

Ю.В. Лебідь, В.Є. Досенко, Г.Г. Скибо

## Експресія мРНК субодиниць протеасоми (PSMB5 та PSMB9) у нейронах гіпокампа при експериментальному цукровому діабеті: зв'язок із процесами апоптозу та некрозу

Цілою низкою досліджень доведено, що довготривалий перебіг цукрового діабету супроводжується розвитком дисфункції гіпокампа – структури, що бере участь у формуванні когнітивних функцій і визначає особливості стрес-реактивності. Метою нашої роботи стало вивчення експресії мРНК субодиниць протеасоми PSMB5 і PSMB9 при розвитку стрептозотозинного цукрового діабету з паралельним дослідженням процесів клітинної загибелі (апоптозу та некрозу) нейронів у різних зонах (CA1, CA2 та CA3) гіпокампа. Вивчення стану нейронів гіпокампа проведено з використанням хроматинового барвника Hoechst-33342 та з застосуванням імуногістохімічного визначення маркера апоптотичної загибелі клітин каспази-3. За допомогою конфокального мікроскопа Olympus FV1000 здійснювали візуалізацію каспази-3 – імунопозитивних клітин і нейронів із ознаками конденсації хроматину (Hoechst-33342) у зрізах гіпокампа щурів на 3-тю та 7-му добу від введення стрептозотозину. Рівень експресії мРНК субодиниць протеасоми PSMB5 та PSMB9 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Отримані результати свідчать про те, що на 3-тю та 7-му добу розвитку діабету збільшується рівень мРНК PSMB9 (з  $4,807 \pm 0,392$  до  $20,023$  ум. од.  $\pm 4,949$  ум. од. на 3-тю добу та до  $20,253$  ум. од.  $\pm 5,141$  ум. од. на 7-му добу). Найбільша кількість клітин із ознаками конденсації хроматину була наявною на 3-тю добу в CA2 зоні (11,51 %), а на 7-му добу – в CA3 зоні гіпокампа (12,49 %), що вказує на різну інтенсивність загибелі клітин через некроз під час розвитку цукрового діабету. Збільшення кількості каспази-3-позитивних клітин ( $137,59 \text{ мкм}^2 \pm 17,91 \text{ мкм}^2$  у контролі,  $143,39 \text{ мкм}^2 \pm 21,45 \text{ мкм}^2$  на 3-ю добу,  $293,42 \text{ мкм}^2 \pm 34,69 \text{ мкм}^2$  на 7-му добу) супроводжувалося зниженням їх площі ( $36,54 \text{ мкм}^2 \pm 0,92 \text{ мкм}^2$  у контролі,  $32,10 \pm 0,91$  і  $30,53 \text{ мкм}^2 \pm 1,05 \text{ мкм}^2$  на 3-тю і 7-му добу відповідно), що свідчить про активізацію проапоптотичних процесів. Таким чином, можна дійти висновку, що в перший тиждень розвитку цукрового діабету відбуваються процеси пошкодження та дегенерації клітин гіпокампа.

*Ключові слова:* цукровий діабет 1-го типу, гіпокамп, пошкодження нейронів, протеасоми.

### ВСТУП

Відомо, що цукровий діабет 1-го та 2-го типу провокує виникнення структурних і функціональних змін у центральній нервовій системі, зокрема у гіпокампі експериментальних тварин. У пацієнтів, що хворіють на цукровий діабет, упродовж тривалого часу також порушується запам'ятовування та навчання, знижується рівень

© Ю.В. Лебідь, В.Є. Досенко, Г.Г. Скибо

уважності та швидкості перебігу розумових процесів [38, 40]. Можливо, що початкові зміни у нейронах гіпокампа, які формуються задовго до перших симптомів порушення когнітивної сфери, створюють підґрунтя для розвитку діабетичної енцефалопатії в подальшому. Молекулярно-генетичні та клітинні механізми формування зазначених патологічних змін, що можна віднести до нейродегенеративних,

активно вивчаються останніми роками. Зокрема, велика увага приділяється дослідженню протеасомного протеолізу, що забезпечує як широке коло регуляторних внутрішньоклітинних процесів, так і контроль за якістю та утилізацією ушкоджених та різним чином модифікованих протеїнів [16, 17, 26]. При цьому незаперечним на сучасному етапі є те, що порушення убіквітинзалежного протеасомного протеолізу – важлива патогенетична ланка розвитку найбільш поширених нейродегенеративних захворювань [14, 15, 27]. Проте їх значення при ураженні ЦНС під час розвитку цукрового діабету невивчені. Невирішеним залишається і питання про експресію різних субодиниць протеасоми в нервових клітинах, особливо про експресію субодиниць імунпротеасоми. В праці Mishito M. та співавт. доведено наявність експресії мРНК і білку однієї з субодиниць імунпротеасоми PSMB9 (LMP2) у гіпокампі людини [32]. Автори роблять висновок, що збільшення експресії LMP2 та однієї з субодиниць конститутивної протеасоми (PSMB1) є характерною ознакою дегенерації мозку, в першу чергу гіпокампа, в процесі старіння. З іншого боку, накопичуються дані про спільні риси нейродегенерації при старінні та цукровому діабеті [4, 6, 34]. Зокрема, вони виявляються у вигляді апоптотичної загибелі нейронів, астрогліозу, змін архітектоники різних зон головного мозку [28]. Стосовно апоптотичної загибелі як добре відрегульованого механізму самознищення клітини, особливий інтерес знов таки становлять процеси убіквітинзалежного протеасомного протеолізу, що й забезпечують вибіркочку деградацію як апоптотичних, так і проти-апоптотичних білків [23, 29, 41].

Мета нашого дослідження – вивчення експресії субодиниць протеасоми PSMB5 та PSMB9 у тканині гіпокампа під час розвитку стрептозотоцинового цукрового діабету із паралельним дослідженням процесів клітинної загибелі (апоптозу та

некрозу) нейронів у різних зонах (CA1, CA2 та CA3) гіпокампа.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 42 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар масою 200–250 г. Тварини знаходилися в умовах природного світлового режиму та у вільному доступі до води та їжі. Всі експерименти були виконані з дотриманням норм та принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Для дослідження змін стану нервової системи була використана стрептозотоцинова модель індукції цукрового діабету. Цей спосіб моделювання діабету є визаним у світі, оскільки стрептозототин вибірково пошкоджує  $\beta$ -клітини острівців Лангерганса та дуже швидко метаболізується в організмі без утворення токсичних речовин [2]. Цукровий діабет моделювали одноразовою внутрішньоочеревиною ін'єкцією стрептозототину ("Sigma-Aldrich", Німеччина) в дозі 45 мг/кг, що був попередньо розчинений в 0,1 М цитратному (рН 4,5). Тваринам контрольної групи вводили аналогічний об'єм цитратного буфера, що не містив стрептозототину. На 3-тю добу після введення стрептозототину вимірювали вміст глюкози в плазмі крові за допомогою приладу для експрес-аналізу Smartest (Тайван). В експеримент відбирали щурів із рівнем глікемії вищим за 10 ммоль/л та ознаками розвитку цукрового діабету: підвищеним споживанням води та поліурією. Вже на 3-тю добу від введення стрептозототину реєструвалося збільшення вмісту цукру до  $14,3 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$ .

Тварин наркотизували каліпсолом (75 мг/гк) і перфузували транскардіально спочатку 50 мл фосфатного буфера, а потім – 200 мл 4%-го формальдегіду. Дослідження тварин з діабетом проводили на 3-тю та 7-му добу після введення стрептозототину. За допомогою мікротому ("Campden Instr.", Німеччина) створювали

фронтальні зрізи мозку 50 мкм завтовшки, двічі промивали у фосфатному буфері та інкубували із моноклональними мишачими первинними антитілами проти каспази-3 (“Sigma-Aldrich”, Німеччина) або (NeuN (від. англ. Neuronal nuclei), “Dako”, Данія) у розведенні 1:800 та 1:1000 відповідно. Антитіла були попередньо розведені 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4) з додаванням Triton X-100 та сироватки у співвідношенні 1:1000. Після 24-годинної інкубації з первинними антитілами зрізи відмивали 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,42) та наносили вторинні антитіла Alexa-488, що були попередньо розведені фосфатним буфером у співвідношенні 1:1000. Інкубацію з вторинними антитілами проводили при 4°C протягом 48 год.

Забарвлення хроматиновим флуорофромом Hoechst-33342 виконували на зрізах мозку 50 мкм завтовшки та промивали їх в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 1,9 % NaCl двічі по 10 хв. Потім після промивання в 0,1 М безсольовому фосфатному буфері (рН 7,4), інкубували в 0,1 мкмоль/л розчині Hoechst-33342 протягом 15 хв при 37 °C. Зрізи переносили на

предметні скельця та заключали в рідину, що стабілізує флуоресцентні барвники (“Dako”, Данія).

Ми використовували Hoechst-33342 для ідентифікації клітин з ознаками конденсації ядерного матеріалу. Кількість клітин з компактним ядром, яке інтенсивно флуоресцює, може відображати кількість пошкоджених нейронів під час дії тих чи інших факторів. Оскільки Hoechst-33342 забарвлює всі клітини, що мають ядра, виникла необхідність відокремити саме нейрони від астроцитів та інших клітин. Для уникнення помилкового врахування клітин інших типів ми здійснили забарвлення за допомогою Hoechst-33342 з одночасним визначенням нейронів (NeuN) (рис. 1). Під час визначення кількості клітин з ознаками нейродегенерації враховували тільки NeuN-позитивні клітини.

Для дослідження рівня експресії мРНК щурів декапітували під каліпсоловим наркозом і вилучали гіпокамп. РНК виділяли з тканини гіпокампа із використанням набору Trizol RNA-prep (“Isogen”, Росія). Концентрацію РНК вимірювали за допомогою спектрофотометра ND1000 (“NanoDrop

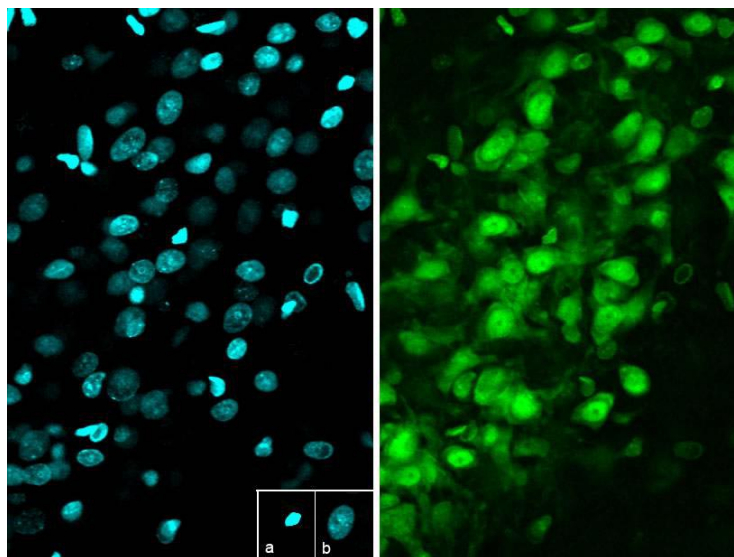


Рис. 1. Подвійне забарвлення з одночасною візуалізацією Hoechst-33342 (ліворуч) та NeuN -позитивних нейронів (праворуч) пірамідального шару гіпокампа у щурів у нормі: а – нейрон з конденсованим та інтенсивно флуоресцюючим ядром; б – нейрон з хроматином, який дифузно розподілений в ядрі та помірно флуоресцює

Technologies Inc”, США). Зворотну транскрипцію проводили із використанням набору First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), застосовуючи 2–2,5 мкг загальної РНК. Суміш для зворотної транскрипції містила у кінцевій концентрації такі компоненти: 50 ммоль тріс-НCl (рН 8,3), 50 ммоль КCl, 4 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 40 ммоль дитіотреїтолу, 40 од. інгібітора РНКаз RiboLock (“Fermentas”, Литва), 0,2 мкг гексимерного праймера, 1 ммоль суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів та 40 од. зворотної транскриптази M-MuLV (“Fermentas”, Литва). Проби інкубували протягом 1 год при 37°C та зупиняли реакцію нагріванням до 70°C впродовж 10 хв. Отриману таким чином одноланцюгову кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням детекційної системи Custom TaqMan® (“Applied Biosystems”, США) для субодиниці протеасоми PSMB9 та PSMB5. Програма ампліфікації складалася з початкової денатурації при 95°C протягом 20 с та з 45 циклів денатурації (95°C, 3 с), приєднання праймерів та елонгації (60°C, 30 с) та проводилася за використання системи 7500 Fast Real-time PCR (“Applied Biosystems”,

США). Аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software (“Applied Biosystems”, США). Рівень експресії розраховувався за загальноприйнятою формулою  $2^{-\Delta Ct}$ .

Статистичну оцінку вірогідності відмінностей проводили за допомогою критерію t Стьюдента та однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Достовірними вважали відмінності з рівнем значущості більшим ніж 95 % (P<0,05).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених експериментів вказують на суттєві зміни як на генетичному (експресія мРНК PSMB5 та PSMB9, так і на клітинному (апоптотична та некротична загибель нейронів гіпокампа) рівні на ранніх стадіях експериментального цукрового діабету. Вихідний рівень експресії мРНК PSMB5 у гіпокампі контрольних тварин значно поступається рівню експресії PSMB9 (субодиниця імунопротеасоми) і становить  $0,493 \pm 0,021$  та  $4,807$  ум. од.  $\pm 0,392$  ум. од. відповідно (рис. 2). Тобто конститутивний рівень експресії PSMB5 майже в 10 разів нижчий, ніж PSMB9.

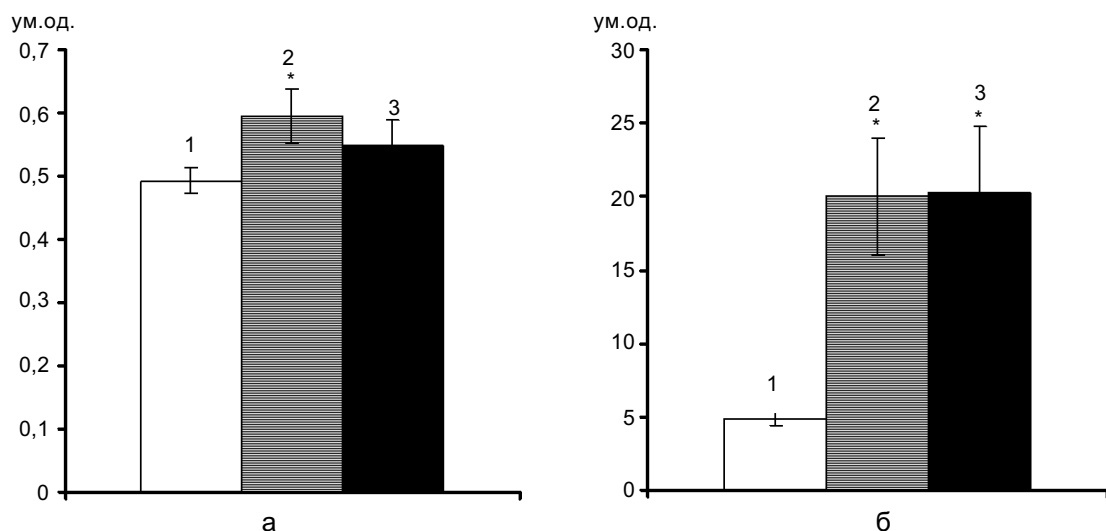


Рис. 2. Діаграми рівня експресії PSMB5 (а) та PSMB9 (б) в гіпокампі контрольних щурів (1) та тварин з цукровим діабетом тривалістю 3 (2) та 7 (3) діб.\*P < 0,05 відносно контролю

Вірогідні змін експресії мРНК PSMB5 під час моделювання цукрового діабету відбуваються на 3-тю добу, наприкінці першого тижня експресія мРНК PSMB5 знову знижується до контрольного значення. Проте рівень експресії мРНК PSMB9 вірогідно збільшується вже через 3 доби після введення стрептозотоцину і залишається на високому рівні і на 7-му добу (див. рис. 2). Стійке підвищення вмісту мРНК PSMB9 може свідчити про те, що наприкінці першого тижня розвитку цукрового діабету продовжується пошкоджувальний вплив на нейрони гіпокампа, збільшення вмісту білків із зміненою третинною структурою та зберігається необхідність в протеасомній деградації білкових молекул. Проте не виключено, що імунопротеасома в мозку має зовсім інші функції, ніж в інших органах. Можна припустити, що вона бере безпосередню участь у процесах довготривалої потенціації та запам'ятовування. Підставою для такого припущення є праці James та співавт., які наводять дані про роль транскрипційного фактора Zif268 (Egr1/Krox24/NGF-IA) зниження регуляції експресії субодиниць протеасоми [10, 21]. Цей фактор

має ключове значення в процесах запам'ятовування та навчання, бо його “вимкнення” спричинює порушення цих процесів у експериментальних тварин [22, 24, 31]. Отже, супресія генів імунопротеасоми під впливом Zif268 є необхідним компонентом для формування довготривалої потенціації та запам'ятовування. А збільшення активності протеасоми внаслідок підвищення експресії її субодиниць, що показано в нашому дослідженні, спричинює погіршення когнітивних властивостей мозку тварин із цукровим діабетом.

Таким чином, можна висловити припущення, що порушення запам'ятовування та навчання, яке виникає під час розвитку діабету певною мірою, може бути зумовлено збільшенням синтезу та активності субодиниць протеасоми PSMB9, а також пошкодженням нейронів гіпокампа (див. нижче).

Виявлення апоптотичних клітин гіпокампа проводилося із застосуванням антитіл до ефекторної каспази-3. Аналіз зрізів показав, що у гіпокампі контрольних щурів є значна кількість клітин, які експресують каспазу-3 (рис. 3). Вони дифузно розподілені в тканині гіпокампа і мають

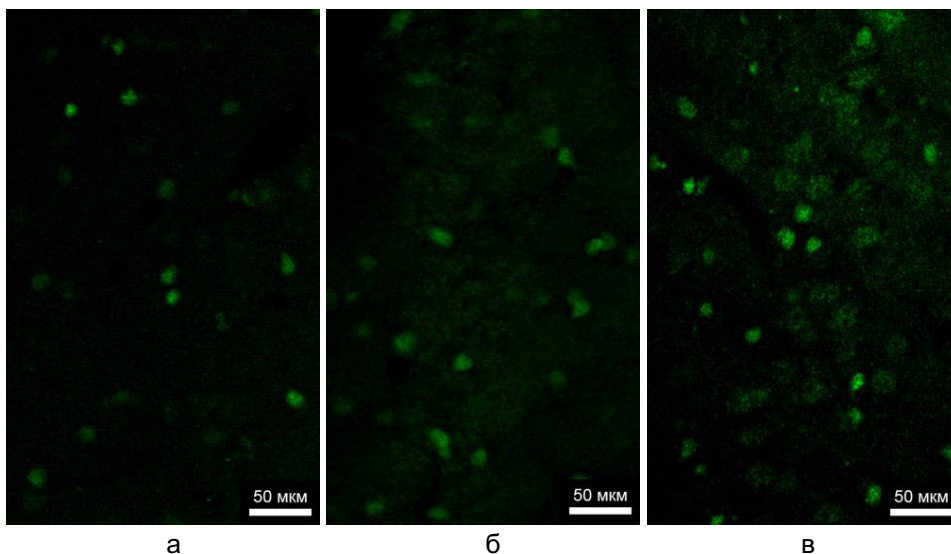


Рис. 3. Каспаза-3-імунопозитивні клітини у щурів в нормі (а), на 3-тю (б) та 7-му (в) добу розвитку цукрового діабету (реакція непрямой імуногістохімії з антитілами до каспази-3)

**Таблиця 1. Морфометричні характеристики каспаза-3-позитивних клітин гіпокампа в нормі та при цукровому діабеті тривалістю 3 та 7 днів (M ± m)**

Серія досліджень	Кількість клітин на 1 мм <sup>2</sup>	Площа клітин, мкм <sup>2</sup>	Інтенсивність флуоресценції, ум. од.
Контроль	137,59 ± 17,91	36,54 ± 0,92	12,97 ± 0,33
Діабет			
3-тя доба	143,39 ± 21,45	32,10 ± 0,91*	12,58 ± 0,34*
7-ма доба	293,42 ± 34,69**	30,53 ± 1,05*	12,47 ± 0,51*

\* P < 0,05 порівняно з контрольною групою, \*\* P < 0,001.

різну інтенсивність флуоресценції. В період розвитку цукрового діабету кількість каспази-3 прогресивно збільшувалася і перевищувала контрольні значення на 53 % (7-ма доба; табл. 1). Площа цих клітин при цьому зменшувалася, що є характерним для клітин, що зазнають апоптотичної загибелі. Середні значення інтенсивності флуоресценції суттєво не змінювалися в динаміці експерименту. Таким чином, на 7-му добу розвитку експериментального цукрового діабету вірогідно підвищувалася кількість клітин, які синтезують каспазу-3, що вказує на активацію апоптотичної загибелі клітин та може бути причиною зниження кількості нейронів пірамідального шару гіпокампа.

Для визначення процесів некротичної загибелі нами був застосований барвник Hoechst-33324, який забарвлює ядерний

матеріал і дає змогу оцінити кількість клітин із ознаками конденсації хроматину, що є характерним для некротичної дегенерації. В гіпокампі контрольних щурів міститься певна кількість клітин з ознаками конденсації хроматину (табл. 2), яка вірогідно зростає на 3-тю та 7-му добу розвитку цукрового діабету. Кількість некротичних клітин суттєво відрізнялася залежно від зони гіпокампа, що досліджувалася: найбільш виражені зміни спостерігалися у CA1 та CA3-зоні та були меншими у CA2-зоні. Співвідношення кількості Hoechst-позитивних клітин і числа нейронів було найбільшим в CA3-зоні, що свідчить про вразливість нейронів указаної зони і про розвиток нейродегенеративного процесу.

Отже, значне підвищення експресії субодиниці імунопротеасоми збігається з активацією апоптотичної та некротичної

**Таблиця 2. Кількість клітин з ознаками конденсації хроматину (Hoechst-33342) в різних зонах гіпокампа в нормі та на 3-тю та 7-му добу розвитку експериментального цукрового діабету (M ± m)**

Серія досліджень	Зона	Кількість конденсованих ядер нейронів на 1 мм <sup>-2</sup>	Кількість клітин з ознаками конденсації хроматину (від загальної кількості NeuN <sup>+</sup> -клітин), %
Контроль	CA1	6,45 ± 0,36	2,91
	CA2	15,36 ± 0,66	6,98
	CA3	14,27 ± 0,63	8,47
Діабет			
	3-тя доба		
	CA1	8,47 ± 0,54*	3,81
CA2	20,58 ± 1,31**	11,51	
CA3	17,00 ± 0,69***	9,84	
7-ма доба	CA1	9,73 ± 0,40*	4,73
	CA2	16,54 ± 0,88	9,84
	CA3	19,14 ± 0,74*	12,49

\* P < 0,05, \*\* P < 0,001, \*\*\* P < 0,01.

загибелі нейронів гіпокампа на ранніх стадіях цукрового діабету. Ми припускаємо, що ці події пов'язані між собою і нейродегенерація запускається саме внаслідок активації імунопротеасоми.

У цьому аспекті надзвичайно важливим є питання про механізми активації експресії генів, що кодують субодиниці протеасом. Згідно з літературними даними, потужний стимулювальний вплив на експресію компонентів протеасоми мають глюкокортикоїди [9]. У працях Mitchell доведено, що процес кахектичного зменшення маси м'язів зумовлений збільшенням експресії субодиниць протеасоми під впливом глюкокортикоїдів, що підтверджувалося застосуванням антагоністів глюкокортикоїдних рецепторів, використання яких запобігало вказаному ефекту. Описано навіть специфічну протеасомрегулювальну сироваткову кіназу, що регулюється глюкокортикоїдами (від англ. proteasome-regulatory kinase serum/glucocorticoid-regulated kinase), яка опосередковує вплив глюкокортикоїдів на експресію генів протеасоми [5, 33]. У наших попередніх працях показано, що моделювання пролонгованого іммобілізаційного стресу спричинювало збільшення активності протеасоми в тканинах гіпокампа, а найбільшою мірою – в синапсомах нейронів цієї частини мозку [1]. Також нами показано, що введення блоатора синтезу глюкокортикоїдних гормонів метирапону призводило до зменшення загибелі нейронів гіпокампа в ранній період розвитку цукрового діабету [25].

Таким чином, є усі підстави вважати, що при цукровому діабеті збільшується вміст глюкокортикоїдів, що стимулюють експресію генів субодиниць протеасоми, зокрема в клітинах гіпокампа. До того ж показано, що експресія PSMB5 збільшується одночасно в нейронах та в астроцитах, що розташовані навколо них. Вважають, що нейрони збільшують продукцію PSMB5 і PSMB9 у відповідь на дію прозапальних цитокінів, зокрема  $\gamma$ -інтерферону,

які продукуються клітинами активованої астроглії [11]. Припускається, що надмірна активація астроцитів та їхня проліферація в процесі нейродегенерації може негативно впливати на життєдіяльність нейронів, зокрема внаслідок синтезу протеогліканів, що обмежують надходження факторів росту, нейротрофінів (NGF, NCGF) до нервових клітин. Нестача трофічних цитокінів є фактором запуску апоптотичної загибелі [12, 19]. Також можливим механізмом запуску апоптозу в нейронах гіпокампа, що експресують надмірну кількість імунопротеасоми, є імунна відповідь локальних імуноцитів мозку на клітини, що презентують надлишок пептидів у комплексі з білками головного комплексу гістосумісності першого типу [13]. Відомо, що субодиниці імунопротеасом, які індукуються інтерфероном, приймають участь у процесингу білків та їх презентації молекулами ГКГС-I [3, 37]. Збільшення створення пептидів для презентації ГКГС-I може впливати на нейрональну пластичність та електричні властивості нейронів, але питання щодо функціонального значення цього процесу залишаються не до кінця визначеними [7, 35].

Дещо складніше пояснити розвиток некрозу нейронів гіпокампа при моделюванні цукрового діабету. Лавиноподібний, нерегульований, незворотний характер розвитку некрозу нібито не надає можливості протеасомі втрутитися в цей процес. Однак в деяких дослідженнях показано, що протеасомний протеоліз бере участь в деградації супероксиддисмутази та каталази — ключових антиоксидантних ферментів [8, 18, 20]. У багатьох дослідженнях показано, що активація гіпоталамо-гіпофізарно-наднирниковозалозної системи, що спостерігається і при моделюванні цукрового діабету, спричинює збільшення продукції вільних радикалів [30, 36, 39]. Таким чином, збільшення експресії субодиниць протеасоми з імовірним збільшенням активності протеасоми, може впливати на

вміст антиоксидантних білків, і внаслідок цього збільшувати вразливість клітин до вільнорадикального ушкодження, наслідком чого є некротична загибель.

Узагальнюючи вищенаведені результати, можна дійти висновку про те, що порушення когнітивної сфери у щурів з експериментальним цукровим діабетом, а можливо і людей, хворих на цукровий діабет, зумовлені гіпрекспресією субодиниць імунопротеасоми та процесами апоптотичної та некротичної загибелі клітин гіпокампа. Збільшення активності синтезу мРНК субодиниці PSMB9, таким чином, може вважатися ознакою нейродегенеративного процесу, що є притаманним не тільки для цукрового діабету, але й для нейропатій іншого генезу.

**Ю.В. Лебедь, В.Е. Досенко, Г.Г. Скибо**

**ЭКСПРЕССИЯ МРНК СУБЪЕДИНИЦ  
ПРОТЕАСОМЫ (PSMB5 И PSMB9) В  
НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА ПРИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ  
ДИАБЕТЕ: СВЯЗЬ С ПРОЦЕССАМИ  
АПОПТОЗА И НЕКРОЗА**

Многими исследованиями доказано, что длительное течение сахарного диабета сопровождается развитием дисфункции гиппокампа – структуры, которая принимает участие в формировании когнитивных функций и определяет особенности стресс-реактивности. Целью данной работы было изучение экспрессии мРНК субъединиц протеасомы PSMB5 и PSMB9 в динамике развития стрептозоточинового сахарного диабета с параллельным изучением процессов клеточной смерти (апоптоза и некроза) нейронов в разных зонах (CA1, CA2 и CA3) гиппокампа. Изучение состояния нейронов проведено с использованием хроматинового красителя Hoechst-33342 и с применением иммуногистохимического маркера апоптотической гибели клеток каспазы-3. С помощью конфокального микроскопа Olympus FV1000 осуществляли визуализацию каспазы-3 – иммунопозитивных клеток и нейронов с признаками конденсации хроматина (Hoechst-33342) в срезах гиппокампа крыс на 3-и и 7-е сутки от момента введения стрептозоточина. Уровень экспрессии мРНК субъединиц протеасомы PSMB5 и PSMB9 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на 3-и и 7-е сутки развития диабета происходит увеличение уровня мРНК PSMB9 (с  $4,807 \pm 0,392$  до

$20,023$  усл. ед.  $\pm 4,949$  усл. ед. на 3-и сутки и до  $20,253$  усл. ед.  $\pm 5,141$  усл. ед. на 7-е сутки). Максимальное количество клеток с признаками конденсации хроматина определялось на 3-и сутки в CA2 зоне (11,51 %), а на 7-е сутки – в CA3 зоне гиппокампа (12,49 %), что указывает на различную интенсивность гибели клеток путем некроза по мере развития сахарного диабета. Увеличение количества позитивных клеток каспазы-3 ( $137,59$  мкм<sup>2</sup>  $\pm 17,91$  мкм<sup>2</sup> в контроле,  $143,39$  мкм<sup>2</sup>  $\pm 21,45$  мкм<sup>2</sup> на 3-и сутки,  $293,42$  мкм<sup>2</sup>  $\pm 34,69$  мкм<sup>2</sup> на 7-е сутки) сопровождалось снижением их площади ( $36,54$  мкм<sup>2</sup>  $\pm 0,92$  мкм<sup>2</sup> в контроле,  $32,10$  мкм<sup>2</sup>  $\pm 0,91$  мкм<sup>2</sup> на 3-и сутки и  $30,53$  мкм<sup>2</sup>  $\pm 1,05$  мкм<sup>2</sup> на 7-е сутки), что свидетельствует об активизации апоптотических процессов. Обобщая вышеизложенные результаты, можно прийти к выводу, что в 1-ю неделю развития сахарного диабета активизируются процессы повреждения и дегенерации клеток гиппокампа.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, гиппокамп, повреждение нейронов, протеасомы

**Y.V. Lebed, V.E. Dosenko, G.G. Skibo**

**EXPRESSION OF PROTEASOME SUBUNITS  
PSMB5 AND PSMB9 MRNA IN HIPPOCAMPAL  
NEURONS: LINK WITH APOPTOSIS AND  
NECROSIS**

There is a huge body of evidence showing that long-termed diabetes mellitus is followed with hippocampal dysfunction. The goal of this work was to investigate the expression of proteasome subunits PSMB5 and PSMB9 mRNA in CA1, CA2 and CA3 areas of hippocampus in parallel with processes of cell death (apoptosis and necrosis) in development dynamics of streptozotocine-induced diabetes. We have studied hippocampal neurons using chromatine dye Hoechst-33342 and immunohistochemical detection of apoptotic cell death marker caspase-3. At day 3 and 7 after injection of streptozotocine we have performed visualization of caspase-3- immunopositive neurons showing signs of neurodegeneration in hippocampal sections using confocal microscope Olympus FV1000. The rate of proteasome subunits PSMB5 and PSMB9 mRNA expression was determined with RT-PCR. The results indicated elevation of PSMB9 mRNA content (from  $4,807 \pm 0,392$  arbU up to  $20,023 \pm 4,949$  arbU on day 3 and up to  $20,253 \pm 5,141$  arbU on day 7). A maximal number of cells with signs of chromatin condensation was observed at day 3 and day 7 in CA2 and CA3 area (11,51% and 12,49% respectively). That indicates an intensification of proapoptotic processes. Summarizing the results presented above we can conclude that during the first week of diabetes mellitus development, hippocampal cells undergo the process of impairment and degeneration.

Key words: type 1 diabetes mellitus, hippocampus, neuronal injury, proteasome.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*



**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Досенко В.Е., Загорий В.Ю., Мойбенко А.А. Изменения протеосомальной активности и активности нейтральных протеинкиназ в тканях головного мозга при старении // *Нейрофизиология*. – 2005. – **37**, № 1. – С.11–15.
2. Полторак В.В., Блох К.О. Стрептозотоциновый и вирусный инсулин-зависимый сахарный диабет (аутоимунные аспекты) // *Пробл. эндокринологии*. – 1989. – **35**, № 3. – С.81–88.
3. Aki M., Shimbara N., Takashina M., Akiyama K., Kagawa S., Tamura T., Tanahashi N., Yoshimura T., Tanaka K., Ichihara A. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes // *J. Biochem.* – 1994. – **115**, №2. – P.257–269.
4. Artola A. Diabetes-, stress- and ageing-related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex – the same metaplastic process? // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – **585**, №1. – P.153–162.
5. Bailey J.L., Wang X., Price S.R. The balance between glucocorticoids and insulin regulates muscle proteolysis via the ubiquitin-proteasome pathway // *Miner. Electrolyte Metab.* – 1999. – **25**, №4–6. – P.220–223.
6. Biessels G.J., van der Heide L.P., Kamal A., Bleys R.L., Gispen W.H. Ageing and diabetes: implications for brain function // *Eur. J. Pharmacol.* – 2002. – **441**, №1–2. – P.1–14.
7. Bonfoco E., Krainc D., Ankarcona M. Nicotera P., Lipton S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – **92**, №16. – P.7162–7166.
8. Cao C., Leng Y., Liu X. Yi Y., Li P., Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteasomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases // *Biochemistry*. – 2003. – **42**. – P.10348–10353.
9. Combaret L., Taillandier D., Dardevet D. Bechet D., Ralliere C., Claustre A., Grizard J. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles // *Biochem. J.* – 2004. – **378**, №1. – P.239–246.
10. Conway A.M., James A.B., Zang J. Morris B.J. Regulation of neuronal cdc20 (p55cdc) expression by the plasticity-related transcription factor zif268 // *Synapse*. – 2007. – **61**, №6. – P.463–468.
11. de Kloet E.R. Hormones and the stressed brain // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – **1018**. – P. 1–15.
12. Feldman E.L., Sullivan K.A., Kim B. Russel J.W. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival // *Neurobiol. Dis.* – 1997. – **4**, №3–4. – P.201–214.
13. Ferrington D.A., Hussong S.A., Roehrich H. Kappahn R.J., Kavanaugh S.M., Heuss N.D., Gregerson D.S. Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain // *J. Neurochem.* – 2008. – **106**, №1. – P.158–169.
14. Finkbeiner S., Mitra S. The ubiquitin-proteasome pathway in Huntington's disease // *Sci. World J.* – 2008. – **8**. – P.421–433.
15. Gao X., Hu H. Quality control of the proteins associated with neurodegenerative diseases // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. – 2008. – **40**, №7. – P.612–618.
16. Goldberg A.L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – **35**, №1. – P.12–17.
17. Goldberg A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins // *Nature*. – 2003. – **426**, №6968. – P. 895–899.
18. Hoffman E.K., Wilcox H.M., Scott R.W., Siman R. Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – **139**. – P.15–20.
19. Huang J.Y., Hong Y.T., Chuang J.I. Fibroblast growth factor 9 prevents MPP+-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro // *J. Neurochem.* – 2009. – **109**, №5. – P.1400–1412.
20. Hyun D.H., Lee M., Halliwell B., Jenner P. Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins // *J. Neurochem.* – 2003. – **86**. – P.363–373.
21. James A.B., Conway A.M., Morris B.J. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1) // *J. Neurosci.* – 2006. – **26**, №5. – P.1624–1634.
22. Jarvis E.D., Scharff C., Grossman M.R., Ramos I.A., Nottebohm F. For whom the bird sings: context-dependent gene expression // *Neuron*. – 1998. – **21**, №4. – P.775–788.
23. Jesenberger, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – **3**, №2. – P. 112–121.
24. Kaczmarek L., Zangenehpour S., Chaudhuri A. Sensory regulation of immediate-early genes c-fos and zif268 in monkey visual cortex at birth and throughout the critical period // *Cereb. Cortex*. – 1999. – **9**, №2. – P.179–187.
25. Lebed Y., Orlovsky M.A., Skibo G.G. Metraprone prevents neuronal degeneration during first two weeks of the development of streptozotocine-induced diabetes mellitus // *FENS Abstr.* – 2008. – **4**. – P.119–125.
26. Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2006. – **17**, №7. – P.1807–1819.
27. Li X., Li H., Li X.J. Intracellular degradation of misfolded proteins in polyglutamine neurodegenerative diseases // *Brain Res. Rev.* – 2008. – **59**, №1. – P.245–252.

28. Li Z.G., Zhang W., Grunberger G. Sima A.A. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes // *Brain Res.* — 2002. — **946**, № 2. — P.221–231.
29. Liu C.H., Goldberg A.L., Qiu X.B. New insights into the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of apoptosis // *Chang Gung. Med. J.* — 2007. — **30**, №6. — P.469–479.
30. Mariappan N., Elks C.M., Sriramula S. Guggilam A., Borkhsenions., Francis J. NF- $\kappa$ B-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes // *Cardiovasc. Res.* — 2009. — **85**, №3. — P.473–483.
31. Mello C., Velho T.A., Pinaud R. Song-induced gene expression: a window on song auditory processing and perception // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — **1016**. — P.263–281.
32. Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains // *Neurobiol. Aging.* — 2006. — **27**, №1. — P.54–66.
33. Mitch W.E., Bailey J.L., Wang X., Jurkowitz C., Newby D., Price S.R. Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting // *Amer. J. Physiol.* — 1999. — **276**, №5 Pt 1. — P.C1132–C1138.
34. Nass N., Bartling B., Navarrete S.A. Scheubel R.J., Burgermann J., Silber R.E., Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing // *Z. Gerontol. Geriatr.* — 2007. — **40**, №5. — P.349–356.
35. Neumann H., Cavalie A., Jenne D.E. Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons // *Science.* — 1995. — **269**, №5223. — P.549–552.
36. Perez –Matute P., Zulet M.A., Martinez J.A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2009. — **9**, №6. — P.771–779.
37. Piccinini M., Mostert M., Croce S. Baldovino S., Papotti M., Rinaudo M.T. Interferon-gamma-inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome // *J. Neuroimmunol.* — 2003. — **135**, №1–2. — P.135–140.
38. Prikryl R. Cognitive functions impairment in diabetes mellitus patients // *Cas. Lek. Cesk.* — 2007. — № 146. — P. 434–437.
39. Sivitz W.I., Yorek M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2009. — **12**, №4. — P.537–577.
40. Wessels A. M., Rombouts S. A., Remijnse P. L. Boom Y., Scheltens P., Barkhof F., Heine R.J., Snoek F.J. Cognitive performance in type 1 diabetes patients is associated with cerebral white matter volume // *Diabetologia.* — 2007. — № 50. — P. 1763–1769.
41. Wolf B.B., Schuler M., Echeverri F., Green D.R. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation // *J. Biol. Chem.* — 1999. — **274**, №43. — P.30651–30656.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: lebed@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 24.09.2009*