

DOI 10.29254/2077-4214-2021-3-161-356-359

УДК 616.153.455-008.61:616.831]-076-092.9-053

*Басиста К. І., Родинський О. Г., Демченко О. М., Гузь Л. В.***НЕЙРОХІМІЧНІ ЗМІНИ В КОРІ І ГІПОКАМПІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ В ПОВЕДІНКОВИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ****Дніпровський державний медичний університет (м. Дніпро, Україна)****katerinkaabas@gmail.com**

Однією з пріоритетних проблем сьогодення вважається цукровий діабет. Він характеризується різноманітними ускладненнями ЦНС. Гіперглікемія сприяє запуску нейродегенеративних процесів, які в свою чергу, призводять до когнітивного дефіциту і енцефалопатії. Метою роботи є дослідження впливу нейромедіаторних амінокислот в корі і гіпокампі щурів в геронтогенезі в умовах експериментальної гіперглікемії за умов змін навколишнього середовища та стресі. Дослідження проводилось на щурах лінії Вістар. Експериментальна гіперглікемія була змодельована шляхом інтраперитонеального введення розчину алоксану моногідрату (120 мг/кг, "Sigma"). На 10-й день відібрали тих тварин, які мали показник глюкози в крові вище ніж 28 ммоль/л. Спочатку вивчали поведінкові та емоційні зміни в поведінкових тестах. Після проведених тестів відібрали щурів, які показали найбільш значимі результати для визначення вмісту ГАМК, гліцину, серотоніну, глутамату в корі великих півкуль і гіпокампі. Для взяття тканин мозку тваринам проводили евтаназію, декапітували, виділяли відповідні тканини, обробляли рідким азотом, подрібнювали та досліджували вміст нейромедіаторних амінокислот. В поведінкових тестах у щурів середнього віку та старих тварин за умов гіперглікемії виявило суттєві порушення в організації когнітивної функції впродовж геронтогенезу. У щурів середнього віку на цьому фоні спостерігалось суттєве підвищення вмісту глутамату в корі і гіпокампі. В старих щурів на фоні менш вираженого поведінкового і когнітивного дефіциту спостерігалось зростання рівня глутамату в неокортексі і гіпокампі. Вміст гліцину, ГАМК, серотоніну в неокортексі старих щурів, як і у щурів середнього віку залишався на рівні контрольних показників. Таким чином, суттєве порушення поведінки в обох вікових групах забезпечується розвитком ексайтотоксичного ефекту глутамату в неокортексі і гіпокампі. Когнітивний дефіцит, переважно в тварин середнього віку, забезпечується надмірним накопиченням в гіпокампі серотоніну.

**Ключові слова:** експериментальна гіперглікемія, цукровий діабет, поведінкова активність, серотонін, ГАМК.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Роботу виконано в межах дисертаційної роботи відповідно до плану Дніпровського державного медичного університету. Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри фізіології «Механізми компенсаторно-адаптивних реакцій центральної і периферичної нервової системи в нормальних і змінених умовах», № державної реєстрації 0119U100957.

**Вступ.** Однією із пріоритетних медичних проблем в усьому світі вважається цукровий діабет (ЦД). Він характеризується швидким зростанням за кількості хворілих. Найбільш частим ускладненням у людей з ЦД є ураження ЦНС [1].

ЦД призводить до різноманітних змін структур в головному мозку. Також гіперглікемія сприяє нейротоксичності шляхом активації оксидативного стресу та збільшенню концентрації внутрішньоклітинного глутамату [2]. Це, в першу чергу, запускає нейродегенеративні процеси, що призводять до когнітивного дефіциту і енцефалопатії [3].

В регуляції функцій ЦНС, емоційній поведінці та рухової активності важливу роль відіграє серотонінергічна система. Тому порушення в цій системі призводить в тому числі до різноманітних депресивних станів [4].

**Мета роботи:** дослідити вплив нейромедіаторних амінокислот в корі і гіпокампі щурів в геронтогенезі в умовах експериментальної гіперглікемії за умов змін навколишнього середовища та стресі.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження було проведено на 90 щурах лінії Вістар. Щури були представлені двома віковими групами (за класифікацією І.П. Западнюка, 1983 р.) – 7-8 місяців (далі «щури середнього віку») з вагою 150-160 г, 20-22 місяці (далі «старі щури») з вагою 270-300 г. Кожна вікова група тварин була розділена на інтактних («контроль»), дослідних (з експериментальною гіперглікемією або змодельованим цукровим діабетом – «ЦД»).

Експериментальну гіперглікемію моделювали шляхом одноразового інтраперитонеального введення розчину алоксану моногідрату (120 мг/кг, "Sigma"). Вже на 10-й день тварини мали високу гіперглікемію з показником глюкози в периферичній крові вище ніж 28 ммоль/л в перші 48 годин та подальшою позначкою 15-20 ммоль/л (визначали за допомогою портативного глюкометра "Bionime").

Спочатку були проведені тести для аналізу емоційної та орієнтовно-дослідницької активності (метод «Відкрите поле») [5], вивчення лабільної і стабільної фаз пам'яті (методика умовної реакції пасивного уникання) [6], оцінки рівня тривожності (тест «Піднятий хрестоподібний лабіринт») [7].

Щурів, які показали найбільш значимий результат, відбирали для визначення вмісту ГАМК, гліцину, серотоніну, глутамату в корі великих півкуль та гіпокампі мозку щурів.

Для забору тканин для дослідження у тварин проводили евтаназію шляхом інгаляції етиловим ефіром [8, 9], далі робили декапітацію, брали мозок при температурі 0 – ±2°C, кору великих півкуль виділяли. Забір тканин здійснювали відповідно до схеми мозку щура

[10]. Відібрані тканини обробляли рідким азотом. Далі кору (170-200 мг у щура середнього віку та 200-250 мг у старого щура) та гіпокамп (70x2 мг у щурів обох вікових груп) окремо подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану та гомогенізували в пропорції 1:9 в охолоджену розчину, який містив (у ммольях): сахарозу – 250, трис-НСІ-буфер – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4). Мікросомальну фракцію виділяли методом диференційного центрифугування. 10% гомогенату кори й гіпокампу центрифугували в рефрижераторній центрифугі (4°C) при 10000 g протягом 10 хвилин для осадження ядер і мітохондрій. Супернатант піддавали повторному центрифугуванню протягом 20 хвилин при 17000g: зливали та зберігали при -80°C.

Визначення концентрації ГАМК, гліцину та глутамату в гомогенаті мозку проводили методом тонкошарової хроматографії [11]. Метод визначення вмісту серотоніну базується на вимірі флюоресценції серотоніну в кислому середовищі [11].

Отримані результати опрацьовували статистично з визначенням середнього (M), помилки середнього (m), середньоквадратичного відхилення (σ) для подальшого аналізу за критерієм Стьюдента з визначенням рівня достовірності (p) [12]. Дотримувалися «Загально-етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовувану для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Дослідження поведінкової активності та формування енграм довготривалої пам'яті при виробленні захисної, больової реакції у щурів середнього віку та старих за умов гіперглікемії виявило суттєві порушення в організації когнітивної функції в геронтогенезі.

У щурів середнього віку на фоні більш суттєвого поведінкового і когнітивного дефіциту в порівнянні із старими тваринами за умов експериментальної гіперглікемії спостерігалось надто суттєве підвищення вмісту глутамату в корі і гіпокампі. Зокрема, рівень даної амінокислоти у контрольних тварин складав  $0,089 \pm 0,013$  мкмоль/г тканини кори головного мозку, а в групі експериментальних тварин дорівнював  $0,136 \pm 0,006$ , тобто на 52,8% ( $p < 0,05$ ). Вміст гліцину, ГАМК і серотоніну в групі експериментальних тварин коливався в межах контрольних значень (рис. 1).

В гіпокампі щурів середнього віку вміст нейромедіаторних амінокислот збуджувального характеру також збільшувався. В групі інтактних щурів вміст глутамату складав  $0,067 \pm 0,004$  мкмоль/г тканини, а в групі «експериментальна гіперглікемія» даний показник дорівнював  $0,104 \pm 0,0097$  мкмоль/г тканини, тобто на 55% більше. На відміну від неокортексу, в гіпокампі окрім глутамату, надмірно зростав рівень серотоніну – майже у 2 рази. Зокрема, в групі контрольних щурів

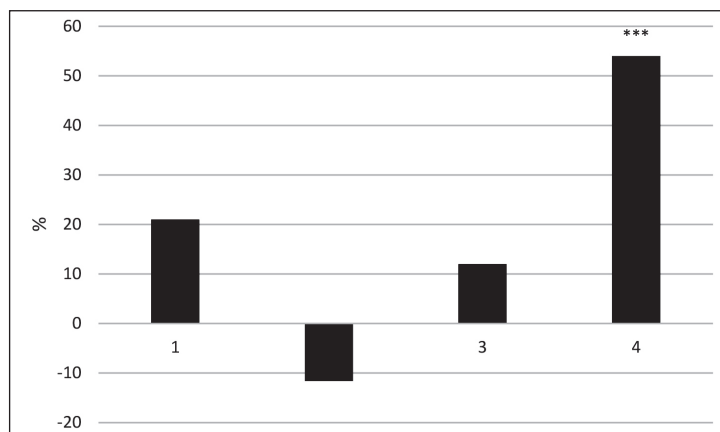


Рисунок 1 – Зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і серотоніну в корі головного мозку щурів середнього віку.

Примітки: \*\*\* – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності  $p < 0,001$ ; 1 – ГАМК; 2 – Серотонін; 3 – Гліцин; 4 – Глутамат.

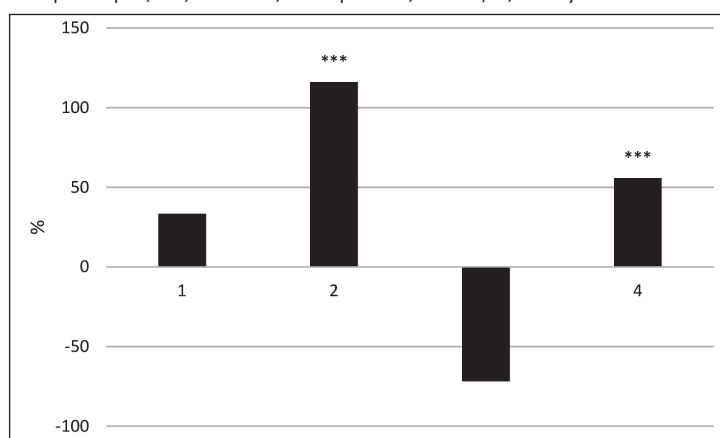


Рисунок 2 – Зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і серотоніну в гіпокампі щурів середнього віку.

Примітки: \*\*\* – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності  $p < 0,001$ ; 1 – ГАМК; 2 – Серотонін; 3 – Гліцин; 4 – Глутамат.

вміст даного біогенного аміну дорівнював  $0,86 \pm 0,044$  мкмоль/г тканини, тоді як в групі експериментальних тварин він був на рівні  $1,86 \pm 0,207$  мкмоль/г тканини, що на 116,3% більше (рис. 2).

У старих щурів на фоні менш вираженого поведінкового і когнітивного дефіциту спостерігалось зростання рівня глутамату в неокортексі і гіпокампі, що

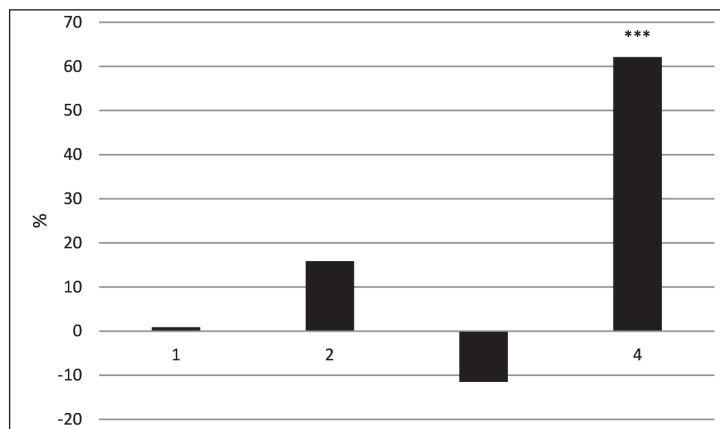


Рисунок 3 – Зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і серотоніну в корі головного мозку старих щурів.

Примітки: \*\*\* – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності  $p < 0,001$ ; 1 – ГАМК; 2 – Серотонін; 3 – Гліцин; 4 – Глутамат.

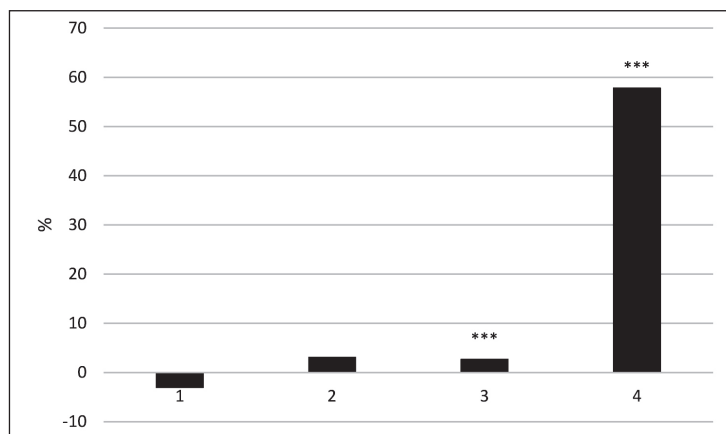


Рисунок 4 – Зміни вмісту нейромедіаторних амінокислот і серотоніну в гіпокампі старих щурів.

Примітки: \*\*\* – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності  $p < 0,001$ ; 1 – ГАМК; 2 – Серотонін; 3 – Гліцин; 4 – Глутамат.

було співставним з підвищенням вмісту даної нейромедіаторної амінокислоти в корі і гіпокампі щурів середнього віку. Зокрема, в корі великих півкуль старих тварин кількість глутамату в групі контролю складала  $0,078 \pm 0,003$  мкмоль/г тканини, тоді як в групі експериментальних тварин вона дорівнювала  $0,126 \pm 0,005$  мкмоль/г, що було на 62% більше.

Вміст гліцину, ГАМК, серотоніну в неокортексі старих щурів, як і у щурів середнього віку залишався на рівні контрольних значень (рис. 3).

В гіпокампі старих тварин, як і в середніх за віком груп щурів, відзначалось досить значене накопичення даної збуджуючої амінокислоти. Зокрема, в групі «експериментальної гіперглікемії» вміст глутамату

складав  $0,104 \pm 0,006$  мкмоль/г, що було більше на 58% порівняно до контролю, де цей показник дорівнював  $0,164 \pm 0,0099$  мкмоль/г тканини (рис. 4).

На відміну від тварин середнього віку, надмірного накопичення серотоніну не спостерігалось, тобто кількість серотоніну, гліцину і ГАМК в гіпокампі старих щурів експериментальної групи коливалась в межах контрольних значень.

**Висновки.** Таким чином, формування анксиогенного ефекту та депресивноподібного стану впродовж геронтогенезу, особливо в щурів середнього віку, та як наслідок, порушення організації енграм довготривалої пам'яті в процесі вироблення захисної набутої поведінки супроводжувалося надмірним зростанням глутамату в корі великих півкуль і гіпокампі. Суттєве порушення мнестичної активності, а також емоційного, рухливо-дослідного компоненту поведінки, ймовірно забезпечується розвитком ексайтотоксичного ефекту глутамату в неокортексі і гіпокампі щурів обох вікових груп. У тварин середнього віку більш виражений поведінковий і когнітивний дефіцит, можливо, пов'язаний з надмірним накопиченням в гіпокампі серотоніну, який за даними багатьох досліджень приймає участь у формуванні депресій і психозів.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальше вивчення нейрохімічного механізму формування психо-емоційної сфери та когнітивної активності може бути основою розробки шляхів корекції психосимптомокомплексу ЦД з урахуванням віку пацієнтів.

### Література

1. Kmet' OG, Zjablicev SV Filipec ND. Osobennosti sistem antioksidantnoj zashhity i oksida azota golovnogogo mozga krysa s jeksperimental'nym saharnym diabetom 2-go tipa posle primenenija karbacetama. Mezhdunarodnyj jendokrinologicheskij zhurnal. 2019;15(5):376-380. [in Russian].
2. Smirnov AV, Shmidt MV, Pan'shin NG, Kuznecova VA. Morfologicheskie izmenenija gippokampa pri jeksperimental'nom modelirovanii diabeticheskoj jencefalopatii. Volgogradskij nauchno-medicheskij zhurnal. 2016;2(50):37-39. [in Russian].
3. Nasehi M, Jamshidi-Mehr M, Khakpai F, Zarrindast MR. Possible involvement of CA1 5-HT1B/1D and 5-HT2A/2B/2C receptors in harmaline-induced amnesia. Pharmacol. Bio-chem. 2014;125:70-77.
4. Serednyuc'ka KR, Konopel'njuk VV, Savchuk OM. Osoblyvosti biosyntezy serotoninu v mozku shhuriv iz streptozotocynindukovanim cukrovym diabetom 2-go typu. Medychna ta klinichna himija. 2013;15(1):135-139. [in Ukrainian].
5. Lutsenko RV. Using of "openfield" test for finding of stress-protector substances among derivatives of 2-oxyindolin-3-glyoxylovic acid. Zdobutki klinichnoyi i eksperimentalnoyi meditsini. 2008;2:70-72.
6. Shvyrkova NA, Zarayskaya IYu, Lukashev AO. Obuchenie zhivotnykh s gipoinsulinemiyey: sistemnyy analiz. Vestnik RAMN. 1994;10:35-40. [in Russian].
7. Tsemenko KV, Kireev IV, Koshoviy OM. Otsinka emotsiyno-povedinkovoyi reaktivnosti u shhuriv pislya vvedennya kompleksu brusnitsi zvychnoyi v kombinatsiyi iz argininom. Ukrayinskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal. 2019;1:50-54. DOI: /10.24959/ubphj.19.210. [in Ukrainian].
8. VOZ. International guidelines for biomedical research using animals. Hronika VOZ. 1985;39(3):3-9.
9. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p.
10. Fifkova E, Marsa CJ. Stereotaxic atlases for the cat, rabbit and rat. Electrophysiological methods in biological research. Praga: Praga Acad.; 1967. 824 p.
11. Chekman IS, Bjelnichev IF, Nagorna OO. Doklinichne vyvchennja specyfichnoi' aktyvnosti potencijnykh likars'kyh zasobiv pervynnoi' ta vtorynnoi' nejroprotekcii'. Kyi'v: Juston; 2016. 93 s. [in Ukrainian].
12. Lakin GV. Biometriya. M.: Vysshaya shkola; 1990. 352 s. [in Ukrainian].

### НЕЙРОХІМІЧНІ ЗМІНИ В КОРІ І ГІПОКАМПІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ В ПОВЕДІНКОВИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Басиста К. І., Родинський О. Г., Гузь Л. В., Демченко О. М.

**Резюме.** У роботі представлені результати вивчення вмісту нейромедіаторних амінокислот в головному мозку та гіпокампі щурів різного віку (щурів середнього віку та старих щурів) з експериментальною гіперглікемією. Тварини утримувалися в стандартних умовах віварію в кількості 90 щурів. Кожна вікова група була розділена на дві підгрупи: інтактна та дослідна з модельованою експериментальною гіперглікемією. Експериментальна гіперглікемія була змодельована шляхом інтраперитонеального введення розчину алоксану

моногідрату (120 мг/кг, "Sigma"). На протязі 10 днів визначали глюкозу крові за допомогою портативного глюкометра "Bionime". На 10-й день відібрали тих тварин, які мали показник глюкози в крові вище ніж 28 ммоль/л. Спочатку вивчали поведінкові та емоційні зміни в поведінкових тестах, таких як «Відкрите поле», «УРПУ», «Піднятий хрестоподібний лабіринт». Після проведених тестів відібрали щурів, які показали найбільш значимі результати для визначення вмісту ГАМК, гліцину, серотоніну, глутамату в корі великих півкуль і гіпокампі. Для взяття тканин мозку тваринам проводили евтаназію, декапітували, виділяли відповідні тканини, обробляли рідким азотом, подрібнювали та досліджували вміст нейромедіаторних амінокислот методом тонкошарової хроматографії. В поведінкових тестах у щурів середнього віку та старих тварин за умов гіперглікемії виявило суттєві порушення в організації когнітивної функції впродовж геронтогенезу. У щурів середнього віку на цьому фоні спостерігалось суттєве підвищення вмісту глутамату в корі і гіпокампі. В старих щурів на фоні менш вираженого поведінкового і когнітивного дефіциту спостерігалось зростання рівня глутамату в неокортексі і гіпокампі. Вміст гліцину, ГАМК, серотоніну в неокортексі старих щурів, як і у щурів середнього віку залишався на рівні контрольних показників. Таким чином, суттєве порушення поведінки в обох вікових групах забезпечується розвитком ексайтотоксичного ефекту глутамату в неокортексі і гіпокампі. Когнітивний дефіцит, переважно в тварин середнього віку, забезпечується надмірним накопиченням в гіпокампі серотоніну.

**Ключові слова:** експериментальна гіперглікемія, цукровий діабет, алоксаніндукований діабет, поведінкова активність, пам'ять, серотонін, ГАМК, глутамат, кора головного мозку, гіпокамп, нейромедіаторні амінокислоти.

### NEUROCHEMICAL CHANGES IN THE CRUST AND HIPOCAMP OF RATS OF DIFFERENT AGE UNDER EXPERIMENTAL HYPERGLYCAEMIA IN BEHAVIORAL STUDIES

Basysta K. I., Rodinskiy A. G., Demchenko O. M., Guz L. V.

**Abstract.** The paper presents the results of studying the content of neurotransmitter amino acids in the brain and hippocampus of rats of different ages (middle-aged rats and old rats) with experimental hyperglycemia. The animals were kept in standard vivarium conditions in the amount of 90 individuals. Each age group was divided into two subgroups: intact and experimental with simulated experimental hyperglycemia. Experimental hyperglycemia was modeled by intraperitoneal administration of aloxane monohydrate solution (120 mg / kg, "Sigma"). Blood glucose was determined using a Bionime portable glucometer for 10 days. On day 10, those animals that had a blood glucose level higher than 28 mmol/l were selected. Behavioral and emotional changes in behavioral tests, such as «Open Field», «CRPA», «Raised cruciform labyrinth», were first studied. After the tests, rats were selected that showed the most significant results for determining the content of GABA, glycine, serotonin, glutamate in the cortex of the large hemispheres and the hippocampus. To collect brain tissue, the animals were euthanized, decapitated, tissue isolated, treated with liquid nitrogen, crushed and examined for the content of neurotransmitter amino acids by thin layer chromatography. Behavioral tests in middle-aged and elderly rats with hyperglycemia revealed significant disturbances in the organization of cognitive function during gerontogenesis. In middle-aged rats against this background, there was a significant increase in glutamate in the cortex and hippocampus. In older rats, an increase in glutamate levels in the neocortex and hippocampus was observed against a background of less pronounced behavioral and cognitive deficits. The content of glycine, GABA, serotonin in the neocortex of old rats, as in middle-aged rats remained at the level of control values. Thus, a significant behavioral disorder in both age groups is provided by the development of the exotoxic effect of glutamate in the neocortex and hippocampus. Cognitive deficiency, mainly in middle-aged animals, with excessive accumulation of serotonin in the hippocampus.

**Key words:** experimental hyperglycemia, diabetes mellitus, aloxan-induced diabetes, behavioral activity, memory, serotonin, GABA, glutamate, cerebral cortex, hippocampus, neurotransmitter amino acids.

#### ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Basysta K. I.: 0000-0002-2343-8975 <sup>ABCD</sup>

Rodynskiy O. G.: 0000-0002-8011-6104 <sup>EF</sup>

Demchenko O. M.: 0000-0002-9065-0538 <sup>E</sup>

Guz L. V.: 0000-0003-1597-4118 <sup>A</sup>

#### Конфлікт інтересів:

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Басиста Катерина Ігорівна

Дніпровський державний медичний університет

Адреса: Україна, 49000, м. Дніпро, вул. Володимира Вернадського 9

Тел.: 097-362-77-28

E-mail: katerinkaabas@gmail.com

**A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

**Рецензент – проф. Міщенко І. В.**

Стаття надійшла 16.01.2021 року

Стаття прийнята до друку 13.07.2021 року