

УДК 669.5:61

ПРО РОЛЬ ЦИНКУ В НЕЙРОМЕДІАТОРНІЙ ФУНКЦІЇ ГІПОКАМПУ

Кучковський О. М.

Різними методами цинк продемонстрований у нейронах гіпокампу [1 - 4]. Було висунуте припущення, що цинк акумулюється в синаптичних пухирцях у вигляді комплексу із збуджуючим нейромедіатором глютаміновою кислотою, подібно до цинк-інсуліновому комплексу в секреторних гранулах панкреатичних клітин [1 - 5]. Для вирішення цього питання були проведені дослідження з використанням в якості конвульсанта 8-(бензолсульфоніламіно)-хіноліну (8-БСХ), а для отримання цитохімічної реакції на цинк в гіпокампі - 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ). Обидва реагенти дають високоселективну реакцію з цинком.

Дослідження проводились на 136 мишах. Серед них були інтактні тварини та миші, що отримали внутрішньочеревинно ін'єкції 8-БСХ, діетилдитіокарбамату натрію (ДЕДТКН), а також сіркокислого магнію та хлористого кальцію.

8-БСХ вводили у вигляді 0,5% розчину на 0,1 н розчині їдкого натру в дозах 200 і 400 мг/кг, ДЕДТКН призначали у вигляді 10% розчину в кількості 1000 мг/кг. Сіркокислий магній та хлористий кальцій - в дозі 200 мг/кг у вигляді 10% розчинів, солі магнію та кальцію вводились за 2 години до ін'єкції хіноліну.

У тварин при житті відмічалися інтенсивність і тривалість судорог після введення 8-БСХ. Їх забивали через 30 хв і 2 год після ін'єкції хіноліну та ДЕДТКН.

Заморожені зрізи головного мозку товщиною 30 - 60 мкм використовували для дослідження інтравітальної реакції хінолінів з цинком і проведення гістохімічної реакції 8-ТСХ з цим металом. У випадку дослідження інтравітальної реакції використовуються нативні зрізи, тобто не оброблені 8-ТСХ. Для цього зрізи зразу з заморожуючого мікротому переносяться на предметні стекла, змочуються дистильованою водою, замикаються в гліцерин та мікроскопуються у світлі люмінесценції. Для збудження останньої використовується світлофільтр ФС-1, а як захисного (окулярного) використовується світлофільтр з скла ЖС-18. На препаратах інтравітальна реакція виявляється по жовто-зеленому світінню.

Для отримання гістохімічної реакції з цинком зрізи оброблюються протягом 1 хв 0,01% ацетоновим розчином 8-ТСХ. При цьому відбувається одночасна фіксація і забарвлення зрізу. Промиті в дистильованій воді (протягом 5 хвилин) зрізи заключаються в гліцерин та досліджуються у світлі люмінесценції, як і інтравітальна реакція. Присутність цинку в гіпокампі встановлюється за жовто-зеленою люмінесценцією нейронів гіпокампі.

Інтенсивність реакції оцінювалась за бальною системою: за один бал приймається слабка, за два - помірна, три - виражена за інтенсивністю реакція.

Уведення мишам 8-БСХ викликало розвиток у них тоніко-клонічних судорог, інтенсивність і тривалість яких залежала від дози хеланту (табл. 1). Якщо при дозі 200 мг/кг судороги були помірними, а їх тривалість складала $3,5 \pm 0,46$ хв, то при введенні 400 мг/кг 8-БСХ (контроль) виникали інтенсивні судороги тривалістю $16,2 \pm 2,37$ хв.

На нативних зрізах головного мозку мишей, що були забиті через 30 хв після введення 8-БСХ, виявлялась інтравітальна реакція у вигляді жовто-зеленої люмінесценції в області зубчатої фасції, полів СА2-СА4 амонова рога. Як видно з таблиці 1 при дозі 8-БСХ 200 мг/кг реакція була слабкою, а його введення в кількості 400 мг/кг - помірна за інтенсивністю. Попереднє введення солей магнію та кальцію суттєво не впливало на інтенсивність інтравітальної реакції 8-БСХ в гіпокампі, а також на інтенсивність і тривалість судорог, що викликані 8-БСХ.

Таким чином існує залежність між інтравітальною реакцією 8-БСХ у гіпокампі та його судорожною дією.

На зрізах головного мозку, що флуорохромовані 8-БСХ, спостерігалась жовто-зелена люмінесценція в області зубчатої фасції та полів СА2 - СА4 гіпокампі. При порівнянні цитохімічної реакції 8-БСХ з

картиною при забарвленні гематоксилин-флоксином, азуром чітко видно концентрування цинку в ділянках розташування гранулярних та пірамідних клітин.

Таблиця 1- Інтенсивність інтравітальної реакції 8-БСХ в гіпокампі, а також інтенсивність і тривалість судорог у мишей, які отримали 8-БСХ

Агент	Доза, мг/кг	Інтенсивність судорог	Тривалість судорог, хв	Інтенсивність інтравітальної реакції
8-БСХ (контроль)	400	+++	$16,2 \pm 2,37$	++
8-БСХ	200	++	$3,5 \pm 0,46$	+
Сіль магнію + 8-БСХ	200		($p < 0,001$)	
8-БСХ	400	+++	$13,1 \pm 1,67$	++
Сіль кальцію + 8-БСХ	200		($p > 0,05$)	
8-БСХ	400	+++	$12,8 \pm 2,43$	++
			($p > 0,05$)	

Специфічність гістохімічної реакції 8-ТСХ з цинком в гіпокампі доказувалась наступним чином. Попередня обробка нативних зрізів головного мозку 10% водним розчином ДЕДТКН або 0,1 М розчином етілендіамінтетраацетату (ЕДТА) попереджувало отримання на зрізах позитивної люмінесцентної реакції 8-ТСХ. Після екстракції з зрізів продукту цієї реакції за допомогою хлороформу або чотирьоххлористого вуглецю вдруге цитохімічна реакція 8-ТСХ на цих зрізах не відбувалась. 8-ТСХ використовується в аналітичній хімії як високоселективний люмінесцентний реагент на цинк [1].

У таблиці 2 наведені дані вмісту цинку в гіпокампі після введення тваринам хелантів (8-БСХ і ДЕДТКН).

Таблиця 2 - Інтенсивність гістохімічної реакції 8-ТСХ в гіпокампі у мишей після введення хелантів (контроль - інтактні тварини)

Хелант	Доза, мг/кг	Інтенсивність реакції	
		$X \pm m$	p
Контроль		$2,0 \pm 0,11$	
8-БСХ	200	$1,5 \pm 0,17$	$< 0,05$
8-БСХ	400	$1,1 \pm 0,17$	$< 0,05$
ДЕДТКН	1000	0	$< 0,001$

З таблиці чітко видно, що хеланти викликають зниження вмісту в гіпокампі цинку, що визначається гістохімічно, причому найбільший вплив спостерігається з боку ДЕДТКН. Після введення останнього навіть відмічалась негативна реакція на цинк. У даному випадку мова йде не про втрату нейронами цинку, а про його блокування (маскування) ДЕДТКН. Підкріпленням цього служить виявлення цинку на озолених зрізах головного мозку. Для цього предметні стекла з зрізами витримувались у муфельній пічці протягом 6 - 12 годин при температурі 450°C . У результаті цього відбувалось озолення тканин на зрізі, але зберігався її рисунок. На отримані таким чином сподограни наносився 0,01% ацетоновий розчин 8-ТСХ, потім їх промивали дистильованою водою і мікроскопували у світлі люмінесценції. При цьому не було відмічено значної різниці між зрізами інтактних тварин і тих, що отримали ДЕДТКН. Попереднє введення солей магнію та кальцію не впливало на зміну вмісту цинку в нейронах гіпокампу при наступному введенні хелантів.

Таким чином, не всі агенти, що зв'язують цинк (хеланти) здібні викликати розвиток судорог у тварин. Це можна пояснити тим, що зв'язування цинку ще не означає позбавлення його головних функцій. Якщо цинк у синаптичних пухирцях, подібно до цинку в панкреатичних бета-гранулах, сприяє утворенню «депо-форми» секреторного матеріалу, то звільнення секрету нейромедіатору можливе лише у випадку відщеплення цього металу, на що не здібні всі хеланти. Певно ДЕДТКН не відщепляє цинк і утворює змішаний комплекс з цинком і нейромедіатором у синаптичних пухирцях.

Результати досліджень підтверджують висунуте раніше припущення [2] про те, що в гіпокампі цинк акумулюється в синаптичних пухирцях у вигляді комплексу з збуджуючим нейромедіатором глютаміновою кислотою. Можна гадати, що вихід цього медіатора з синаптичних пухирців здійснюється

в результаті відщеплення від нього іонів цинку сильними біолігандами металотіонеїнами, що знайдені в різних клітинах, у тому числі і в нейронах гіпокампу [6, 7].

ЛІТЕРАТУРА

1. Ещенко В. А. Гистохимическое исследование цинка. //Цитология. - 1978. - № 8. - С. 927-933.
2. Кузнецов В. И. Глутамат и цинк в передаче нервных импульсов в гигантских синапсах мшистых волокон гиппокамповой формации. //Нейрохимия и физиология синаптических процессов. - Пущино-на-Оке, 1976. - С. 26-27.
3. De Biasi S., Brendotti C. A. Simplified procedure for the physical development of the sulphide silver method to reveal synaptic zinc in combination with immunocytochemistry at light electron microscopy. // J. Neurosci Methods. - 1998. - V. 79. - P. 87-96.
4. Chausmer A. B. Zinc, insulin and diabetes. //J. Am. Coll. Nutr. - 1998. - V. 17. - P. 109-115.
5. Chen Q. X., Perkins K. L., Wong R. K. S. Zn²⁺ block the NMDA- and Ca²⁺ triggered postexposure current ipe in hippocampal pyramidal cells. //J. Neurophysiol. - 1998. - V. 79. - P. 1124-1126.
6. Deng D. X., Ono S., Koropatnick J., Cherian M. G. Metallothionein and apoptosis in the toxic milk mutant mouse.// Lab. Invest. - 1998. - V. 78. - P. 175-183.
7. Saito S., Kojima Y. Differential role of metallothionein on Zn, Cd and Cu accumulation in hepatic cytosol of rats. //Cell Mol. Life Sci. - 1997. - V. 53. - P. 267-270.