

Г.А. Романова, Ф.М. Шакова, Т.В. Давыдова

## **Сравнение нейропротективного действия антител к глутамату и лекарственного препарата семакса при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Установлено, что при фокальной фотоиндуцируемой ишемии префронтальной коры головного мозга крыс семакс (*Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro*) и АТ-Глу (антитела к глутамату) при интраназальном введении проявляют выраженное нейропротективное и антиамнестическое действие. Интраназальное введение семакса (250 мкг/кг ежедневно в течение 6 суток) и АТ-Глу (250 мкг/кг через 1 ч после фототромбоза) вызывают уменьшение размера коркового инфаркта в коре головного мозга и способствуют сохранению и воспроизведению выработанного условного рефлекса пассивного избегания при проверке рефлекса на 8-й день после ишемического повреждения.

**Ключевые слова:** префронтальная кора головного мозга крыс, фотоиндуцируемый тромбоз, условный рефлекс пассивного избегания, амнезия, нейропротекция, антитела к глутамату (АТ-Глу), семакс

G.A. Romanova, F.M. Shakova, T.V. Davudova

## **The comparison of anti-amnestic action of antibodies to glutamate and neuropeptide Semax in the focal ischemic damage of prefrontal cortex of rat brain**

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

It was stated, that with bilateral photochemically induced thrombosis of the prefrontal cortex peptide semax and the AB-Glu by intranasal injection provoke pronounced neuroprotective and anti-amnestic action. Intranasal injection semax (250 mkg/kg/daily during six postoperative days) and AB-Glu (250 mkg/kg in 1 hour after phototrombosis) demonstrate diminishing of cortex damage volume and relieve preservation and reproduction rat passive avoidance reflex, acquired before bilateral photochemically induced thrombosis of prefrontal cortex.

**Key words:** bilateral photothrombosis, prefrontal cortex, peptide semax, AB-Glu, intranasal injection

Ишемия является наиболее распространенной причиной нарушений функций мозга [3]. Причем глобальная ишемия мозга встречается реже, чем фокальная церебральная ишемия при нарушении мозгового кровообращения в отдельном сосудистом бассейне (при ишемическом инсульте или транзиторной ишемической атаке). Передние префронтальные отделы неокортекса играют ключевую роль в процессе консолидации временной связи, в интегративной деятельности мозга, связанной с обучением и памятью [2, 6, 7]. Известно, что одним из ключевых механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии. Глутамат является основным возбуж-

дающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах в мозге, включая когнитивные функции. Избыточное выделение глутамата при ишемических повреждениях мозга оказывает нейротоксическое действие, обуславливая из-за длительного притока кальция гибель кортикальных и субкортикальных нейронов [3].

Наиболее адекватной экспериментальной моделью, позволяющей избирательно исследовать когнитивные расстройства, является двустороннее локальное ишемическое повреждение префронтальной коры мозга крыс методом фототромбоза [16]. При быстро развивающейся недостаточности кровоснабжения в очаге ишемии, прежде всего в нейронах, возникают некробиотические повреждения, где наряду с простым цитолизом и острым набуханием можно выявить нейроны с гиперхроматозом и тяжелыми дест-

**Для корреспонденции:** Романова Галина Александровна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. ишемических повреждений мозга ФГБУ «НИИОПП РАМН». E-mail: romanovaga@mail.ru

руктивными процессами. В этот период в пограничной с некротическим очагом зоне (пенумбре), помимо отека, отмечаются изменения нейронов, где наряду с погибшими (ацидофильными) клетками присутствуют нормальные неизмененные нейроны, а также гиперхромные нейроны, которые на более поздних сроках либо восстанавливаются, либо погибают. Избыточное высвобождение и нарушение обратного захвата глутамата, ведущее к внутриклеточному накоплению кальция, действует эксайтотоксически и обуславливает гибель нейронов при ишемических повреждениях мозга.

Целью исследования было изучение образования Глу-АТ в сыворотке крови крыс при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры мозга и сравнение влияния интраназального введения Глу-АТ и нейропротектора семакса на сохранение условного рефлекса пассивного избегания, выработанного до ишемического повреждения коры.

### Методика

Все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями, сформулированными в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований. Работа выполнена на 50 самцах беспородных крыс массой 200—250 г, выращенных в виварии ФГБУ Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии РАМН. Животных содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде и двенадцатичасовом световом режиме (освещение — с 7:00 до 19:00).

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 [13] создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [16]. Операцию проводили под общим наркозом (хлоралгидрат в дозе 300 мг/кг, внутривенно). После введения фотосенсибилизируемого 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 роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали холодным светом каждое из полушарий мозга в течение 20 мин. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Все взятые в эксперимент животные были разделены на две серии. В первой серии (n=24) изучали образование антител к глутамату (Глу-АТ) в сыворотке крови после воспроизведения двустороннего ишемического инфаркта префронтальной коры головного мозга через 1 час, 4 и 8 сут. после операции.

Глу-АТ в сыворотке крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на полистироловых 96-луночных планшетах, сенсибилизированных тест-антигеном. В качестве тест-антигена использовали конъюгат глутамата с БСА (бычьим сывороточным альбумином), синтезированный модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида [14]. Тест-антиген вносили в объеме 100 мкл в лунки планшета («Costar», USA) в конечной концентрации 0,3 мкг/лунка. Через 18 часов инкубации при 4°C планшеты 3—4 раза промывали физиологическим раствором с 0,05% Твином-20. Образцы сывороток инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,4) с 0,05% Твином-20 в объеме 100 мкл, используя 10-кратные разведения, начиная с разведения 1:10. После инкубации планшеты промывали и обрабатывали вторичными антителами к IgG крысы, меченные пероксидазой хрена, в разведении 1:2000. После часовой инкубации планшеты отмывали и в лунки добавляли по 100 мкл субстратной смеси, содержащей 10 мл 0,2 М раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 10 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты, 8 мг о-фенилдиамина («Sigma», USA), 8 мкл 33% раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. После часовой инкубации в темноте при комнатной температуре реакцию останавливали 6N. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Содержание антител в каждой лунке оценивали по оптической плотности сыворотки при λ=495 нм с использованием считывающего устройства «Mini-reader» («Dynatech») и выражали в условных единицах активности — показателем, представляющим собой отношение оптической плотности сыворотки каждой крысы к среднему значению оптической плотности сывороток контрольных крыс. Если значение этого отношения превышало 1,0, делали вывод о наличии антител в сыворотках крови.

Глу-АТ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат-БСА [14]. Титр Глу-АТ, определяемый методом иммуноферментного анализа, составил 1:1000. γ-глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом переосаждения сульфатом аммония, лиофилизировали и хранили при 4°C.

Во второй серии исследований было 5 групп:

- 1) ложнооперированные — ЛО (n=9);
- 2) крысы с двусторонним ишемическим инфарктом префронтальной коры головного мозга, которым

через 1 ч после операции, а далее ежедневно в течение 6 суток вводили интраназально по  $7 \times 2$  мкл дистиллированной воды — Иш +  $H_2O$  ( $n=9$ );

3) животные, которым через 1 ч после операции вводили интраназально водный раствор Глу-АТ в дозе 250 мкг/кг — Иш + Глу-АТ ( $n=9$ );

4) животные, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего  $\gamma$ -глобулина от интактных животных по той же схеме и в той же дозе — Иш +  $\gamma$ -ГЛ ( $n=7$ );

5) животные, которым вводили интраназально ежедневно в течение 6 суток семакс ( $7 \times 2$  мкл) в дозе 250 мкг/кг — Иш + семакс ( $n=7$ ). Введение семакса прекращали за двое суток до проверки сохранения УРПИ.

Всех животных проверяли на сохранение УРПИ через 8 суток после операции.

Оценку функционального состояния ЦНС крыс проводили по показателям латентного периода (ЛП с) условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Выработку УРПИ осуществляли по методике [2] в челночной камере отечественного производства Биотест РК-5201. УРПИ считали выработанным, если ЛП УРПИ составлял 300 с, животных с меньшими показателями исключали из эксперимента.

Объем очага повреждения коры фотоиндуцированным тромбозом определяли по формуле:

$$V = \Sigma(S_n d),$$

где:

$d$  — толщина пары срезов (200 мкм);

$S_n$  — измеренная площадь ишемического очага серийного среза ( $mm^2$ );

$\Sigma$  — сумма объемов ишемического повреждения.

#### Статистические методы обработки данных

Полученные данные обрабатывали при помощи пакета прикладных программ Statistica. Несколько групп сравнивали по одному признаку при помощи непараметрического метода сравнения независимых групп (метод Краскела—Уоллиса). Если этот анализ выявлял уровень значимости 0,05 или меньше, то парное сравнение между группами проводили, используя метод Манна—Уитни (сопоставление двух групп по одному или нескольким количественным признакам, имеющим хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального). Различия в пределах каждой группы между дооперационными и послеоперационными показателями оценивали по парному Т-критерию Вилкоксона. Полученные данные представлены в виде  $M \pm m$ .

## Результаты и обсуждение

Использование фармакологических препаратов, оказывающих нейропротективное действие, способствует репаративным процессам в области пенумбры, снижает степень ишемического повреждения мозговой ткани и корректирует возникшие функциональные нарушения. Одним из механизмов иммунологической защиты от токсического действия глутамата на нейроны может быть образование антител к нему, вырабатывающихся в ответ на его избыточное высвобождение в ЦНС. В настоящее время показано образование антител к глутамату (Глу-АТ) при нейродегенеративных повреждениях головного мозга [4].

Ранее было показано, что фотохимически индуцируемый двусторонний тромбоз кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага (рис. 1), который захватывает всю толщину коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей [6, 7].

При исследовании содержания Глу-АТ в сыворотках крови крыс с фокальным ишемическим очагом в префронтальной коре через 1 ч, на 4 и 8 сут. после фототромбоза по сравнению с ложноперирированными животными были выявлены существенные различия между группами (рис. 2). Через 1 ч после фототромбоза уровень Глу-АТ не отличался от контрольных ложноперирированных животных и сохранялся на этом уровне и на 4 сут. после операции. На 8 сут. в сыворотке крови крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры резко возросло содержание Глу-АТ, что связано с реакцией иммунной системы на усиленную продукцию глутамата при развитии ишемического повреждения и проявляется повышенной выработкой антител.

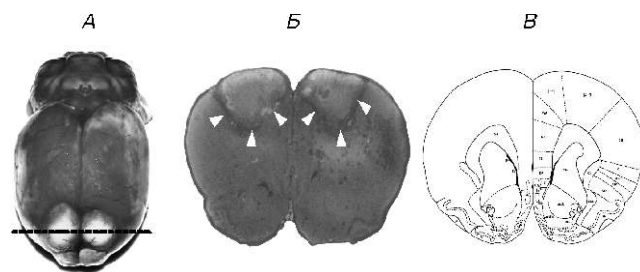
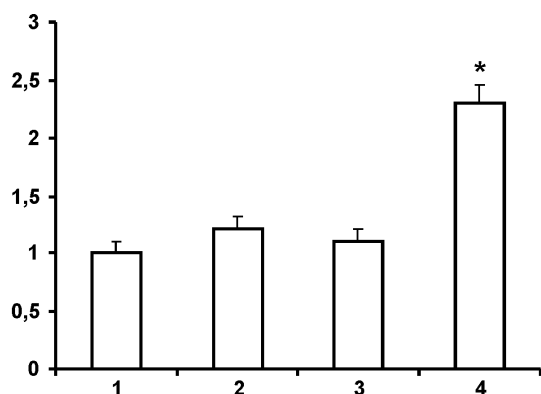


Рис. 1. Симметричные очаги ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы через 8 суток после фототромбоза:

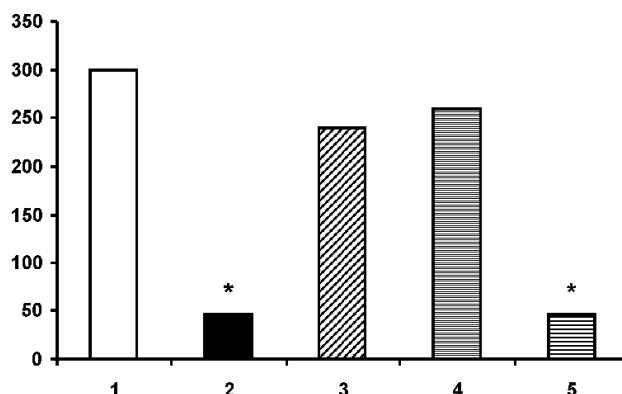
А — окрашивание мозга трифенилтетразолия хлоридом; пунктирная линия показывает место среза, соответствующее приведенной схеме на рис. 1 В (2,2 мм от брегмы);

Б — окрашивание среза мозга крезилловым фиолетовым. Стрелки область очагов ишемии;

В — схема расположения префронтальной области мозга (поля Fr 1 и Fr 2) согласно стереотаксическому атласу [13]



**Рис. 2.** Уровень Глу-АТ в сыворотке крови крыс (усл.ед.) при двустороннем фототромбозе префронтальной коры мозга крыс: 1 – ложнооперированные; 2 – через 1 ч после ишемического повреждения; 3 – на 4-е сутки после ишемического повреждения; 4 – на 8-е сутки после ишемического повреждения.  $P < 0,05$  по сравнению с ложнооперированными



**Рис. 3.** Влияние интраназального введения АТ-Глу на сохранение УРПИ (с) у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры мозга: 1 – ложнооперированные; 2 – ишемическое повреждение; 3 – интраназальное введение семакса + ишемическое повреждение; 4 – интраназальное введение АТ – Глу + ишемическое повреждение; 5 – интраназальное введение гамма-глобулина + ишемическое повреждение

Полученные результаты по изменению уровня Глу-АТ при создании в префронтальной коре головного мозга животных ишемического очага позволили предположить, что введение Глу-АТ сразу после ишемического повреждения может способствовать снижению эксайтотоксичности и улучшению когнитивных функций. В качестве способа доставки Глу-АТ в головной мозг был выбран интраназальный путь, позволяющий быстро доставить антитела непосредственно в мозг [15]. Глу-АТ вводили в острый период эксайтотоксичности глутамата, когда еще очень низок уровень эндогенных антител, т.е. через 1 ч после проведения операции по воспроизведению фотохимического тромбоза сосудов коры. Интрана-

зальное введение Глу-АТ в дозе 250 мкг/кг через 1 ч после операции способствовало сохранению уровня ЛП УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры на уровне ложнооперированного контроля при проверке сохранения на 8-е сут. после ишемического повреждения (таблица). Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина от интактных кроликов не оказывало влияния на потерю выработанного до ишемии УРПИ (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о выраженном протективном действии Глу-АТ при остром нейродегенеративном повреждении мозга, возможно, благодаря их способности снижать накопление глутамата и тем самым предотвращать гибель нейронов.

**Сравнительная оценка нейропротективного и антиамнестического действия АТ-ГЛУ и Семакса на модели фотохимического инсульта**

Таблица

Действующие вещества	АТ-ГЛУ, 0,25 мг/кг, и/н, n=9	Семакс, 0,25 мг/кг и/н, n=7
<b>Нейропротекция</b>		
Объем очага при тромбозе в контроле, $V_0$ мм <sup>3</sup>	14	15
Объем очага при тромбозе в опыте, $V_E$ мм <sup>3</sup>	10*	11*
Эффективность лечения, E (%)	28,5	26,7
<b>Антиамнестическое действие</b>		
ЛП ложнооперированных животных, с	300	300
ЛП контрольных животных с фототромбозом, с	50	50
ЛП опытных животных с фототромбозом и веществом, с	260*	240*
Эффективность лечения, A(%)	84	76

Примечание. и/н – интраназально; n – число животных; ЛП – латентный период захода в темную камеру при проверке сохранения на 8-й день после операции. Эффективность лечения рассчитывалась по формуле:

$$E(\%) = 100 \cdot (V_E - V_0) / V_0;$$

$p < 0,05$  по сравнению с контролем;

$$A(\%) = 100 \cdot (\text{ЛП} - \text{ложнооперированные}) - \text{ЛП} (\text{фототромбоз с веществом}) / \text{ЛП} (\text{ложнооперированные}) - \text{ЛП} (\text{фототромбоз})$$

\*  $P < 0,05$  по сравнению с активным контролем

Как препарат сравнения нами был выбран лекарственный препарат «Семакс», который в настоящее время получил большое распространение в отечественной медицинской практике. Он был создан на основе синтетического пептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, являющегося аналогом фрагмента АКТГ(4-10). Было показано, что семакс стимулирует процессы обучения и формирования памяти и обладает нейропротективными свойствами [1].

В опытах на животных при глобальной ишемии мозга, вызванной окклюзией двух сонных артерий, внутрибрюшинное введение семакса уменьшало выраженность неврологических нарушений и увеличивало выживаемость животных [11]. Кроме того, семакс способствовал восстановлению поведенческих реакций, нарушенных после введения крысам 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) — нейротоксина, избирательно повреждающего дофаминэргические нейроны черной субстанции [12]. Оценку нейропротективного действия семакса проводили на 8-е сутки после воспроизведения коркового инфаркта. Схема введения семакса животным предусматривала возможность его воздействия на процессы, происходящие как в острый период, так и на более поздних сроках ишемии. Введение препарата прекращали за 48 ч до тестирования, чтобы исключить его кратковременные эффекты, влияющие на память и поведение.

Через 8 сут. после индукции коркового инфаркта сравнивали объемы повреждения у групп животных, которым в течение 6 сут. вводили интраназально водный раствор семакса в дозе 250 мкг/кг в сутки с группой, которой по той же схеме вводили дистиллированную воду. Из представленных в таблице данных видно, что введение семакса приводило к уменьшению объема инфаркта в среднем на 26,7% ( $p < 0,05$ ).

Через 8 сут. после фототромбоза коры были также выявлены значительные изменения в поведении животных. Значения ЛП УРПИ снижались по сравнению с исходным уровнем (рис. 3). Систематическое введение семакса животным (250 мкг/кг в сутки, интраназально) после создания двустороннего локального ишемического очага значительно облегчало сохранение и воспроизведение УРПИ (рис. 3) — эффективность антиамнестического лечения составила 76%. Таким образом, были подтверждены полученные ранее данные о нейропротективном и ноотропном действии производного нейропептида АКТГ(4-10) — семакса [8].

Проявление такого действия через 48 ч после отмены семакса свидетельствует о формировании устойчивых изменений, которые могут быть связаны как с уменьшением степени повреждения корковых

структур, так и с изменениями на уровне медиаторных, метаболических или трофических систем.

Полученные результаты указывают на наличие у семакса выраженного нейропротективного и антиамнестического действия при фокальной ишемии коры головного мозга. В основе обнаруженных эффектов может лежать способность семакса снижать активацию провоспалительных реакций, вызванных ишемией [5], и предотвращать гибель нейронов [10]. Эти данные следует рассматривать также как одно из важных экспериментальных доказательств обоснованности использования лекарственного препарата семакса в остром периоде ишемического инсульта головного мозга.

Таким образом, представленные экспериментальные данные сравнительного анализа нейропротективного и ноотропного эффектов АТ-ГЛУ и хорошо изученного лекарственного препарата семакса на модели фотохимически индуцируемого двустороннего тромбоза кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс свидетельствуют о выраженном протективном действии как семакса, так ГЛУ-АТ при остром нейродегенеративном ишемическом повреждении мозга. Возможно такое сходное коррегирующее действие исследованных веществ обусловлено влиянием на основные молекулярно-биохимические механизмы нейродегенерации, лежащие в основе ишемического повреждения мозга, регуляторное влияние на которые способствует восстановлению их нормального баланса и таким образом сокращению размеров инсульта и улучшению неврологических показателей.

### Список литературы

1. *Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф.* и др. Ноотропный аналог адренорекортикотропина 4-10 семакс (15-летний опыт разработки и изучения) // Журн. высш. нерв. деят. — 1997. — Т. 47, №2. — С. 420—430.
2. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.Р.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высш. Шк., 1991. — 399 с.
3. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М., 2001. — 501 с.
4. *Евсеев В.А.* Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии. — М.: Изд. РАМН, 2007. — 144 с.
5. *Мясоедов Н.Ф., Скворцова В.И., Насонов Е.Л.* и др. Исследование механизмов нейропротекторного действия семакса в острый период ишемии // Журн. невропсихиатр. — 1999. — №5. — С. 15—31.
6. *Романова Г.А., Барсков И.В., Островская Р.У.* и др. Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двусторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры мозга крыс // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1998. — №2. — С. 8—10.

7. *Романова Г.А.* Дизрегуляционная патология / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М., 2002. — С. 605—615.

8. *Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М., Кващенко Ю.Н., Викторов И.В., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф.* Нейропротективное и антиамнестическое действие пептида семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 618—621.

9. *Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю., Кващенко Ю.Н., Давыдова Т.В.* Влияние антител к глутамату на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261—264.

10. *Сафарова Э.Р., Шрам С.И., Золоторев Ю.А., Мясоедов Н.Ф.* Действие пептида семакса в культуре клеток рhesoscytoma во время оксидативного стресса // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №3. — С. 309—313.

11. *Яковлева Е.В., Кузенков В.С., Федоров В.Н.* и др. Исследование эффективности семакса при глобальной ишемии мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1999. — Т. 128, №3. — С. 172—174.

12. *Levitskaya N.G., Sebentsova E.A., Andreeva L.A.* et al. The neuroprotective effects of Semax in conditions of

MPTP -induced lesions of the brain dopaminergic system // *Neurosci. Behav. Physiol.* — 2004. — Vol. 34, №4. — P. 399—405.

13. *Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 3<sup>rd</sup> ed. / Paxinos G., Watson C. — San Diego, 1997.

14. *Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moat M.* Antibodies against gamma-aminobutyric acid specificity studies and immunocytochemical results // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, №12. — P. 3888—3892.

15. *Talegaonkar S., Mishra P.R.* Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier // *Indian J. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 36. — P. 140—147.

16. *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 12.03.2012

#### Сведения об авторах:

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

*Давыдова Татьяна Викторовна*, главн. науч. сотр. лаб. нейроиммунологии ФГБУ «НИИОПП» РАМН