

ARTICLE

УДК [576.3:546.47]:502.55(203)(477.64-2)+612:014.1:576.32:159.944.4

МЕТАБОЛІЗМ МЕТАЛІВ У ГІПОКАМПИ ТА РОЛЬ ЦИНКУ В ПАТОГЕНЕЗИ ЕПІЛЕПТИФОРМНИХ СУДОМ

О.М. Кучковський

Запорізький національний університет. Email: olegk181@gmail.com

У досліджах на щурах було показано, що при стресуванні організму тварин спостерігаються корелятивні зміни вмісту цинку та секреторного матеріалу в гіпокампі, клітинах Панета та В-клітинах підшлункової залози. Характер змін цих показників залежав від стресора. При цьому зміни вмісту цинку в гіпокампі та гіпоталамусі були протилежними, що можна пояснити виходом цього металу разом із секретом у кров'яне русло. За результатами дослідження змін вмісту цинку в центральних та периферичних цинкмістких органах при різних змодельованих функціональних станах можна припустити наявність загального механізму координації функціональної активності гіпокампу й інших цинкмістких органів за допомогою зміни метаболізму хелатоутворюючого цинку, регуляція якого здійснюється за участю гіпокампу.

Ключові слова: 8-ТСХ, 8-БСХ, гіпокамп, В-клітини, клітини Панета, цинк.

МЕТАБОЛИЗМ МЕТАЛЛОВ В ГИППОКАМПЕ И РОЛЬ ЦИНКА В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ СУДОРОГ

О.Н. Кучковский

Запорожский национальный университет. Email: olegk181@gmail.com

В опытах на крысах было показано, что при стрессировании организма животных наблюдались коррелятивные изменения содержания цинка и секреторного материала в гиппокампе, клетках Паннета и В-клетках поджелудочной железы. Характер изменения зависел от стрессора. При этом изменения содержания цинка в гиппокампе и гипоталамусе были разнонаправленными, что можно объяснить выходом данного металла вместе с секреторным материалом в кровяное русло. Результаты исследований изменений содержания цинка в центральных и периферических цинксодержащих органах при разных смоделированных функциональных состояниях позволяют сделать предположение о наличии общего механизма координации функциональной активности как гиппокампа, так и других цинксодержащих органов при помощи изменений метаболизма хелатообразующего цинка, регуляция которого осуществляется при помощи гиппокампа.

Ключевые слова: 8-ТСХ, 8-БСХ, гиппокамп, В-клетки, клетки Паннета, цинк.

METALS IN THE METABOLISM OF HIPPOCAMPUS AND ROLE OF ZINC IN THE PATHOGENESIS OF EPILEPTIC SEIZURES

O.M. Kuchkovsky

Zaporizhzhya National University. Email: olegk181@gmail.com

Physiological mechanisms of convulsions status during epilepsy or episindrom significantly different from the mechanisms, which were describe for other disorders associated with glutamatergic system, such as schizophrenia (a decrease of glutamate in neurons and increased dopaminergic load), drug addiction and alcoholism (the formation of endogenous opioids and dopamine, strengthening the role of GABA-ergic system).

Citation:

Kuchkovsky, O.M. (2016). Metals in the metabolism of hippocampus and role of zinc in the pathogenesis of epileptic seizures. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 34–44.

Поступило в редакцию / Submitted: 12.04.2016

Принято к публикации / Accepted: 13.05.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201633>

© Kuchkovs'kij, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License

With glutamatergic transmission are connect not only convulsive state, but also the realization of higher integrative functions. Therefore, the development of epilepsy, particularly which caused glutamate, implemented by activating Zn-ergic hippocampal neurons, associate with complex changes in human mental functions. Based on a scientific literature about of the role of chelating zinc in the mechanisms of glutamatergic transmission, we can suggest it participation in the mechanisms of formation of epilepsy convulsions.

In experience on animals, was show that in the animal organism of stressing correlative changes observe zinc content and secretory material in the hippocampus, Paneth cells and B cells of pancreas. The nature of the changes depend on the stressor. When this change of zinc content in the hippocampus and hypothalamus (as the main regulator of stress reaction) were multidirectional that this can be explained by the release of metal together with secretory material in the hypothalamus into the bloodstream. Research epileptic activity of hippocampus by administering to the animal chelate 8 BSQ allowed to establish the dependence between convulsant action and first stress condition of the animal. Evocation of stress by 8-BSQ and physical activity, immobilization and alcohol abuse found that the convulsive effect of this reagent during intravitreal research increased in the case of prior exposure by specified kinds of stressors. In this pre-convulsive effect on exertion increased by 266% and the zinc content was increased by 75%; in the case of pre-immobilization duration of seizures increased by 206% and the zinc content – 50%; in the case of pre-alcoholization duration of seizures increased by 234%, and a chelating zinc content – 75%. These results suggest a chelating zinc epileptiform participate in the mechanisms of seizures and, possibly, the development of mechanisms of temporal lobe epilepsy (hippocampal). The results of studies of zinc changes in central and peripheral organs of zinc-containing simulated at different functional states allow us to make the assumption that there is a common mechanism for coordination of functional activity as the hippocampus and other zinc-containing bodies with the help of changes in the chelating zinc metabolism, regulation is carried out by means of the hippocampus.

Key words: 8-TSQ, 8-BSQ, hippocampus, B-cells, Paneth cells, zinc.

ВСТУП

Фізіологічні механізми судомних станів і особливо такої хвороби, як епілепсія, принципово відрізняються від описаних для шизофренії (зниження рівня глутамата в нейронах і посилення дофамінергічної трансмісії), депресій (зниження рівня катехоламінів і порушення співвідношень між глутаматергічною і ГАМК-ергічною системами), наркоманії та алкоголізму (утворення ендогенних аналогів морфіну з серотоніну і дофаміну, підвищення активності ГАМК-ергічної системи) (Дамбинова, 1980; Astasheva et al., 2009). Важлива роль в індукції синдрому епілепсії належить глутаматергічній системі. Очевидно також значення ГАМК-ергічної і ендозепамергічної систем (Bird et al., 2008).

Із глутаматергічною трансмісією тісно пов'язана не лише можливість індукції судомних станів, а й ряд вищих функцій ЦНС, зокрема, пам'ять. У цьому одна з причин того, що епілепсія не зводиться до судомного синдрому, а пов'язана з низкою складних змін психіки (Дамбинова, 1980; Takeda, 2011; Kazemi, 2016).

Також відома роль мікроелементів у розвитку цієї хвороби (Кудрин и др., 2006; Zalups & Koropatnick, 2010). Магнійдефіцитна залежність патогенезу найбільш важлива для ідіопатичної первинної епілепсії. Гіпомагніємія розвивається на фоні вторинної епілепсії, яка виникла внаслідок порушення метаболізму після інсульту, черепно-мозкової травми, при гіпертензивній енцефалопатії, ускладнень після наркозу. Такі речовини як кофеїн, теобромін, нікотин, алкоголь, кокаїн, морфін, героїн, похідні амфетаміну, марихуана, гіперсольова дієта сприяють виходу магнію з клітин у позаклітинну рідину, посилюючи екскрецію іонів K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} із сечею та сприяє гіпокаліємії, гіпомагніємії, гіпокальціємії та перерозподілу мікро- та макроелементів у мозку. Мікроелементний склад мозку дуже чутливий до світло- та кольоронавантаження (перерозподіл Zn, K, Mg, Na) (Андрианова М.Ю. и соавт., 1995; R.K. Zalups, J. Koropatnick, 2010).

Іони таких металів як Na, Cu, Co, Fe, Zn та ін. можуть підвищувати епіактивність мозку. В експериментах із гіпомагніємією в CA1-зрізах гіпокампу щурів спостерігалися епілептиформні судоми, при відновленні балансу магнію спостерігали зниження судомного порогу впливу (Szewczyk et al., 2010; Zalups & Koropatnick, 2010).

Деякі лікарські препарати, що використовуються при лікуванні епілепсії призводять до зниження рівня цинку в мозку і варіацій із вмістом міді та селену (Кудрин, Громова, 2006; Zalups & Koropatnick, 2010).

Скронева епілепсія, за деякими даними, складає 60% усіх форм епілепсії (Кудрин, Громова, 2006). Найчастіше при скроневої епілепсії патологічний осередок розташовується в медіобазальних відділах скроневої долі (гіпокамп, мигдалеподібний комплекс, конвексимальна кора). Тому вивчення епілептогенних властивостей структур лімбічної системи має не лише теоретичне, але і практичне значення.

Показано, що в NMDA-рецепторі є ділянка для зв'язування цинку (Авцын А.П., 1979; Coulter, 2000). Значні концентрації іонів Zn^{2+} виявлені в пресинаптичних везикулах і синаптичному просторі відразу після стимуляції нейронів. Було встановлено, що цинк може впливати на ряд рецепторів і потенціалзалежних іонних каналів, зокрема може інгібувати активність NMDA-рецепторів (Кудрин, Громова, 2006; Takeda et al., 2009; Zalups & Koropatnick, 2010).

Zn на відміну від Mg не просто блокує іонні канали, а регулятор синаптичної передачі, головним чином глутаматергічних нейронів. Цинк виходить разом з глутаматом, впливає на рецептори, що локалізовані як на пресинаптичній, так і на постсинаптичній мембрані. Крім того, він має здатність виходити з синаптичної щілини та впливати на стан інших синапсів – це так звана «об'ємна передача» (Takeda et al., 2009; Elsas et al., 2009).

Наведений аналіз літературних даних дозволяє зробити висновок, що роль цинку як мікроелементу, який здатен утворювати комплекси з хелаторами дуже важлива як у підтримці фізіологічно стабільного стану окремих клітин, органів, так і розвитку патологічних змін при його дефіциті. Усе це вказує на необхідність подальшого вивчення ролі хелатоутворюючого цинку в механізмах розвитку стресу та судомної активності гіпокампу, а також спонукає до пошуку заходів запобігання ушкоджувальній дії вказаних змін.

Відомо, що в патогенезі нейродегенеративних змін гіпокампу (епілепсія, хвороба Альцгеймера, хорея Гентінгтона) суттєву роль відіграє хелатоутворюючий цинк, але не з'ясований механізм змін цього металу та його взаємозв'язок із вмістом секреторного матеріалу в цих клітинах. Із літературних даних відомо, що під час електричного імпульсу підвищується вміст цинку в синаптичній щілині, який захищає клітини від руйнівного впливу глутамату. Але не вивчені зміни даного металу в цинкістких клітинах під час судомної активності аmonoва рога, та вплив стресорів на тривалість і інтенсивність судом. Також залишається не вивченим питання змін вмісту хелатоутворюючого цинку в гіпокампі у тварин різного виду залежно від розвитку гіпокампу (еволюційного положення виду). Важливо також простежити вплив діабетогенних речовин, стрес-факторів, деяких хелаторів на вміст цього металу в клітинах цинкдепонуючих органів (гіпокамп, клітини Панета, В-клітини).

У сучасній фармакології часто використовують хелатори, які є дуже зручними молекулами для створення нових препаратів. Хелатори, або хелатуючі агенти – обширна група органічних сполук, що здатні утворювати з металами клішнєподібні комплекси – хелати (Андрух, 2001; Кудрин, Громова, 2006). Координаційні зв'язки надають хелату іноді настільки високу стійкість, що метал вдається виділити лише шляхом озолення речовини. Завдяки успіхам координаційної хімії відкриваються можливості для все більш широкого застосування хелаторів у промисловості, сільському господарстві, фармакології, харчовій промисловості. За допомогою хелатоутворюючих агентів проводяться близько чверті робіт в аналітичній хімії (Кудрин, Громова, 2006; Zalups & Koropatnick, 2010).

Велика кількість лікарських речовин та деякі радіофармацевтичні діагностичні речовини також можуть зв'язувати хелатори. Хелаторами є антидоти, які застосовуються для зв'язування і виведення із організму токсичних і радіоактивних речовин. У результаті глибоких порушень обміну речовин сполуки з вираженими хелатуючими властивостями можуть утворюватися і в самому організмі, тому все частіше постає питання щодо можливої ролі цих сполук у розвитку таких захворювань, як цукровий діабет, хвороба Альцгеймера, хорея Гентінгтона, епілепсія та шизофренія (Кудрин, Громова, 2006; Takeda et al., 2009; Zalups & Koropatnick, 2010).

Хелатори проникають в клітину та взаємодіють, у першу чергу, із тими металами, у яких константи стабільності комплексів характеризуються найбільшою величиною. Найбільш стійкі хелаторні комплекси важких металів (Zalups & Koropatnick, 2010).

Центральний атом (метала) у хелаторному комплексі (хелаті) зв'язаний із лігандом за допомогою іонних та донорно-акцепторних зв'язків (Кудрин, Громова, 2006; Takeda et al., 2009). За ра-

хунок поєднання електронних пар двох взаємодіючих атомів утворюється другий тип зв'язку. При утворенні хелаторних комплексів донором виступають атоми кисню, азоту та сірки в той час, як акцептором виступають атоми металів.

На донорні властивості впливають сусідні атоми в молекулі ліганда, тому не рідко застосовують термін донорні групи. Спорідненість реагенту до певних металів обумовлює присутність деяких донорних груп (Кудрин, Громова, 2006).

Більшість мікроелементів, які здатні вступати в бінарні і мультилігандні комплекси з амінокислотами, карбоновими та нуклеїновими кислотами, нуклеотидами, білками є d-металами. Фундаментальну роль у клітині та позаклітинній динаміці метаболізму мікроелементів, антагонізмі, синергізмі та фармакодинамічній дії мікроелементів відіграє стійкість цих комплексів. Стабільність конформерної та комплексоутворюючої дії мікроелементів визначаються принципами компліментарності, стереоселективності, макроциклічності, природою розчинника, лігандів, кількістю утворюваних циклів, природою всередині молекулярних стабілізуючих і дестабілізуючих взаємодій, та кінетичною енергією комплексоутворювача (Кудрин, Громова, 2006; Takeda et al., 2009; Zalups & Koropatnick, 2010).

Однією з найважливіших проблем сучасної медицини є розробка засобів, які забезпечують детоксикацію та елімінацію екопатогенів. У сучасній літературі виділяють два типи хелаторної патології людини: із превалюванням іонів металів та зниженим синтезом продуктів, що зв'язують ліганд, та з дефіцитом металів, асоційованих із гіперпродукцією ліганда – найважливіша група засобів, що сприяють елімінації металів і ліквідують інтоксикацію цими речовинами. Проведення хелатуючої терапії ефективно при лікуванні гострих та хронічних отруєннях металами, при терапії постдіалізної остеоартропатії, анемії, рефректорної до еритропоєтину, енцефалопатії. Лікування хелаторами вимагає точності дозування і великої обережності, тому що при виведенні хелаторами токсичних мікроелементів, зокрема Pb, можлива гостра свинцева інтоксикація. При застосуванні хелаторів Fe і DFO (десферроksamін) отримані задовільні результати лікування хвороби Альцгеймера (Zalups & Koropatnick, 2010). Д-пеніцилламін або куприніл зв'язують надлишкову мідь при хворобах Менкенса та Вільсона-Коновалова. Хелатори широко використовують у комплексі з протипухлинними засобами для зниження їхньої токсичності. Також застосовують хелатуючі лікарські препарати при отруєнні різними металами – Cu, Cd, Pb, Al, Mo, Vi, Te (Кудрин, Громова, 2006; Zalups & Koropatnick, 2010; Takeda et al., 2013).

Синтез високо селективних хелаторів, які забезпечують елімінацію токсичних мікроелементів і не порушують метаболізм есенціальних мікроелементів – одна з перспективних задач фармакології. Однак, більшість хелаторів не мають специфічних ефектів або здатні потенціювати токсичний ефект міді та інших нейротоксичних металів, викликаючи апоптоз нейроглиї (Кудрин, Громова, 2006).

Важливим аспектом фармакотерапії нейродегенеративних, цереброваскулярних та інших захворювань ЦНС, в етіології яких значну роль відіграють стрес і порушення металолігандного гомеостазу є нейропротекція, яка розглядається як захист нейронів при судинній патології головного мозку. Однак на сьогодні велика кількість проведених клінічних досліджень страждають на відсутність задовільних доказів ефективності дії хелаторів, для цього також необхідно дослідити фізіологічні механізми металолігандного гомеостазу (Кудрин, Громова, 2006; Zalups & Koropatnick, 2010; Takeda et al., 2013).

Стосовно нейропротекції застосовується металолігандне направлення наукового пошуку, що також дає досить достовірні результати. Як грубу деформацію картографії металів та їхніх комплексів у ЦНС можна розглядати такі захворювання, як хвороба Альцгеймера, інсульт, ДЦП, хвороби мітохондрій, лізосом та інші. При хворобі Альцгеймера та шизофренії в нейронах у 5–9 раз збільшується концентрація алюмінію, скандію, та кремнію, знижується рівень цинку, магнію, селену (Zalups & Koropatnick, 2010).

Синтез пептидів із потенційними металолігандними властивостями є одним із найбільш перспективних напрямів застосування нейротрофіків. Але для цього потрібно з'ясувати фізіологічні механізми металолігандного гомеостазу. Одним із низькомолекулярних пептидів, які можуть зв'язувати цинк і мідь та транспортувати його до мозку є кортизол. Також він може попереджувати апоптоз, викликаний нейротоксичними концентраціями цинку та міді. Цей гормон є аналогом важ-

ливих гормонів стресу (глюкокортикоїдів), а це означає, що зміни в металолігандному гомеостазі можуть впливати на гормональну регуляцію (Coulter, 2000).

Хелатори дитизон і 8-ТСХ були запропоновані для цитохімічного визначення цинку. Менше виявляється цинку в клітинах, які сильніше ушкоджені. Навіть при відсутності грубих змін у клітинах інтенсивність цитохімічної реакції була знижена, це вказує на те, що надзвичайна чутливість цитохімічних реакцій дозволяє використовувати їх для виявлення найлегших і самих ранніх змін, що передують розвитку деструктивних змін у клітинах, тобто для виявлення преморбідних станів (Кудрин, Громова, 2006; Szewczyk, 2010; Zalups & Koropatnick, 2010). Це має значний інтерес при вивченні дії на організм людини факторів, які викликають стани, що передують розвитку професійних захворювань, наприклад у промислових робітників. Виявлення цих станів дуже важливе з погляду проведення лікувально-профілактичних заходів на промислових підприємствах.

Мета роботи – дослідити зміни вмісту хелатоутворюючого цинку в гіпокампі при моделюванні стресу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідах було використано 143 щура, серед яких 18 тварин були контрольними, інші тварини піддавалися гострому стресуванню шляхом введення біологічно активних речовин (глюкози, інсуліну, ГАМК, лептину, дексаметазону, 8-БСХ, етанолу), а також іммобілізацією, фізичним навантаженням та голодуванням у відповідності із описаними методиками (Омельяничук та ін., 2013). Дослідження на тваринах проводили згідно з дотриманням загальних принципів біоетики у відповідності до Хельсінкської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації з біоетики та правах людини (ООН, 1997), Закону України № 3447 «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Інсулін вводили у дозі 0,1 ОД/кг, ГАМК – 50 мг/кг, лептин – 10 мг/кг, дексаметазон – 0,1 мг/кг – вводились внутрішньом'язово. Всі ці речовини виготовлені ЗАТ Фармацевтична «Дарниця». Для оцінки впливу алкоголізації на організм тварин, їм через шлунковий зонд вводили 20 % розчин етанолу в дозі 2 мл/кг. У дослідах з голодуванням тварин на 12 годин позбавляли їжі.

Хелатор (8-БСХ) тваринам вводили внутрішньочеревно в дозах 200 і 400 мг/кг.

Тварин забивали через 30 хвилин після гострого стресування. Органи, що брали для дослідження заморожували за допомогою заморожувача мікромому та готували заморожені зрізи товщиною 30–60 мкм. Зрізи заключали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом. Для збудження люмінесценції використовували світлофільтр ФС-1, а в якості захисного (окулярного) – світлофільтр із скла ЖС-18.

Продукт реакції визначали за жовто-зеленою люмінесценцією на зрізах головного мозку – у полях СА2-СА4 гіпокампу і в зубчастій фасції, а також у В-клітинах підшлункової залози щурів.

Для отримання цитохімічної реакції на цинк зрізи досліджуваних тканин обробляли 0,1% ацетоновим розчином 8-ТСХ, через 1–5 хв їх промивали дистильованою водою, заключали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом, як описано вище. У нейронах гіпокампа та В-клітинах підшлункової залози спостерігалася жовто-зелена люмінесценція, рівень якої був прямо пропорційним вмісту цинку.

Цифрові зображення препаратів отримували за допомогою люмінесцентного мікроскопу Мікмед-2, варіант 11 (виробництво ЛОМО, Росія). Отримані за допомогою цифрової камери знімки зберігали на жорсткому диску ПЕОМ у форматі tiff (Tagged Image File Format), який призначений для зберігання цифрових зображень без втрат їх якості. Вимірювання інтенсивності флуоресценції на цифрових знімках проводили за допомогою растрового графічного редактора GIMP, версія 2.6.10. У вікні «Гістограма» отримували основні статистичні параметри (кількість пікселів у зоні виділення, середнє значення яскравості пікселів у зоні виділення та стандартне відхилення), за якими характеризували ступінь інтенсивності люмінесцентної реакції 8-ТСХ на цинк.

Так як реакція 8-ТСХ на цинк є кількісною, то вміст хелатоутворюючого цинку оцінювали в мкг/г.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для встановлення характеру змін вмісту цинку в цинкмістких клітинах при дії стресорів фізичного та хімічного походження було досліджено наявність цинку і секреторного матеріалу, з яким він може бути пов'язаний, у клітинах мозкових структур-ефекторів стресу. У якості таких цинкмістких клітин були розглянуті клітини гіпокампу і гіпоталамусу.

Результати дослідження вмісту цинку і секреторного матеріалу в гіпокампі свідчили про сполученість змін, але різноспрямований їх характер при дії різних стресорів (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст цинку (забарвлення 8-ТСХ) і секреторного матеріалу (забарвлення альдегідфуксином) та їх взаємозв'язок (r) у гіпокампі щурів при стресі та модифікації його функціонального стану дією хімічних сполук

| Група тварин | Вміст цинку, мкг/г ($\bar{X} \pm m$) | Вміст секрету, ум. од. ($\bar{X} \pm m$) | r |
|--|---|---|-------|
| Контроль (n = 18) | 50,1 ± 3,8 | 0,3 ± 0,02 | 0,38* |
| Імобілізація (n = 11) | 73,2 ± 6,2*** | 0,5 ± 0,02* | 0,37* |
| Голодування (n = 12) | 67,0 ± 5,5* | 0,4 ± 0,03* | 0,35* |
| Введення інсуліну (n = 10) | 70,4 ± 6,4*** | 0,4 ± 0,03* | 0,41* |
| Введення лептину (n = 28) | 33,5 ± 2,7*** | 0,2 ± 0,01** | 0,43* |
| Введення дексаметазону (n = 30) | 39,3 ± 2,8* | 0,2 ± 0,02** | 0,44* |
| Введення ГАМК (n = 12) | 38,1 ± 2,9* | 0,2 ± 0,01*** | 0,43* |
| Введення конвульсанту (8-БСХ) (n = 12) | 25,4 ± 1,4*** | 0,1 ± 0,01*** | 0,42* |

* – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001 у порівнянні з контрольною групою.

Так, імобілізація, голодування та введення інсуліну підвищували вміст цинку та секрету в середньому на 34–46 і 33–67% відповідно. У той же час такі сполуки, як лептин, дексаметазон, ГАМК, що теж моделюють стрес-реакцію, а також конвульсант 8-БСХ, сприяли зниженню вмісту цинку в гіпокампі та секреторного матеріалу на 22–44% і 33–67% відповідно. При цьому спостерігали позитивну кореляцію змін вмісту цинку та секрету в нейронах амонова рога.

Враховуючи те, що в основі реагування на стресорні подразники лежить діяльність гіпоталамуса, для з'ясування його можливої участі у змінах вмісту цинку, що спостерігалися, і взаємовідносин із гіпокампом визначали вміст цього елемента в нейронах гіпокампу та гіпоталамуса у щурів при різних стресових впливах і модифікації стану підшлункової залози, яка є одним із важливих ефекторів стресу, що забезпечує енергією перебіг стрес-реакції (табл. 2).

Голодування, імобілізація та введення інсуліну підвищували вміст цинку в клітинах гіпокампу на 28–39% та знижували на 38–48% у клітинах гіпоталамуса. Введення глюкози призводило до зниження вмісту цього металу в амоновому розі на 22% та підвищення цього показника в клітинах гіпоталамуса на 29%. При цьому спостерігали негативну кореляцію змін вмісту цинку в клітинах гіпокампу та гіпоталамуса.

Таким чином, визначення вмісту цинку в гіпокампі і гіпоталамусі при дії таких стресорів як голодування та імобілізація, показало, що в них відбуваються сполученні, але протилежні за характером, зміни. При цьому вміст цинку та секреторного матеріалу в гіпокампі був підвищений при дії чинників, які гальмують секреторну активність його нейронів, а при дії факторів, які стимулю-

Таблиця 2. Вміст цинку (забарвлення 8-ТСХ) та його взаємозв'язок (r) у гіпокампі та гіпоталамусі щурів при дії стресорів

| Група тварин | Вміст цинку, мкг/г ($\bar{X} \pm m$) | | r |
|---|--|---------------|----------|
| | гіпокамп | гіпоталамус | |
| Контроль (n = 18) | 53,1 ± 4,2 | 21,2 ± 1,6 | -0,47* |
| Тварини, які голодували (n = 14) | 72,1 ± 6,5* | 12,0 ± 0,7*** | -0,41* |
| Тварини, які отримали глюкозу (n = 14) | 41,2 ± 3,3* | 27,1 ± 1,5 | -0,72*** |
| Тварини, яких піддавали імобілізації (n = 12) | 73,0 ± 6,5* | 11,3 ± 0,9*** | -0,49* |
| Тварини, які отримали інсулін (n = 13) | 68,4 ± 5,5* | 13,1 ± 1,0*** | -0,47* |

Примітка: тут і далі: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

ють секреторну активність нейронів гіпокампу, їх вміст знижувався, що в сукупності з визначеними кореляційними зв'язками свідчить про пов'язаність кількості цинку в клітині із її секреторною активністю.

Як було показано вище (табл. 1–2), гостре стресування імобілізацією, інсуліном та голодуванням організму призводить до накопичення цинку в клітинах гіпокампу.

Відомий вплив гіпокампу на функціональну активність інших органів, а саме підшлункової залози та тонкого кишечника. Для об'єктивізації та уточнення одержаних даних, а також подальшого дослідження на процеси, що спостерігалися, безпосередньо впливу цитотоксичного хелатору 8-БСХ, який відомий як стресор і конвульсант, було виконане дослідження впливу такого стресування на

Таблиця 3. Вміст цинку (забарвлення 8-БСХ) і секреторного матеріалу (забарвлення альдегідфуксином і флоксином) у клітинах гіпокампу, панкреатичних острівців і клітинах тонкого кишечника у щурів після фізичного навантаження, імобілізації та алкоголізації

| Група тварин | Інтенсивність реакції, ум. од. ($\bar{X} \pm m$) | | | | |
|---------------------------------------|--|--------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | 8-БСХ | | | альдегідфуксин (клітини В) | флоксин (клітини Панета) |
| | гіпокамп | клітини В | клітини Панета | | |
| Контроль (n = 18) | 2,01 ± 0,11 | 1,94 ± 0,15 | 1,10 ± 0,09 | 1,32 ± 0,10 | 0,81 ± 0,07 |
| Фізичне наванта- ження (n = 16) | 2,52 ± 0,18* | 2,43 ± 0,15* | 1,51 ± 0,10* | 1,63 ± 0,12* | 1,10 ± 0,10* |
| Імобілізація (n = 15) | 2,64 ± 0,25* | 2,61 ± 0,21* | 1,44 ± 0,12* | 1,71 ± 0,14* | 1,22 ± 0,11* |
| Алкоголізація (n = 16) | 2,53 ± 0,19* | 2,51 ± 0,22* | 1,62 ± 0,13* | 1,64 ± 0,11* | 1,13 ± 0,13* |

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

функціональну активність гіпокампу та зміни вмісту хелатоутворюючого цинку в його нейронах із забарвленням зрізів тканин за допомогою цього хелатору, а також з використанням нецитотоксичного хелатору. При цьому шурів піддавали впливу наведених вище стресорів із наступним визначенням вмісту досліджуваного металу в нейронах амонова рога та периферичних цинкмістких органах.

Дослідження інтенсивності реакції при забарвленні зрізів тканин 8-БСХ, яка відображає насиченість цинком клітин, також показало його підвищення при дії стресорів в усіх типах досліджених клітин: гіпокампу, панкреатичних острівців і тонкого кишечника (табл. 3).

Так, фізичне навантаження, іммобілізація та алкоголізація викликали збільшення вмісту цинку в гіпокампі на 25%, 30% і 25%, у клітинах В – на 26%, 37% і 32%, у клітинах Панета – на 36%, 27% і 36% відповідно. Також спостерігали збільшення вмісту секреторного матеріалу на 23%, 30%, 23% у клітинах панкреатичних острівців та на 38%, 50%, 38% у клітинах тонкого кишечника при дії тих же стресових факторів.

Вище (табл. 1–3) було показано, що вміст хелатоутворюючого цинку в клітинах цинкмістких органів змінюється під дією стресових факторів. У зв'язку з цим представляло інтерес оцінити зв'язок такого інтегрального показника функціонального стану гіпокампу, як його судомна активність, із рівнем цинку в гіпокампі для одного біологічного виду при дії стресорів, що призводили до змін вмісту цинку. Результати досліджень впливу стресування на інтенсивність інтравітальної реакції 8-БСХ у гіпокампі та тривалість судом у тварин представлені у наведених нижче таблицях.

Таблиця 4. Інтенсивність інтравітальної реакції 8-БСХ у гіпокампі та тривалість судом при введенні 8-БСХ (200 мг/кг) щурам після фізичного навантаження

| Група тварин | Кількість тварин | Інтенсивність реакції, ум. од. | Тривалість судом, хв |
|------------------------------|------------------|--------------------------------|----------------------|
| 8-БСХ (контроль) | 18 | 0,81 ± 0,09 | 3,53 ± 0,46 |
| Фізичне навантаження + 8-БСХ | 13 | 1,43 ± 0,15** | 12,28 ± 1,55** |
| Іммобілізація + 8-БСХ | 12 | 1,24 ± 0,15* | 10,71 ± 1,23*** |
| Алкоголізація + 8-БСХ | 15 | 1,42 ± 0,13*** | 11,74 ± 1,38*** |

Примітка: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Аналіз отриманих даних свідчить, що гостре стресування тварин, яке само по собі викликало, як було показано вище, підвищення вмісту цинку в нейронах гіпокампу, при сумісній дії з хелатором 8-БСХ, супроводжувалося збільшенням вмісту цинку в клітинах і тривалості судом відповідно на 75% і 266% у випадку попереднього стресування фізичним навантаженням, на 50% і 206% – іммобілізацією, 75% і 234% – алкоголізацією. Таким чином, збільшення вмісту цинку в клітинах при гострому стресуванні призводило до збільшення тривалості судом у тварин.

Ці органи забезпечують підтримку металолігандного гомеостазу в організмі людини і тварин. При цьому підшлункова залоза та тонка кишка належать до органів ентеро-інсулярної системи і в клітинах В панкреатичних острівців і клітинах Панета тонкого кишечника міститься хелатоутворюючий цинк, про що свідчать одержані нами та чисельні літературні дані (Кучковський та ін., 2001; Єщенко та ін., 2001; Takeda et al., 2009, Zalups & Koropatnick, 2010).

При однакових станах спостерігали сполучені зміни вмісту цинку в гіпокампі та клітинах інших цинкмістких органів у тварин різних біологічних видів (мишей та шурів), що вказує на їхній закономірний характер, а саме, – не тільки на залежність функціонального стану органу від вмісту хелатоутворюючого цинку, а й на існування зв'язку між змінами вмісту цинку в усіх цинкмістких органах. Характер цих змін, як вже було частково сказано, свідчив про те, що голодування призводило до збільшення вмісту цинку, а введення глюкози супроводжувалося протилежними змінами – зниженням вмісту цього металу в зазначених клітинах.

У сукупності з даними про сполучені зміни вмісту цинку із наявністю секреторного матеріалу в клітинах дані інтравітальних досліджень дають підставу для заключення про участь цинку в реалізації секреторної функції клітин, не тільки відомої для підшлункової залози, але і для інших

досліджених нами клітин. Оскільки всі цинкмісткі клітини тим чи іншим чином здійснюють свої функції завдяки секреції, присутність у них цинку також може бути пов'язана саме із цим процесом.

Добре відомо, що надлишкове звільнення цинку підчас нейрональної активності може призводити до порушень збудливості гіпокампу, у тому числі виникненню судомної активності (Elsas et al., 2009; Takeda et al., 2013; Kazemi et al., 2016).

Узагальнюючи викладені та обговоренні вище результати дослідження змін вмісту цинку в центральних та периферичних цинкмістких органах при різних змодельованих функціональних станах із літературними даними можна припустити, що механізм реакцій, що спостерігаються, може бути наступним: везикулярний цинк при збудженні нервових закінчень відщеплюється від глутамата, дає змогу йому вийти у синаптичну щілину для того, щоб провзаємодіяти з рецепторами постсинаптичної мембрани та викликати потенціал дії. При цьому, цинк теж поступає в синаптичну щілину для сенсibiлізації і, одночасно, стабілізації постсинаптичної мембрани, захищає нейрон від руйнівного впливу глутамату, тобто від розвитку глутаматної ексайтотоксичності (Takeda, 2009). Після виходу в синаптичну щілину, він взаємодіє із чутливими до нього рецепторами, що індукує звільнення внутриклітинного кальцію, а також фосфорилування кінази, що регулюється позаклітинно та кальцій-кальмодулінової кінази II. Іншими словами, цинк може регулювати функції нейронів у гіпокампі через взаємодію з метаболічними рецепторами (Astashova, 2009).

ВИСНОВКИ

Результати дослідження вмісту цинку і секреторного матеріалу в гіпокампі свідчили про сполученість змін, але різноспрямований їх характер при дії різних стресорів. Імобілізація, голодування та введення інсуліну підвищували вміст цинку та секрету в середньому на 34–46 і 33–67% відповідно. У той же час такі сполуки, як лептин, дексаметазон, ГАМК, що теж моделюють стрес-реакцію, а також конвульсант 8-БСХ, сприяли зниженню вмісту цинку в гіпокампі та секреторного матеріалу на 22–44% і 33–67% відповідно. При цьому спостерігали позитивну кореляцію змін вмісту цинку та секрету в нейронах амонова рога.

Визначення вмісту цинку в гіпокампі та гіпоталамусі при дії таких стресорів як голодування та імобілізація, показало, що в них відбуваються сполученні, але протилежні за характером зміни. При цьому вміст цинку та секреторного матеріалу в гіпокампі був підвищений при дії чинників, які гальмують секреторну активність його нейронів, а при дії факторів, які стимулюють секреторну активність нейронів гіпокампу, їх вміст знижувався, що в сукупності з визначеними кореляційними зв'язками свідчить про пов'язаність кількості цинку в клітині із її секреторною активністю.

Фізичне навантаження, імобілізація та алкоголізація викликали збільшення вмісту цинку в гіпокампі на 25%, 30% і 25%, у клітинах В – на 26%, 37% і 32%, у клітинах Панета – на 36%, 27% і 36% відповідно. Також спостерігали збільшення вмісту секреторного матеріалу на 23%, 30%, 23% у клітинах панкреатичних ostriv'civ та на 38%, 50%, 38% у клітинах тонкого кишечника при дії тих же стресових факторів.

Гостре стресування тварин викликало підвищення вмісту цинку в нейронах гіпокампу, а при сумісній дії з хелатором 8-БСХ супроводжувалося збільшенням вмісту цинку в клітинах і тривалості судом відповідно на 75% і 266% у випадку попереднього гострого стресування фізичним навантаженням, на 50% і 206% – імобілізацією, 75% і 234% – алкоголізацією.

На підставі аналізу отриманих результатів досліджень змін вмісту цинку в центральних та периферичних цинкмістких органах при різних змодельованих функціональних станах можна припустити наявність загального механізму координації функціональної активності як гіпокампу, так й інших цинкмістких органів за допомогою зміни метаболізму хелатоутворюючого цинку, регуляція якого здійснюється за участю гіпокампу.

ЛІТЕРАТУРА

- Авцын А.П. Ультроструктурные основы патологии клетки. / А.П. Авцын, В.А. Шахламов. – М.: Медицина, 1979. – 318 с.
- Андреанова М.Ю. Магний и его баланс. / М.Ю. Андреанова, И.И. Дементьева, А.Ю. Мальцева //Анестезиология и реаниматология. – 1995. – №6. – С. 73–76.

- Андрух П.Г. Этиология, нейрохимия и клиника современных форм тревожно-депрессивных расстройств / П.Г. Андрух // Медицинские исследования. – 2001. – Т. 1, вып. 1. – С. 109–110.
- Вміст цинку в панкреатичних острівцях і гіпокампі при дії фізіологічних і надзвичайних подразників / В.А. Єщенко, В.Д. Бовт, М.М. Малько, А.В. Прохватулова, О.М. Кучковський // Фізіологічний журнал. – 2001 – № 2. – С. 66–69.
- Дамбинова С.А. Нейрорецепторы глутамата / С.А. Дамбинова. – Л.: Наука, 1989. – 143 с.
- Крыжановский Г.Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы: генераторные механизмы нейрорепатологических синдромов. / Г.Н. Крыжановский. – М.: Медицина, 1980. – 358 с.
- Кудрин А.В. Микроэлементы в неврологии. / А.В. Кудрин, О.А. Громова. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2006. – 304 с.
- Кучковський О.М. Вплив конвульсанту на вміст цинку в інсулоцитах і нейронах гіпокампі у мишей / О.М. Кучковський, В.Ю. Єщенко // Вісник ЗДУ. – 2001. – № 1. – С. 176–177.
- Омельянчик Л.О. Адаптація та металолігандний гомеостаз / Л.О. Омельянчик, Ю.В. Єщенко, О.М. Кучковський [та ін.] – Запоріжжя: ЗНУ, 2013. – 351 с.
- Astasheva E.V. Activation of glutamatergic system of the medial septal region facilitates the epileptogenesis / E.V. Astasheva, V.F. Kichigina // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. – 2009 – Vol. 59, № 6. – P. 743–749.
- Coulter D.A. Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with altered “epileptic” gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule cells. / D.A. Coulter // Epilepsia. – 2000. – Vol. 41, Suppl 6. – P. 96–99.
- Enhanced susceptibility to spontaneous seizures of noda epileptic rats by loss of synaptic zn(2+) / [A. Takeda, M. Iida, M. Ando та ін.]. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8., №8. – doi: 10.1371/journal.pone.0071372.
- Facilitation of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation in the hippocampus / A. Takeda, N. Sakurada, M. Ando [et al.] // Neurochem. Int. – 2009. – Vol. 55, N. 6. – P. 376–382.
- Hippocampal zinc infusion delays the development of after discharges and seizures in a kindling model of epilepsy / S.M. Elsas, S. Hazany, W.L. Gregory [et al.] // Epilepsia. – 2009. – Vol. 50, N 4 – P. 870–879.
- Ionic Glutamate Modulators in Depression (Zinc, Magnesium) / B. Szewczyk, E. Poleszak, A. Pilc [et al.] // Glutamate-Based Therapies for Psychiatric Disorders (Milestones in Drug Therapy) / P. Skolnick. – Berlin: A Birkhäuser Basel book, 2010. – P. 21–38.
- Jansen K.L. Excitatory amino acid receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of [3H]TCP, [3H]glycine, L-[3H]glutamate, [3H]AMPA and [3H]kainic acid binding sites / K.L. Jansen, R.L. Faull, M. Dragunow // Neuroscience. – 1989. – Vol. 32, № 3. – P. 587–607.
- Modulation of axonal sprouting along rostro-caudal axis of dorsal hippocampus and no neuronal survival in parahippocampal cortices by long-term post-lesion melatonin administration in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. / [M. Kazemi, S. Shokri, M. Ganjkhani et al.]. // Anat. Cell. Biol. – 2016. – Vol 49, № 1. – С. 21–33.
- Zalups R.K. Cellular and molecular biology of metal / R.K. Zalups, J. Koropatnick. – N.Y.: CRC Press, 2010. – 442 p.

REFERENCES

- Andrianova, M. Y., Dement'eva, I. I., & Mal'ceva, A. Y. (1995). Magnij i ego balans. *Anesteziologija i reanimatologija*, 73–76.
- Andruh, P. G. (2001). Jetiologija, nejrohimija i klinika sovremennyh form trevozhno–depressivnyh rasstrojstv. *Medicinskie issledovanija*, 1(1), 109–110.
- Astasheva, E. V., & Kichigina, V. F. (2009). Activation of glutamatergic system of the medial septal region facilitates the epileptogenesis. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova*, 59(6), 743–749.
- Avcyn, A. P., & Shahlamov, V. A. (1979). *Ul'trastrukturnye osnovy patologii kletki*. M: Medicina.
- Coulter, D. A. (2000). Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with altered “epileptic” gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule cells. *Epilepsia*, 41(6), 69–99.
- Dambinova, S. A. (1989). *Nejroreceptory glutamata*. Leningrad: Nauka.
- Elsas, S.–M., Hazany, S., Gregory, W. L., & Mody, I. (2009). Hippocampal zinc infusion delays the development of after discharges and seizures in a kindling model of epilepsy. *Epilepsia*, 870–879.
- Eshhenko, V. A., Bovt, V. D., Mal'ko, M. M., V., P. A., & Kuchkovs'kij, O. M. (2001). Vmist cinku v pankreatichnih ostrivcjah i gipokampi pri dii fiziologichnih i nadzvichajnih podraznikiv. *Fiziologichnij zhurnal*(2), 66–69.
- Jansen, K. L., Faull, R. L., & Dragunow, M. (1989). Excitatory amino acid receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of [3H]TCP, [3H]glycine, L-[3H]glutamate, [3H]AMPA and [3H]kainic acid binding sites. *Neuroscience*, 32(3), 587–607.
- Kazemi, M., Shokri, S., Ganjkhani, M., Ali, R., & Iraj, J. A. (2016). Modulation of axonal sprouting along rostro-caudal axis of dorsal hippocampus and no neuronal survival in parahippocampal cortices by long-term post-lesion melatonin administration in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Anat Cell Biol.*, 49(1), 21–33.

-
- Kryzhanovskij, G. N. (1980). *Determinantnye struktury v patologii nervnoj sistemy: generatornye mehanizmy nejropatologicheskikh sindromov*. Moscow: Medicina.
- Kuchkovs'kij, O. M., & Eshchenko, Y. V. (2001). Vpliv konvul'santu na vmist cinku v insulocitah i nejronah gipokampu u mishej. *Visnik ZDU(1)*, 176–177.
- Kudrin, A. V., & Gromova, O. A. (2006). *Mikrojelementy v nevrologii*. Moscow: GEOTAR–Media.
- Omeljanchik, L. O., Eshchenko, Yu. V., Kuchkovskij O.M. & Bovt V. D. (2013). *Adaptacija ta metaloligandnij gomeostas*. Zaporizhzhia: Zaporizhzhia National University.
- Szewczyk, B., Poleszak, E., Pilc, A., & Nowak, G. (2010). Ionic Glutamate Modulators in Depression (Zinc, Magnesium). B P. Skolnick, *Glutamate–Based Therapies for Psychiatric Disorders (Milestones in Drug Therapy)* (pp. 21–38). Berlin: A Birkhäuser Basel book.
- Takeda, A., Iida, M., Ando, M., Nakamura, M., Tamano, H., & Oku, N. (2013). Enhanced Susceptibility to Spontaneous Seizures of Noda Epileptic Rats by Loss of Synaptic Zn²⁺. *PLoS One*, 8(8), doi: 10.1371/journal.pone.0071372.
- Takeda, A., Sakurada, N., Ando, M., Kanno, S., & Oku, N. (2009). Facilitation of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation in the hippocampus. *Neurochem Int.*, 55(6), 376–382.
- Zalups, R., & Koropatnick., J. (2010). *Cellular and molecular biology of metal*. N.Y.: CRC Press.