

УДК 616.831. – 018 - 053

О. В. Ткачук

Буковинський державний медичний  
університет, м. Чернівці**РАННІ ЗМІНИ ОБМЕЖЕНОЇ ТКАНИННОЇ  
ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ  
В СТРУКТУРАХ МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ  
ПОЄДНАНІЙ ДІЇ СТРЕПТОЗОТОЦИН-  
ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ ТА НЕПОВНОЇ  
ГЛОБАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

**Ключові слова:** цукровий діабет, неповна глобальна ішемія мозку, реперфузія, тканинний протеоліз, потилична кора, лімбіко-гіпоталамічні структури.

**Резюме.** Досліджено ранні зміни обмеженої тканинної протеолітичної активності в корі потиличної частки та лімбіко-гіпоталамічних структурах після ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку в щурів зі стрептозотоциновим цукровим діабетом. Встановлено, що в усіх досліджених структурах мозку цукровий діабет знижує лізис низькомолекулярних білків і не впливає на лізис високомолекулярних. Ішемія-реперфузія головного мозку в щурів із цукровим діабетом знижує лізис азоколу в усіх досліджених структурах мозку.

**Вступ**

Ішемічно-реперфузійні пошкодження мозку реалізується низкою специфічних та неспецифічних патогенетичних ланок, які призводять до порушення морфофункціонального стану нейронів, а згодом і до їх загибелі [7,8]. Серед неспецифічних механізмів, які лежать в основі патогенезу багатьох захворювань, є порушення узгодженого функціонування активаторів та інгібіторів протеолітичної системи [2]. Модифікація балансу протеази-антипротеази є складовою патогенезу багатьох захворювань ЦНС [3,11]. Показано, що активація деяких протеолітичних ферментів може брати участь в ініціації каскаду екситотоксичності [11,12], порушувати проникність гематоенцефалічного бар'єру, особливо під час реперфузії [10]. Пригнічення та активація ферментів процесингу та деградації пептидів субстратами і продуктами протеолізу має важливе біологічне значення, яке полягає у регуляції рівня пептидів при патологічних станах організму, у тому числі при стрес-реакції. Така ендогенна саморегуляція необхідна для захисту організму від можливого виснаження внаслідок гіперфункції стресорних агентів (гормонів, катехоламінів та ін.) [3]. Таким чином, зміни активності протеолітичних ферментів можуть носити як пошкоджувальний, так і захисний характер.

Ми не зустріли в опрацьованих літературних джерелах даних стосовно стану обмеженої тканинної протеолітичної активності в церебральних структурах при поєднаній дії цукрового діабету та ішемічно-реперфузійного пошкодження мозку.

Однак саме за умов цукрового діабету ішемічні стани мозку зустрічаються часто як наслідок ангіопатій, гіпо-, гіперглікемічних і кетоацидотичних ком та інших ускладнень цього страждання. Тому подібні дослідження є актуальними.

**Мета дослідження**

Вивчити вплив неповної глобальної ішемії мозку з наступною реперфузією на показники лізису низько-, високомолекулярних білків та колагену в окремих структурах головного мозку щурів зі стрептозотоциновим цукровим діабетом.

**Матеріал і методи**

Дослідження проведено на самцях щурів, яким у віці два місяці однократно внутрішньочеревинно вводили стрептозотин (Sigma, США, 60 мг на 1 кг маси тіла) [1]. Рівень глікемії визначали глюкооксидазним методом. Тривалість діабету становила чотири місяці. По закінченні даного терміну в частини щурів під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг маси тіла) моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом двобічного кліпсування загальних сонних артерій протягом 20 хв [8]. Реперфузійний період становив 60 хв. Евтаназію тварин здійснювали декапітацією під наркозом.

Усі втручання та забій тварин проводилися паралельно в дослідних та контрольних групах.

Показники тканинної протеолітичної активності визначали в гомогенатах кори потиличної частки, перегородки мозку, преоптичної ділянки, медіобазального гіпоталамуса та мигдалеподібно-

го комплексу [9]. В дослідженнях використано реактиви Simko Ltd, Україна. Структури забирали, зв'язуючись з атласом стереотаксичних координат [14].

Отримані результати опрацьовано математично за допомогою пакета прикладних програм "Statistica ("Statsoft", США). Згідно теста Шапіро-Уїлка групи порівняння мали нормальний розподіл. Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Ст'юдента, достовірними вважали зміни при  $P < 0,05$ .

Усі експериментальні дослідження та евтаназія тварин проводилися з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000).

### Обговорення результатів дослідження

За дослідженими показниками цукровий діабет має неоднозначний вплив на різні структури мозку (табл.). Так, у потиличній частці кори, перегородці мозку та мигдалеподібному комплексі ядер шурів із цукровим діабетом достовірно знизився (в 1,2 раза у всіх структурах) лізис низькомолекулярних білків та зріс (в 1,3, 1,3 й 1,2 раза відповідно) лізис колагену. У преоптичній ділянці та медіобазальному гіпоталамусі встановлено лише достовірне зниження лізису азоальбуміну в 1,4 та 1,1 раза відповідно.

Наслідки ішемії-реперфузії головного мозку як у контрольних шурів, так і у тварин із цукровим діабетом у різних структурах мозку також неоднорідні. У контрольних тварин після такого втручання відбулося зростання лізису високомолекулярних білків та колагену в 1,4 та 1,2 раза відповідно в потиличній частці кори, зниження в 1,2 раза лізису низькомолекулярних білків та зростання в 1,1 раза лізису колагену в перегородці мозку й мигдалеподібному комплексі ядер.

Виявлено також зростання лізису високомолекулярних та зниження лізису низькомолекулярних білків у преоптичній ділянці та медіобазальному гіпоталамусі відповідно (в 1,1 раза в обох випадках).

Цукровий діабет суттєво модифікував реакцію вказаних структур на ішемію-реперфузію. У потиличній частці кори, на відміну від контрольних шурів, не страждав лізис високомолекулярних білків та протилежних змін – зниження в 1,4 раза – зазнав лізис колагену. У перегородці мозку та мигдалеподібному комплексі ядер знову ж таки, зворотних змін – зниження (в 1,7 та 1,4 раза) на відміну від контрольних шурів зазнав лізис колагену та не було притаманного контрольним тваринам

зниження лізису низькомолекулярних білків. У преоптичній ділянці та медіобазальному гіпоталамусі також мало місце зниження лізису колагену (в 1,5 та 1,4 раза), хоча в контрольних шурів цей показник на ішемію-реперфузію не реагував. Крім того, у преоптичній ділянці зріс лізис низькомолекулярних білків та не було притаманного контрольним тваринам зростання лізису високомолекулярних, а в медіобазальному гіпоталамусі не було змін лізису низькомолекулярних білків.

Аналіз отриманих результатів виявив декілька закономірностей. По-перше, у всіх п'яти досліджених структурах мозку цукровий діабет знижує лізис низькомолекулярних білків, у трьох (потиличній частці кори, перегородці мозку та мигдалеподібному комплексі ядер) – підвищує лізис колагену. По-друге, у жодному випадку діабет не впливає на лізис високомолекулярних білків.

Окрім того, цікавим є реагування протеолітичних систем на ішемію-реперфузію головного мозку в шурів із цукровим діабетом: стабільним у всіх досліджених структурах мозку цих тварин є зниження лізису азоколу, незалежно від наявності змін цього показника чи їх спрямування в контрольних шурів. Ймовірно, найбільш вразливими до ішемічно-реперфузійних впливів при діабеті в головному мозку є білки сполучної тканини.

Неоднозначність реакції протеолітичних систем різних структур мозку в контрольних шурів, на наш погляд, може мати декілька причин. Серед них можна вказати різну вираженість у цих структурах оксидативного стресу, до якого чутливі ферменти, у тому числі й протеолітичні [4,5,13]. Крім того, модифікація активності протеолітичних ферментів є однією з ланок неспецифічної реакції організму на дію екстремальних чинників [3], що доведено при різних моделях стрес-реакції, а також введенням глюкокортикоїдів. Таким чином, різниця в реакції протеолітичних систем різних структур мозку може відображати ступінь участі останніх в реакції на заподіяний ішемічний стрес та, до певної міри, їх чутливість до ішемії-реперфузії.

### Висновки

1. У всіх досліджених структурах мозку цукровий діабет знижує лізис низькомолекулярних білків, у потиличній частці кори, перегородці мозку та мигдалеподібному комплексі ядер – підвищує лізис колагену і не впливає на лізис високомолекулярних білків.

2. У шурів із цукровим діабетом ішемія-реперфузія головного мозку знижує лізис азоколу в усіх досліджених структурах мозку, незалежно від наявності змін цього показника чи їх спрямування в контрольних шурів.

Таблиця

Показники тканинного протеолізу в потиличній частці кори та лімбіко-гіпоталамічних структурах за поєднаної дії цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку (M±m, n=11)

Група спостереження	Лізис низько-молекулярних білків (мкг азоальбуміну /г тканини за год)	Лізис високо-молекулярних білків (мкг азоказеїну/г тканини за год)	Лізис колагену (мкг азоколу/г тканини за год)
потилична частка кори			
Контроль	110±2,19	75,6±2,17	4,41±0,131
Ішемія	113±4,90	102±2,98 p <sub>1</sub> <0,0001	5,27±0,182 p <sub>1</sub> <0,001
Діабет	88,9±5,61 p <sub>1</sub> <0,002	84,7±5,54	5,84±0,492 p <sub>1</sub> <0,01
Діабет та ішемія-реперфузія	94,7±5,17	86,9±4,50	4,20±0,313 p <sub>2</sub> <0,01
перегородка мозку			
Контроль	133±3,84	95,3±2,68	5,33±0,181
Ішемія	106±2,98 p <sub>1</sub> <0,0001	92,8±2,99	6,06±0,155 p <sub>1</sub> <0,006
Діабет	108±7,02 p <sub>1</sub> <0,006	105±7,58	7,06±0,682 p <sub>1</sub> <0,03
Діабет та ішемія-реперфузія	104±5,87	100±6,55	4,12±0,376 p <sub>2</sub> <0,001
мигдалеподібний комплекс ядер			
Контроль	119±2,78	92,4±2,50	5,07±0,142
Ішемія	101±2,75 p <sub>1</sub> <0,0001	92,7±3,04	5,76±0,160 p <sub>1</sub> <0,005
Діабет	98,9±4,01 p <sub>1</sub> <0,0001	98,3±3,44	6,28±0,555 p <sub>1</sub> <0,05
Діабет та ішемія-реперфузія	108±7,61	101±6,68	4,34±0,340 p <sub>2</sub> <0,007
преоптична ділянка			
Контроль	122±2,85	95,4±2,26	6,07±0,172
Ішемія	114±4,06	106±3,62 p <sub>1</sub> <0,02	6,04±0,230
Діабет	89,4±4,07 p <sub>1</sub> <0,0001	90,9±4,78	5,99±0,391
Діабет та ішемія-реперфузія	110±6,14 p <sub>2</sub> <0,01	104±7,10	4,11±0,318 p <sub>2</sub> <0,001
медіобазальний гіпоталамус			
Контроль	114±2,78	93,4±2,14	5,26±0,141
Ішемія	102±2,11 p <sub>1</sub> <0,003	94,8±2,21	5,54±0,265
Діабет	101±5,07 p <sub>1</sub> <0,05	101±4,19	5,20±0,435
Діабет та ішемія-реперфузія	96,4±5,72	91,5±5,37	3,60±0,355 p <sub>2</sub> <0,05

Примітка. Вірогідність змін у порівнянні з показниками: p<sub>1</sub> – у контрольних тварин; p<sub>2</sub> – у тварин із цукровим діабетом

### Перспективи подальших досліджень

Отримані результати обґрунтовують доцільність дослідження впливу поєднаної дії цукрового діабету та ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку на показники прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, порушення якого може лежати в основі виявлених змін протеолітичної активності.

**Література.** 1. *Антиоксидантная защита и структурные изменения в головном мозге у крыс при экспериментальном сахарном диабете* / С. А.Шестакова, Р.П.Степанов, Г.А.Григоренко, Н.В.Федорова [и др.] // Пробл. эндокринолог. -2006. - №1. - С.37- 44. 2. *Веремеенко К.Б.* Белковые ингибиторы плазмы крови - регуляторы активности протеолитических ферментов // К.Б. Веремеенко Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения. - Киев:МОРИОН, 2000. - С. 21-53. 3. *Веремеенко К.Б., Голобородько О.П., Кизим А.А.* Протеолиз в норме и патологии. - К.: Здоров'я, 1988. - 20 с. 4. *Вернигора А.Н.* Влияние гидроксибутирата натрия на активность

карбоксіпептидазы Н и ангиотензинпревращающего фермента в различных отделах мозга крыс / А.Н. Вернигора, М.Т. Генгин, Н.В. Щетинина, Д.А. Спиридонов // Укр. биохим. журн. - 1999. - Т. 71, № 2. - С. 91-92. 5. *Вьюшина А.В.* Перекисное окисление белков в сыворотке крови пренатально стрессированных крыс / А.В. Вьюшина, И.Г. Герасимова, М.А. Флеров // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 2004. - Т. 138, №9. - С. 41-44. 6. *Лебедев В.В.* Супероксидная теория патогенеза и терапии иммунных расстройств / В.В. Лебедев // Вест. Рос. АМН. - 2004 - №2. - С. 34-40. 7. *Лукьянова Л.Д.* Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 2004. - №2. - С. 2-11. 8. *Оксидантный стресс и кислородный статус при ишемическом инсульте* / В.И. Скворцова, Я.Р. Нарциссов, М.К. Бодыхов [и др.] // Журн. неврол. и психиатрии. - 2007. - № 1. - С. 30-36. 9. *Скибо Г.Н.* Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга Г.Н. Скибо // Патология. - 2004. - Т.1, №1. - С. 22-30. 10. *Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії* / В.М. Магальяс, А.О. Міхєєв, Ю.Є. Роговий [та ін.] - Чернівці, 2001. - 42 с. 11. *Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: Activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures* / G.A. Rosenberg, L.A. Cunningham, E.Y. Estrada et al. // Elsev. Netherlands. - 2001. - № 1-2. - P. 104-112. 12. *Kimura Y.* Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas / Y. Kimura, H. Saya, M. Nakao // Neuropathol. - 2000. - Vol. 20, N3. - P. 153-160. 13. *Neurotoxicity induced cleavage of p35 to p25 by calpain* / M.S. Lee, Y.T. Kwon, M. Li [et al.] // Nature. - 2000. - Vol. 405, N8526. - P. 360-364. 14. *Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation* / J. Rodrigo, D. Alonso, A. Fernandez et al. // Brain Res. - 2001. - Vol. 840, № 1-2. - P. 20-45. 15. *Sherwood N.M.* A stereotaxis atlas of the developing rat brain / N.M. Sherwood, P.S. Timiras - Berkely - Los Angeles - London: University of California Press, 1970. - 208 p.

**РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОСЛЕ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА З ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕПЕРFUЗИЕЙ У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

*О. В. Ткачук*

**Резюме.** Исследованы ранние изменения ограниченной тканевой протеолитической активности в коре затылочной доли и лимбико-гипоталамических структурах после ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом. Показано, что во всех исследованных структурах мозга сахарный диабет снижает лизис низкомолекулярных белков и не влияет на лизис высокомолекулярных. Ишемия-реперфузия головного мозга у крыс с сахарным диабетом снижает лизис коллагена во всех исследованных структурах мозга.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, неполная глобальная ишемия мозга, реперфузия, структуры мозга, протеолиз.

**EARLY CHANGES OF LIMITED TISSUE PROTEOLITIC ACTIVITY IN RATS BRAIN STRUCTURES UNDER COMBINED INFLUENCE OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES AND INCOMPLETE GLOBAL BRAIN ISCHEMIA**

*О. В. Ткачук*

**Abstract.** The influence of the incomplete global brain ischemia on the indices of tissue proteolytic activity in occipital cortex and some limbic-hypothalamic structures of rats brain with streptozotocin-induced diabetes has been studied. It was ascertained that the diabetes increases lysis of lowmolecular proteins in all investigated structures and has not any effects on lysis highmolecular ones. Ischemic-reperfusion damage of the brain decreases lysis of collagen in rats under streptozotocin-induced diabetes in all investigated structures.

**Key words:** diabetes mellitus, incomplete global brain ischemia, tissue proteolysis, cortex, limbic-hypothalamic structures.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

*Clin. and experim. pathol. - 2009. - Vol. 8, №2. - P. 72-75.*

*Надійшла до редакції 26.05.2009*

Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький