

ПЕРЕРОЗПОДІЛ БІЛКІВ КЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТА ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЙ ЩУРІВ ПРИ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ

Надійшла 1 березня 2014 р.

Показано, що в умовах розвитку експериментального хронічного панкреатиту в мозочку та таламусі щурів відбуваються зміни концентрацій розчинної та мембранної форм нейронної молекули клітинної адгезії (NCAM), що супроводжується зниженням локомоторної та орієнтувально-пізнавальної активності тварин і розвитком стану стресу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ізоформи NCAM, хронічний панкреатит, поведінкові реакції.

ВСТУП

В останні роки в усьому світі та Україні спостерігається збільшення кількості пацієнтів із хронічним панкреатитом (ХП) [1]. ХП – це прогресуюче запальне захворювання підшлункової залози, що призводить до поступового руйнування її паренхіми та фіброзного переродження. В результаті розвивається екзокринна й ендокринна недостатність даного органа [2].

Порушення процесів вільнорадикального окиснення є раннім неспецифічним фактором пошкодження, що лежить в основі розвитку багатьох захворювань, у тому числі ХП. Рівень антиоксидантної активності в тканині підшлункової залози є одним із найнижчих в організмі, тому вивільнення з цієї залози в кров продуктів вільнорадикального окиснення та ендотоксинів сприяє формуванню синдрому ендогенної інтоксикації [3]. Ендотоксини викликають зміни проникності гемато-енцефалічного бар'єра. Основна їх частина належить до молекул середньої маси, що здатні проявляти виражену нейротоксичну активність, приєднуватися до певних клітинних рецепторів і блокувати їх, неадекватно змінюючи метаболізм та функції нервових клітин [4].

Раннім і тяжким ускладненням гострого панкреатиту є панкреатична енцефалопатія, патогенез та механізми розвитку якої досліджені недостатньо

[5]. Механізм розвитку такої енцефалопатії при ХП на сьогодні практично не з'ясований та представляє значний інтерес для дослідників. Дані про вплив ХП на розподіл нейронспецифічних білків у різних відділах головного мозку та на поведінку тварин з цією патологією поки відсутні.

У нашій роботі ми досліджували зміни рівнів фракцій нейронної молекули клітинної адгезії (NCAM) у різних відділах головного мозку та модифікації поведінкових феноменів у щурів в умовах перебігу фіброзної стадії ХП.

МЕТОДИКА

Експерименти виконували на лабораторних щурах-самцях (вік шість місяців, маса 190–220 г). Для моделювання ХП тваринам після лапаротомії проводили оклюзію панкреатичної протоки, накладаючи лігатуру («Prolene» 5/0) [6]. Одну групу тварин ($n = 6$) склали псевдооперовані щури, яким здійснювали лише лапаротомію (контроль), а другу ($n = 6$) – щури, в яких ХП, викликаний згаданою оклюзією, на 30-ту добу відповідав фіброзній стадії.

Через 30 діб після операцій мозок щурів вилучали, очищали від оболонок і капілярів та виділяли мозочок, гіпокамп і таламус. Гомогенізацію тканин мозку проводили при +4 °С в буфері А, що вміщував 25 мМ трис-НСІ (рН 7.4), 1 мМ ЕДТО, 2 мМ β-меркаптоетанолу, 0.2 мМ ФМСФ, 0.01 % мертвіоляту (співвідношення 1:10). У перебігу послідовних стадій центрифугування отримували фракції, які вміщували водорозчинну (sNCAM)

¹ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», Дніпропетровськ (Україна).

²Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара (Україна).
Ел. пошта: viktoriam7@gmail.com (В. А. Макачук).

та мембранну (mNCAM) фракції білка клітинної адгезії; екстракцію виконували за допомогою три-тону X-100 (2 %).

В отриманих фракціях білків визначали кількісний вміст NCAM за допомогою інгібіторного методу ІФА з використанням моноспецифічних антитіл щодо NCAM і відповідного очищеного білка як стандарту [7]. Вміст NCAM характеризували відношенням його кількості в пробі до кількості загально-го білка (ЗБ) у даному екстракті (мкг NCAM/мг ЗБ). Кількість ЗБ у фракціях мозку визначали за методом Бредфорд [8].

Поведінкову активність тварин досліджували з використанням стандартного тесту «відкритого поля» [9].

Статистичну обробку числових результатів здійснювали, застосовуючи стандартний пакет прикладних програм „SPSS for Windows 9.0”. Для показників розраховували середні значення та похибку середнього. Міжгрупові різниці вважали вірогідними при $P < 0.05$. Проводили кореляційний аналіз, за Пірсоном [10].

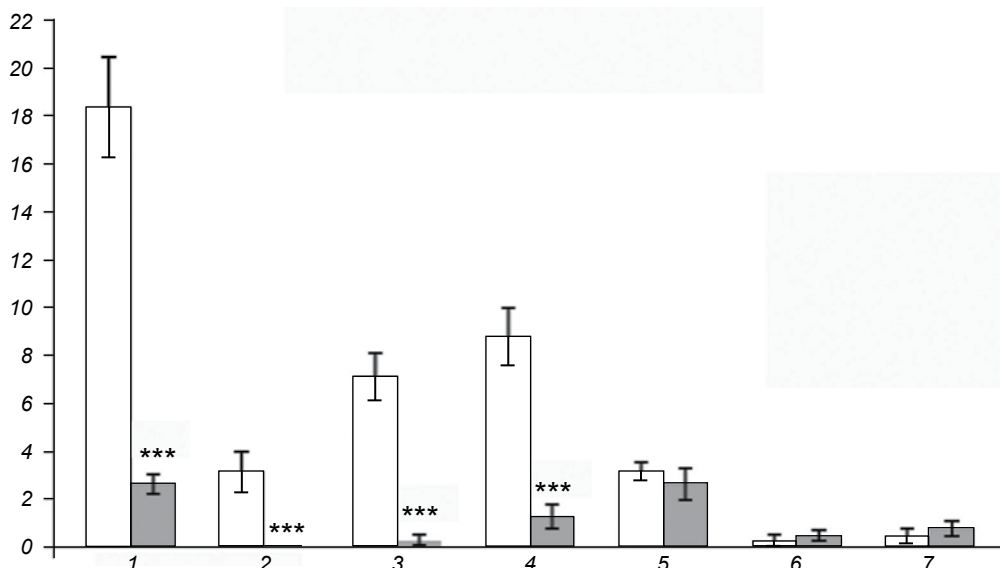
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження розподілу NCAM були обрані відділи мозку, значною мірою відповідальні за кон-

троль рухової активності, сенсорну чутливість (у тому числі больову) та процеси навчання і пам'яті.

Зміни розподілу NCAM в умовах гострих неврологічних розладів (глобальна гіпоксія, ішемічний і геморагічний інсульт, черепно-мозкові травми) були докладно описані раніше [11]. Проте на сьогодні відомості щодо перерозподілу NCAM у різних відділах головного мозку при хронічних захворюваннях внутрішніх органів, у тому числі і при ХП, є досить обмеженими.

За результатами кількісного аналізу фракцій NCAM у мозочку було встановлено, що вміст sNCAM у даному відділі мозку був більшим, ніж у контролі, на 19.7 % (2.18 ± 0.14 порівняно з 1.75 ± 0.14 мкг/мг ЗБ; $P < 0.05$). У той же час вміст mNCAM був на 46.0 % нижчим (212.52 ± 29.19 та 114.83 ± 9.48 мкг/мг ЗБ відповідно; $P < 0.01$). Такі зрушення, можливо, відбувалися за рахунок «зрізання» позаклітинного домену mNCAM із мембран клітин. Кореляційний аналіз продемонстрував наявність сильного зворотного кореляційного зв'язку між вмістами sNCAM і mNCAM у фракціях, екстрагованих із мозочка ($r = -0.886$, $P < 0.05$). Як відомо, sNCAM істотно залучений у контроль позаклітинного сигналювання [12]. NCAM регулює міжклітинну адгезію та міграцію нейронів [13]. Трансмембранні адгезивні молекули є не лише посередниками в процесі



Характеристики поведінки в тесті відкритого поля у контрольних щурів і тварин із хронічним панкреатитом (ХП) у фіброзній стадії (білими та сірими стовпчиками позначені показники в групах контролю та щурів із ХП відповідно).

По вертикалі – кількість поведінкових феноменів протягом періоду спостереження. 1–4 – кількості перетинів меж зовнішніх квадратів, меж внутрішніх квадратів, вертикальних стійок та реалізацій норкового рефлексу відповідно; 5–7 – кількість актів грумінгу, уринації та дефекації відповідно. Трьома зірочками позначені випадки вірогідної міжгрупової різниці з $P < 0.001$. У кожній групі було по шість тварин.

міжклітинного розпізнавання, але й можуть перетворювати сигнали всередині клітини та індукувати клітинні відповіді, що змінюють синаптичну пластичність [14]. Перерозподіл водорозчинної та мембранної форм NCAM у мозочку є наслідком ендотоксикації при ХП може бути помітним фактором, що впливає на функціональну активність цього відділу мозку досліджуваних щурів.

У таламусі була виявлена протилежна тенденція перерозподілу NCAM; очевидними були зниження кількості sNCAM і збільшення mNCAM (на 34.2 %, у середньому з 153.82 ± 7.55 до 206.45 ± 21.74 мкг/мг ЗБ). У гіпокампі відмінності вмісту NCAM при експериментальному ХП не досягли рівня вірогідності; функціонування зазначеного відділу мозку, відповідального за пізнавальну діяльність, не зазнавало драматичних змін у відповідному аспекті.

Певний дисбаланс вмісту форм NCAM у мозочку і таламусі свідчить про істотний перерозподіл цього протеїну між згаданими відділами мозку, що, вірогідно, визначає деякий специфічний патерн пластичності в ЦНС при ендотоксикації в умовах розвитку ХП.

Перебіг ХП та перерозподіл форм NCAM у мозку експериментальних тварин супроводжувалися істотним зниженням інтенсивностей локомоторної та орієнтувально-пізнавальної активності щурів (див. рисунок), а також проявами стресового стану (про що свідчило деяке збільшення кількості актів уринації і дефекації). Кореляційні зв'язки між рівнями фракцій NCAM та показниками поведінки щурів були різноспрямованими. Для кількостей перетину тваринами зовнішніх квадратів та рівня sNCAM у мозочку r складав -0.638 ($P < 0.05$), а аналогічний коефіцієнт для рівня sNCAM у таламусі був позитивним (0.638 ; $P < 0.05$). Між рівнем mNCAM у мозочку та кількістю вертикальних стійок кореляція була також позитивною ($r = 0.828$, $P < 0.05$).

Як видно з представлених результатів, розвиток експериментального ХП у щурів протягом 30 діб істотно впливає на функціонування мозочка й таламуса, і одним із аспектів таких змін є перерозподіл форм NCAM. Зміна характеристик міжклітинної адгезії в зазначених структурах мозку може бути одним із факторів, що сприяють розвитку панкреатичної енцефалопатії; це супроводжується пригніченням моторної активності тварин та розвитком стану стресу.

Дослідження виконувалися згідно з положеннями Міжнародної конвенції із захисту тварин, які використовуються в експериментах (Страсбург, 1985), а також Закону України „Про захист тварин від жорстокого поводження” (Київ, 2006).

Автори даної статті – В. А. Макаруч та Г. О. Ушакова – підтверджують, що у них немає конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ю. М. Степанов, Н. Г. Заїченко, “Хронічний панкреатит: біліарний механізм, чинники та перебіг”, *Запорозж. мед. журн.*, **70**, № 1, 46-50 (2012).
2. R. K. Tandon and P. K. Garg, “Oxidative stress in chronic pancreatitis: pathophysiological relevance and management,” *Antioxidants Redox Signal.*, **15**, No. 10, 2757-2766 (2011).
3. C. Çöl, K. Dinler, O. Hasdemir, et al., “Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis,” *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **9**, No. 1, 78-82 (2010).
4. A. Catalá, “Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions,” *Chem. Phys. Lipids*, **157**, 1-11 (2009).
5. D. Zhen, L. Jun, L. Rong, and H. Xiao Hua, “Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: A potential role of MCP-1,” *J. Digest. Dis.*, **13**, 179-185 (2012).
6. B. J. Page, D. F. Toit, C. Muller, et al., “An immunocytochemical profile of the endocrine pancreas using an occlusive duct ligation model,” *J. Pancreas*, **4**, No. 1, 191-203 (2000).
7. Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф, А. Яклич, *Иммуноферментный анализ*, Мир, Москва (1988).
8. M. Bradford, “Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1985).
9. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991).
10. А. Петри, К. Сэбин, *Наглядная статистика в медицине*, Гэотар-Мед, Москва (2003).
11. L. H. Brennaman and P. F. Maness, “NCAM in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, **663**, 299-317 (2010).
12. M. Hagiya, N. Ichianagi, K. B. Kimura, et al., “Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth,” *Am. J. Pathol.*, **174**, No. 6, 2278-2289 (2009).
13. S. Zecchini, L. Bombardelli, A. Decio, et al., “The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signaling,” *EMBO Mol. Med.*, **3**, 480-494 (2011).
14. R. Kleene, M. Mzoughi, G. Joshi, et al., “NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments,” *J. Neurosci.*, **32**, No. 30, 10784-10798 (2010).