

О.Г. Родинський
О.І. Селезньова

Дніпровський державний
медичний університет
Дніпро, Україна


Надійшла: 18.09.2023

Прийнята: 15.10.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.120-124>

УДК 612.83:612.662.9:618.173–073.7/-076–085:615.2.1–092.9

НЕЙРОСПЕЦИФІЧНІ БІЛКИ В ОЦІНЦІ СТАНУ ТКАНИНИ СПИННОГО МОЗКУ ЗА УМОВ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

Rodynsky O.G.  , Seleznyova O.I. Neurospecific proteins in the assessment of the condition of the spinal cord tissue under the conditions of the metabolic syndrome.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The results of the conducted research made it possible to reveal the general patterns of changes that occur after the formation of the metabolic syndrome in the nervous tissue of the spinal cord in young and old rats, which is accompanied primarily by a pathological condition, which at the cellular level was proven by changes in the indicators of neurotransmitters. **Objective.** The purpose of the work was to analyze the indicators of spinal cord neurotransmitters — nitrotyrosine, glutathione reductase, iNOS — inducible nitric oxide synthase and S-100 using the immunofluorescence method. **Results.** All indicators of these chemicals showed what changes occur in the spinal cord after the formation of metabolic syndrome. Against the background of the activity of metabolic processes in young rats, we observed an increase in the indicator of nitrotyrosine and inducible nitric oxide synthase, as an indicator of a pathological state, but against the background of intensive activity of metabolic processes, which are more pronounced in young rats, and the indicators of glutathione reductase sharply decreased in comparison with the control group. **Conclusion.** Thus, in our study, the indicators of neurotransmitters of spinal cord cells — nitrotyrosine, glutathione reductase, iNOS — inducible nitric oxide synthase and S-100 were analyzed using the immunofluorescence method. That is, against the background of the activity of metabolic processes in young rats, we observed an increase in the indicator of nitrotyrosine and inducible nitric oxide synthase, as an indicator of a pathological state, but against the background of intensive activity of metabolic processes, which are more pronounced in young rats, and the indicators of glutathione reductase sharply decreased in comparison with the control group, which indicated the processes of hypoxic phenomena, which were the worst in young rats, which we interpreted as the activity of the reaction at the metabolic level, and S-100, a binding protein that participates in the processes of cell growth, was increased in comparison with the control group, which we interpreted as a more pronounced pathological condition in metabolic syndrome at the cellular level.

Key words: metabolic syndrome, spinal cord, neuron, immunofluorescent analysis, neurotransmitters.

Citation:

Rodynsky OG, Seleznyova OI. [Neurospecific proteins in the assessment of the condition of the spinal cord tissue under the conditions of the metabolic syndrome]. *Morphologia*. 2023;17(3):120-4. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.120-124>

 Rodynsky O.G. 0000–0002–8011–6104

 a.rodinsky@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Метаболічний синдром є однією з найбільш актуальних проблем нашого суспільства, який пов'язаний насамперед із введенням неправильного образу життя. Цей синдром — це сукупність порушень обміну речовин, який характеризується комплексом клінічних, метаболічних і гормональних порушень, які призводять до ожиріння, гіпертонії, підвищення рівня холестерину (дисліпідемії). Порушення також викликає збільшення рівня глюкози, що поєднується з підвищенням збільшенням тканини до впливу

інсуліну — інсулінорезистентності й порушенням толерантності до глюкози, що значною мірою збільшує ризик цукрового діабету другого типу, що призводить до зниження працездатності та порушення когнітивних функцій (від латинського «cognoscere» — знання, впізнання, процеси мислення) [1,2,3]. Існує зв'язок між цукровим діабетом і порушенням когнітивних функцій, які знижують здатність хворих на цукровий діабет, як один із захворювань метаболічного синдрому, і збільшують ризик розвитку типових ускладнень. Це призводить до інвалідизації та загрози

життю [4]. «Метаболічний синдром» — термін введено у 80-х роках ХХ століття, був захворюванням тільки людей старшого віку, але тепер відсоток молодих людей збільшився [5,6]. Крім серцево-судинних захворювань і цукрового діабету, метаболічний синдром веде до неалкогольного стеатогепатиту, низки онкологічних захворювань, таких як онкозахворювання молочних залоз та простати. Метаболічний синдром, особливо в сучасному середовищі та в умовах постійного стресу, насамперед впливає на нервову систему та все частіше зустрічається в сучасній медицині, люди частіше звертаються до лікарів із поодинокими симптомами, які складаються в метаболічний синдром.

Тому виникає потреба поглибленого вивчення симптомів метаболічного синдрому та можливих ускладнень, а також адаптивних механізмів нервової системи в таких умовах на клітинному рівні за допомогою нейрофізіологічних методів. Від своєчасної діагностики, зокрема, і навіть за допомогою імунофлюоресцентного аналізу й показників нейромедіаторів та кваліфікованих дій медичного персоналу на догоспітальному етапах, багато в чому залежить зниження відсотка ускладнень та можливої інвалідації у хворих на метаболічний синдром [7,8]. Експериментальні моделі в поєднанні з клінічними та морфологічними дослідженнями дають нам можливість оцінити нейропротекторну дію нервової системи в пацієнтів із метаболічним синдромом. Ці результати можуть становити важливі перспективи для терапії і адаптаційних можливостей нервової системи в пацієнтів з описаним нами синдромом на фоні неврологічної симптоматики [9].

Мета

Встановити динаміку змін показників нейроспецифічних білків в оцінці стану тканини спинного мозку за умов метаболічного синдрому.

Матеріали та методи

У морфологічному дослідженні було залучено 82 білих безпородних статевозрілих щури, але з різною вагою, з огляду на експериментальні групи — від 180 до 200 г. (контрольна група) та від 320 до 530 грам в експериментальних групах. Весь період підготовки до експерименту та під час його проведення щури були розташовані у віварії «ДМУ», при температурі 20–25 С, вологості не менше 50 %, у добре провітрюваному приміщенні та світовому режимі день / ніч, у стандартних пластикових клітках із розмірами, не більш ніж п'ять особин у кожній. Стандартний раціон харчування в контрольній групі — добова потреба дорослої тварини становить у середньому 30–32 г (25 г сметанного корму, 5–7 г овочів (контрольна група) та щурів двох експериментальних груп годували дуже калорійною їжею для формування метаболічного синдрому в

експерименті. Усі щури, які взяли участь в експерименті, мали здоровий вигляд і були більш-менш активними, але по-різному, враховуючи ожиріння та цукровий діабет. Експериментальні тварини були розподілені ще на 2 експериментальні групи (молоді та старі групи щурів) по 30 об'єктів та по 20 об'єктів — у контрольній групі (їх було дві для кожної з експериментальних груп). Тканини для дослідження вилучали у тварин після етаназії через інгаляцію етиловим ефіром, потім проводили декапітацію, брали спинний мозок при температурі 0 — $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Відібрані тканини обробляли рідким азотом. Далі спинний мозок подрібнювали в цьому азоті до порошкоподібного стану та гомогенізували в пропорції 1:9 в охолодженому розчині, який містив (у ммольях): сахарозу — 250, трис-НСІ буфер — 20, ЕДТА — 1 (рН 7,4). Мікросомальну фракцію виділяли методом диференційного центрифугування. 10 % гомогенату центрифугували в рефрижераторній центрифугі (4°C) при 10000 g упродовж 10 хвилин для осадження ядер і мітохондрій. Супернатант піддавали повторному центрифугуванню протягом 20 хвилин при 17000g: зливали та зберігали при -80°C . Визначення концентрації медіаторів у гомогенаті мозку проводили методом тонкошарової хроматографії [10]. Отримані результати опрацьовували статистично з визначенням середнього (M), помилки середнього (m), середньоквадратичного відхилення (σ) для подальшого аналізу за критерієм Стьюдента та визначенням рівня достовірності (p) [11]. Дотримувалися «Загально-етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Зв'язуючий специфічний білок S — 100 присутній у високих концентраціях у гліальних та шванівських клітинах та є маркером оцінки та прогнозу ушкоджень структур центральної нервової системи, який бере участь у процесах диференціації та росту клітин, фосфолірування та транскрипції м'язових волокон та регуляції апоптозу (запрограмованої загибелі клітин). Він складається з двох субодиниць (альфа та бета) та 17-ти тканинно-специфічних мономерів, високий рівень якого міститься в допоміжних клітинах нервової тканини — леммоцитах, нейроглії, і медіаторах спинного мозку щурів — нітротирозин та глутатионредуктаза. Нітротирозин — є продуктом нітрування тирозину, опосередкованих реакційно здатних форм азоту, такими як пероксинітрит — аніон і діоксид азоту. Нітротирозин ідентифікується як індикатор або маркер пошкодження клітин, запалення, а також вироблення NO. Чому? Більшість патологічних процесів супроводжується розвитком оксидативного стресу, який розглядається як надлишкове нако-

пичення активних форм кисню та азоту, які збільшуються в більш патологічному стані.

Результати та їх обговорення

У нашому дослідженні ми спостерігали зміни показників нейромедіаторів у тканині спинного мозку після формування метаболічного синдрому у двох експериментальних групах — різного віку — молодий та старий, порівнюючи з контрольними групами. Але методом ІФА було доказово досліджено кількість специфічних медіаторів як показників реакції спинного мозку на метаболічний синдром. Були досліджені специфічні медіатори центральної нервової системи, а в нашій науковій роботі — спинний мозок та його середні показники, порівняно з контрольною групою. На сьогодні відомо, що більшість патологічних процесів супроводжується розвитком оксидативного стресу, який розглядається як надлишкове накопичення активних форм кисню та азоту, які збільшуються в більш патологічному стані. Тому ми дослідили медіатор **нітротирозин**, як маркер пошкодження клітин та запалювального процесу. Так, у контрольній групі цей показник складав — 1,603 нг/мл; у старих щурів — перша експериментальна група — 6,146 нг/мл; у молодих щурів — друга експериментальна група — 7,308 нг/мл (рис. 1).

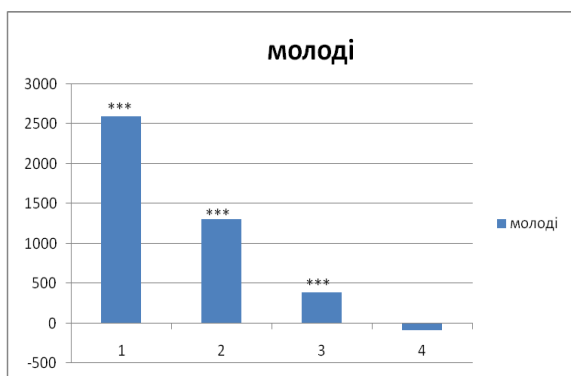


Рис. 1. Процентні зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і білків у спинному мозку щурів молодого віку відносно контрольної групи. Примітки: *** — вірогідність результату порівняно з контролем при рівні достовірності $p < 0,001$; 1 — iNOS; 2 — S 100; 3 — нітротирозин; 4 — глутатіонредуктаза.

Як ми в нашому дослідженні інтерпретували ці показники? Так, за умов метаболічного синдрому, цій показник різко збільшився у двох експериментальних групах, що свідчило про виражений процес ушкодження клітин та запалювального процесу (формування метаболічного синдрому). Однак, у першій експериментальній групі (старі щури) цей показник був менший на одиниці в середньому значенні, ніж у другій експериментальній групі — молоді щури, але різко збільшений відносно контрольних груп, що підтверджуються показниками цього нейромедіатора в патологічному стані з метаболічним синдромом у молодих та старих щурів, але, що

зрозуміло, не приходять у норму (рис. 2).

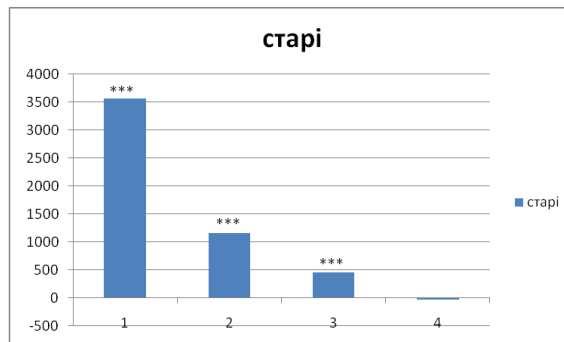


Рис. 2. Процентні зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і білків у спинному мозку старих щурів відносно контрольної групи. Примітки: *** — вірогідність результату порівняно з контролем при рівні достовірності $p < 0,001$; 1 — iNOS; 2 — S 100; 3 — нітротирозин; 4 — глутатіонредуктаза.

Другий нейромедіатор, який ми дослідили — це глутатіонредуктаза (GR), що є найбільш важливим клітинним антиоксидантом та відіграє важливу роль у захисті клітини від оксидативного стресу спричиненого активними формами кисню. Встановлено, що на початковій стадії гіпоксії в тканинах щурів знижується вміст глутатіону та підвищується активність глутатіонредуктази, а в аганальній стадії вміст глутатіону підвищується, а активність глутатіонредуктази падає. Усі ці процеси доказово були підтвержені в нашому дослідженні показниками глутатіонредуктази — у контрольній групі — 7,525 нг/мл; у першій експериментальній групі (старі щури) — 6,402 нг/мл; а в другій експериментальній групі (молоді щури) — 1,948 нг/мл.

Тобто, у другій експериментальній групі — молоді щури, показники глутатіонредуктази різко падали, що свідчило про підвищення глутатіону, що відбувається в аганальній стадії гіпоксичних явищ, але в першій експериментальній групі (старі щури) показник глутатіонредуктази навпаки різко підвищився, що характерно для початкової стадії гіпоксії. Отже, ми можемо зробити висновок, що в молодих щурів процеси гіпоксичних явищ були найгіршими, що нами інтерпретувалось як активність реакції на метаболічному рівні, а в старих щурів, логічно, активність метаболічних процесів на фоні більш вираженого метаболічного синдрому був різко знижений, тому ми і спостерігали вищезазначені результати (рис. 3). У роботі було досліджено iNOS — індукційну синтазу оксиду азоту, яка теж є показником ступеню патологічного стану в нейронах спинного мозку після формування метаболічного синдрому.

У контрольній групі цей показник був — 0,278 нг/мл; у першій експериментальній групі (старі щури) — 7,243 нг/мл; у другій експериментальній групі (молоді щури) — 9,902 нг/мл. У більш патологічному стані оксид азоту (iNOS)

збільшується, що й було підтверджено в нашому дослідженні, особливо, у другій експериментальній групі — молоді щури, у якої цей показник був найбільш виражений, та зменшення цього показника в першій експериментальній групі — старі щури, порівнюючи з між двома експериментальними групами. Проте в обох групах ці показники були в 7 та 9 разів більш, ніж у контрольних групах.

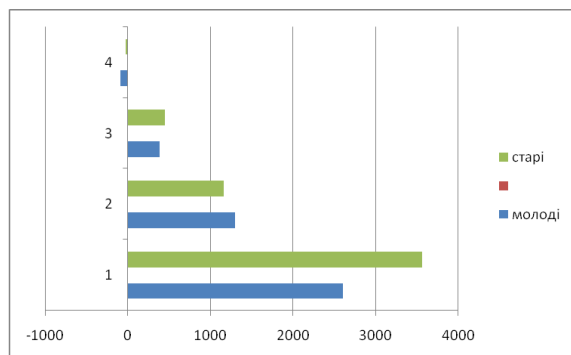


Рис. 3. Процентні зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і білків у спинному мозку молодих і старих щурів відносно контрольних груп. 1 — iNOS; 2 — S-100; 3 — нітротирозин; 4 — глутатіонредуктаза.

Наступний медіатор, який ми дослідили, це S-100, зв'язуючий білок, який бере участь у процесах диференціації та росту клітин, м'язових волокон та регуляції запрограмованої гибелі клітин. Тому в результаті нашого дослідження ми спостерігали: у контрольній групі показник S-100 був — 0,257 нг/мл; у першій експериментальній групі — старі щури, він підвищувався до 3,351 нг/мл; а в другій експериментальній групі цей показник зменшувався, порівняно з першою експериментальною групою до 2,990 нг/мл; та був підвищений в обох експериментальних групах, як порівняти з контрольними групами. Високий рівень якого свідчив про збільшення процесів росту клітин, що під час метаболічного синдрому свідчить про більш виражений патологічний стан на клітинному рівні.

Підсумок

Отже, у нашому дослідженні за допомогою імунофлюоресцентного методу було проаналізовано показники нейромедіаторів клітин спинного мозку — нітротирозин, глутатіонредуктаза, iNOS — індукбельна синтаза оксиду азота і S-100. Усі результати цих хімічних речовин доказово підтвердили ті процеси, які ми простежили після проведення експерименту на макроскопічному та мікроскопічному рівні, що відбуваються в спинному мозку після формування метаболічного синдрому. Тобто, на фоні активності метаболічних процесів у молодих щурів ми спостерігали збільшення показника нітротирозину та індукбельної синтази оксиду азота, як ознака патологічного стану. Проте на фоні інтенсивної активності процесів метаболізму, які більш виражені в молодих щурів, показники глутатіонредуктази різко зменшилися, порівнюючи з контрольною групою, що свідчило про процеси гіпоксичних явищ, які були найгіршими в молодих щурів, а нами інтерпретувалися як активність реакції на метаболічному рівні. Показник S-100, зв'язуючий білок, який бере участь у процесах росту клітин, був збільшений порівняно з контрольною групою, що пояснювалося нами як більш виражений патологічний стан за умов метаболічного синдрому на клітинному рівні.

Перспективи подальших досліджень.

Планується дослідити корелятивні зв'язки різних медіаторів впливу. Дослідити реакцію периферійної нервової системи з метаболічним синдромом та зіставити зі змінами нейромедіаторів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Механізми компенсаторно-адаптивних реакцій центральної і периферичної нервової системи в нормальних і змінених умовах» (номер державної реєстрації 0119U100957).

Літературні джерела References

1. Cortez M, Singleton JR, Smith AG. Glucose intolerance, metabolic syndrome, and neuropathy. *Handb Clin Neurol.* 2014;126:109–122. doi: 10.1016/B978-0-444-53480-4.00009-6. PMID: 25410218.
2. Kannan MA, Sarva S, Kandadai RM, Paturi VR, Jabeen SA, Borgohain R. Prevalence of neuropathy in patients with impaired glucose tolerance using various electrophysiological tests. *Neurol India.* 2014;62(6):656–661. doi: 10.4103/0028-3886.149393. PMID: 25591680.
3. Kurisu S, Sasaki H, Kishimoto S, Hirayasu

4. K, Ogawa K, Matsuno S, Furuta H, Arita M, Naka K, Nanjo K, Akamizu T. Clinical polyneuropathy does not increase with prediabetes or metabolic syndrome in the Japanese general population. *J Diabetes Investig.* 2019;10(6):1565–1575. doi: 10.1111/jdi.13058. Epub 2019 May 14. PMID: 30980464; PMCID: PMC6825938.
4. Kryvenko VI, Fedorova OP, Pakhomova SP, Kolesnyk MY, Nepryadkina IV, Kachan IS, authors. Osnovni syndromy, pov'yazani z metabolichnymu porushennyamy, u praktytsi likarya zahal'noyi praktyky [Main syndromes associated with metabol-

ic disorders in the practice of a general practitioner]. Zaporizhzhya: ZDMU; 2016. 98 p. Ukrainian.

5. Callaghan BC, Xia R, Banerjee M, de Rekeniere N, Harris TB, Newman AB, Satterfield S, Schwartz AV, Vinik AI, Feldman EL, Strotmeyer ES. Health ABC Study. Metabolic Syndrome Components Are Associated With Symptomatic Polyneuropathy Independent of Glycemic Status. *Diabetes Care*. 2016;39(5):801–7. doi: 10.2337/dc16-0081. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26965720; PMCID: PMC4839175.

6. Zhetpisbayev BB, Kerimbayev TT, Aleynikov VG, Kozhakhmetova AO, Umbetaliyev SG, Useyeva MS. [Clinical and morphological assessment of regeneration of spinal cord injury in an experiment in rats]. *Neyrokhirurgiya i nevrologiya Kazakhstana*. 2018;2(51):37-42. Russian.

7. Rodyns'kyu OH, Basysta KI, Huz' IV. [Neurochemical and behavioral processes in heron-tohenesis for experimental conditions]. *Medychni perspektyvy*. 2018;23(2):4-13. Ukrainian.

8. Fedets' OM. [Glutathione transferase, glutathione reductase and glutathione peroxidase of cae-

cum and liver of horse and sheep]. *Naukovyy visnyk L'vivs'koho natsional'noho universytetu veterynarnoyi medytsyny ta biotekhnolohiy imeni SZ Gzhyts'koho*. 2010;12(2-2(44)):349-352. Ukrainian.

9. Chelyshev YUA, Shaymardanova HF, Mashutov RF, Mashutova HA, Ryzvanov AA, Rubashkyna YAO. [Cellular technologies for stimulation of post-traumatic spinal cord regeneration]. In: [RAMS International Association of Morphologists. VI Congress anatomists, histologists and embryologists of Russia; 2009 Sep 23-25; Saratov, Russia]. *Morphology*; 2009. p. 150-151. Russian.

10. Chekman IS, Bjelenichev IF, Nagorna OO, authors. *Doklinichne vyvchennja specyficnoi' aktyvnosti potencijnyh likars'kyh zasobiv pervynnoi' ta vtorynnoi' nejroprotekcii'* [Preclinical study of the specific activity of potential drugs for primary and secondary neuroprotection]. Kyiv: Osvita; 2016. 93 p. Ukrainian.

11. Lakin GV, author. *Biometriya* [Biometrics]. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. 352 p. Russian.

Родинський О. Г., Селезньова О.І. Нейроспецифічні білки в оцінці стану тканини спинного мозку за умов метаболічного синдрому.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Результати проведених досліджень дали змогу виявити загальні закономірності змін, які відбуваються після формування метаболічного синдрому в нервовій тканині спинного мозку в молодих та старих щурів, що супроводжується насамперед патологічним станом, за умов якого на клітинному рівні були доказово підтверджені змінами в показниках нейромедіаторів. **Метою роботи** було проаналізувати за допомогою імунофлюоресцентного методу показники нейромедіаторів спинного мозку — нітротирозин, глутатіонредуктаза, iNOS — індукційна синтаза оксиду азота і S-100. **Результати.** Усі показники цих хімічних речовин показали, які зміни відбуваються в спинному мозку після формування метаболічного синдрому. На фоні активності метаболічних процесів у молодих щурів ми спостерігали збільшення показників нітротирозину та індукційної синтази оксиду азота, як ознака патологічного стану. Однак, за умов інтенсивної активності процесів метаболізму, які більш виражені в молодих щурів, показники глутатіонредуктази різко зменшувалися, порівнюючи з контрольною групою. **Висновки.** Отже, у нашому дослідженні за допомогою імунофлюоресцентного методу було проаналізовано показники нейромедіаторів клітин спинного мозку — нітротирозин, глутатіонредуктаза, iNOS — індукційна синтаза оксиду азота і S-100. Тобто, під час активності метаболічних процесів у молодих щурів ми спостерігали збільшення показників нітротирозину та індукційної синтази оксиду азота, як ознака патологічного стану. У той час на фоні інтенсивної активності процесів метаболізму, які більш виражені в молодих щурів, показники глутатіонредуктази різко зменшувалися, порівнюючи з контрольною групою. Цей процес є свідченням гіпоксичних явищ, які були найгіршими в молодих щурів, що нами інтерпретувалось як активність реакції на метаболічному рівні, а S-100, зв'язуючий білок, який бере участь у процесах росту клітин, був збільшений, порівнюючи з контрольною групою, що було пояснено нами як більш виражений патологічний стан за умов метаболічного синдрому на клітинному рівні.

Ключові слова: метаболічний синдром, спинний мозок, нейрон, імунофлюоресцентний аналіз, нейромедіатори.