

В. А. Макарчук¹, Г. О. Ушакова²ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ¹, ДНІПРОПЕТРОВСЬК
ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. ГОНЧАРА²**ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ S-100b І ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО
КИСЛОГО ПРОТЕЇНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТА ПІДШЛУНКОВІЙ
ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПАНКРЕАТИЧНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ**

Досліджено особливості розподілу S-100b і гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП) в головному мозку та підшлунковій залозі щурів за умов моделювання хронічного панкреатиту. Методом конкурентного інгібіторного імуноферментного аналізу в структурно і функціонально різних відділах головного мозку виявлено підвищення рівня S-100b та розчинної форми ГФКП, перерозподіл між розчинною і філаментною фракціями ГФКП, що може бути однією з причин розвитку панкреатичної енцефалопатії. Методом тестування тварин у "відкритому полі" за умов панкреатичної енцефалопатії встановлено, що виявлені зміни в розподілі даних білків супроводжувалися зниженням локомоторної та пізнавальної активності щурів і збільшенням їх стресогенності. При розвитку експериментального хронічного панкреатиту в підшлунковій залозі відзначено збільшення вмісту S-100b та зниження розчинної і філаментної фракцій ГФКП, що свідчить про деполімеризацію проміжних філаментів гліальних клітин у периферичній нервовій системі в досліджуваному органі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: панкреатична енцефалопатія, мозочок, таламус, гіпокамп, підшлункова залоза, S-100b, гліальний фібрилярний кислий протеїн.

ВСТУП. В останні роки у всьому світі та Україні спостерігають збільшення кількості хворих на хронічний панкреатит, який є прогресуючим, запальним захворюванням підшлункової залози, що призводить до поступового руйнування паренхіми органа і його фіброзної трансформації [6, 26].

Порушення процесів вільнорадикального окиснення є раннім неспецифічним фактором пошкодження, що лежить в основі розвитку різних захворювань, у тому числі й хронічного панкреатиту. Рівень антиоксидантної активності тканини підшлункової залози один із найнижчих в організмі, тому вивільнення в кров продуктів вільнорадикального окиснення та ендотоксинів буде сприяти формуванню синдрому ендогенної інтоксикації [19]. Ендотоксини змінюють проникність гематоенцефалічного бар'єру. Основна їх частина належить до молекул середньої маси, що здатні проявляти нейротоксичну активність, приєднуватися до рецепторів і блокувати їх, неадекватно змінюючи метаболізм та функції нервових клітин [11].

Раннім і тяжким ускладненням гострого панкреатиту є панкреатична енцефалопатія [13, 20, 21]. Дослідження молекулярно-біохімічних механізмів її розвитку на сьогодні є досить

© В. А. Макарчук, Г. О. Ушакова, 2014.

актуальним. Патофізіологія даного захворювання не зовсім зрозуміла: зміна гемодинаміки, метаболічний статус, розлади рідинного чи електролітного балансу, запальні цитокіни і пряма нейротоксична дія фосфоліпази – всі ці фактори можуть бути причетні [29]. Високий рівень панкреатичних ензимів у крові при гострому панкреатиті призводить до зміни проникності гематоенцефалічного бар'єру і викликає пошкодження структур головного мозку [22]. Питання про розвиток панкреатичної енцефалопатії при хронічному панкреатиті на сьогодні мало розкрито, воно становить значний інтерес для дослідників.

Дія ендотоксикантів направлена насамперед на астроцитарні клітини, призводячи до їх морфологічних та біохімічних змін. Стан астрогліальних клітин зазвичай оцінюють за рівнем специфічних гліальних протеїнів – Ca²⁺-зв'язувального білка S-100b та гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП).

S-100b бере участь в Ca²⁺-залежній регуляції різноманітних внутрішньоклітинних процесів, таких, як фосфорилування білків, активність ферментів, клітинна проліферація та диференціювання, динаміка зміни цитоскелетних складових, структурна організація мембран, внутрішньоклітинний Ca²⁺-гомеостаз, запален-

ня, захист від окиснювального пошкодження клітин [18]. S-100b локалізований переважно в астроцитах та шванівських клітинах нервової системи [9, 18]. При фізіологічних (наномолярних) концентраціях даний протеїн виконує захисні функції, що підтверджує його роль як нейротрофічного фактора під час розвитку та регенерації нейронів, а при мікромолярних – індукує апоптоз і нейродегенерацію клітин. S-100b – високочутливий біохімічний маркер пошкодження головного мозку, що може сигналювати про гліальну клітинну активацію, гибель нейронів [15, 18, 27].

ГФКП – протеїн проміжних філаментів, декілька ізоформ якого було описано, в тому числі α , β , γ , δ , $\Delta 135$, $\Delta 164$, Δ ехон і зовсім нещодавно κ . Переважає така форма, як ГФКП- α , що експресується більшістю астроцитів, володіє високою специфічністю до астрогліальної клітинної лінії, активується у відповідь на пошкодження та широко використовується як діагностичний маркер реактивного гліозу. ГФКП- β міститься переважно в периферичній нервовій системі [14]. ГФКП є специфічним маркером диференційованих астроцитів [16]. Даний протеїн забезпечує структурну підтримку та міцність на розтягнення цитоскелета нормальних астроцитів [12].

На сьогодні залишається нез'ясованим характер кількісного розподілу S-100b і гліального фібрилярного кислого протеїну в мозку та підшлунковій залозі щурів при розвитку панкреатичної енцефалопатії в експерименті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили з використанням хімічно чистих реагентів: моноспецифічних поліклональних антитіл проти S-100b та ГФКП, очищених антигенів S-100b і ГФКП ("Santa Cruze", США), вторинних антитіл, мічених пероксидазою хрому ("Sigma", США).

Експеримент виконували на 36 нелінійних білих щурах-самцях (6 місяців, 190–220 г) згідно із Законом України № 3447-IV від 21.02.06 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження". Для моделювання хронічного панкреатиту тваринам під наркозом (кетамін гідрохлорид, 110 мг/кг) проводили лапаротомію та тривалу оклюзію панкреатичної протоки в хвостовій частині підшлункової залози лігатурою "Prolene" 6/0 [8].

Експериментальних тварин було поділено на дві групи: 1-ша – псевдооперовані щури, яким проводили лапаротомію і відразу ж зашивали розріз шкірного покриву на череві (контроль), з наступним виведенням на 6-ту (n=6), 15-ту (n=6) і 30-ту доби (n=6) дослідження

після попереднього введення наркозу; 2-га – щури з тривалою оклюзією панкреатичної протоки з виведенням на 6-ту (запально-некротична стадія гострого панкреатиту, n=6), 15-ту (перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту, n=6) та 30-ту доби (фіброзна стадія хронічного панкреатиту, n=6) дослідження після попереднього введення наркозу.

Мозок щурів очищали від поверхневої плівки і капілярів, вилучали окремо мозочок, таламус та гіпокамп. Гомогенізацію тканини мозку та підшлункової залози проводили в буфері А, що містив трис-НCl – 25 мМ; рН 7,4; етилендіамінтетраоцет – 1 мМ; β -меркаптоетанол – 2 мМ; фосфометилсульфонілфторид – 0,2 мМ; мертіолят – 0,01 %, у співвідношенні 1:10 при температурі +4 °С. У ході послідовних стадій центрифугування було виділено фракції, що містили цитозольні (розчинні, soluble) білки (S-100b та sГФКП). Після цього осад ресуспендували в розчині буфера А, до складу якого додавали сечовину – 4 М, екстракція проходила протягом 18 год. Подальше центрифугування проводили при 100 000 g протягом 60 хв, супернатант містив сечовинорозчинні філаментні (filament) білки (fГФКП). Отримані фракції білків використовували для визначення в них кількісного вмісту S-100b та ГФКП методом конкурентного інгібіторного методу імуноферментного аналізу з застосуванням моноспецифічних антитіл проти S-100b та ГФКП і відповідних очищених білків-стандартів [4]. Вміст S-100b та ГФКП визначали як відношення їх кількості в пробі до кількості загального білка (ЗБ) в пробі (мкг S-100b (ГФКП)/мг ЗБ). Кількість ЗБ у фракціях мозку визначали за Bradford [10]. Дані дослідження з визначення вмісту S-100b та ГФКП в підшлунковій залозі й відділах мозку проводили у тварин 1-ї та 2-ї груп на 30-ту добу експерименту.

Поведінкову активність щурів досліджували за допомогою тестування у "відкритому полі" за методом Буреша [1]. Реєстрацію показників рухово-дослідницької та емоційної активності у тварин 1-ї та 2-ї груп проводили на 5-ту, 14-ту і 29-ту доби експерименту. В процесі проходження щурами "відкритого поля" фіксували горизонтальну і вертикальну рухову активність (кількість перетину ліній зовнішніх та внутрішніх квадратів і вертикальні стійки), реакції дефекації, уринації та число ґрумінгів, які розцінювали як емоційну реактивність тварин, і визначали їх орієнтовно-дослідницьку поведінку (число заглядань у нірки).

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з вико-

ристанням стандартного пакета прикладних програм SPSS for Windows 9.0. Для показника визначали вибіркове середнє значення (M) та похибку середнього (m). Досліджувані співвідношення вважали достовірними при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. Кореляційний аналіз проводили за Пірсоном [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Відомо, що існує кореляційний зв'язок між функціональною активністю різних відділів мозку і видом діяльності організму тварини. Для дослідження розподілу Ca^{2+} -зв'язувального протеїну S-100b та ГФКП було обрано відділи мозку, відповідальні за рухову активність, сенсорну чутливість, у тому числі й больову, та процеси навчання і пам'яті.

Одержані величини S-100b складаються з концентрацій його розчинної форми й експресованих астроглією позаклітинних молекул. Результати досліджень показали достовірне збільшення рівня S-100b, екстрагованого з гіпокампа і таламуса, – на 78,0 % ($p < 0,001$) та 60,3 % ($p < 0,01$) відповідно відносно контролю. В мозочку вірогідних змін не було зареєстровано (рис. 1).

Розвиток хронічного панкреатиту супроводжувався достовірним підвищенням на 119,7 % ($p < 0,01$) вмісту S-100b із підшлункової залози – з $(0,06 \pm 0,01)$ мкг S-100b/мг ЗБ (контроль) до $(0,13 \pm 0,01)$ мкг S-100b/мг ЗБ, що може індукувати каскад кальціезалежних дегенеративних процесів у залозі.

ГФКП – один із головних імуноцитохімічних маркерів астроцитів, важливий представник макроглії в центральній нервовій системі ссавців. Як маркер астрогліальних клітин його широко застосовують у діагностичних цілях та експериментальних роботах при дослідженні функцій нервової системи в нормі й при патології. Однією з ключових і найбільш досліджуваних функцій астроцитів є їх участь в органі-

зації та регуляції проникності гемато- і ліквороенцефалічного бар'єрів. Відомо, що саме накопичення ГФКП пов'язане із забезпеченням астроцитами бар'єрних функцій [7]. Реакція астрогліальних елементів у відповідь на розвиток хронічного панкреатиту не тільки проявляється змінами кількості цих клітин внаслідок процесів міграції та проліферації, але і дозволяє припустити процеси перебудови (реорганізації) проміжних філаментів астроглії. Особливістю змін вмісту розчинної форми ГФКБ у щурів на 30-ту добу після тривалої оклюзії панкреатичної протоки, на відміну від філаментної фракції, було підвищення концентрації sГФКП в екстрактах із досліджуваних структур головного мозку. Так, вміст розчинної форми даного протеїну збільшився у мозочку на 31,3 % ($p < 0,05$), а в таламусі спостерігали тенденцію до його зростання на 12,3 % порівняно з контролем (рис. 2).

Вміст розчинної фракції ГФКП із підшлункової залози зазнав значних змін при фіброзній стадії хронічного панкреатиту – знизився на 41,9 % ($p < 0,05$) з $(0,13 \pm 0,02)$ мкг sГФКП/мг ЗБ (контроль) до $(0,08 \pm 0,008)$ мкг sГФКП/мг ЗБ.

Результати визначення вмісту філаментної фракції ГФКП у відділах мозку при розвитку хронічного панкреатиту наведено на рисунку 3. Встановлено, що на 30-ту добу експериментальних спостережень концентрація ГФКП у всіх досліджуваних відділах мозку щурів вірогідно знизилась порівняно з контролем. Так, у мозочку рівень fГФКП зменшився на 18,0 % ($p < 0,05$), у гіпокампі – на 43,5 % ($p < 0,001$), а в таламусі – на 41,7 % ($p < 0,01$) відносно контролю.

Вміст fГФКП із підшлункової залози знизився на 18,6 % ($p < 0,05$) до $(0,78 \pm 0,04)$ мкг fГФКП/мг ЗБ відносно контролю $(0,96 \pm 0,06)$ мкг fГФКП/мг ЗБ.

Як свідчать наведені результати, розвиток експериментального хронічного панкреатиту

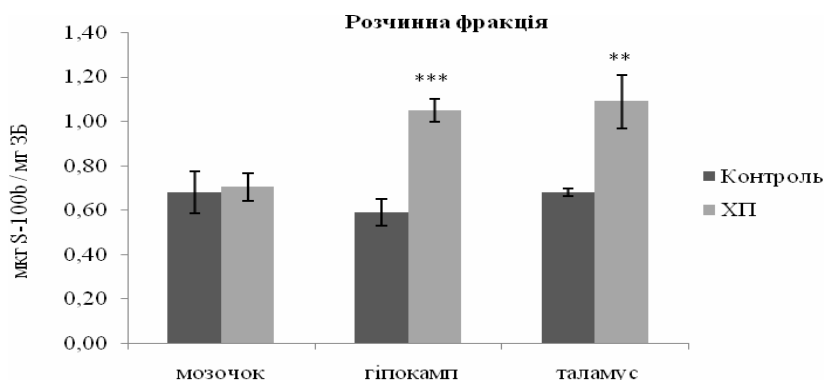


Рис. 1. Вміст S-100b в екстрактах із відділів головного мозку. Контроль – псевдооперовані щури, n=6; ХП – щури з експериментальним хронічним панкреатитом, n=6; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем.

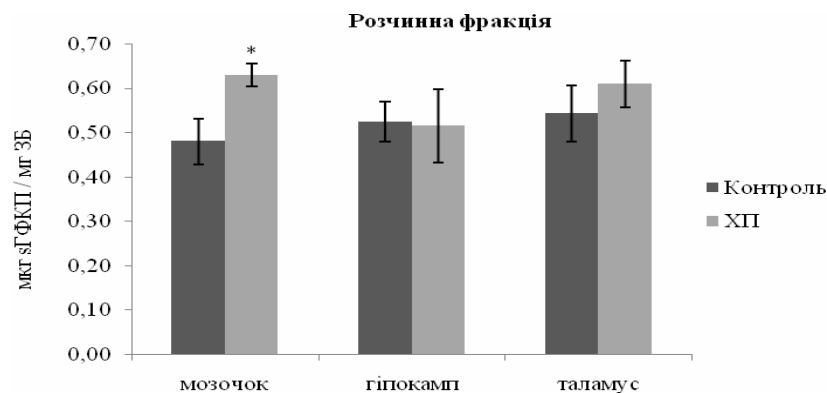


Рис. 2. Вміст sGFAP в екстрактах із відділів головного мозку. Контроль – псевдооперовані щури, n=6; ХП – щури з експериментальним хронічним панкреатитом, n=6; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

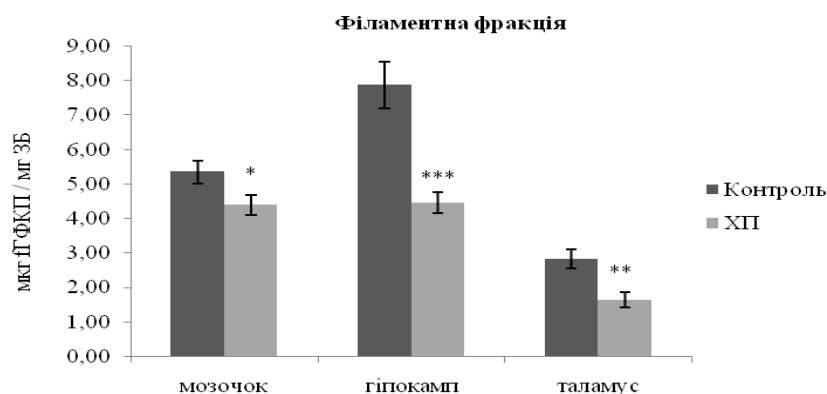


Рис. 3. Вміст fGFAP в екстрактах із відділів головного мозку. Контроль – псевдооперовані щури, n=6; ХП – щури з експериментальним хронічним панкреатитом, n=6; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем.

суттєво впливає на функціонування структурно різних відділів головного мозку. За умов токсикації мозку під час розвитку хронічного панкреатиту відбувається активація астроглії: збільшення рівня кальцієзв'язувального білка S-100b призводить до деполімеризації проміжних філаментів, що підтверджується перерозподілом між розчинною і філаментною формами GFAP. Отримані дані свідчать про реорганізацію проміжних філаментів астроцитів, що зменшує функціональну цілісність їх цитоскелета, це, у свою чергу, може бути однією з причин розвитку панкреатичної енцефалопатії, яка супроводжується зниженням локомоторної і пізнавальної активності щурів та збільшенням їх стресочутливості (збільшення активів “уринація” і “дефекація”).

Так, у результаті проведених досліджень з визначення поведінкової активності щурів після тривалої оклюзії панкреатичної протоки було встановлено, що тварини проявляли локомоторну активність тільки на перших хвиликах тестування: вони зупинялись в одному з кутів поля вже через 1–2 хв. Кількість перетину ліній зовнішніх і внутрішніх квадратів достовірно знижувалася вже на 5-ту добу експерименту – на 51,1 % ($p < 0,01$) та 91,8 % ($p < 0,01$) відпо-

відно, продовжувала зменшуватися на 14-ту добу – на 80,7 % ($p < 0,001$) та 91,4 % ($p < 0,01$) і максимального зниження досягла на 29-ту добу експерименту – на 85,4 % ($p < 0,001$) та 100 % відносно контролю (табл.).

Спостерігали достовірне зниження кількості активів “вертикальна стійка” та “нірка” в щурів на 5-ту добу експерименту – на 37,9 % ($p < 0,05$) та 60,3 % ($p < 0,01$) відповідно відносно контролю. В подальшому значне порушення орієнтовно-дослідницької активності тварин проявлялося значимим зменшенням кількості активів “вертикальна стійка” і “нірка” – на 87,8 % ($p < 0,001$) та 84,7 % ($p < 0,001$) і на 95,4 % ($p < 0,001$) та 84,9 % ($p < 0,001$) відповідно на 14-ту і 29-ту доби порівняно з контролем. Кількість активів “грумінг” на 5-ту і 14-ту доби експериментального дослідження зростала на 76,3 % ($p < 0,05$) та 15,5 % відповідно, а на 29-ту добу спостерігали зниження даного показника на 15,8 % відносно контролю. При дослідженні динаміки вегетативної активності щурів слід відзначити збільшення на 5-ту добу тестування кількості активів “уринація” та “дефекація” – на 74,6 та 166,0 % відповідно, на 14-ту – на 34,0 та 123,9 % ($p < 0,05$), а на 29-ту – на 51,5 та 66,0 % порівняно з контролем (табл.).

Таблиця – Динаміка зміни показників тесту “відкрите поле” в експериментальних щурів ($M \pm m, n=36$),

Показник (кількість)	Контроль	Доба тестування тварин		
	Дослід	5-та	14-та	29-та
Лінії зовнішніх квадратів	Контроль	22,50±2,26	19,83±1,78	18,33±2,14
	Дослід	11,00±1,18**	3,83±0,48***	2,67±0,42***
Лінії внутрішніх квадратів	Контроль	4,00±1,00	3,83±1,08	3,17±0,87
	Дослід	0,33±0,21**	0,33±0,21**	0
Акти “вертикальна стійка”	Контроль	6,17±0,75	5,50±0,67	7,17±0,95
	Дослід	3,83±0,60	0,67±0,21***	0,33±0,21***
Акти “нірка”	Контроль	12,17±1,45	9,83±1,19	8,83±1,17
	Дослід	4,83±0,87**	1,50±0,56***	1,33±0,49***
Акти “грумінг”	Контроль	3,50±0,62	4,33±0,71	3,17±0,40
	Дослід	6,17±0,70	5,00±0,73	2,67±0,67
Акти “уринація”	Контроль	0,67±0,33	0,50±0,22	0,33±0,21
	Дослід	1,17±0,17	0,67±0,33	0,50±0,22
Акти “дефекація”	Контроль	0,50±0,22	0,67±0,21	0,50±0,34
	Дослід	1,33±0,49	1,50±0,22	0,83±0,31

Примітка. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (вірогідність різниці порівняно з контрольною групою).

Таким чином, визначене підвищення в гіпокампі й таламусі вмісту S-100b, який продукується переважно астроцитами мозку, свідчить про активацію астроглії внаслідок токсикації мозку при фіброзній стадії хронічного панкреатиту. S-100b, вивільняючись з пошкодженої тканини, може посилювати нейродегенерацію шляхом S-100b-індукованого апоптозу.

Встановлене достовірне підвищення S-100b в екстракті з підшлункової залози вказує на активацію пошкодження Ca^{2+} -залежних механізмів з участю цього протеїну в периферичних нервах і взаємодію з мультілігандним рецептором до кінцевих продуктів глікозилування цитоплазматичної мембрани, що може призводити до збудження сигнальних внутрішньоклітинних мітогенактивованих протеїнкіназ – екстрацелюлярних сигнальних кіназ, p38 та jun-термінальних кіназ, які беруть участь у процесах синтезу прозапальних цитокінів. Збудження рецепторів до кінцевих продуктів глікозилування активує внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які зумовлюють індукцію нуклеарного фактора транскрипції κB [9].

Підвищена експресія ГФКП є важливим маркером активації глії після пошкодження центральної нервової системи, але не зовсім зрозуміло, що дане збільшення означає для виживання навколишніх нейронів і який його потенціал для регенерації аксонів. Підвищення вмісту ГФКП як маркера реактивності глії необхідно вважати негативним результатом для нейронів, є докази того, що це може бути не так і що гліальну реактивність та зміни експресії даного протеїну слід розглядати в контексті їх виникнення. ГФКП позитивно

впливає на здатність до регенерації нейронів, змінюючи локалізацію протеїнів, які можуть взаємодіяти з нейронами в гліальних клітинних мембранах; контролює експресію інших молекул, що секретуються, таких, як гліальний нейротрофічний фактор або позаклітинний матриксний протеїн ламінін, які змінюють регенерацію аксонів. ГФКП може бути каркасом для нових нейритів [28].

В результаті розвитку фіброзної стадії хронічного панкреатиту спостерігали перерозподіл вмісту ГФКП між розчинною та філаментною формами в мозочку і таламусі, тобто збільшення в цих відділах мозку концентрації sГФКП відбувалося за рахунок зниження вмісту fГФКП. Дані зміни в розчинній фракції досліджуваного протеїну свідчили про активацію астроглії внаслідок токсикації мозку при розвитку патології підшлункової залози, а перерозподіл між фракціями вказував на реорганізацію проміжних філаментів астроцитів, порушення структурної підтримки цих клітин.

Багато клітин за межами центральної нервової системи в нейронній та нейронній тканинах мають морфологічну і функціональну подібність з астроцитами. Периферичні ганглії містять клітини-сателіти, які експресують ГФКП, периферичні нерви – немієлінізовані шванівські клітини, що синтезують ГФКП та оточують немієлінізовані аксони. Він широко експресується в багатьох тканинах за допомогою різних видів клітин, включаючи мезенхімальні зірчасті клітини, що мають структурну та функціональну подібність з астроцитами, в тому числі у печінці, нирках і підшлунковій залозі. Функціональну роль цих клітин та їх потенційну подібність з астроцитами тільки починають досліджувати.

Наприклад, з'являється все більше доказів того, що ГФКП-експресія панкреатичними зірчастими клітинами відіграє важливу роль у тканинній репарації, фіброзі та формуванні рубців [25].

Слід відзначити середній зворотний кореляційний зв'язок між підвищенням у гіпокампі вмісту S-100b та зниженням fГФКП ($r=-0,657$, $p<0,05$) і між збільшенням у таламусі вмісту S-100b та зменшенням fГФКП ($r=-0,714$, $p<0,05$). Відомо, що S-100b пригнічує збирання проміжних філаментів шляхом інгібування полімеризації ГФКП за присутності Ca^{2+} [17, 23]. Тому в нашому експерименті при зростанні концентрації S-100b в таламусі та гіпокампі знижується вміст філаментної форми ГФКП у вказаних відділах мозку.

Відомо, що енцефалопатія може призводити до легких і тяжких психоневрологічних симптомів, набряку мозку з підвищенням внутрішньочерепного тиску. Астроцити відіграють центральну роль у патофізіології енцефалопатії. Набряк мозку значною мірою відбувається внаслідок набряку астроцитів, що, у свою чергу, спричинено поглинанням цими клітинами NH_4^+ . Хоча таке поглинання розглядають спочатку як нейропротекторні механізми, воно також призводить до синтезу глутаміну з глутамату за допомогою глутаматсинтетази, в результаті чого виникають зміни в гомеостазі нейромедіаторів, що може викликати поведінкові симптоми. Накопичення глутаміну в астроцитах також призводить до осмотичного стресу, що спричиняє набряк астроцитів і прогресування цитотоксичного набряку [25].

Для дослідження особливостей вищої нервової діяльності гризунів, зокрема поведінки щурів, широко використовують тест "відкрите поле" [3]. Відомо, що нервова система найбільш чутлива до різних впливів. На даний час спостерігають розширення сфери застосування поведінкових реакцій тварин як тестових систем [2]. Більшість авторів вважає, що факторами, які визначають поведінку тварин у "відкритому полі", є дослідницька мотивація та емоційна реактивність (Чуян, 2003). Фактор емоційності при проведенні даного тесту проявляється через локомоторну активність щурів (Титов, Каменский, 1980) і вегетативну функцію у вигляді уринації та дефекації (Кулагин, Федоров, 1969). Згідно з даними (Hall, 1934), емоційність свідчить про пасивно-оборонну поведінку щурів, для яких характерні низька рухова активність і високий рівень вегетативної реакції, відповідно, проводять деяку аналогію між неемоційністю та активно-оборонною поведінкою. Водночас вертикальні стійки, ґрумінг

та заглядання в нірки вважають видоспецифічними проявами орієнтувально-дослідницької діяльності (Silverman, 1996). Зі збільшенням величини дефекації знижується рухова активність тварин (Кулагин, Федоров, 1969). Але також існують дані, що ці два показники взаємно не пов'язані (Титов, Каменский, 1980). Це пояснюють тим, що локомоторна реакція тварин при розміщенні їх у нових обставинах може здійснюватись у зв'язку з різними мотиваціями: уникненням і дослідженням нової території (Маркель, Хусаинов, 1976) [3].

Підсумовуючи результати проведених нами досліджень щодо моделювання панкреатиту шляхом оклюзії панкреатичної протоки, можна стверджувати, що зниження локомоторної активності та зростання показників вегетативної функції вказують на посилення тривожно-фобічних реакцій у піддослідних щурів. Різновидом орієнтувально-дослідницької поведінки тварин є кількість здійснених ними вертикальних стійок та обстежених отворів. Дані показники статистично значимо знижувалися в щурів протягом усього експерименту. Кількість актів "ґрумінг", що також характеризує поведінку тварин у "відкритому полі", достовірно зростала на 5-ту добу експерименту порівняно з контролем, а в подальшому спостерігали лише незначні коливання даного показника.

Кореляційний аналіз виявив також при фіброзній стадії хронічного панкреатиту пряму залежність між зниженням концентрації fГФКП із мозочка та зменшенням перетину тваринами ліній зовнішніх квадратів ($r=0,941$, $p<0,01$) і між зростанням вмісту sГФКП із мозочка та збільшенням актів "ґрумінг" ($r=0,812$, $p<0,05$). Відмічали різнонаправлений зв'язок між зниженням концентрації fГФКП із мозочка та зростанням кількості дефекацій ($r=-0,926$, $p<0,01$).

ВИСНОВКИ. 1. Підвищення вмісту S-100b у різних відділах головного мозку та підшлунковій залозі може індукувати розвиток панкреатичної енцефалопатії за умов ендогенної токсикації при хронічному панкреатиті в щурів.

2. Достовірне зниження вмісту філаментної форми ГФКП у центральній та периферичній нервовій системі свідчить про реорганізацію цитоскелета астрогліальних клітин, що опосередковано впливає на синаптичну пластичність і забезпечення функцій нервової системи.

3. За умов розвитку експериментальної панкреатичної енцефалопатії встановлено залежність між рівнем астроцитспецифічних протеїнів у мозку щурів та їх фізіологічними реакціями.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М. : Высшая школа, 1991. – 352 с.
2. Влияние диоксида титана на некоторые функции центральной нервной системы крыс / Н. А. Кривова, М. Ю. Ходанович, Т. А. Замощина [и др.] // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. – 2011. – **14**, № 2. – С. 96–109.
3. Кальян В. В. Поведінкові реакції самиць-щурів, матері яких підлягали дії різних рухових режимів, в умовах відкритого поля / В. В. Кальян // Вісник Харківського нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. – 2007. – Вип. 6, № 788. – С. 134–140.
4. Нго Т. Т. Иммуноферментный анализ / Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф, А. Яклич. – М. : Мир, 1988. – 444 с.
5. Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин. – М. : Гэотар-Мед, 2003. – 144 с.
6. Степанов Ю. М. Хронічний панкреатит: білярний механізм, чинники та перебіг / Ю. М. Степанов, Н. Г. Заїченко // Запороз. мед. журн. – 2012. – **70**, № 1. – С. 46–50.
7. Сухорукова Е. Г. Структурная организация астроцитов неокортекса крысы и человека, содержащих глиальный фибриллярный кислый белок : автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. мед. наук / Е. Г. Сухорукова. – С. Пб., 2011. – 22 с.
8. An Immunocytochemical Profile of the Endocrine Pancreas Using an Occlusive Duct Ligation Model / B. J. Page, D. F. Toit, C. Muller [et al.] // Journal of the Pancreas. – 2000. – **4**, № 1. – P. 191–203.
9. 100B Protein, a Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond / G. Sorci, R. Bianchi, F. Riuzy [et al.] // Cardiovascular Psychiatry and Neurology. – 2010. – **2010**, Article ID 656481. – 13 p.
10. Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1985. – **72**. – P. 248–254.
11. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions / A. Catala // Chemistry and Physics of Lipids. – 2009. – **157**. – P. 1–11.
12. Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas / A. Restrepo, C. A. Smith, S. Agnihotri [et al.] // Neuro-Oncology. – 2011. – **13**, № 1. – P. 42–50.
13. Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: A potential role of MCP-1 / D. Zhen, L. Jun, L. Rong, H. Xiao Hua // Journal of Digestive Dis. – 2012. – **13**. – P. 179–185.
14. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies / L. Martinian, K. Boer, J. Middeldorp [et al.] // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 2009. – **35**, Issue 4. – P. 394–405.
15. Functional Assessment of a Promoter Polymorphism in S100B, a Putative Risk Variant for Bipolar Disorder / E. Dagdan, D. W. Morris, M. Campbell [et al.] // American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. – 2011. – **156**, Issue 6. – P. 691–699.
16. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling / C. S. Ennen, T. A. Huisman, W. J. Savage [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2011. – **205**, № 3. – P. 251–257.
17. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity / V. L. Savchenko, J. A. Mckanna, I. R. Nikonenko, G. G. Skibo // Neuroscience. – 2000. – **96**, № 1. – P. 195–203.
18. Morphologic, flow cytometric, functional, and molecular analyses of S100B positive lymphocytes, unique cytotoxic lymphocytes containing S100B protein / Y. Miki, Y. Gion, Y. Mukae [et al.] // European Journal of Haematology. – 2012. – **90**. – P. 99–110.
19. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis / C. Col, K. Dinler, O. Hasdemir [et al.] // Hepatobiliary Pancreat Dis. Int. – 2010. – **9**, № 1. – P. 78–82.
20. Pancreatic encephalopathy and Wernicke encephalopathy in association with acute pancreatitis: A clinical study / G.-H. Sun, Y.-S. Yang, Q.-S. Liu [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2006. – **12**, № 26. – P. 4224–4227.
21. Ramanathan R. S. Acute necrotizing pancreatitis leading to pancreatic encephalopathy in a patient undergoing long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis / R. S. Ramanathan, T. Ahluwalia // Journal of Academy of Medical Sciences. – 2012. – **2**, Issue 2. – P. 85–87.
22. Ruggieri R. M. Pancreatic encephalopathy: a 7-year follow-up case report and review of the literature / R. M. Ruggieri, I. Lupo, F. Piccoli // Neurol. Sci. – 2002. – **23**. – P. 203–205.
23. S100b is expressed in, and released from, oligodendrocytes: influence of serum and glucose deprivation / J. Steiner, H.-G. Bernstein, B. Bogerts [et al.] // Neuroscience. – 2008. – **154**, № 2. – P. 496–503.
24. S100B protein in tissue development, repair and regeneration / G. Sorci, F. Riuzy, C. Arcuri [et al.] // World J. Biol. Chem. – 2013. – **4**, Issue 1. – 12 p.
25. Sofroniew M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // Acta Neuropathol. – 2010. – **119**, № 1. – P. 7–35.
26. Tandon R. K. Oxidative Stress in Chronic Pancreatitis: Pathophysiological Relevance and Management / R. K. Tandon P. K. Garg // Antioxidants & Redox Signaling. – 2011. – **15**, № 10. – P. 2757–2766.
27. The Danger Signal S100B Integrates Pathogen and Danger-Sensing Pathways to Restrain Inflammation / G. Sorci, G. Giovannini, F. Riuzy [et al.] // PLoS Pathogens. – 2011. – **7**, Issue 3. – e1001315. – 15 p.
28. The effect of glial fibrillary acidic protein expression on neurite outgrowth from retinal explants in a

permissive environment / K. Toops, T. Hagemann, A. Messing, R. Nickells // BMC Research Notes. – 2012. – 5, № 693. – 9 p.

29. Wernicke Encephalopathy Presenting in a Patient with Severe Acute Pancreatitis / A. C. Arana-Guajardo, C. R. Camara-Lemarroy, E. J. Rendon-Ramirez [et al.] // JOP. Journal of the Pancreas. – 2012. – 13, № 1. – P. 104–107.

В. А. Макаrchук¹, Г. А. Ушакова²

ИНСТИТУТ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ НАМН УКРАИНЫ¹, ДНЕПРОПЕТРОВСК
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ О. ГОНЧАРА²

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ S-100B И ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО ПРОТЕИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС ПРИ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Исследовано особенности распределения S-100b и глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в головном мозге и поджелудочной железе крыс в условиях моделирования хронического панкреатита. Методом конкурентного ингибиторного иммуноферментного анализа в структурно и функционально различных отделах головного мозга выявлено повышение уровня S-100b и растворимой формы ГФКБ, перераспределение между растворимой и филаментной фракциями ГФКБ, что может быть одной из причин развития панкреатической энцефалопатии. Методом тестирования животных в “открытом поле” в условиях панкреатической энцефалопатии установлено, что обнаруженные изменения в распределении данных белков сопровождались снижением локомоторной и познавательной активности крыс и увеличением их стрессогенности. При развитии экспериментального хронического панкреатита в поджелудочной железе отмечено увеличение содержания S-100b и снижение растворимой и филаментной фракций ГФКБ, что свидетельствует о деполимеризации промежуточных филаментов глиальных клеток в периферической нервной системе в исследуемом органе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: панкреатическая энцефалопатия, мозжечок, таламус, гиппокамп, поджелудочная железа, S-100b, глиальный фибриллярный кислый протеин.

V. A. Makarchuk¹, H. O. Ushakova²

INSTITUTE OF GASTROENTEROLOGY OF NAMS OF UKRAINE¹, DNIPROPETROVSK
OLES HONCHAR DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY²

DISTRIBUTION OF S-100B AND GLIAL FIRILLARY ACIDIC PROTEIN IN THE RAT BRAIN AND PANCREAS UNDER THE CONDITIONS OF PANCREATIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The aspects of the S-100b and glial fibrillary acidic protein (GFAP) distribution in the brain and pancreas of rats were analyzed under the conditions of experimental chronic pancreatitis. Using competitive inhibition ELISA we discovered the increase S-100b level and the soluble form of GFAP, along with redistribution between the soluble and filament fractions of GFAP in structurally and functionally differ regions of brain, which may be one of the causes of pancreatic encephalopathy. Under development of pancreatic encephalopathy we found that the observed changes in the proteins distribution were accompanied by a decrease of locomotor and cognitive activities and increase of stress level in rats as the animals were tested in the “open field” also. Under the conditions of chronic pancreatitis development we discovered elevation of S-100b and reduction of soluble and filament fractions of GFAP in the rat pancreas, which goes to prove the intermediate filaments depolymerization in glial cells of the peripheral nervous system in the organ.

KEY WORDS: pancreatic encephalopathy, cerebellum, thalamus, hippocampus, pancreas, S-100b, glial fibrillary acidic protein.

Отримано 28.01.14

Адреса для листування: В. А. Макаrchук, Інститут гастроентерології НАМН України, просп. Газети “Правда”, 96, Дніпропетровськ, 49074, Україна, e-mail: viktoriam7@gmail.com.