

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ ОКРЕМИХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗКУ СТАРИХ ЩУРІВ НА ДВОБІЧНУ КАРОТИДНУ ІШЕМІЮ-РЕПЕРФУЗІЮ ЗА ПАРАМЕТРАМИ ПРОТЕО- ТА ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Досліджено вплив двобічної каротидної ішемії-реперфузії на показники протео- та фібринолітичної активності в структурах нової кори та полях гіпокампа дорослих і старих щурів. Установлено, що ішемія-реперфузія посилює всі або окремі показники протео- та фібринолітичної активності майже у всіх досліджених структурах мозку дорослих щурів і знижує їх у мозку старих тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мозок, каротидна ішемія-реперфузія, протеоліз, фібриноліз, старіння.

ВСТУП. Оксидативний стрес, який лежить в основі пошкодження мозкової тканини за умов ішемії-реперфузії, може ініціювати багато інших патогенетичних механізмів, здатних поглибити негативні наслідки порушення церебральної гемодинаміки [4, 9]. Одним із них є модифікація тканинної протео- та фібринолітичної активності, в результаті якої може змінюватися гомеостаз на клітинному рівні (транскрипція, трансляція та посттрансляційний процесинг), тканинному (секреція та інактивація нейропептидів), а також на рівні цілісного організму [9, 15]. До сьогодні неможливо дати однозначну оцінку ефектам активації протеолітичних систем нервової тканини в контексті співвідношення механізмів її пошкодження та виживання. З одного боку, надмірна активація деяких протеолітичних ферментів, зокрема калпаїну, який бере участь у пускових механізмах ексайтотоксичності, посилює небезпеку ішемічного пошкодження мозку, активує регулятори апоптозу [13, 15, 18]. Активація металопротеїназ призводить до підвищення проникності гематоенцефалічного бар'єру, виходу в кров і ліквор значної кількості нейроспецифічних білків та формування автоімунної реакції, спрямованої на посилення нейродеструктивних процесів у мозку [1, 2, 5, 6]. З іншого боку, активація протеаз необхідна для елімінації пошкоджених білків, зокрема в зоні ішемічного ядра [10], для метаболічного утворення стреслімітуючих нейропептидів – ендорфінів, α -передсердного натрійуретичного пептиду енкефалінів тощо, здатних обмежувати пошкоджувальні впливи

[16, 17], а також для підтримання балансу про- та антикоагуляційних механізмів [3].

Відомо, що старіння мозку супроводжується змінами прооксидантно-антиоксидантного статусу, кальцієвого гомеостазу, зростанням оксидативної модифікації білків, у тому числі ферментів [11, 12, 14], що зумовлює доцільність вивчення реакції протео- та фібринолітичних систем на ішемію-реперфузію головного мозку в старих тварин.

Метою роботи було провести порівняльний аналіз реакції протео- та фібринолітичної активності тканини нової кори і гіпокампа на двобічну каротидну ішемію-реперфузію в дорослих та старих щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на дорослих (5 міс.) і старих (22 міс.) білих лабораторних щурах-самцях. У частини тварин кожної вікової групи моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом 20-хвилинного двобічного кліпсування загальних сонних артерій та односторонньої реперфузії [7]. Контролем слугували псевдооперовані тварини. Усі втручання та евтаназію здійснювали під каліпсоловим наркозом (70 мг/кг маси тіла) з дотриманням ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000).

У гомогенатах кори лобової (КЛЧ) та потиличної часток (КПЧ), полів гіпокампа СА1, СА2, СА3 щурів обох вікових груп контрольних та дослідних серій після завершення часу спостереження визначали показники тканинної протео- (лізис низько-, високомолекулярних білків і колагену) та фібринолітичної активності (сумарний, ферментативний і неферментатив-

ний фібриноліз) [8] із використанням реактивів Simko Ltd, Україна.

Статистичну обробку проводили за t-критерієм Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Після двобічної каротидної ішемії-реперфузії в КЛЧ і КПЧ п'ятимісячних щурів зріс лізис високомолекулярних білків та колагену (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив ішемії-реперфузії на показники тканинного протеолізу в корі лобової та потиличної часток дорослих і старих щурів-самців ($M \pm m$, $n=11$)

Група спостереження	Лізис низькомолекулярних білків (мкг азоальбуміну/г тканини за 1 год)	Лізис високомолекулярних білків (мкг азоказеїну/г тканини за 1 год)	Лізис колагену (мкг азоколу/г тканини за 1 год)
Кора лобової частки			
Контроль 5 міс.	102±2,93	91,5±2,74	5,51±0,141
Ішемія 5 міс.	98,3±1,94	110±3,18 $p_1 < 0,001$	6,16±0,163 $p_1 < 0,01$
Контроль 22 міс.	80,2±3,39 $p_2 < 0,005$	72,8±3,49 $p_2 < 0,005$	4,21±0,232 $p_2 < 0,01$
Ішемія 22 міс.	102±4,91 $p_3 < 0,005$	76,1±3,38	3,09±0,249 $p_3 < 0,01$
Кора потиличної частки			
Контроль 5 міс.	113±2,09	77,9±2,23	4,67±0,137
Ішемія 5 міс.	116±3,89	105±3,10 $p_1 < 0,001$	5,59±0,193 $p_1 < 0,001$
Контроль 22 міс.	91,5±3,77 $p_2 < 0,002$	86,2±5,71	3,02±0,291 $p_2 < 0,001$
Ішемія 22 міс.	80,7±3,17 $p_3 < 0,01$	68,4±3,95 $p_3 < 0,01$	4,10±0,213 $p_3 < 0,05$

Примітка. У всіх таблицях даної статті – достовірність змін порівняно з показниками контрольних п'ятимісячних щурів (p_1); контрольних 22-місячних щурів (p_2); достовірність міжвікових відмінностей (p_3).

Порівняльний аналіз активності процесів протеолізу в контрольних щурів зазначених вікових груп показав, що в старих щурів у КЛЧ лізис низько-, високомолекулярних білків та колагену, а в КПЧ лізис низькомолекулярних білків і колагену нижчий, ніж у дорослих.

Ішемія-реперфузія мозку в КЛЧ старих щурів призвела до зростання лізису азоальбуміну та зниження лізису азоколу. В КПЧ лізис низько- та високомолекулярних білків зменшився, а лізис колагену збільшився.

У полі гіпокампа СА1 дорослих щурів ішемія-реперфузія знизилася лізис низькомолекулярних білків, у полях СА2 і СА3 – посилила лізис колагену та високомолекулярних білків (табл. 2). При порівнюванні конститутивної протеолітичної активності виявлено, що в полі СА1 старих щурів нижчий, ніж у дорослих, лізис низькомолекулярних білків, у полі СА2 – лізис низько- та високомолекулярних, у полі СА3 – лізис колагену. В останньому полі старих тварин також вища активність лізису високомолекулярних білків. Після ішемії-реперфузії в полях гіпокампа СА1 та СА2 старих щурів зменшився лізис низькомолекулярних білків і колагену, в полі СА3 – лише колагену.

Аналіз фібринолітичної активності показав, що в КЛЧ та КПЧ і полі гіпокампа СА3 дорос-

лих щурів ішемія-реперфузія мозку підвищувала активність усіх складових фібринолізу, в полі гіпокампа СА1 – сумарного та ферментативного, у полі СА2 – сумарного та неферментативного (табл. 3, 4).

У досліджених структурах мозку старих щурів, за винятком поля гіпокампа СА3, виявлено зниження конститутивної активності всіх або окремих параметрів фібринолізу. Так, у КЛЧ та полях гіпокампа СА1 і СА2 22-місячних щурів менша сумарна та ферментативна фібринолітична активність, у КПЧ – сумарна, неферментативна та ферментативна.

На протипагу дорослим тваринам, у відповідь на ішемію-реперфузію в КЛЧ та КПЧ і полі гіпокампа СА1 старих щурів відбулося зниження сумарної, неферментативної та ферментативної фібринолітичної активності, у полі СА2 – сумарної та ферментативної, у полі СА3 – ферментативної.

ВИСНОВКИ. 1. За більшістю визначених показників майже у всіх досліджених структурах мозку конститутивна протео- та фібринолітична активність нижча в старих щурів.

2. У дорослих щурів двобічна каротидна ішемія-реперфузія посилює лізис високомо-

Таблиця 2 – Вплив ішемії-реперфузії на показники тканинного протеолізу в полях гіпокампа дорослих і старих щурів-самців (M±m, n=10)

Група спостереження	Лізіс низькомолекулярних білків (мкг азоальбуміну/г тканини за 1 год)	Лізіс високомолекулярних білків (мкг азоказеїну/г тканини за 1 год)	Лізіс колагену (мкг азоколу/г тканини за 1 год)
Поле гіпокампа CA1			
Контроль 5 міс.	123±2,89	92,2±2,46	5,89±0,175
Ішемія 5 міс.	102±4,60 p ₁ <0,005	98,9±3,38	6,41±0,300
Контроль 22 міс.	100±6,52 p ₂ <0,01	101±6,95	6,58±0,425
Ішемія 22 міс.	84,2±4,51 p ₃ <0,05	97,2±5,98	5,01±0,381 p ₃ <0,01
Поле гіпокампа CA2			
Контроль 5 міс.	112±2,96	89,2±2,12	5,29±0,112
Ішемія 5 міс.	116±3,29	110±3,26 p ₁ <0,001	7,37±0,289 p ₁ <0,001
Контроль 22 міс.	98,2±3,92 p ₂ <0,025	71,3±3,09 p ₂ <0,005	6,17±0,403
Ішемія 22 міс.	73,2±2,92 p ₃ <0,005	78,6±3,49	4,37±0,373 p ₃ <0,01
Поле гіпокампа CA3			
Контроль 5 міс.	128±4,01	96,4±2,01	5,10±0,132
Ішемія 5 міс.	119±5,06	117±3,31 p ₁ <0,005	7,01±0,117 p ₁ <0,001
Контроль 22 міс.	110±5,08	119±5,48 p ₂ <0,025	4,22±0,242 p ₂ <0,01
Ішемія 22 міс.	107±4,09	105±5,02	3,04±0,341 p ₃ <0,01

Таблиця 3 – Вплив ішемії-реперфузії на показники тканинного фібринолізу в корі лобової та потиличної часток дорослих і старих щурів-самців (M±m, n=10)

Група спостереження	Сумарна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за 1 год)	Неферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за 1 год)	Ферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за 1 год)
Кора лобової частки			
Контроль 5 міс.	35,7±1,01	20,6±0,492	15,2±0,628
Ішемія 5 міс.	50,1±1,06 p ₁ <0,001	27,2±1,37 p ₁ <0,001	22,9±0,792 p ₁ <0,001
Контроль 22 міс.	27,1±2,01 p ₂ <0,005	19,1±1,72	8,01±0,389 p ₂ <0,001
Ішемія 22 міс.	20,1±1,39 p ₃ <0,025	14,7±0,481 p ₃ <0,05	5,41±0,492 p ₃ <0,005
Кора потиличної частки			
Контроль 5 міс.	50,1±0,508	24,2±0,982	25,9±0,461
Ішемія 5 міс.	58,1±0,785 p ₁ <0,001	29,7±0,588 p ₁ <0,001	28,4±0,606 p ₁ <0,005
Контроль 22 міс.	32,5±2,68 p ₂ <0,001	18,1±0,560 p ₂ <0,001	14,4±0,702 p ₂ <0,001
Ішемія 22 міс.	21,2±2,79 p ₃ <0,005	14,1±0,721 p ₃ <0,005	7,2±0,501 p ₃ <0,001

Таблиця 4 – Вплив ішемії-реперфузії на показники тканинного фібринолізу в полях гіпокампа дорослих і старих щурів-самців (M±m, n=11)

Група спостереження	Сумарна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за 1 год)	Неферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за 1 год)	Ферментативна фібринолітична активність (мкг азофібрину/г тканини за 1 год)
Поле СА1			
Контроль 5 міс.	55,7±3,08	27,3±1,95	28,4±1,39
Ішемія 5 міс.	64,2±2,52 p ₁ <0,05	29,1±1,98	35,1±1,41 p ₁ <0,01
Контроль 22 міс.	47,7±1,91 p ₂ <0,025	23,8±0,682	23,9±0,538 p ₂ <0,01
Ішемія 22 міс.	38,6±0,878 p ₃ <0,005	21,1±0,569 p ₃ <0,05	17,5±0,462 p ₃ <0,005
Поле СА2			
Контроль 5 міс.	60,7±3,02	25,2±2,18	35,5±1,01
Ішемія 5 міс.	71,2±2,32 p ₁ <0,01	35,5±2,38 p ₁ <0,01	35,7±1,39
Контроль 22 міс.	51,0±1,29 p ₂ <0,01	21,6±0,861	29,4±0,872 p ₂ <0,005
Ішемія 22 міс.	45,1±1,32 p ₃ <0,01	23,5±0,952	21,6±0,911 p ₃ <0,001
Поле СА3			
Контроль 5 міс.	51,2±1,28	22,6±0,504	28,6±0,712
Ішемія 5 міс.	61,8±1,47 p ₁ <0,001	27,0±1,32 p ₁ <0,01	34,8±1,42 p ₁ <0,01
Контроль 22 міс.	56,1±2,72	26,6±2,19	29,5±1,01
Ішемія 22 міс.	55,7±2,09	31,0±1,97	24,7±1,52 p ₃ <0,05

лекулярних білків та колагену в усіх досліджених структурах, за винятком поля гіпокампа СА1, а також посилює всі або окремі складові фібринолітичної активності.

3. У старих щурів ішемія-реперфузія знижує лізис всіх або окремих параметрів протео- та фібринолітичної активності в досліджених структурах мозку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аутоиммунные механизмы при ишемии / Н. Константинова, В. И. Скворцова, И. Еремин [и др.] // Аллергол. и иммунол. – 2005. – **6**, № 2. – С. 147–149.
2. Иммунохимическая верификация постинсультной хронизации нейродегенеративного процесса у крыс с окклюзией средней мозговой артерии / С. В. Петров, С. В. Лебедев, О. Ц. Турина, В. П. Чехонин // Нейрохимия. – 2005. – № 2. – С. 38–44.
3. Монастирський В. А. Коагулопатичні аспекти патогенезу загально-патологічних процесів / В. А. Монастирський // Журн. АМН України. – 2002. – **8**, № 2. – С. 238–258.
4. Оксидантний стресс и кислородный статус при ишемическом инсульте / В. И. Скворцова, Я. Р. Нарциссов, М. К. Бодыхов [и др.] // Журн. неврол. и психиатр. – 2007. – **107**, № 1. – С. 30–36.

5. Патогенетическая роль нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейроспецифических белков при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях центральной нервной системы у новорожденных / В. П. Чехонин, С. В. Лебедев, Д. В. Блинов [и др.] // Вопр. гин. акуш. и перинатол. – 2004. – **3**, № 2. – С. 50–61.
6. Прогностическое значение маркеров воспаления и аутоантител к нейроспецифическим антигенам у больных с острым ишемическим инсультом / Н. Ю. Рулева, П. Р. Камчатнов, Т. К. Люкова [и др.] // Аллергол. и иммунол. – 2004. – **5**, № 1. – С. 211.
7. Скибо Г. Н. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г. Н. Скибо // Патология. – 2004. – **1**, № 1. – С. 22–30.

8. Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / [В. М. Магальяс, А. О. Міхеев, Ю. Є. Роговий та ін.]. – Чернівці, 2001. – 42 с.
9. Тимофійчук І. Р. Вікові особливості впливу емоксипіну на постішемні зміни фібрино- та протеолітичної активності в структурах проміжного мозку щурів / І. Р. Тимофійчук // Бук. мед. вісник. – 2004. – **8**, № 3–4. – С. 280–284.
10. Элиминация нейроспецифических белков из ЦНС (патогенетические и методические аспекты) / В. П. Чехонин, С. В. Лебедев, О. И. Гурина [и др.] // Вестн. РАМН. – 2006. – № 6. – С. 3–12.
11. Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism / N. M. Giusto, G. A. Salvador, P. I. Castagnet [et al.] // Neurochem. Res. – 2002. – **27**, № 11. – P. 1513–1523.
12. Age-related changes in levels of tyrosine kinase B receptor and fibroblast growth factor receptor 2 in the rat inferior colliculus: Implications for neural senescence / T. Sato, T. S. Wilson, L. F. Hughes [et al.] // Neurosci. – 2001. – № 3. – P. 695–702.
13. Calpain-Mediated N-Cadherin Proteolytic Processing in Brain Injury / Y. N. Jang, Y. S. Jung, S. H. Lee [et al.] // J. Neurosci. – 2009. – **29**, № 18. – P. 5974–5984.
14. Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects / E. Mariani, F. Mangialasche, F. T. Feliziani [et al.] // Exp. Gerontol. – 2008. – **43**, № 5. – P. 445–451.
15. Neurotoxicity induced cleavage of p35 to p25 by calpain / M. S. Lee, Y. T. Kwon, M. Li [et al.] // Nature. – 2000. – **405**, № 8526. – P. 360–364.
16. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis / M. Yamakuchia, C. D. Lottermanb, C. Baob [et al.] // PNAS. – 2010. – **107**, № 14. – P. 6334–6339.
17. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions / K. Tahaka // Proc. Jpn. Acad. Ser. Phys. Biol. Sci. – 2009. – **85**, № 1. – P. 12–36.
18. Zhao B.Q. Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke / B. Q. Zhao, E. Tejima, E. H. Lo // Stroke. – 2007. – **38**, № 2. – P. 748–752.

Т.И. Бойчук

БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ЧЕРНОВЦЫ

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА СТАРЫХ КРЫС НА ДВУСТОРОННЮЮ КАРОТИДНУЮ ИШЕМИЮ-РЕПЕРФУЗИЮ ПО ПАРАМЕТРАМ ПРОТЕО- И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Резюме

Исследовано влияние двусторонней каротидной ишемии-реперфузии на показатели протео- и фибринолитической активности в структурах новой коры и полях гиппокампа взрослых и старых крыс. Установлено, что ишемия-реперфузия усиливает все или некоторые показатели протео- и фибринолитической активности почти во всех исследованных структурах мозга взрослых крыс и снижает их в мозге старых животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мозг, каротидная ишемия-реперфузия, тканевой протеолиз, фибринолиз, старение.

T.I. Boychuk

BUCOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, CHERNIVTSI

PECULIARITIES OF SOME BRAIN STRUCTURE REACTION OF OLD RATS ON BILATERAL CAROTID ISCHEMIA-REPERFUSION BY THE PARAMETERS OF FIBRINOLYTIC AND PROTEOLYTIC ACTIVITY

Summary

The effect of bilateral carotid ischemia-reperfusion on the proteo- and fibrinolytic activity parameters in the neocortex structures and hippocampal zones of adult and old male rats has been investigated. It has been revealed that ischemia-reperfusion increases all or some parameters of proteo- and fibrinolytic activity almost in all studied brain structures of adult rats and decreases them in old rats.

KEY WORDS: brain, carotid ischemia-reperfusion, fibrinolysis, proteolysis, ageing.

Отримано 01.12.10

Адреса для листування: Т.І. Бойчук, Буковинський державний медичний університет, площа Театральна, 2, Чернівці, 58000, Україна.