

## ВПЛИВ ДИЗОЦИЛПІНУ МАЛЕАТУ – БЛОКАТОРА ІОННИХ КАНАЛІВ ГЛУТАМАТНИХ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ НА КИСЛУ ШЛУНКОВУ СЕКРЕЦІЮ

Н.В. Дзюбенко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**РЕЗЮМЕ.** Дослідження були проведені в умовах гострого експерименту на білих щурах самцях. Шлункова секреція досліджувалась методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом. Нами було показано, що введення блокатора глутаматних рецепторів NMDA-типу дизоцилпінну малеату (МК-801) не впливало на базальну і стимульовану гістаміном та пентагастрином кислую шлункову секрецію. МК-801 пригнічував кислую шлункову секрецію, стимульовану карбахоліном та посилював інсулінову і викликану 2-дезоксид-Д-глюкозою. Ваготомія усувала вплив МК-801 на карбахолінову шлункову секрецію. Нами було зроблено висновки: 1) до реалізації кислій шлункової секреції, стимульованої холіноміметиками, залучені центральні глутаматні рецептори; 2) до регуляції кислій шлункової секреції залучено декілька різновидів центральних глутаматних рецепторів, що по-різному впливають на секрецію.

Ключові слова: глутаматні рецептори NMDA-типу, шлункова секреція кислоти, МК-801.

**РЕЗЮМЕ.** Исследования были проведены в условиях острого эксперимента на белых крысах самцах. Желудочная секреция исследовалась методом перфузии изолированного желудка по Гхошу и Шильду. Нами было показано, что введение блокатора глутаматных рецепторов NMDA-типа дизоцилпина малеата (МК-801) не влияло на базальную и стимулированную гистамином и пентагастрином кислую желудочную секрецию. МК-801 угнетал карбахолиновую кислую желудочную секрецию, но стимулировал инсулиновую и вызванную 2-деокси-Д-глюкозой. Эффект МК-801 на кислую желудочную секрецию снимался после ваготомии. Нами были сделаны выводы: 1) в реализацию кислій желудочной секреции, стимулированной холиномиметиками, вовлечены центральные глутаматные рецепторы; 2) в регуляции кислій желудочной секреции принимают участие несколько видов центральных глутаматных рецепторов, которые по-разному влияют на секрецию.

Ключевые слова: глутаматные рецепторы NMDA-типа, желудочная секреция кислоты, МК-801.

**SUMMARY.** The investigations were carried out on white male rats in acute experiments by method of perfusion of isolated stomach by Ghosh and Shild. It showed that administration of glutamate NMDA-receptors ion channels blocker - dizocilpine maleate (MK-801) didn't affect the basal and stimulated by histamine and pentagastrine gastric acid secretion. MK-801 suppressed carbachol and stimulated insulin, 2-deoxy-D-glucose gastric acid secretion. Effect of MK-801 on carbachol gastric acid secretion was abolished by vagotomy. We concluded: 1) the central glutamate receptors are involved in realization of cholinomimetics' stimulated gastric acid secretion; 2) a few subpopulations of central glutamate receptors might be involved in regulation of gastric acid secretion, that has differ effect at the secretion.

Key words: glutamate NMDA-receptor, gastric acid secretion, MK-801.

Глутаматні рецептори NMDA-підтипу вперше були відкриті як постсинаптичні рецептори глутаматергічних синапсів [4] у центральній нервовій системі. В ході інтенсивних досліджень, які розпочались відтоді, було показано, що ці рецептори активно залучені в процесах синаптичної передачі, дендритної інтеграції, синаптичного та нейронального розвитку, навчання та пам'яті [4]. Саме тому NMDA-рецептори тісно пов'язані з рядом неврологічних та психіатричних захворювань, таких як нейродегенеративні стани, інсульт, епілепсія, шизофренія, хвороба Альцгеймера, паркінсонізм [5]. Однак, останнім часом з'являється все більше відомостей про розташування глутаматних рецепторів на тих клітинах, для яких вони вважались нехарактерними, а значить і про участь цих рецепторів в "нових" процесах. Так, наприклад, NMDA-рецептори були знайдені на олігодендроцитах та астроцитах [26], остеокластах та хондроцитах [14], де їх роль поки що не зрозуміла.

Досить інтенсивно досліджується роль глутаматних рецепторів у регуляції кислій шлункової секреції. Однак, отримані результати часом мають протирічний характер, що свідчить

про необхідність більш детального вивчення зазначеної проблеми. За даними одних авторів центральне введення глутамату чи кайнату посилює базальну шлункову секрецію соляної кислоти [9]. Іншими встановлено, що малі дози ендотоксину гальмують пентагастринову секрецію. Гальмівний ефект ендотоксину усувався введенням у шлуночки мозку блокаторів глутаматних рецепторів як NMDA, так і AMPA та кайнатних [7]. Проте Tsai зі співавторами на препаратах ізольованих шлунків тварин показали, що L-глутамат не впливав на базальну шлункову секрецію кислоти, але гальмував оксотреморинову, гістамінову та пентагастринову секрецію [15]. Отримані результати частково були підтверджені на цілісному організмі щура, але L-глутамат у даних умовах експерименту не впливав на пентагастринову секрецію [16]. Фалалєєва Т.М. та ін. показали, що 10-денне введення глутамату не впливало на рівень базальної шлункової секреції, однак, 20-и та 30-денне — посилювало дебіт базальної шлункової секреції [2]. В роботі Степанової та ін. встановлено, що NMDA не впливав на гістамінову ШСК. Як відомо, NMDA майже не проходить через гематоенцефалічний бар'єр,

отже, автори дійшли висновку, що периферичні глутаматні рецептори NMDA-типу не залучені до механізму реалізації гістамінової ШСК, хоча їх активація призводить до посилення ШСК, стимульованої карбахоліном. Після двобічної стовбурової ваготомії стимулюючий ефект NMDA на карбахолінову ШСК зберігався, хоча був дещо послаблений, а після блокади нікотинічних ацетилхолінових рецепторів він був відсутній. Дослідники вважають, що іонотропні глутаматні рецептори NMDA-типу, які залучені до стимулюючого ефекту NMDA на карбахолінову ШСК, локалізовані на пресинаптичній мембрані або на інтернейронах, збудження з яких передається на постсинаптичну мембрану [3].

Як бачимо, більшість науковців для дослідження впливу NMDA-рецепторів на шлункову секрецію використовують агоніст цих рецепторів — глутамат. Результати, отримані на фоні додаткового введення глутамату, можуть бути наслідком фармакологічного впливу цієї речовини. Крім того, синапси в ентеральній нервовій системі мають систему захвату глутамату з високим ступенем спорідненості [10]. Тому, на нашу думку, для встановлення ролі NMDA-рецепторів, що збуджуються ендogenousним глутаматом, доцільніше використовувати блокатори глутаматних рецепторів.

Відсутність цілісного уявлення про феноменологію та нез'ясований механізм впливу різних сайтів глутаматних рецепторів на шлункову секрецію обумовили наш інтерес до даної проблеми.

Таким чином, метою нашої роботи було вивчити роль центральних та периферичних іонотропних глутаматних рецепторів NMDA-типу в регуляції базальної та стимульованої карбахоліном, пентагастрином, гістаміном, інсуліном та 2-дезоксид-D-глюкозою шлункової секреції у щурів.

#### Методика

Дослідження проведені в умовах гострого експерименту на 103 білих безпородних щурах самцях, масою 170-200г. За 24 години до початку експерименту тварин відсаджували на голод, з вільним доступом до води. Шлункову секрецію щурів досліджували методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом [8]. Тварин наркотизували уретаном (110 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Збирали десятихвилинні проби перфузату, в якому визначали кислотність шляхом титрування 0,01N розчином гідроксиду натрію.

Досліджували вплив блокатора іонного каналу глутаматних рецепторів NMDA-типу дицилліну малеату (МК-801, Sigma-ALDRICH, Inc., USA) в дозі 0,1 мг/кг (внутрішньоочеревинно) на базальну та стимульовану шлункову секрецію кислоти у

щурів. Піддослідних тварин було поділено на 2 групи, перша з яких була з інтактною нервовою системою, а в другій було зроблено білатеральну стовбурову ваготомію з метою дослідити шлункову секрецію в умовах відсутності впливів з ЦНС. Шлункову секрецію стимулювали внутрішньоочеревинним введенням гістаміну (Sigma-ALDRICH, Inc., USA) в дозі 3 мг/кг, карбахоліну (Sigma-ALDRICH, Inc., USA) в дозі 0,01 мг/кг, пентагастрину (Sigma-ALDRICH, Inc., USA) в дозі 26 мкг/кг, інсуліну (1,2 од/кг) та 2-дезоксид-D-глюкози (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) в дозі 200 мг/кг.

Отримані результати піддавали статистичній обробці. Підраховували середнє значення (M) та стандартне відхилення (SD). Ряди даних перевіряли на їх відповідність нормальному розподілу, використовуючи тест Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод — тест Мана-Вітні. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю  $p < 0,05$  [1].

#### Результати та їх обговорення

У ході наших досліджень було показано, що блокада іонного каналу глутаматних рецепторів NMDA-типу за допомогою МК-801 не впливала на базальну та стимульовану гістаміном і пентагастрином шлункову секрецію (рис. 1). Подібні результати були отримані й іншими дослідниками [15].

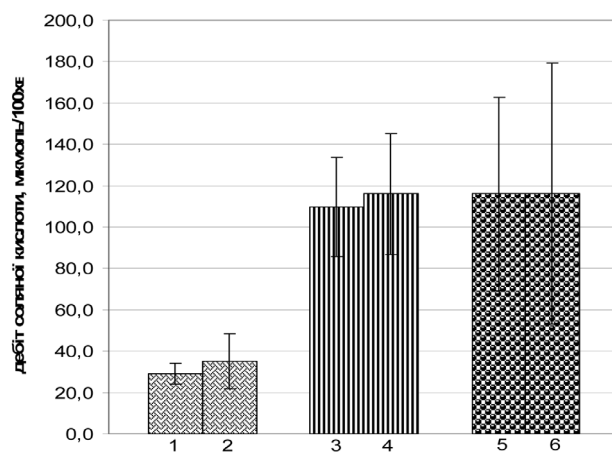


Рис. 1. Вплив МК-801 (0,1 мг/кг, в/о) на базальну та стимульовану гістаміном (3 мг/кг, в/о), пентагастрином (0,026 мг/кг, в/о) секрецію соляної кислоти, M ± SD.

1. базальна секреція (n=7);
2. базальна секреція + МК-801 (n=7);
3. гистамін (n=7);
4. гистамін + МК-801 (n=7);
5. пентагастрин (n=12);
6. пентагастрин + МК-801 (n=13)

МК — 801 у дозі 0,1 мг/кг зменшував рівень шлункової секреції, стимульованої карбахоліном з  $91,6 \pm 11,5$  до  $59,2 \pm 15$  мкмоль/100 хв (рис. 2), або на 35% ( $p < 0,05$ ). Ваготомія усувала гальмівний вплив МК-801 на карбахолінову шлункову секрецію (рис. 2). Одержані дані свідчать, по-перше, про те, що хоча ендогенний глутамат збуджує і центральні, і периферичні глутаматні NMDA-рецептори, до реалізації шлункової секреції, стимульованої холіноміметиками, залучені лише центральні глутаматні рецептори, котрі за літературними даними, розташовані на нейронах ядер солітарного тракту (ЯСТ) та блукаючих нервів [18]. По-друге, ваготомія усувала ефект збудження центральних глутаматних рецепторів на карбахолінову кислоту шлункову секрецію, отже, ми дійшли висновку, що передача збудження до парієтальних клітин відбувається по блукаючих нервах, із закінчень яких виділяється ацетилхолін.

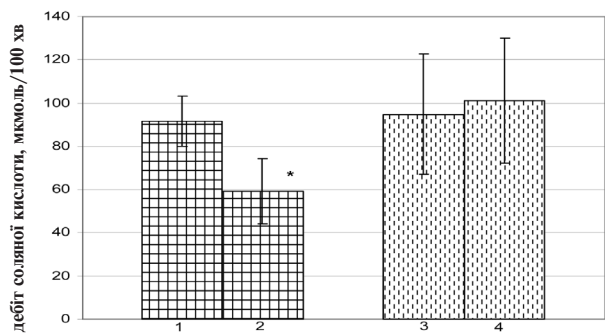


Рис. 2. Вплив МК-801 (0,1 мг/кг, в/о) на секрецію соляної кислоти, стимульовану карбахоліном (0,01 мг/кг, в/о),  $M \pm SD$ . \* -  $p < 0,05$ .  
 1. карбахолін, (n=8);  
 2. карбахолін + МК-801 (n=8);  
 3. ваготомія + карбахолін (n=8);  
 4. ваготомія + карбахолін + МК-801 (n=8)

У наступних серіях досліджень вивчали вплив блокади центральних глутаматних рецепторів NMDA-типу на шлункову секрецію, викликану такими стимуляторами, механізм дії яких пов'язаний зі збудженням блукаючих нервів. До таких речовин належать інсулін та 2-дезоксид-D-глюкоза. Механізм стимулюючої дії інсуліну на шлункову секрецію пов'язаний зі збудженням гіпоглікемією глюкосенситивної зони гіпоталамуса, звідки збудження по солітарному тракту передається до ядер блукаючих нервів. 2-дезоксид-D-глюкоза, на відміну від інсуліну, не збуджує глюкосенситивну зону гіпоталамуса, а діє безпосередньо на ядра блукаючих нервів. І в тому, і в іншому випадку відбувається збудження блукаючих нервів.

Показано, що МК — 801 збільшував дебіт кислоти шлункової секреції, стимульованої 2-дезоксид-D-глюкозою з  $168,5 \pm 34$  до  $317 \pm$

81 мкмоль/150 хв (рис. 3) або на 88% ( $p < 0,001$ ). Інсулінова секреція під впливом МК-801 збільшувалась з  $174,2 \pm 37$  до  $299,6 \pm 75$  мкмоль/150 хв (n=7), або на 72 % ( $p < 0,01$ ).

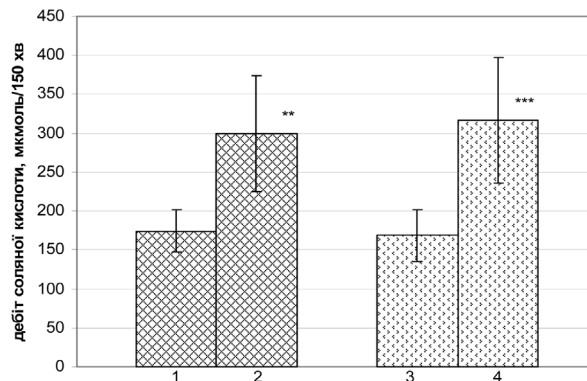


Рис. 3. Вплив МК-801 (0,1 мг/кг, в/о) на секрецію соляної кислоти, стимульовану інсуліном (1,2 од/кг, в/о) та 2-дезоксид-D-глюкозою (200 мг/кг, в/о),  $M \pm SD$ . \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .  
 1. інсулін (n=9); 2. інсулін + МК-801 (n=7);  
 3. 2-дезоксид-D-глюкоза (n=8);  
 4. 2-дезоксид-D-глюкоза + МК-801 (n=9)

Отже, збудження NMDA-рецепторів, локалізованих в глюкосенситивній зоні гіпоталамуса та на ядрах блукаючих нервів [6], призводить до пригнічення шлункової секреції, стимульованої інсуліном та 2-дезоксид-D-глюкозою. У даному випадку ми спостерігали ефект протилежний впливу МК-801 на карбахолінову шлункову секрецію. Однак, коли вводили інсулін чи 2-дезоксид-D-глюкозу, а на їх фоні МК — 801, то спостерігали ефект впливу на додатково збуджені структури мозку, чого не відбувалось при стимуляції шлункової секреції за допомогою карбахоліну. Очевидно, в ЦНС існує субпопуляція NMDA-рецепторів, яка при збудженні ендогенним глутаматом справляє гальмівний вплив на кислоту шлункову секрецію лише тоді, коли є додаткове збудження. Відомо, що інсулін і 2-дезоксид-D-глюкоза є найпотужнішими стимуляторами шлункової секреції. Тому цілком очевидно, що при додатковому збудженні структур мозку, які лежать на шляху передачі збудження від гіпоталамуса до ядер блукаючих нервів, в тому числі і при додатковому збудженні самих ядер блукаючих нервів, необхідним є існування гальмівних впливів, котрі б не дозволяли надмірно зростати шлунковій секреції. Таку функцію, очевидно, і відіграють глутаматні рецептори. Дійсно, за даними літератури, існує кілька різновидів рецепторів даного типу, що різняться за субодиничним складом [9]. NMDA-рецептори з різним субодиничним складом значно відрізняються за фармакологічними та кінетичними характеристиками, такими як сила

зв'язування агоністів, час інактивації, пропускна здатність відкритого каналу, тривалість відкритого стану іонного каналу [12]. Так, рядом авторів було показано, що NMDA-рецептори, що містять NR2A субодиницю, але не NR2C чи NR2D характеризуються найвищою вірогідністю відкриття іонного каналу та тривалістю довгочасової потенціації [12]. На користь наших досліджень свідчать також роботи Н. Наканіші зі співавторами, котрі встановили, що в залежності від субодиничного складу глутаматні NMDA-рецептори можуть справляти різнонаправлений вплив [13]. Критичною в даному випадку є наявність NR3 субодиниці, яка здатна справляти нейропротекторний вплив. Тобто, як і у наших дослідженнях, зникає уявлення про NMDA-рецептори як виключно збуджуючі. Таким чином, можливо, у випадку регуляції кислої шлункової секреції, коли виникає додаткове збудження структур мозку, включається інший вид NMDA-рецепторів, залучаючи гальмівні механізми, що не

дозволяє парієтальним клітинам виробляти надмірну кількість соляної кислоти [16].

#### Висновки

1. Іонні канали глутаматних рецепторів NMDA-типу не залучені до реалізації базальної, гістамінової та пентагастринової шлункової секреції.
2. Блокада іонних каналів глутаматних рецепторів NMDA-типу гальмує шлункову секрецію, стимульовану карбахоліном. Ваготомія усувала гальмівний вплив МК — 801 на карбахолінову шлункову секрецію, що свідчить про центральну локалізацію глутаматних рецепторів, котрі збуджуються ендogenousним глутаматом і роблять певний внесок у реалізацію кислої шлункової секреції, стимульованої холіноміметиками.
3. Різнонаправлений ефект МК — 801 на карбахолінову шлункову секрецію та секрецію кислоти, стимульовану інсуліном та 2-дезоксид-Д-глюкозою, дозволяє стверджувати про наявність декількох різновидів глутаматних рецепторів, що по-різному впливають на секрецію соляної кислоти.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Гланс С. Медико-биологическая статистика / С. Гланс. — Москва, Практика, 1999. — 459 с.
2. Фалалеева Т.М. Вплив довготривалого введення глутамату натрію на шлункову секрецію кислоти у щурів / Т.М. Фалалеева, Т.В. Берегова, В.М. Кухарський // Матеріали наукової конференції "Системна організація психофізіологічних та вегетативних функцій". — Луцьк, Україна. — 2009. — С. 99—100.
3. Степанова Ю.Ю. Дослідження участі периферичних глутаматних рецепторів NMDA-типу в регуляції шлункової секреції у щурів, стимульованої карбахоліном / Ю.Ю. Степанова, Л.Я. Штанова, Т.В. Берегова // Інформаційна та негентропійна терапія. — 2006. — № 1. — С. 20.
4. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity / Corlew R., Brasier D.J., Feldman D.E. [et al.] // *Neuroscientist*. — 2008 — Vol. 14, № 6 — P. 609—625.
5. Cull-Candy S. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease / S. Cull-Candy, S. Brickley, M. Farrant // *Curr. Opin Neurobiol.* — 2001. — № 11. — P. 327—335.
6. Fugo K.R. Ibotenic acid lesions reduce noradrenergic activation in ventromedial hypothalamus during hypoglycaemia / K.R. Fugo // *Brain Res.* — 2006. — Vol. 21. — P. 105.
7. Garcia-Zaragoza E. Interleukin 1 beta-induced inhibition of gastric acid secretion involves glutamate, NO and cGMP synthesis in the brain / E. Garcia-Zaragoza // *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* — 2003. — Vol. 367. — P. 22—27.
8. Ghosh M.N. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat / M.N. Ghosh, H.O. Schild // *Br. J. Pharmac.* — 1958. — 13. — P. 54—61.
9. Herman J.P. Expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat / J.P. Herman // *J. Comp. Neurol.* — 2000. — Vol. 422. — P. 352—362.
10. Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney and pancreas / Howell J.A., Matthews A.D., Swanson K.C. [et al.] // *J. Anim. Sci.* — Vol. 79. — P. 1329—1336.
11. Kaneko H. TRH in the dorsal motor nucleus of vagus is involved in gastric acid erosion induced by excitation of raphe pallidus in rats / H. Kaneko // *Brain Res.* — 1995. — Vol. 699. — P. 97—102.
12. Li P. NR2A-containing NMDA receptors are required for LTP induction in rat dorsolateral striatum in vitro / P. Li, Y.H. Li, T.Z. Han // *Brain Res.* — 2009. — № 5. — P. 40—46.
13. Neuroprotection by the NR3A Subunit of the NMDA Receptor / Nakanishi N., Tu S., Shin Y. [et al.] // *J. Neurosci.* — 2009. — Vol. 29; № 16. — P. 5260—5265.
14. Mechanical loading modulates glutamate receptor subunit expression in bone / Szczesniak A.M., Gilbert R.W., Mukhida M. [et al.] // *Bone.* — 2005. — Vol. 37. — P. 63—73.
15. Tsai L.H. Effect of L-glutamic acid on acid secretion and immunohistochemical localization of glutamatergic neurons in the rat stomach / L.H. Tsai, Y.J. Lee, J. Wu. // *J. Neurosci. Res.* — 1994. — Vol. 38. — P. 188—195.
16. Tsai L.H. NMDA inhibits oxotremorin-induced acid secretion via the NO-dependent cyclic GMP system in the rat stomach / L.H. Tsai, Y.J. Lee, J.Y. Wu // *Chin. J. Physiol.* — 2001 — Vol. 44. — P. 193—198.
17. Verkhatsky A. NMDA receptors in glia / A. Verkhatsky, F. Kirchhoff // *Neuroscientist*. — 2007. — № 13. — P. 28—37.
18. Zheng X. The central nucleus of the amygdala modulates gut-related neurons in the dorsal vagal complex in rats / X. Zheng, J. Cui // *J. Physiol.* — 2003. — Vol. 553. — P. 1005—1018.

Надійшла до редакції 6.04.2011 р.