

УДК 616.831 – 005.4 - 092

С.С.Ткачук,
В.П.Пішак,
В.Ф.Мислицький,
О.Д.Шимків,
Л.О.Філіпова

Буковинська державна медична
академія, м. Чернівці

ОНТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ФОРМУВАННЯ СЕЛЕКТИВНОЇ ЧУТЛИВОСТІ ПОЛІВ ГІПОКАМПА ДО ІШЕМІЇ

Ключові слова: каротидна ішемія, онтогенез, гіпокамп, селективність.

Резюме. За показниками вільнорадикального окиснення ліпідів і білків, активності антиоксидантних ферментів, стану маркерних ферментів мембран та системи циклічних нуклеотидів селективна чутливість полів гіпокампа до ішемічно-реперфузійних пошкоджень, притаманна дорослим тваринам, не завершена в одномісячних щурів і продовжує формуватися впродовж подальшого онтогенезу.

Вступ

Незважаючи на інтенсивні дослідження механізмів ішемічно-реперфузійних пошкоджень мозку, досить мало робіт присвячено віковим особливостям перебігу даної патології, хоча існуючі нечисельні дані свідчать про їх наявність [4,5]. Це створює певні труднощі для оцінки ефективності різних засобів корекції патологічного процесу, що зумовлює своєчасність та актуальність подібних досліджень.

Мета дослідження

Вивчити вікові особливості відстрочених показників ішемічно-реперфузійних пошкоджень полів гіпокампа.

Матеріал і методи

На шосту добу після 20-хвилинної каротидної ішемії мозку, змодельованої кліпсуванням загальних сонних артерій, або несправжньої операції (виділення судин без їх перетиснення) в гомогенатах полів гіпокампа СА1, СА2, СА3 самців білих лабораторних щурів віком один та три місяці визначали вміст дієнових кон'югатів (ДК), малонового альдегіду (МА) [8,12], продуктів окиснювальної модифікації білків (ОМБ) [11], активність супероксиддисмутази (СОД) [13], глутатіонпероксидази (ГПО) [3], каталази (КТ) [10], активність Na^+/K^+ -АТФази [18] та 52-нуклеотидази [14,15], вміст цАМФ та цГМФ (наборами "сАМР" і "сГМР" ("Immunotech", Франція) згідно доданих інструкцій.

Досліджувані структури забирали за методом [17], користуючись атласом стереотаксичних координат [19]. Статистичну обробку проводили за критерієм Стьюдента (t).

© С.С.Ткачук, В.П.Пішак, В.Ф.Мислицький, О.Д.Шимків, Л.О.Філіпова, 2004

Обговорення результатів дослідження

Ступінь ішемічно-реперфузійних пошкоджень мозку визначається вираженістю оксидативного стресу [1,2], який може мати вікову специфіку.

Аналіз вікових особливостей конститутивного вмісту продуктів ліпопероксидації в досліджених нами структурах підтвердив їх наявність, та, водночас, продемонстрував виражену мозаїчність показників (табл.1).

У полі СА1 одномісячних тварин вміст первинних продуктів та активність КТ були вищими, а вторинних – нижчими, ніж у тварин старшої вікової групи. У той же час, у зоні гіпокампа СА2 одномісячних тварин базальний вміст ДК був значно вищим, а КТ та ГПО – нижчим, ніж у тримісячних. У полі гіпокампа СА3 одномісячних тварин всі досліджені показники, за винятком СОД, були вищими, ніж у тримісячних.

Таким чином, проведені дослідження показали не лише наявність міжвікової різниці конститутивних показників проокисно-антиоксидантного гомеостазу, але й її виражену регіонарну специфічність.

Ішемічне втручання нівелює міжвікову різницю інтенсивності ПОЛ в межах кожного окремого поля, притаманну тваринам контрольних груп (табл.2). У той же час, за сукупними показниками, активність антиоксидантних ферментів після ішемії-реперфузії в полях СА1 та СА3 була вищою в одномісячних тварин, а в полі СА2 вікової різниці не спостерігалось. Це свідчить, що постішемічні зміни інтенсивності ліпопероксидації не залежать від віку, а активність та потужність ферментативного антиоксидантного захисту вища в одномісячних тварин.

Таблиця 1

Структурні особливості вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів у контрольних тварин різного віку (M±m, n=8)

Вік тварин	Поле	Вміст		Активність ферментів		
		дієнових кон'югатів (нмоль/мг білка)	малонового альдегіду (нмоль/мг білка)	супероксид-дисмутази (од/хв-мг білка)	каталази (мкмоль/хв-мг білка)	глутатіон-пероксидази (нмоль G-SH/хв-мг білка)
1 місяць	CA1	10,83 ± 1,43	5,59 ± 0,23	6,31 ± 0,12	39,71 ± 1,91	8,57 ± 0,43
	CA2	19,89 ± 1,23	5,83 ± 0,37	5,49 ± 0,56	25,12 ± 2,00	5,00 ± 0,28
	CA3	31,38 ± 2,25	8,66 ± 0,78	4,20 ± 0,33	30,22 ± 2,34	7,22 ± 0,31
3 місяці	CA1	15,64 ± 0,92 p# ₁ <0,01	4,57 ± 0,43 p# ₁ <0,01	5,88 ± 0,49	29,23 ± 1,98 p# ₁ <0,01	9,12 ± 0,82
	CA2	11,69 ± 1,20 p# ₂ <0,01	6,53 ± 0,52	5,08 ± 0,45	42,04 ± 3,17 p# ₂ <0,01	8,83 ± 0,72 p# ₂ <0,01
	CA3	23,25 ± 2,41 p# ₃ <0,05	5,38 ± 0,41 p# ₃ <0,01	4,31 ± 0,40	13,55 ± 1,09 p# ₃ <0,005	5,10 ± 0,46 p# ₃ <0,01

Примітки: тут та в наступній таблиці p#₁ - p#₃ – міжвікова різниця між відповідними полями. У решті випадків зміни невірні.

Таблиця 2

Структурні особливості вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів у щурів різного віку після ішемії (M±m, n=8)

Вік тварин	Поле	Вміст		Активність ферментів		
		дієнових кон'югатів (нмоль/мг білка)	малонового альдегіду (нмоль/мг білка)	супероксид-дисмутази (од/хв-мг білка)	каталази (мкмоль/хв-мг білка)	глутатіон-пероксидази (нмоль G-SH/хв-мг білка)
1 місяць	CA1	11,52 ± 0,61	4,95 ± 0,34	4,96 ± 0,44	33,84 ± 3,21	8,12 ± 0,62
	CA2	16,11 ± 1,17	5,5 ± 0,50	2,67 ± 0,23	21,61 ± 2,19	4,76 ± 0,40
	CA3	24,72 ± 1,81	6,49 ± 0,52	3,82 ± 0,35	20,12 ± 1,31	5,35 ± 0,44
3 місяці	CA1	13,12 ± 1,35	4,48 ± 0,31	4,95 ± 0,41	14,74 ± 1,28 p# ₁ <0,01	7,31 ± 0,47
	CA2	15,96 ± 0,95	5,24 ± 0,50	3,12 ± 0,32 p* ₂ <0,01	21,56 ± 1,22 p* ₂ <0,005	4,33 ± 0,32 p* ₂ <0,005
	CA3	22,39 ± 1,09	5,59 ± 0,34	4,74 ± 0,35	13,95 ± 1,12 p# ₃ <0,01	4,11 ± 0,34 p# ₃ <0,01

Таблиця 3

Структурні та вікові особливості конститутивного вмісту продуктів окиснювальної модифікації білків (M±m, n=8)

Вік тварин	Поле гіпокампа	Вміст альдегідо- та кетонпохідних	
		нейтрального характеру (о.о.г./г білка, 370 нм)	основного характеру (о.о.г./г білка, 420 нм)
1 місяць	CA 1	40,32 ± 2,32	5,63 ± 0,98
	CA 2	34,79 ± 0,95	3,73 ± 0,33
	CA 3	22,90 ± 1,39	2,17 ± 0,22
3 місяці	CA 1	31,01 ± 0,94 p# ₁ <0,05	3,01 ± 0,15 p# ₁ <0,05
	CA 2	19,22 ± 0,39 p# ₂ <0,005	1,71 ± 0,22 p# ₂ <0,05
	CA 3	15,81 ± 0,54 p# ₃ <0,05	0,89 ± 0,10 p# ₃ <0,05

Примітки: тут та в наступній таблиці p#₁ - p#₃ – міжвікова різниця між відповідними полями гіпокампа. У решті випадків зміни невірні.

Пошкоджувальний вплив вільних радикалів на нервову тканину здійснюється за рахунок полідромних механізмів. Одним з них є окиснення білкових молекул [16].

Міжвіковий аналіз вихідного рівня продуктів ОМБ показав, що у всіх полях гіпокампа він був значно вищим у тварин молодшої вікової групи (табл.3). У них також більш значною була різниця вмісту динітрофенілгідразонів основного характеру, ніж нейтрального. Це свідчить, що чутливість різних білків до дії вільних радикалів та/або

активність внутрішньоклітинних протеаз суттєво змінюється з віком.

Вплив ішемії на міжвікові взаємовідносини ОМБ проявляється накопиченням її продуктів у старших тварин, що призводить до усунення міжвікової різниці в полях СА1 та СА3 і її зменшення - в полі СА2 (табл.4).

Серед ферментів плазматичної мембрани нейронів, які в першу чергу зазнають атаки вільних радикалів та реагують порушенням функції, є Na^+, K^+ -АТФаза та 52 -нуклеотидаза [2,9].

Таблиця 4
Структурні та вікові особливості вмісту продуктів окиснювальної модифікації білків у одномісячних щурів після ішемії ($M \pm m$, $n=8$)

Вік тварин	Поле гіпокампа	Вміст альдегідо- та кетонпохідних	
		нейтрального характеру (о.о.г./г білка, 370 нм)	основного характеру (о.о.г./г білка, 420 нм)
1 місяць	СА 1	38,60 ± 1,96	4,05 ± 0,22
	СА 2	27,38 ± 1,81	1,91 ± 0,37
	СА 3	19,59 ± 1,96	1,97 ± 0,07
3 місяці	СА 1	38,88 ± 1,61	4,15 ± 0,32
	СА 2	22,91 ± 0,49 $p_2 \# < 0,05$	1,96 ± 0,22
	СА 3	23,12 ± 1,70	1,72 ± 0,29

Таблиця 5
Вікові та структурні особливості конститутивної й постішемічної активності $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФази та 5'-нуклеотидази в гіпокампі щурів ($M \pm m$, $n=8$)

Вік тварин	Поле	Характер впливу	Активність ферментів		
			АТФази (мкмоль P_i за хв / мг білка)	5'-нуклеотидази (мкмоль P_i за хв / мг білка)	
1 місяць	СА1	Контроль	0,39 ± 0,019	0,61 ± 0,015	
		Ішемія	0,30 ± 0,014 $p < 0,01$	0,88 ± 0,014 $p < 0,005$	
3 місяці		Контроль	0,39 ± 0,018	0,78 ± 0,016 $p \# < 0,005$	
		Ішемія	0,22 ± 0,014 $p < 0,01$ $p \# < 0,005$	1,04 ± 0,01 $p < 0,005$ $p \# < 0,005$	
1 місяць		СА2	Контроль	0,28 ± 0,014	0,67 ± 0,013
			Ішемія	0,20 ± 0,015 $p < 0,005$	0,57 ± 0,012 $p < 0,005$
3 місяці			Контроль	0,29 ± 0,013	0,65 ± 0,012
			Ішемія	0,26 ± 0,015 $p \# < 0,005$	0,61 ± 0,011 $p < 0,05$ $p \# < 0,005$
1 місяць	СА3	Контроль	0,25 ± 0,012	0,53 ± 0,011	
		Ішемія	0,22 ± 0,011 $p < 0,05$	0,84 ± 0,011 $p < 0,005$	
3 місяці		Контроль	0,26 ± 0,013	0,57 ± 0,008 $p \# < 0,0125$	
		Ішемія	0,21 ± 0,014 $p < 0,05$	0,68 ± 0,010 $p < 0,005$ $p \# < 0,005$	

Примітки: 1. вірогідність постішемічних змін активності ферментів у порівнянні з контролем – p ; 2. вірогідність міжвікових відмінностей конститутивної активності ферментів – $p \#$; 3. вірогідність міжвікових відмінностей постішемічної активності ферментів – $p \#$.

Міжвіковий аналіз активності маркерних ферментів стану плазматичних мембран не виявив суттєвих відмінностей конститутивної активності $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPази}$, а активність 52-нуклеотидази була вірогідно нижчою в полі СА1 та СА3 одномісячних тварин (табл.5).

Ішемія спричиняє появу вікових відмінностей активності $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPази}$ між полями СА1 та СА2, не притаманних контрольним тваринам. Генералізованого характеру та більшої виразності

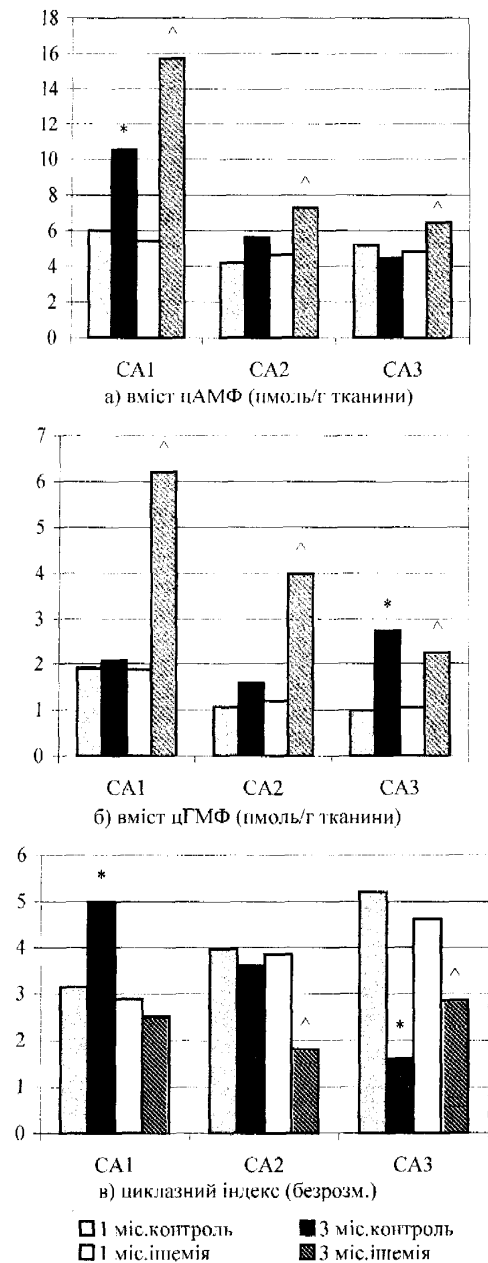


Рис.1. Вікові особливості впливу каротидної ішемії на вміст циклічних нуклеотидів у полях гіпокампа
Примітки: вірогідні вікові відмінності між: * контрольними тваринами; ^ дослідними тваринами.

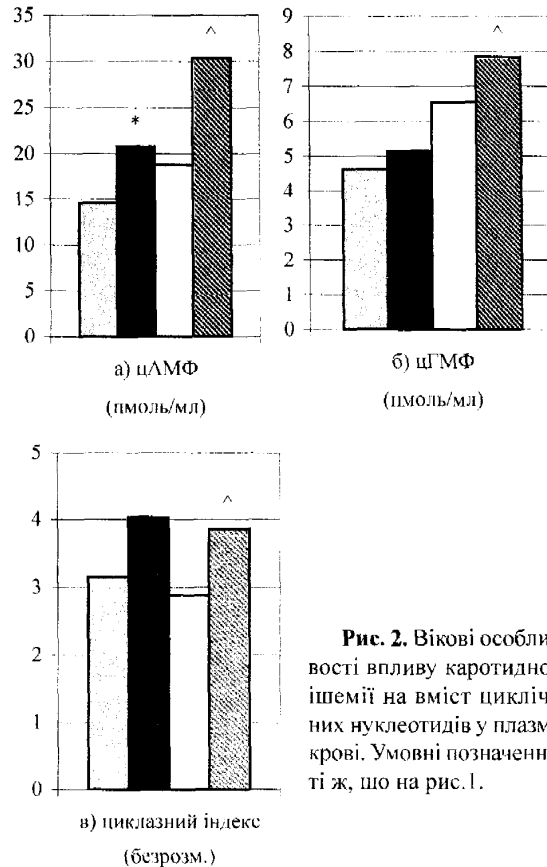


Рис. 2. Вікові особливості впливу каротидної ішемії на вміст циклічних нуклеотидів у плазмі крові. Умовні позначення ті ж, що на рис.1.

набуває також міжвікова різниця активності 52-нуклеотидази - в полі СА1 більш значний підйом активності мав місце в тримісячних тварин, а в полі СА3 - в одномісячних. Постішемічне зниження активності даного ферменту в полі СА2 було більш значущим в одномісячних тварин.

Результати досліджень свідчать про існування міжвікової різниці відстроченої реакції Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPази}$ та 52-нуклеотидази на ішемічно-реперфузійне пошкодження.

Порушення активності системи циклічних нуклеотидів спричиняє дезадаптацію в тварин, а їх стан вважають прогностичним щодо стійкості до несприятливих чинників [6].

Результати міжвікового аналізу конститутивного та індукційного вмісту циклічних нуклеотидів представлено на рисунках 1-2.

Конститутивний вміст цАМФ у контрольних одномісячних щурів відрізнявся від показників у тримісячних лише у зоні гіпокампа СА1 (рис.1), а цГМФ - у зоні СА3, де він був вищим у тварин старшої вікової групи. За рахунок зазначеної вікової різниці циклазний індекс виявився вірогідно нижчим у зоні СА1 та вищим у зоні СА3 одномісячних тварин.

Внаслідок того, що в одномісячних тварин ішемія не впливала на вміст ЦН, а в тримісячних

– стимулювала їх реакцію, постішемичний характер міжвікових взаємовідносин суттєво відрізнявся від контрольного. Вміст цАМФ став вищим у полях СА1, СА2 й СА3. У порівнянні з контрольними тваринами постішемична міжвікова різниця вмісту цГМФ у полі СА3 зменшилася, проте з'явилась у полях СА1 та СА2 (в обох випадках показник був вищим у старших тварин). У плазмі крові ішемія також спричинила появу міжвікової різниці вмісту цГМФ, якої не було в контрольних тварин.

Таким чином, незважаючи на близькі конститутивні показники циклічних нуклеотидів у тварин обох вікових груп, постішемична картина відрізнялася кардинально, що свідчить про вікову відмінність індукційних регуляторних механізмів участі цих посередників у перебігу ішемічно-реперфузійних пошкоджень.

Висновок

За сукупністю досліджених показників селективна чутливість полів гіпокампа до ішемічно-реперфузійних пошкоджень, притаманна дорослим тваринам, не завершена в шурів віком один місяць і продовжує формуватися впродовж подальшого онтогенезу.

Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять отримати нові наукові дані про онтогенетичні аспекти формування селективної чутливості різних структур лімбічної системи до інтимно-реперфузійних впливів.

Література. 1. *Абрамец И.И., Комиссаров И.В.* Глутаматергические механизмы ишемических повреждений мозга (обзор литературы и собственных исследований) // *Ж. Акад. мед. наук Украины.* – 2001. – Т.4, №4. – С. 613-633. 2. *Болдырев А.А., Бульгина Е.Р., Крамаренко Г.Г.* Является ли Na⁺/K⁺-АТФаза мишенью окислительного стресса? // *Бюл. экперим. биол. и мед.* – 1996. – Т. 121, №3. – С. 275-278. 3. *Геруш І.В., Мецишен І.Ф.* Стан глутатионової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настійки екінатеї пурпурової // *Вісн. проблем біол. і мед.* – 1998. – №7. – С. 10-15. 4. *Дев А.С., Захарушкина И.В.* Причинные факторы, течение и исходы ишемического инсульта у лиц молодого возраста // *Неврол. ж.* – 1999. – Т.4, №6. – С. 28–31. 5. *Дев А.С., Захарушкина И.В.* Переносные инсульты в молодом возрасте // *Ж. неврол. и психиатрии.* – 2000. – №1. – С.14-17. 6. *Зінкович І.І.* Фактори прогнозування стійкості організму до стресу // *Фізіол. ж.* – 1998. – Т.44, №3. – С.293. 7. *Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А.* Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. – М.: Знание, 2002. – 344с. 8. *Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф.* Спектрофотометрическое определение диеновых копьюгатов // *Вопр. мед. химии.* – 1984. – №4. – С. 125-127. 9. *Маньковская И.И., Вавилова Г.И., Харламова О.Н. и др.* Активность маркерных ферментов клеточных мембран у крыс при адаптации к гипоксической гипоксии // *Укр. биохим. ж.* – 1997. – Т.69, №2. – С. 79-87. 10. *Метод определения активности каталазы / Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Тока-*

рев В.Е. // *Лабор. дело.* 1988. – №1. – С. 16-18. 11. *Мецишен І.Ф.* Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // *Бук. мед. вісник.* – 1998. – Т. 2, №2. – С. 156-158. 12. *Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Совр. методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. 13. *Чевари С., Чабя И., Секей И.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лабор. дело.* – 1985. – №11. – С. 678-681. 14. *Fiske S., Subbarow J.* The colorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1925. – Vol. 66, N7. – P. 375-400. 15. *Israelsson B., Tengrup I.* Changes in adenylate cyclase and 5_α-nucleotidase activities in liver membranes from alloxan diabetic rats // *Experientia.* – 1980. – Vol.36, N2. – P. 257-258. 16. *Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadman E.R. et al.* Oxidative damage to brain proteins: loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87, № 3. – P. 5144-5147. 17. *Palkovits M.* Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat // *Brain. Res.* – 1973. – V.59, N1. – P. 449-450. 18. *Robinson J.D.* Interaction between monovalent cations and the (Na⁺-K⁺)-dependent adenosine triphosphatase // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1970. – Vol. 139, N1. – P. 17-27. 19. *Sherwood N.M., Timiras P.S.* A stereotaxis atlas of the developing rat brain. – Berkely-Los Angeles-London: University of California Press, 1970. – 208 p.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПОЛЕЙ ГИПОКАМПА К ИШЕМИИ

С.С.Ткачук, В.П.Пишак, В.Ф.Мыслицкий, О.Д.Шымкив, Л.О.Филиппова

Резюме. Установлено, что по показателям интенсивности липопероксидации, окислительной модификации белков, антиоксидантной активности, состояния маркерных ферментов мембран и системы циклических нуклеотидов селективная чувствительность полей гиппокампа к ишемическим-реперфузионным повреждениям, характерная для взрослых животных, не завершающаяся у одномесячных крыс и продолжает формироваться в течение дальнейшего онтогенеза.

Ключевые слова: каротидная ишемия, онтогенез, гиппокамп, селективность.

ONTOGENETIC ASPECTS OF THE FORMATION OF THE SELECTIVE SENSITIVITY OF HYPOCAMPAL AREAS TO ISCHEMIA

S.S.Tkachuk, V.P.Pishak, V.F.Myslytskiy, O.D.Shymkiv, L.O.Filipova

Abstract. According to the indices of free-radical lipid and protein oxidation, the activity of the antioxidant enzymes, membrane marker enzymes and the system of cyclic nucleotides the selective sensitivity of hippocampal areas to ischemic-reperfusion disorders, inherent to adult animals, is not completed in one month rats and continues its forming throughout further ontogenesis.

Key words: carotid ischemia, ontogenesis, hippocamp, selectivity.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. – 2004. Vol.3, №2. – P.306–310.

Надійшла до редакції 03.03.2004