

О. М. Демченко, П.О. Неруш

## Вікові особливості вмісту гліального фібрилярного кислого білка в структурах головного мозку щурів за умов больового синдрому

*В исследованиях на крысах линии Вистар трех возрастных групп (неполовозрелых, половозрелых и старых) было изучено содержание глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в коре больших полушарий, гиппокампе, таламусе и стволе мозга после лапаротомии. Установлена связь между эмоциональной активностью и уровнем ГФКБ в данных структурах мозга. У неполовозрелых крысят активация эмоционального компонента поведения проходила на фоне сниженного содержания растворимой и нерастворимой фракций полипептида в стволе мозга на 16 и 18 % по отношению к интактным животным. У половозрелых крыс операционная травма сопровождалась снижением груминга и уменьшением содержания растворимой фракции ГФКБ во всех изучаемых структурах. У старых животных лапаротомия вызывала накопление полимеризованной и деполимеризованной формы ГФКБ в гиппокампе до 34 и 48 % ( $P < 0,05$ ).*

### ВСТУП

Біль є складною інтегративною реакцією нервової системи мультифункціонального характеру. Тим більше, якщо йдеться про післяопераційний біль, який викликає складний каскад нейроендокринних змін [3, 7, 8]. Ноцицептивні сигнали від операційного поля передаються в ЦНС, викликаючи не тільки рухливо-захисну, а й емоційну реакцію. Вираженість мотиваційно-афективного компонента больового реагування багато в чому зумовлюється процесами адаптації ЦНС у період післяопераційного больового синдрому. Відомо, що емоційна активність у щурів змінюється з віком. У ранньому онтогенезі вона знижена, а у старих тварин зростає [9]. Очевидно, що діяльність ЦНС у відповідь на операційну травму буде залежати від вікових особливостей. Велику роль у функціонуванні нейронів, синапсів медіаторних систем мозку відіграє глія, зокрема астро-

цити. Тому метою нашої роботи було дослідити віковий аспект стану цитоскелетного білка проміжних філаментів астроглії за умов експериментальної лапаротомії.

### МЕТОДИКА

Експерименти були проведені на щурах лінії Вістар трьох вікових груп. I група – статевонезрілі (5 тиж), II – статевозрілі (5 міс) і III – старі щури (від 18 до 22 міс). Тварини кожного віку були розділені на дві підгрупи – контрольну (інтактні тварини) та дослідну (щури, яким робили лапаротомію).

Модель післяопераційного соматовісцерального больового стану створювали за допомогою лапаротомії, яку виконували під ефірним наркозом з додержанням загальноприйнятих правил оперативного втручання. Така модель ноцицептивного подразнення максимально наближена до реальної клінічної ситуації та дає змогу досліджувати явища, пов'язані з болем, через 16–18 год

© О. М. Демченко, П.О. Неруш

після оперативного втручання й закінчення післядії анестетика, тобто в ранньому післяопераційному періоді [13].

По закінченні зазначеного терміну тварин декапітували, ізолювали головний мозок і виділяли такі структури ЦНС, як кора великих півкуль, стовбур мозку, таламус і гіпокамп. Зразки тканин мозку після очищення від оболонок і кровоносних судин поміщали в скляний гомогенізатор з тефлоновим поршнем у тріс-НСІ-буфер (50 ммоль/л, рН 7,4) із співвідношенням тканина/буфер 1:6. Тріс-буферна система вмішувала (ммоль/л) ЕДТА – 2, 2-меркаптоетанол – 1, фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) – 0,1 та соєвий інгібітор трипсину – 5. Усі маніпуляції проводили при умовах температури 4 °С. Гомогенат центрифугували при 30000 g упродовж 60 хв. Отриманий супернатант ( $S_1$ ) містив у собі розчинні білки мозку. Осад ( $P_1$ ) промивали в тому самому буфері та центрифугували впродовж 45 хв при 30000 g, після чого його ресуспендували в буфері А з додаванням 4 моль/л сечовини (буфер Б) та інкубували протягом 12 год. Подальше центрифугування проводили при 30000 g упродовж 60 хв. Супернатант ( $S_2$ ) вміщував водонерозчинні філаментні білки. Білкові фракції  $S_1$  та  $S_2$  фракціонували за молекулярною масою із застосуванням методу електрофорезу на пластині поліакриламідного гелю товщиною 1 мм за методикою Laemmli [17].

Для розділення білків розчинної та сечовинної фракції головного мозку в гелі створювали градієнт акриламідну  $T = 7-18\%$  при наявності 0,1 % додецилсульфату натрію. Аналіз поліпептидного складу проводили за допомогою методики імуноблотингу. Після електрофоретичного розділення білки у 12,5 ммоль/л тріс-НСІ-буфері за наявності 0,2 моль/л  $\beta$ -гліцину, 30 % метанолу та 2 моль/л сечовини переносили на нітроцелюлозні мембрани. Для імунохімічної ідентифікації гліального фібрилярного білка (ГФКБ) викорис-

товували поліклональну моноспецифічну кролячу антисироватку в розведенні 1:1500 [20]. Забарвлення імуноблотингу проводили за допомогою пероксидази хрину, кон'югваної з вторинними антитілами з додаванням хромогена діамінобензидину.

Кількісний аналіз здійснювали з використанням програми «Lab Work 4.0» (UVP, Великобританія), порівнюючи скановані інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон ГФКБ в дослідних і контрольних пробах. Результати відносили до загальної кількості білка у фракціях, який визначали за методом Лоурі [19]. Отримані результати обробляли за методами математичної статистики для малих вибірок [5].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В експериментах з визначення впливу операційної травми на безумовно-рефлекторну діяльність тварин різного віку було встановлено, що реакція ЦНС у післяопераційному періоді модулювалася рівнем розвитку головного мозку. Відомо, що в першу добу після операційного втручання знижуються метаболічні процеси в організмі на фоні зменшення споживання кисню, температури тіла, сечовиділення, зниження функціональної залишкової ємності легень, гальмування біоелектричної активності шлунково-кишкового тракту [12, 15, 18]. Цілком логічно припустити, що за умов гіпометаболізму в ЦНС будуть також переважати процеси гальмівного характеру. Дійсно, при вивченні поведінки щурів у “відкритому полі” спостерігався дефіцит рухливо-дослідницької активності у тварин усіх вікових груп (рис. 1). Так, статевонезрілі щури відповідали на післяопераційний біль зниженням кількості пересічених квадратів на 32 %, числа оглянутих нірок на 47 %, величини вертикальних стійок на 52 % порівняно з інтактними тваринами ( $P < 0,05$ ). Особливо слід відмітити, що показник емоційності не тільки не зменшувався, а й збільшувався.

Тривалість грумінгу була довша за контрольний рівень на 25 % ( $P < 0,05$ ).

Цей факт досить цікавий тим, що достатньо низька емоційність незрілих щурів підвищується за наявності гострого болю. Можливо, ноцицептивне стимулювання з боку сомато-сенсорних аферентів, які через сенситизацію посилюють свій вплив на розташовані вище відділи ЦНС [21], посилює активність емоціогених ділянок мозку та гальмує діяльність кори великих півкуль. Імовірно, в незрілому мозку лімбічна система найменш захищена від впливу як больових подразнень, так і від підвищеного викиду норадреналіну, адреналіну, глюкокортикоїдів, вміст яких суттєво збільшувався в першу добу після оперативного втручання.

У статевозрілих щурів в післяопераційному періоді також пригнічувалася рухливість – горизонтальний компонент знижувався на 33 %, а вертикальний – на 40 % порівняно з інтактними тваринами (див. рис. 1). Кількість обстежуваних нірок у дослідній підгрупі була на 29 % менша за контрольне значення ( $P < 0,05$ ). На відміну від попередньої вікової групи, емоційна активність у статевозрілих щурів гальмувалася – грумінг тривав у середньому на 27 % менше, ніж у інтактних. Зменшення тривожності, як і гіподинамія, – важливе позитивне надбання за наявності емоційно-больового чинника і може розцінюватися як адаптаційна реакція ЦНС.

У групі старих щурів за умов лапаротомії також знижувалася поведінкова діяльність. Рівень горизонтальної та вертикальної рухливості зменшувався на 40 та 56 % порівняно з контролем (див. рис. 1). Кількість обстежуваних нірок, яка і так удвічі нижча від групи статевонезрілих, зменшувалася на 29 % ( $P < 0,05$ ). Емоційна активність, на відміну від значень перших двох вікових груп тварин, не змінювалася, хоча спостерігалася тенденція до її зниження.

Відома участь глії, зокрема астроцитів, у формуванні адаптаційних відповідей ЦНС та її окремих структур на дію багатьох патологених факторів [10, 14] і, зокрема, операційного втручання [4]. Паралельно зі змінами в поведінці щурів за умов емоційно-больового подразнення, при вивченні стану астроглії відзначалося суттєве коливання вмісту гліального кислого білка проміжних філаментів астроцитів залежно від віку тварин. Вміст нерозчинної та розчинної фракцій ГФКБ у разі імуноблотингу були представлені основною субодиницею (49 кДа). За умов лапаротомії вміст філаментної форми ГФКБ у стовбурі мозку зменшився на 18 %, а в проміжних філаментах астроцитів неокортекса, гіпокампа та таламуса коливався в межах контролю. Щодо розчинної фракції гліального білка оперованих 5-тижневих щурів, то вміст його збільшувався в гіпокампі до 26 % і зменшувалася в корі та стовбурі до 28 і 16 % від-

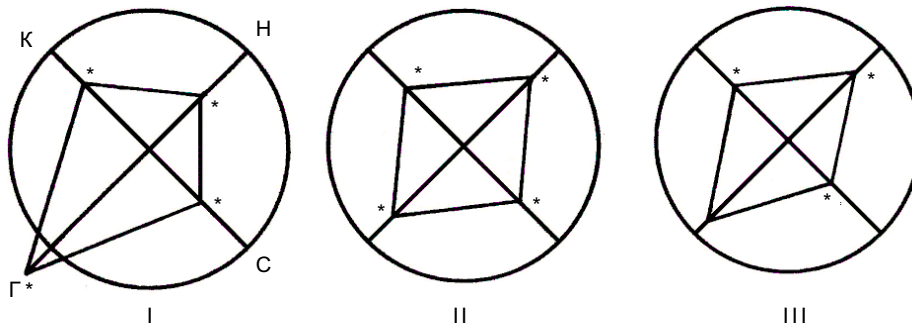


Рис. 1. Показники поведінкової активності щурів різного віку за умов лапаротомії: К – пересічені квадрати, Н – нірки, С – стійки, Г – грумінг, I – статевонезрілі, II – статевозрілі, III – старі щури.

Тут і на рис. 2 достовірність різниць групи післяопераційних тварин відносно інтактних при  $P < 0,05$

повідно. У гіпокампі, навпаки, вміст розчинної форми білка збільшувався на 26 % відносно контролю ( $P < 0,05$ ). Зниження вмісту ГФКБ у стовбурі мозку може відбуватися при зменшенні експресії цього білка або при підвищенні катаболічних процесів у клітинах. У першу добу післяопераційного періоду обидва фактори не виключаються. Але кінцевим результатом може бути збільшення вмісту глутамату в стовбурі мозку статевонезрілих щурів, оскільки астроглія активно захоплює з синаптичних щілин цей медіатор і перетворює його в глутамін [1], таким чином захищає нейрони від надмірного збудження [2]. Можливо, цей факт є причиною збільшення емоційної активності у цій віковій групі тварин.

Участь підкіркових утворень, зокрема неспецифічної системи ретикулярної формації, в активації лімбічних структур достатньо відома. З іншого боку, NMDA-рецептори ЦНС, які активуються глутаматом та

аспаратом, посилює проведення больових імпульсів через блокаду гальмівних нейронів системи антиноцицепції [12, 16]. Можливо, в незрілому мозку емоційний компонент больової реакції формується більшою мірою за участю глутаматергічної системи, активність якої в цьому разі посилюється на рівні стовбурових структур.

У статевозрілих оперованих тварин відзначалося різке зниження вмісту розчинного ГФКБ у корі великих півкуль, гіпокампі, стовбурі та таламусі в межах 22–56 % відносно інтактних щурів (рис. 2), тоді як вміст філаментної фракції залишався в межах контролю. Це значно, в 1,5–2 рази, зменшувало коефіцієнт “розчинна/нерозчинна фракція”, що дає можливість розцінювати цитоскелет астрогліальних клітин як менш лабільну і більш стабільну напружену структуру, стійку до деструктивних перетворень, зокрема внаслідок гальмування катаболізму полімеризованої частки цито-

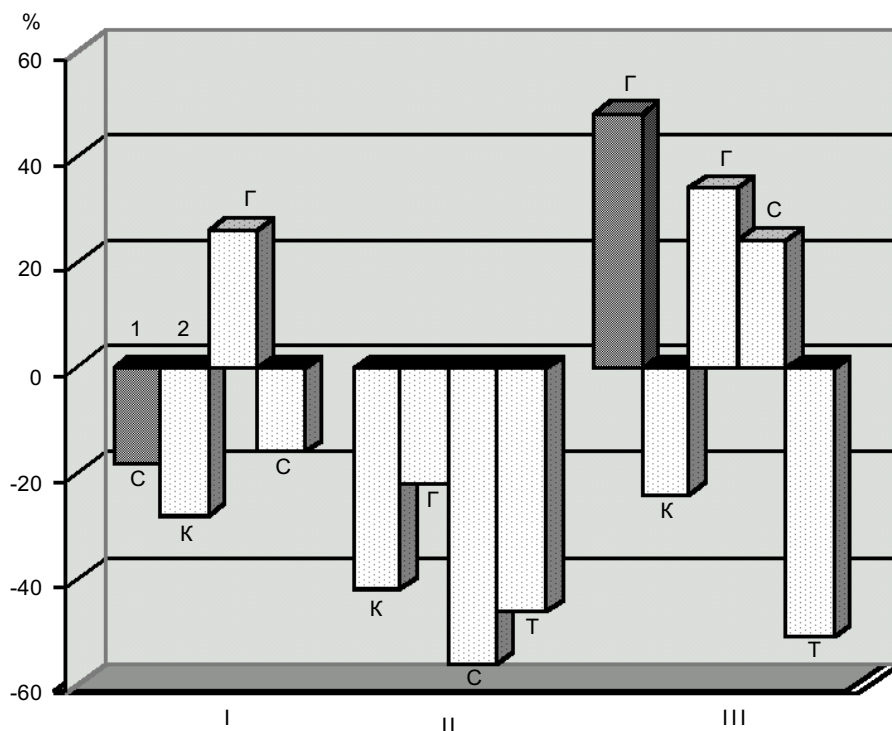


Рис. 2. Зміни вмісту гліального фібрилярного білка в структурах головного мозку щурів різного віку за умов лапаротомії: I – статевонезрілі, II – статевозрілі, III – старі щури. К – кора; Г – гіпокамп; С – стовбур; Т – таламус; 1 – нерозчинна фракція, 2 – розчинна фракція

скелетного білка. Ймовірно, такий стан глії зменшує збудливість нейронів головного мозку і в них переважають процеси депривуючого характеру, які за даних умов мають виражену адаптивну направленість.

У старих щурів у післяопераційний період підвищувався вміст філаментної та розчинної фракцій ГФКБ у гіпокампі на 48 та 34 % щодо інтактних тварин (див. рис. 2). Крім цього, вміст розчинної форми збільшувався в стовбурі мозку на 24 % і зменшувався в неокортексі та таламусі на 24 та 51 % в порівнянні з контролем. У гіпокампі старих тварин, у зв'язку з посиленням синтезу цитоскелетного білка проміжних філаментів або, можливо, проліферацією астроцитів підвищується захоплення і нейтралізація глутамату та включення його в синтез ГАМК [1, 2]. Можливо, через гальмівні процеси в гіпокампі, який має пряме відношення до формування емоційної реакції на біль [6], розвивається деяке зниження тривожності у старих щурів.

Таким чином, у статевонезрілих щурів підвищення емоційності в післяопераційному періоді, можливо, пов'язане зі зниженням експресії ГФКБ і/або підвищенням його катаболізму в стовбурових структурах. Зниження тривожності у статевозрілих тварин може бути наслідком посилення "фібрилізованості" астроглії, пов'язаної зі втратою великої кількості деполімеризованої частки ГФКБ, очевидно, внаслідок гальмування катаболізму його філаментної фракції. У старих щурів лапаротомія супроводжувалася підвищенням експресії ГФКБ або кількості астроцитів гіпокампа, що, можливо, викликає гальмівні процеси прояву емоцій.

**О.М. Demchenko, P.A. Nerush**

**AGE-RELATED FEATURES OF CONTENT OF GLIAL FIBROUS ACIDIC PROTEIN IN STRUCTURES OF RATS' BRAIN ON CONDITION OF THE POSTOPERATIVE STATE**

In experiments in white Wistar rats of three-age groups (immature, mature and old rats) content of glial fibrous acidic

protein (GFAP) was investigated in cerebral cortex, hippocampus, thalamus and brain stem after the carrying out of laparotomy. The correlation between emotional activity and the level of GFAP has been found in the given structures of a brain. In immature animals, the activation of emotional component of behaviour was accompanied by decrease in polypeptide's soluble and insoluble fractions in brain stem by 16% and 18%, respectively ( $p < 0,05$ ) in relation to intact animals. In mature rats, the operative trauma was accompanied by the lowering of grooming and lowering of the level of soluble fraction of GFAP in all structures. In old rats, laparotomy evoked accumulation of polymerized and depolymerized forms of GFAP in hippocampus by 34% and 48% ( $p < 0,05$ ), respectively.

*Dnepr. med. acad., MH of Ukraine*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бокша И.С. Взаимосвязь нейронов и глиальных клеток через метаболизм глутамата в мозгу здоровых людей и больных психическими заболеваниями // Биохимия. – 2004. – **69**, №7. – С. 869–886.
2. Бурбаева Г.Ш., Бокша И.С., Турищева М.С. и др. Нарушение метаболизма глутамата в мозгу при психической патологии (болезнь Альцгеймера, шизофрения) // Вестн. РАМН. – 2001. – №7. – С. 34–37.
3. Кобеляцкий Ю.Ю. Возбуждающие механизмы ноцицепции и их клиническое значение // Травма. – 2003. – **4**, №2. – С. 218–233.
4. Кобеляцкий Ю.Ю. Диференційоване управління післяопераційним больовим синдромом в залежності від характеру болю і динаміки нейропластичності: Автореф. дис. ... д-ра мед.наук. – Дніпропетровськ, 2003. – 36 с.
5. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – **47**, №6. – С. 776–791.
6. Крапивин С.В., Харитонов А.В, Воронина Т.А. Изменения спектров мощности электроэнцефалографии при некоторых видах патологии ЦНС и при боли // Вестн. РАМН. – 2004. – №5. – С. 25–32.
7. Крыжановский Г.Н. Важное событие в отечественной медицине // Боль. – 2003. – №1. – С. 5–12.
8. Кукушкин М.А. Патологические механизмы болевых синдромов // Там же. – С. 13–18.
9. Марков Е.В, Козлов В.А., Трофимова Н.А. и др. Стимуляция клеточного звена иммунного ответа активизирует исследовательское поведение преднамеренно стареющих крыс OXYS // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – **140**, №9. – С. 332–334.
10. Недзвецкий В.С., Неруш П.О., Тихомиров А.О. та ін. Вплив іонізуючого випромінювання і хлориду алюмінію на білок проміжних філаментів головного мозку щурів // Нейрофізіологія. – 2001. – **33**, №1. – С. 33–38.
11. Осипова Н.А. Антиноцицептивные компоненты общей

- анестезии и послеоперационной анальгезии // Анестезиология и реаниматология. – 1998. – №5. – С. 11–15.
12. Тропская Н.С. Роль серотонина в восстановлении электрической активности желудка и тонкой кишки в раннем послеоперационном периоде у крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – 140, №11. – С. 511–514.
13. Ярош А.К. Нейрофармакологический анализ функционирования ЦНС в динамике послеоперационного состояния и экспериментальное обоснование его коррекции: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1991. – 34 с.
14. Baydas G., Lipka M.V., Tikhomirov et al. Increase of glial molecular markers in the brain of diabetic rats reversed with vitamin E // Crimea- IBRO Advanced School of Neuroscience (Yalta). – 2004. – P. 3.
15. Hensle T.W. Askanazi I. Metabolism and nutrition in the perioperative period // J. Urol. – 1988. – 139. – P. 229–235.
16. Goffaux V., Mouraux A., Dosmet S. et al. Human non – phase – lock gamma oscillations in experience based perception of visual scenes // Neurosci. Lett. – 2004. – 354, №1. – P. 14–18.
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227, №1. – P. 249–259.
18. Liu S., Carpenter R., Neal I. Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome // Anesthesiology. – 1995. – 82. – P. 1474–1506.
19. Lowry O.H., Rosenbough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 133, № 1 – P. 265–275.
20. McLean W., Lane E. Intermediate filaments in disease // Current Opin. Cell Biol. – 1995. – №7. – P. 118–125.
21. Wool C., Chong M. Preemptive analgesia – treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization // Anesth. Analg. – 1993. – 77. – P. 1–18.

*Дніпропетров. мед. академія МОЗ України*

*Матеріал надійшов до редакції 25.01.2007*