

УДК 577.15+577.112] : 577.121.7

Т.І. Бойчук, С.С. Ткачук

**РАННІ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ КЛІТИННИХ
МЕМБРАН ПІСЛЯ НЕПОВНОЇ ГЛОБАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ МОЗКУ В
ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ**

Буковинський державний медичний університет, м.Чернівці

Резюме. За показниками активності маркерних ферментів стану плазматичних мембран - $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФази}$ та 5'-нуклеотидази – досліджено ранні зміни функціонального стану нейронів гіпокампа після ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку в одно- та п'ятимісячних щурів. Неповна глобальна ішемія головного мозку знижує активність $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-АТФази}$ в усіх досліджених полях гіпокампа тварин обох вікових груп, за винятком поля СА3 п'ятимісячних тварин, та підвищує активність 5'-нуклеотидази в усіх досліджених полях гіпокампа тварин обох вікових груп.

Ключові слова: неповна глобальна ішемія мозку, гіпокамп, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФаза}$, 5'-нуклеотидаза.

Вступ

Ішемічне пошкодження мозку ініціює низку змін функціонального стану нейронів. Одними із ранніх маркерів реакції нейронів на ішемію-реперфузію є зміни активності ферментів їх плазматичної мембрани - $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФази}$ та 5'-нуклеотидази [2,3,4]. Існують літературні дані щодо вікових особливостей реакції мозку на неповну глобальну ішемію мозку в пізньому постішемічному періоді [9], однак рання церебральна реакція за названими показниками недосліджена. Проте саме вона може бути показником стану мембран нейронів у тому періоді ішемії мозку, протягом якого хворі найбільш часто надходять до стаціонару і може слугувати одним із критеріїв перебігу патологічного процесу та орієнтувати на відповідні терапевтичні заходи.

Мета дослідження

Вивчити стан активності $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФази}$ та 5'-нуклеотидази у тварин двох вікових груп після впливу неповної глобальної ішемії мозку.

Матеріал і методи

Дослідження проведено на самцях щурів віком один та п'ять міс. У тварин дослідної групи моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом припинення кровотоку по загальних сонних артеріях протягом 20 хв [7]. Реперфузійний період тривав одну год. Усі втручання та забій тварин проводилися паралельно в дослідних та контрольних групах, із 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).

Для вивчення активності $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаз}$ и та 5'-нуклеотидази забирали поля гіпокампа CA1, CA2, CA3. В якості контролю використано аналогічні структури мозку щурів, у яких препарували сонні артерії, але кровотік по них не порушували. Активність $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаз}$ и [КФ 3.6.1.3] визначали за методом [16], а 5'-нуклеотидази [КФ 3.1.3.5] - за методом [11] і обчислювали в мкмоль неорганічного фосфору (P_i) за хв/мг білка.

Для ідентифікації структур гіпокампа користувалися атласом стереотаксичних координат для мозку щурів, що розвивається [17].

Статистичну обробку проводили за t-критерієм Стьюдента.

Обговорення результатів дослідження

Дослідження показали, що конститутивна активність $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаз}$ и та 5'- нуклеотидази в різних полях гіпокампа досить варіабельна у тварин обох вікових груп. У той же час, відмінності активності ферментів у межах кожного поля одно- та п'ятимісячних щурів відсутні або несуттєві (табл.).

У щурів обох вікових груп неповна глобальна ішемія мозку знизила активність $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаз}$ и в усіх досліджених полях гіпокампа, за винятком поля CA3 п'ятимісячних тварин, де достовірних ефектів ішемії не спостерігалось (табл.). Найпомітнішим було падіння активності ферменту в полі CA1 п'ятимісячних щурів та полі CA2 одномісячних, а найменші зміни виявлено в полі CA3 одномісячних тварин.

Що стосується активності 5'-нуклеотидази, то за даного втручання вона зростала в полях СА1, СА2 та СА3 як одно-, так і п'ятимісячних щурів.

Найбільш суттєва активація цього ферменту відбулася в полі СА1 одномісячних щурів. Цікаво, що в цьому ж відділі гіпокампа п'ятимісячних тварин приріст активності ферменту стосовно інших полів був найменшим.

Отримані результати свідчать, що неповна глобальна ішемія головного мозку вже на ранніх стадіях розвитку спричиняє суттєві зміни активності Na^+/K^+ -АТФази та 5'-нуклеотидази.

Порушення активності мембранних ферментів за умов різних видів гіпоксії спостерігали інші автори [2,9]. Ці зміни пов'язують з багатьма причинами. У першу чергу, це виникнення енергодефіциту та ацидозу. За даними літератури, двобічна оклюзія сонних артерій ініціює порушення окиснювального фосфорилування та розвиток енергодефіциту. Вже через 15-30 хв після ішемії в структурах мозку значно порушується вміст глікогену, глюкози, пірувату, лактату креатинфосфату, АТФ, АДФ, АМФ, неорганічного фосфату й енергетичного заряду системи аденіннуклеотидів [3,4]. Через 1,5-2 год у великих півкулях мозку на 53% зменшувався вміст глікогену та на 44% зростав вміст глюкози. Значно збільшувався вміст лактату на тлі зниження пірувату. Відношення лактат/піруват зростало більш, ніж у 6 разів, що свідчить про різке посилення процесів анаеробного гліколізу. Вміст креатинфосфату в мозку щурів знижувався на 66%, АТФ – на 32% при одночасному зростанні вмісту АДФ, АМФ й неорганічного фосфату, що свідчить про порушення енергетичного обміну та виникнення метаболічного ацидозу [5]. Разом із тим відомо, що навіть за нормальних умов нейрональна Na^+/K^+ -АТФаза споживає 15-40 % енергії клітини, спрямовуючи її на підтримання іонної асиметрії. Тому зрозуміло, що енергодефіцит, який виникає за умов ішемії, порушує активність даного ферменту.

Крім того, активність Na^+/K^+ -АТФази регулюється катехоламінами, вміст яких у структурах мозку також негайно реагує на ішемічне втручання [8, 10,13].

Таблиця

Активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФази та 5'-нуклеотидази в полях гіпокампа щурів різного віку в ранньому періоді ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку ($M \pm m, n=9$)

Поле гіпокампа	Група тварин	Активність	
		АТФази (мкмоль P_i за хв / мг білка)	5'-нуклеотидази (мкмоль P_i за хв / мг білка)
CA1	1 місяць		
	Контроль	0,438 ± 0,021	0,677 ± 0,017
	Ішемія	0,337 ± 0,016*	0,977 ± 0,015*
	5 місяців		
	Контроль	0,439 ± 0,020	0,866 ± 0,018
	Ішемія	0,247 ± 0,016*	1,15 ± 0,011*
CA2	1 місяць		
	Контроль	0,315 ± 0,016	0,633 ± 0,013
	Ішемія	0,225 ± 0,017*	0,744 ± 0,014*
	5 місяців		
	Контроль	0,292 ± 0,015	0,632 ± 0,089
	Ішемія	0,236 ± 0,016*	0,754 ± 0,011*
CA3	1 місяць		
	Контроль	0,281 ± 0,013	0,588 ± 0,012
	Ішемія	0,247 ± 0,011*	0,932 ± 0,012*
	5 місяців		
	Контроль	0,326 ± 0,015	0,677 ± 0,012
	Ішемія	0,292 ± 0,017	0,721 ± 0,013*

Примітка: * - вірогідність змін стосовно показників у контрольних щурів

Значною мірою на активність ферменту впливають гормони, зокрема такі, як мінералокортикоїди та інсулін, які є гормонами стресу і їх секреція за умов ішемії мозку зазнає суттєвих модифікацій [3].

Пригнічення активності ферменту може спричинити також надмірна активація глутаматних рецепторів, зокрема, $m\text{GluIII}$, у той час як рецептори $m\text{GluI}$ мають протекторну властивість стосовно даного ферменту й запобігають його пригніченню [12,15]. Цілком зрозуміло, що співвідношення різних типів рецепторів у досліджених нами відділах гіпокампа може визначати їх чутливість до ішемії-реперфузії. Більше того, зниження активності $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФази є чинником, який через порушення енергозалежних систем зворотного захвату глутамату посилює ішемічний "глутаматний каскад" [1,6,14].

Пригнічує активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФази також надмірне утворення пероксинітриту, яким супроводжуються ішемічно-реперфузійні впливи [3,4].

Висновки

1. Ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку знижує активність Na^+K^+ -АТФази в усіх досліджених полях гіпокампа одно- та п'ятимісячних щурів за винятком поля СА3 п'ятимісячних тварин та підвищує активність 5'-нуклеотидази в усіх досліджених полях гіпокампа тварин обох вікових груп.

2. Ступінь реагування активності Na^+K^+ -АТФази та 5'-нуклеотидази різних полів гіпокампа суттєво відрізняється як у межах однієї вікової групи, так і в залежності від віку щурів.

Перспективи подальших досліджень

Враховуючи зміни активності Na^+K^+ -АТФази та 5'-нуклеотидази в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді доцільно вивчити в досліджених полях гіпокампа експресію генів раннього реагування.

Література. 1.Абрамець И.И. Глутаматергические механизмы ишемических повреждений мозга (обзор литературы и собственных исследований) /И.И.Абрамець, И.В.Комиссаров //Журн. АМН України.- 2001.- Т.4, №4.- С. 613-633. 2.Активность маркерных ферментов клеточных мембран у крыс при адаптации к гипоксической гипоксии / И.Н.Маньковская, Г.Л.Вавилова, О.Н.Харламова [и др.] //Укр. биохим. журн.- 1997.- Т.69, № 2.- С. 79-87. 3.Гусев Е.И. Ишемия головного мозга.- М.:Медицина, 2001.– 328 с. Е.И.Гусев, В.И.Скворцова. 4. Зозуля Ю.А.Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга.– М.:Знание, 2002.– 344 с. / Ю.А.Зозуля, В.А.Барабой, Д.А.Сутковой. 5.Лукиянова Л.Д. Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии / Л.Д.Лукиянова // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 2004. - №2. - С. 2-11. 6. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - обмен и регуляция цитоплазматической концентрации кальция в нейронах мозжечка крысы при действии глутамата / Т.П.Сторожевых, Е.Г.Сокорина, А.В.Вабниц [и др.]//Биохимия. – 2007. – Т.72,№7. – С.923-933. 7.Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга /Г.Г. Скибо//Патология.- 2004.- Т.1, №1.- С. 22-

30. 8. Тимофійчук І.Р. Постішемична реорганізація катехоламінергічних систем лімбіко-гіпоталамічних структур мозку та її корекція емоксипіном у щурів різного віку / І.Р.Тимофійчук, В.П.Пішак, В.Ф.Мислицький // Клін. та експерим. патол. - 2005. -Т.IV, №2. - С.96-99. 9.Шимків О.Д. Вікові особливості впливу неповної глобальної ішемії мозку на активність маркерних ферментів клітинних мембран / О.Д.Шимків, С.С.Ткачук // Експерим. та клін. мед. - 2004. – Т.1, № 2. – С. 25-28. 10. Blockade of central histaminergic H₂ receptors facilitates catecholaminergic metabolism and aggravates ischemic brain damage in the rat telencephalon / R.Otsuka, N.Adachi, G. Hamami [et al.] // Brain Res.-2003.- Vol.974, №.1-2.-P.117-126. 11. Israelsson B., Tengrup I. Changes in adenilate cyclase and 5'-nucleotidase activities in liver membranes from alloxan diabetic rats /B.Israelsson, I. Tengrup / B.Israelsson, I.Tengrup //Experientia. – 1980. – Vol.36, N2. – P. 257-258. 12. LY393615, a novel neuronal Ca²⁺ and Na⁺ channel blocker with neuroprotective effects in models of in vitro and in vivo cerebral ischemia / K.S. Mathews, D.P. McLaughlin, K.E. Patrick [et al.] // Elsev. Netherlands.- 2001.- №1.-P.138-149. 13. Monoamine metabolism and sympathetic nervous activation following subarachnoid haemorrhage: influence of gender and hydrocephalus / G. Lambert, S. Naredi, E. Eden [et al.] // Brain Res Bull.- 2002.- Vol.58,№.1.- P.77-82. 14. Neuronal hyperexcitability induced by reperfused brief episodes of hypoxia in rat hippocampal slices: involvement of ionotropic glutamate receptors and L-type Ca²⁺ channels / O. Godukhin, A. Savin, S. Kalemenev [et al.] // Neuropharmacol.- 2002. - Vol.42. - P.459 - 466. 15. O'Neill M.J. A new neuronal Ca²⁺ and Na⁺ channel blocker with neuroprotective effects / O'Neill M.J., Hicks C.A., Ward M.A. // Elsev. Netherlands.-2001.-№1.-P.138-149. 16. Robinson J.D. Interaction between monovalent cations and the (Na⁺ - K⁺)-dependent adenosine triphosphatase / J.D. Robinson //Arch. Biochem. and Biophys. – 1970. – Vol. 139, N1. – P. 17-27. 17. 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. Sherwood N.M., Timiras P.S.

**РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ МАРКЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ
КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПОСЛЕ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ
ИШЕМИИ МОЗГА У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

Т.И. Бойчук, С.С. Ткачук

Резюме. По показателям активности маркерных ферментов состояния плазматических мембран - $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$ и 5'-нуклеотидазы – исследованы ранние изменения функционального состояния нейронов гиппокампа после ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга в одно- и пятимесячных крыс. Неполная глобальная ишемия головного мозга уменьшает активность $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATФазы}$ во всех исследованных полях гиппокампа животных обеих возрастных групп, за исключением поля СА3 пятимесячных животных, и повышает активность 5'-нуклеотидазы во всех исследованных полях гиппокампа животных обеих возрастных групп

Ключевые слова: неполная глобальная ишемия мозга, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФазы}$, 5'-нуклеотидаза, гиппокамп.

**EARLY CHANGES OF THE ACTIVITY OF ENZYMATIC MARKERS OF
CELL MEMBRANES AFTER INCOMPLETE GLOBAL ISCHEMIA OF THE
BRAIN IN ANIMALS OF DIFFERENT AGE**

T.I. Wojchuk, S.S. Tkachuk

Abstract. On the basis of parameters of enzymatic markers of cell membranes $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and 5'-nucleotidase early changes of functionally state hippocampal neurons after ischemic-reperfusion brain damage in one and five month old rats has been established. The incomplete global brain ischemia decreases activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in all hippocampal regions except hippocampal CA3 field five month old animals and increases 5'-nucleotidase activity in all hippocampal regions of animals of both age groups.

Key words: incomplete global brain ischemia, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, 5'-nucleotidase, hippocamp.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2008. - Vol.7, №3.-P..

Надійшла до редакції 05.08.2008

Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький