

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

Защитная роль антител к глутамату при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры мозга крыс

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 фототромбоза сосудов префронтальной коры головного мозга крыс показано, что антитела к глутамату при их интраназальном введении через 1 ч после ишемического повреждения коры способствуют снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе.

Ключевые слова: антитела к глутамату, глутамат, нейромедиаторные аминокислоты, фототромбоз, префронтальная кора мозга, гиппокамп, гипоталамус

F.M. Shakova¹, P. Klodt², V.S. Kudrin², T.V. Davydova¹, G.A. Romanova¹

The saving role of glutamate antibodies with the acute ischemic damage of the rat brain prefrontal cortex

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Institute of Pharmacology of the V.V.Zakusov RAMS, 8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

On the model of acute ischemic damage of prefrontal areas of the rats brain cortex was shown, that intranasal injection of glutamate antibodies over one hour after ischemic damage of brain prefrontal areas leads to diminishing of glutamate content in hippocampus and prefrontal cortex.

Key words: antibodies to glutamate, glutamate, neuromediator aminoacids, photothrombosis, prefrontal cortex of brain, hippocampus, hypothalamus

Известно, что одним из ключевых механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии в головном мозге. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах в мозге, включая когнитивные функции. Ведущая роль при осуществлении процессов обучения и памяти принадлежит префронтальной коре и гиппокампу [4]. Избыточная активация глутаматергической системы при ишемических повреждениях мозга оказывает нейротоксическое действие, обуславливая из-за длительного притока кальция, гибель кортикальных и субкортикальных нейронов [8]. Помимо глутамата в первоначальный период церебральной ишемии важную роль играет тормозный медиатор ГАМК, который выполняет протективную функцию. Показано, что нарушение соотношения глутамат/ГАМК в первые 30 мин. в пользу глутамата является триггерным механизмом повреждения коры головного мозга [8]. Ранее было показано усиленное образование аутоантител к глутамату (АТ-ГЛ) у крыс с двусторонним ишемическим повреждением пре-

фронтальной области коры головного мозга к 8-м суткам после операции [3]. Показано также, что АТ-ГЛ при интраназальном введении через час после операции двустороннего фотохимического тромбоза сосудов префронтальной коры способствуют сохранению условного рефлекса пассивного избегания, выработанного до повреждения коры у крыс [3]. Одним из механизмов протективного действия Глу-АТ при ишемическом повреждении мозга, может быть их способность снижать усиленную продукцию глутамата.

В связи с этим *целью настоящей работы* было изучение влияния АТ-ГЛ на содержание возбуждающих аминокислот (глутамата, аспартата), а также тормозной аминокислоты ГАМК в структурах мозга крыс (префронтальная кора, гиппокамп, гипоталамус), связанных с когнитивными функциями, в первые и восьмые сутки после ишемического повреждения префронтальной области коры.

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.

Для корреспонденции: Романова Галина Александровна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. ишемических повреждений мозга ФГБУ НИИОП РАМН. E-mail: romanovaga@mail.ru

При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Все взятые в эксперимент животные были разделены на две серии: I — первые сутки и II — восьмые сутки после фототромбоза по 4 группы в каждой:

1-я группа (n=6) — ложнопериорированные;

2-я группа (n=6) — крысы с двусторонним ишемическим инфарктом префронтальной коры головного мозга, которым через час после операции вводили интраназально по 7 мкл физиологического раствора;

3-я группа (n=6) — крысы, которым по той же схеме вводили интраназально водный раствор АТ-ГЛ в дозе 250 мкг/кг;

4-я группа (n=6) — животные, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего γ -глобулина от интактных животных по той же схеме и в той же дозе.

АТ-ГЛ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат-бычий сывороточный альбумин (БСА), синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида [7]. Титр АТ-ГЛ, 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.

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля F1 и F2 [6] создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [9]. Операцию проводили под общим наркозом, вызываемым внутрибрюшинным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового («Sigma», USA; 40 мг/кг, внутривенно) крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света с галогеновой лампой мощностью 250 Вт, и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа на 2 мм ростральнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали холодным светом каждое из полушарий мозга в течение 15 мин. Ложнопериорированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Определение содержания глутамата, аспартата и ГАМК-нейромедиаторных аминокислот проводили в структурах мозга (префронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе) на 1-е и 8-е сутки после операции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с

электрохимической детекцией согласно стандартной методике [5]. Поскольку аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не поглощаются УФ спектром) и не проявляют электрохимической активности, для их детекции необходимо предварительное проведение химического модифицирования — дериватизации. Для этого использовали ортафталевоый альдегид (ОФА), способный флуоресцировать при связывании с аминокислотой.

Аспартат, глутамат, и ГАМК в концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н. HClO₄ использовали в качестве стандартной смеси для калибровки. Через 15 мин. после инкубации при комнатной температуре 20 мкл раствора наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкМ, 4,6x250. Регистрацию продуктов разделения проводили на флуоресцентном детекторе Agilent 1100 (USA) при длине волны возбуждения 230 нм и волны эмиссии 392 нм. Мобильная фаза состояла из 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,6) с 0,025 мМ ЭДТА и 5% ацетонитрила. Скорость подвижной фазы составляла 1,5 мл/мин.

Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозный фильтр (диаметр пор — 0,02 мкм) и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом.

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

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были выявлены существенные различия в содержании глутамата в префронтальной коре головного мозга у исследуемых групп крыс на 1-е и 8-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры $H(3, N=24)=8,88659, p=0,0308$; $H(3, N=24)=14,98333, p=0,0018$ соответственно.

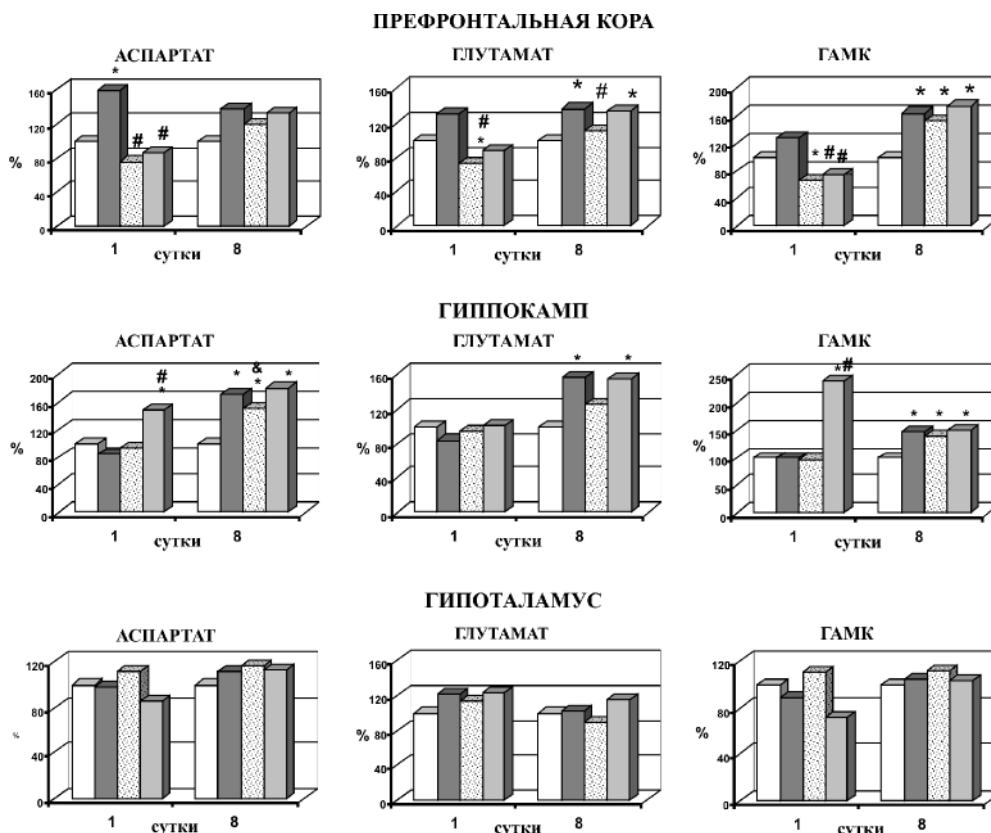
Как видно из рисунка, интраназальное введение АТ-ГЛ через час после ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга приводило к выраженному снижению содержания глутамата в префронтальной коре как в 1-е, так и на 8-е сутки наблюдения. Интраназальное введение γ -глобулина от интактных кроликов через час после операции не оказывало существенного влияния на содержание глутамата в префронтальной коре по сравнению с группой крыс с очаговым ишемическим повреждением этой структуры головного мозга.

В префронтальной коре головного мозга выявлены различия в уровнях аспартата в опытных группах животных в 1-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры $H(3, N=24)=12,64266, p=0,0055$ (рисунок). Так, наблюдалось выраженное повы-

шение содержания аспартата у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры по сравнению с ложнооперированными животными в этот срок наблюдения. В это же время интраназальное введение через час после операции как АТ-ГЛ, так и γ -глобулина приводило к существенному снижению уровня аспартата у животных с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга.

Как видно из рисунка, в 1-е сутки интраназальное введение животным АТ-ГЛ или γ -глобулина через час после операции приводило к выраженному снижению содержания ГАМК в префронтальной коре головного мозга ($H(3, N=24)=10,25558, p=0,0165$). На 8-е сутки после операции двустороннего фотохимического фототромбоза сосудов префронтальной коры было отмечено существенное увеличение уровня ГАМК в группах с ишемическим повреждением префронтальной коры, с ишемическим повреждением префронтальной коры и интраназальным введением АТ-ГЛ или γ -глобулина интактных кроликов ($H(3, N=24)=11,60360, p=0,089$).

В гиппокампе на 8-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры были выявлены основные изменения в содержании возбуждающих аминокислот среди исследуемых групп животных: глутамата — $H(3, N=24)=8,987297, p=0,0295$, и аспартата $H(3, N=24)=14,26712, p=0,0026$. Так, уровень глутамата был повышен в группе крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры и в группе крыс с таким же повреждением коры и интраназальным введением γ -глобулина по сравнению с группой ложнооперированных животных. Группа животных с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавшая интраназально АТ-ГЛ, по содержанию глутамата в гиппокампе не отличалась от контрольной группы ложнооперированных крыс. Уровень аспартата в гиппокампе был повышен во всех опытных группах по сравнению с контрольной группой ложнооперированных животных. Однако уровень аспартата в гиппокампе у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавших



По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс; по оси ординат показано содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в префронтальной коре крыс в процентах. Содержание аминокислот 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.

интраназально АТ-ГЛ, был ниже, чем у крыс, получавших интраназально γ -глобулин интактных кроликов. В отношении содержания ГАМК в гиппокампе у всех трех опытных групп было отмечено его повышение по сравнению с контрольной группой ложноперированных крыс ($H(3, N=24)=14,44306, p=0,0024$).

Во все периоды наблюдения содержание аспартата, глутамата и ГАМК в гипоталамусе в исследуемых группах существенно не различалось (1 сутки аспартат — $H(3, N=24)=5,042629, p=0,1687$; глутамат — $H(3, N=24)=3,259251, p=0,3534$; ГАМК $H(3, N=24)=5,656504, p=0,1296$; 8 сутки аспартат — $H(3, N=24)=2,091685, p=0,5536$; глутамат — $H(3, N=24)=3,321776, p=0,3446$; ГАМК — $H(3, N=24)=0,8172419, p=0,8453$).

Можно заключить, что в результате проведенных экспериментов получены данные, свидетельствующие о специфическом защитном влиянии АТ-ГЛ на уровень глутамата в префронтальной коре и гиппокампе у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга как на 1-е, так и на 8-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры.

В гиппокампе увеличение глутамата выявляется только на 8-е сутки наблюдения у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры и защитный эффект интраназального введения АТ-ГЛ также отмечен в этот срок наблюдения. В 1-е сутки после операции выявлены неспецифические защитные эффекты интраназального введения как АТ-ГЛ, так и γ -глобулина интактных кроликов на содержание аспартата в префронтальной коре крыс при её ишемическом повреждении. В отношении содержания ГАМК у животных с фототромбозом префронтальной коры также выявлены неспецифические эффекты АТ-ГЛ. Интраназальное введение как АТ-ГЛ, так и γ -глобулина вызывает снижение содержания ГАМК в 1-е сутки наблюдения у животных с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлено нормализующее действие АТ-ГЛ на содержание возбуждающей нейротрансмиттерной аминокислоты — глутамата у животных с очаговым ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга. Ранее показано увеличение содержания возбуждающих аминокислот (аспартата и глутамата) при ишемическом повреждении коры головного мозга [2].

Интраназальное введение АТ-ГЛ через час после операции приводило к снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе как в 1-е, так и на 8-е сутки после фототромбоза, что свидетельствует о специфическом действии АТ-ГЛ на усиленную продукцию глутамата. Полученные данные позволяют объяснить ранее полученные проактивные эффекты АТ-ГЛ при остром нейродегенеративном повреждении когнитивных функций мозга [3]: значительное антиамнестическое действие интраназального введения АТ-ГЛ при ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга.

Список литературы

1. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М., 2001. — С. 328.
2. *Романова Г.А.* Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // *Дизрегуляторная патология* / Под ред. Г.Н. Крыжановского. М., 2002. — С. 605-615.
3. *Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю.* и др. Влияние антител к глутамату на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга // *БЭБ и М.* — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261-264.
4. *Kolb B.* Functions of the frontal cortex of the rat: comparative review // *Brain Res.* — 1984. — Vol. 320, №1. — P. 65-98.
5. *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.
6. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 3rd ed. / Paxinos G., Watson C. — San Diego, 1997.
7. *Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moal M.* Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunochemical results. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, №12. — P. 3888-3892.
8. *Wang X., Shimizu-Sasamata M., Moskowitz M.A.* et al. Profiles of glutamate and GABA efflux in core versus peripheral zones of focal cerebral ischemia in mice. // *Neurosci. Lett.* — 2001. — Vol. 313, №3. — P. 121-124.
9. *Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R.* et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // *Ann. Neurol.* — 1985. — Vol. 17, №5. — P. 497-504.

Поступила 15.04.13

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. ишемических повреждений мозга ФГБУ НИИОПП РАМН

Клодт Петр Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. нейрхимической фармакологии ФГБУ НИИФ РАМН

Владимир Сергеевич Кудрин, канд. мед. наук, зав. лаб. нейрхимической фармакологии ФГБУ НИИФ РАМН

Давыдова Татьяна Викторовна, д-р мед. наук, главн. науч. сотр. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ НИИОПП РАМН