

Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в структурах мозга крыс после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры

Ф.М. Шакова¹, П.М. Клодт², В.С. Кудрин², Т.В. Давыдова¹, Г.А. Романова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

На модели двустороннего фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крыс показано, что антитела к глутамату при их однократном интраназальном введении через 1 час после фототромбоза коры способствуют снижению эксайтотоксичности в исследованных структурах мозга, что приводит к изменению уровня дофамина и серотонина, а также их метаболитов, в префронтальной коре и гиппокампе.

Ключевые слова: ишемия, антитела к глутамату, моноамины, дофамин, серотонин, их метаболиты, фототромбоз, префронтальная кора, гиппокамп

F.M. Shakova, P.M. Klodt, V.M. Kudrin, T.V. Davydova, G.A. Romanova

Federal State Budgetary Institution «Institution of General Pathology and pathophysiology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiiskaya, 8

Federal State Budgetary Institution «Institution of Pharmacology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiiskaya, 8

The influence of glutamate antibodies on the level of neurotransmitter monoamines in brain structures of rats with ischemic damage of prefrontal cortex

Experiments on the model of bilateral photothrombosis in prefrontal cortex showed that antibodies to glutamate one-time administered intranasally 1h after ischemic damage to the brain cortex lead to decrease of neurodegenerative influence of excitatory neurotransmitter after photothrombosis. It was showed the change of the level of dopamine, serotonin and their metabolites in hippocampus and prefrontal cortex.

Key words: rats, antibodies to glutamate, monoamines, serotonin, dopamine, prefrontal cortex of brain, hippocampus

В последние годы значительно увеличился фронт исследований, направленных на понимание патогенеза ишемического повреждения мозга и поиск фармакологических средств, вызывающих усиление регенеративных процессов при данной патологии [7, 11]. Эти исследования имеют не только теоретическое патофизиологическое значение, но и необходимы для неврологической практики, так как известно, что тромбоз сосудов головного мозга является причиной около 75% инсультов у людей и почти всегда приводит к когнитивным расстройствам: нарушению памяти, обучаемости и анализа ситуации, значительно снижая качество жизни [5].

Известно, что передние префронтальные отделы неокортекса у крыс наряду с гиппокампом играют ключевую роль в процессах обучения и памяти [6, 8, 9, 10]. В основе интегративной деятельности мозга

лежат события, обеспечиваемые классическими нейромедиаторами, которые оказывают действие на нейрохимические реакции в нейронах, способствуя консолидации и воспроизведению памятного следа [1]. Одним из главных механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии в головном мозге [2, 3]. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах мозговой деятельности, включая когнитивные функции [1, 9]. Эксцитотоксичность один из основных патологических механизмов, приводящих к повреждению и гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и ишемии головного мозга. Все существующие методы нейропротекции остаются недостаточно эффективными [16] и нуждаются в дальнейшей разработке.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния антител к глутамату (АТ-ГЛ) на содержание моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре и гиппокампе в 1-е и на 8-е сутки после фототромбоза префронтальной области коры мозга крыс.

Методика

Работа выполнена на 48 беспородных крысах-самцах массой 200-220 г, выращенных в виварии НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище, воде и 12-часовом световом режиме. При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Экспериментальные животные были разделены на две серии: I — первые и II — восьмые сутки после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры. Каждая серия была разделена на 4 группы:

- 1-я группа (n = 6) — ложнооперированные;
- 2-я группа (n = 6) — крысы с двусторонним фототромбозом префронтальной коры головного мозга, которым однократно через 1 час после операции вводили интраназально по 7 мкл NaCl 0,9%;
- 3-я группа (n = 6) — крысы, которым после ишемического повреждения по той же схеме вводили интраназально водный раствор АТ-ГЛ в дозе 250 мкг/кг;
- 4-я группа (n = 6) — ишемизированные крысы, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего γ -глобулина от интактных животных по той же схеме, в дозе 250 мкг/кг.

Двустороннее фокальное ишемическое повреждение префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 по стереотаксическому атласу [12], создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [19]. Операцию проводили под наркозом, вызываемым внутривенным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Перед операцией наркотизированным животным вводили внутривенно в *v. jugularis* 3% раствор фоточувствительного красителя бенгальского розового (Rose Bengal from Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) в дозе 40 мг/кг. Крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и отделяли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника света — галогеновой лампы ($\lambda = 560$ нм) мощностью 250 W (25V), охлаждаемой вмонтированным в установку вентилятором, и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее са-

гитального шва. Облучение проводили в течение 15 мин с каждой стороны [3]. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения бенгальского розового. Фоточувствительный краситель при взаимодействии со светом длиной волны 560 нм выделяет свободный кислород, что приводит к повреждению эндотелия микрососудов коры и тромбообразованию.

АТ-ГЛ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат — бычий сывороточный альбумин (БСА), синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида. Титр Глу-АТ, определяемый методом иммуноферментного анализа (ИФА), составил 1:1000. γ -глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом переосаждения сульфатом аммония, очищали от БСА методом аффинной хроматографии, лиофилизировали и хранили при 4°C [17].

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс (префронтальной коре, гиппокампе) определяли на 1-е и 8-е сутки после фототромбоза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [13] (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке Rego-Sil-Pur, ODS-3, 4x100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr. Majsch GmbH, «Элсико», Москва). Насос RM-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин, при давлении 2 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3,0). Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозные фильтры (диаметр пор 0,2 мкм) при P = 20-40 мм Hg столба и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом с одновременной обработкой на ультразвуковой бане («Серьга», Россия) в течение 40-50 с. Для определения количества моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий в качестве внутреннего стандарта диоксибензиламин (ДОБА), 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (ДОФУК), дофамин (ДА), 5-гидрокситриптамин (5-ОТ), 5-оксииндолуксусную кислоту (5-ОИУК) в концентрации 500 пкмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и в образце, и выражали в нмоль/г ткани.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 с использованием однофакторного непараметрического дисперсионного анализа по Kruscal-Wallis с последующим внутригрупповым сравнением по U критерию Mann-Whitney.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что двусторонний фототромбоз сосудов префронтальной коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага и сопровождается изменениями метаболизма

моноаминов в коре и в подкорковых структурах, что неизменно сказывается на мнестических функциях мозга, приводя к нарушению воспроизведения и сохранения выработанных навыков [3, 15, 18].

В данной работе было выявлено значительное повышение уровня дофамина (ДА) в префронтальной коре головного мозга в первые сутки после фототромбоза коры, как в группе, получавшей NaCl 0,9% Н (3, N = 24) = 10,49, $p = 0,0148$, так и при введении АТ-ГЛ Н (3, N = 24) = 12,66, $p = 0,0054$ (рис. 1). Однако к 8-м суткам уровень дофамина во всех исследуемых группах животных снижался. Оборот дофамина

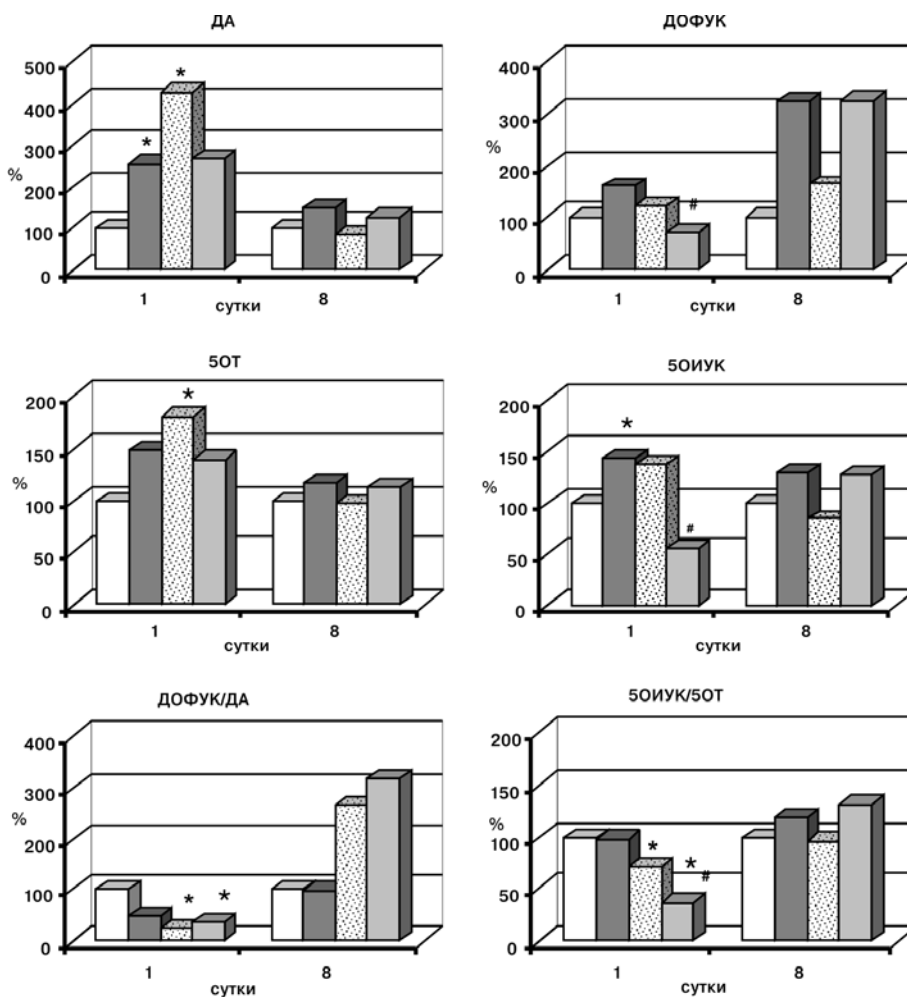


Рис. 1. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в префронтальной коре после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс; По оси ординат показано содержание моноаминов в префронтальной коре головного мозга крыс в процентах. Содержание моноаминов в контрольной группе ложнооперированных крыс принято за 100%.

Белые столбики — ложнооперированные животные +0,9% NaCl.

Темно-серые столбики — крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + 0,9% NaCl, заштрихованные столбики — крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + АТ-Глу 250 мкг/кг, светло-серые столбики — крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + гамма-глобулин от интактных кроликов 250 мкг/кг.

Постдисперсионный анализ по непарному критерию Манна-Уитни. Число животных в группах по 6. $P < 0,05$: * — по сравнению с группой ложнооперированных крыс; # — по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры.

(ДОФУК/ДА) в первые сутки после фототромбоза коры достоверно снижался как в ишемизированной группе, так и в группах, получавших АТ-ГЛ и γ -глобулин. $H(3, N = 24) = 9,01, p = 0,0291$ и $H(3, N = 24) = 12,80, p = 0,0051$, а к 8-м суткам оборот дофамина имел тенденцию к увеличению в ишемизированной группе с введением АТ-ГЛ и с введением гамма-глобулина.

Уровень серотонина(5-ОТ) в префронтальной коре в первые сутки после ишемии повышался во всех экспериментальных группах. Достоверно повышался уровень 5-ОИУК в ишемизированной группе и группе с введе-

нием АТ-ГЛ, В группе с введением гамма-глобулина в этот срок уровень метаболита 5-ОИУК был достоверно ниже, чем в ишемизированной. Уровень метаболита 5-ОИУК к восьмым суткам после ишемического повреждения оставался выше контроля в ишемизированной группе без лечения и группе с введением гамма-глобулина. Оборот серотонина (5ОИУК/5ОТ) в первые сутки снижался в группах, получавших АТ-ГЛ и γ -глобулин. На 8-е сутки показатели уровня серотонина (5ОТ) и его оборота (5ОИУК/5ОТ) во всех исследуемых группах не отличался от контроля.

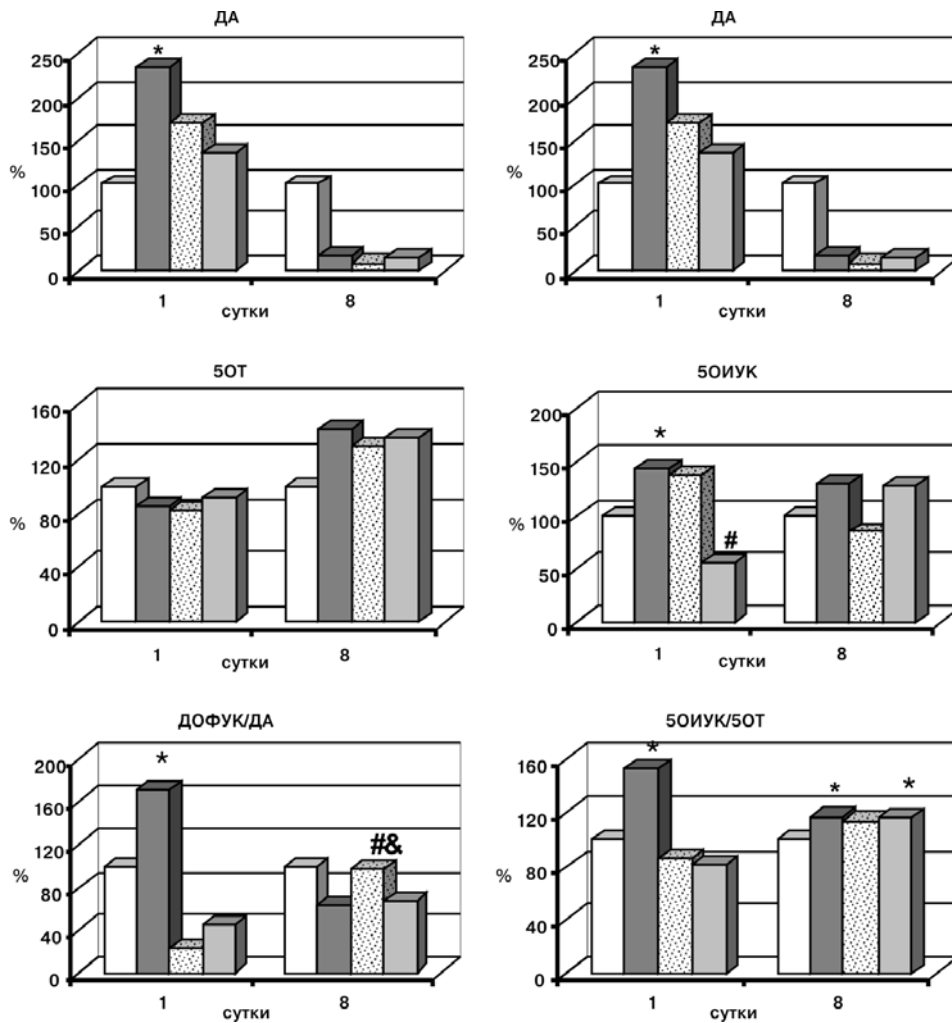


Рис. 2. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в гиппокампе после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс; По оси ординат показано содержание моноаминов в гиппокампе головного мозга крыс в процентах. Содержание моноаминов в контрольной группе ложнооперированных крыс принято за 100%. Белые столбики – ложнооперированные животные +0,9% NaCl; темно-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + 0,9% NaCl, заштрихованные столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + АТ-Глу 250 мкг/кг, светло-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + гамма-глобулин от интактных кроликов 250 мкг/кг.

Постдисперсионный анализ по непарному критерию Манна-Уитни. Число животных в группах по 6. $P < 0,05$: * – по сравнению с группой ложнооперированных крыс; # – по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, & – по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавших гамма-глобулин от интактных кроликов.

Как видно из рис. 2, в гиппокампе в первые сутки после фототромбоза у ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался уровень ДА Н ($3, N = 24$) = 12,53, $p = 0,0057$. Эта тенденция сохранялась в группах с введением АТ-ГЛ и γ -глобулина. Оборот ДА (ДОФУК/ДА) в первые сутки у ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался и имел тенденцию к значительному снижению в группах с введением АТ-ГЛ и γ -глобулина. К 8-м суткам уровень ДА был резко снижен во всех группах по отношению к ложнооперированному контролю, тогда как оборот (ДОФУК/ДА) к 8-м суткам возрастал в группе получавшей АТ-ГЛ по отношению к ишемизированной группе без лечения. Уровень 5-ОТ в гиппокампе во всех экспериментальных группах в первые сутки после ишемического повреждения префронтальной коры не отличался от контрольного. К 8-м суткам эти показатели имели тенденцию повышения по отношению к контролю. Значительно менялся уровень метаболита серотонина 5ОИУК: этот показатель был в первые сутки после ишемического повреждения коры достоверно выше контроля в ишемизированной группе по отношению к ложнооперированному контролю и достоверно ниже в группе с введением γ -глобулина в сравнении с группой с ишемическим повреждением без лечения. К восьмым суткам уровень метаболита 5-ОИУК оставался в указанных группах повышенным по сравнению с контрольными значениями. Оборот серотонина (5-ОИУК/5ОТ) в гиппокампе в первые сутки возрастал в группе с ишемическим повреждением по сравнению с контролем. На 8-е сутки оборот серотонина незначительно отличался от контроля во всех группах.

Механизмы патологических процессов, происходящих при ишемическом инсульте и влияние на них нейропротекторов подробно изучены в исследованиях на животных, у которых экспериментально вызывали ишемию мозга. В настоящее время выявлена сложная цепь метаболических и клеточных реакций, вызываемых нарушениями мозгового кровообращения [7, 11].

На сегодняшний день все имеющиеся нейропротекторы, испытанные в мультифокальных клинических исследованиях, недостаточно эффективны [17], поэтому разработка новых подходов к терапии и профилактике инсульта является важнейшей задачей фундаментальной медицины [3, 7].

Новым приоритетным направлением в разработке противоишемической защиты является использование методов нейроиммунологии. Антитела к нейромедиаторам в настоящее время становятся объектом исследований при изучении проблемы регуляции нейроиммунных взаимодействий, составляющих основу функциональных нарушений при ишемических поврежде-

ниях головного мозга. Особое значение в этих процессах приобретает роль глутамата, исследуемая с помощью антител к нему [4, 14, 17]. Дисбаланс глутаматергической нейромедиации при ишемическом повреждении мозга приводит к развитию каскада эксайтотоксичности, в ходе которого наблюдается гибель нейронов прежде всего в префронтальной коре и гиппокампе. Необходимо отметить и тот факт, что гиппокамп имеет прямую эфферентную связь с префронтальной корой [8-10].

Установлено, что интраназальное однократное введение АТ-ГЛ (250 мкг/кг) через 1 час после фотоиндуцируемого тромбоза сосудов префронтальной коры головного мозга крыс приводит на 8-е сутки после операции к снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе и не влияет на содержание аспартата в этих структурах, что свидетельствует о специфическом нормализующем действии АТ-ГЛ на усиленную продукцию глутамата [4, 14].

Полученные ранее данные показали выраженное протективное действие АТ-ГЛ при нейродегенеративном повреждении когнитивных функций мозга, возможно, благодаря их способности снижать усиленную продукцию глутамата и тем самым предотвращать гибель нейронов, что позволяет также объяснить антиамнестические эффекты АТ-ГЛ при остром ишемическом повреждении префронтальной коры. Поскольку в процессах обучения и памяти ключевую роль играют нейромедиаторные взаимодействия, то можно предположить, что изменения уровня моноаминов в префронтальной коре и гиппокампе являются отражением перестройки пластических процессов, происходящих в условиях снижения эксайтотоксичности под действием АТ-ГЛ в исследуемых структурах ишемизированного головного мозга.

Список литературы

1. *Ашмарин И.П., Стукалов П.В.*, Нейрохимия. — М.: Изд-во Инст. Биомед. Химии РАНН, 1966. — С. 87-117.
2. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М., 2001. — С. 328.
3. *Романова Г.А.* Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // *Дизрегуляторная патология* / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М., 2002. — С. 605-615.
4. *Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю.* и др. // *БЭБиМ.* — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261-264.
5. *Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Айрян Н.Ю.* Эпидемиология инсульта в Российской Федерации // *Consilium Medicum.* — 2005. — №1. — С. 10-12.
6. *Degenetais E., Thierry A.M., Glowinski J.* Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study // *Life Sci Med.* — 2003. — Vol. 13(7). — P.782-792.

7. **Ginsberg M.D.** Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future // *Neuropharm.* — 2008. — Vol. 55. — P. 363-389.
8. **Goldman-Rakic P.S., Selemon L.D., Schwartz M.L.** Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey // *Neurosci.* — 1984. — Vol. 12. — P. 719-743.
9. **Kolb B.** Function of the cortex of the rat: a comparative review // *Brain Res Rev.* — 1984. — Vol. 8. — P. 65-98.
10. **Lee I., Kesner R.P.** Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23. — P. 1517-1523.
11. **Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z.F.** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke // *Cell Tiss Res.* — 2000. — Vol. 301. — P. 173-187.
12. **Paxinos G., Watson C.** Atlas of anatomy of rat brain // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* — 3rd San Diego, Calif. Academic Press Inc; 1997.
13. **Pearson S.J., Crudek C., Mercer K.** et al. // Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde-sulphite derivatives // *J. Neural Transm.* — 1991. — Vol. 86. — P. 151-157.
14. **Romanova G.A., Gorbatov V.Y., Shakova F.M.** Effect of antibodies to glutamate on retention of conditioned passive avoidance response in rats with ischemic injury of the prefrontal cortex // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2012. — Vol.153(1). — P. 12-15.
15. **Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M.** Neuroprotective and anti-amnesic actions of Semax in experimental ischemic cerebral cortical infarct // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 142(12). — P. 612-628.
16. **Rother J.** Neuroprotection does not work // *Stroke.* — 2008. — Vol. 39. — P. 523-524.
17. **Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moal M.** // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. — Vol. 81, №12. — P. 3888-3892.
18. **Silachev D.N., Shram S.I., Shakova F.M., Romanova G.A.** Formation of spatial memory in rats with ischemic lesions to the prefrontal cortex; effects of a synthetic analog of ACTH(4-7) // *Neurosci Beh. Phys.* — 2009. — Vol. 8. — P. 749-757.
19. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 3rd.ed. / Paxinos G., Watson C. — San Diego, 1997.

Поступила 10.12.13

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна — к.м.н., с.н.с. лаборатории ишемических повреждений мозга ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН»

Клодт П.М. — к.б.н., в.н.с. лаборатории нейрохимической фармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН

Кудрин В.С. — к.м.н., зав. лаб. нейрохимической фармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН

Давыдова Т.В. — д.м.н., гл.н.с. лаборатории нейроиммунопатологии ФГБУ НИИОПП РАМН

Романова Г.А. — д.б.н., проф., зав. лаб. ишемических повреждений мозга ФГБУ НИИОПП