), яких утримували в стандартних умовах вівари. Хронічний панкреатит моделювали за (Page В. J., 2000). Щури були розділені на наступні групи: I – тривала оклюзія панкреатичної протоки (n=6); II – псевдооперовані тварини (контроль, n=6), яким під наркозом виконували лапаротомію та ушивання передньої черевної стінки. Тварин виводили з експерименту на 30 добу дослідження. Білкові фракції з мозочка, гіпокампуса та таламуса щурів отримували методом центрифугування відповідних гомогенатів в гіпотонічному буфері. В ході послідовних реакцій центрифугування отримували фракції, що містили розчинні та філаментні білки. Кількісне визначення загального білка (ЗБ) проводили за методом (Bradford M., 1976). Кількісне визначення гліальних білків

здійснювали методом твердофазного імуоферментного аналізу (Нго Т. Т., 1988) з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл до ГФКП ("Boehringer", США) та S-100b ("Sigma", США), відповідно стандартних білків і антитіл проти IgG кролів, мічених пероксидазою хрому ("Sigma", США). Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали за допомогою програми пакету аналізу MS Excel. Порівняння середніх значень чинних проводили за допомогою параметричних методів (критерію t Стьюдента) після перевірки розподілу ознак на нормальність. Результати при  $P \leq 0,05$  вважалися вірогідними. Для визначення ступеня взаємозв'язку між двома показниками проводили кореляційний аналіз із визначенням достовірних коефіцієнтів кореляції Пірсона – r (Петри А., 2003).

Результати досліджень. Існує кореляційний зв'язок між функціональною активністю різних відділів мозку і видом діяльності організму. Для дослідження розподілу S-100b і ГФКП були обрані відділи мозку, що відповідають за рухову активність, сенсорну (і больову) чутливість та процеси навчання і пам'яті. На 30 добу досліджень рівень S-100b збільшувався у гіпокампі і таламусі відповідно на 78% ( $P < 0,001$ ) і 60% ( $P < 0,01$ ). Вміст розчинної форми ГФКП зростав у мозочку на 31% ( $P < 0,05$ ), а у таламусі відзначалася тенденція до його збільшення на 12% відносно контролю. Вміст філаментної форми ГФКП у відділах мозку щурів вірогідно знизилися: у мозочку на 18% ( $P < 0,05$ ), у гіпокампі – на 44% ( $P < 0,001$ ), а в таламусі – на 42% ( $P < 0,01$ ). Встановлено кореляційний зв'язок між підвищенням в гіпокампі та таламусі вмісту S-100b і зниженням у цих відділах ГФКП (відповідно  $r = -0,657$ ,  $P < 0,05$ ;  $r = -0,714$ ,  $P < 0,05$ ). Відомо, що S-100b пригнічує збирання проміжних філаментів цитоскелета шляхом інгібування полімеризації ГФКП при наявності  $Ca^{2+}$  (Savchenko V. L., 2000; Steiner J., 2008). Тому в нашому експерименті при зростанні рівня S-100b було відмічено зниження філаментної форми ГФКП в таламусі та гіпокампі. Через реорганізацію проміжних філаментів астроцитів знижується функціональна цілісність їхнього цитоскелета, що, в свою чергу, може бути однією із причин розвитку панкреатичної енцефалопатії, яка супроводжується зниженням локомоторної та пізнавальної активності щурів.

Таким чином, за умов розвитку панкреатичної енцефалопатії встановлено зростання вмісту білка S-100b у гіпокампі та таламусі на 78% і 60% відповідно, що вказує на активацію астроглії внаслідок інтоксикації мозку. Збільшення вмісту S-100b індукує деполімеризацію проміжних філаментів цитоскелета астроцитів, що підтверджується підвищенням вмісту розчинної ГФКП у мозочку на 31%, у таламусі на 12% і зниженням її філаментної форми у мозочку на 18%, у гіпокампі на 44%, у таламусі на 42%.