

УДК 577.3

КОРТЕКСИН И НИТРИТ В СОЧЕТАНИИ С КОРТЕКСИНОМ УМЕНЬШАЮТ ОТЕК И РАЗРУШЕНИЕ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

© 2009 г. В. П. Реутов, Н. В. Самосудова, Н. А. Филиппова, А. Л. Крушинский,
В. С. Кузенков, Е. Г. Сорокина, В. Г. Пинелис, О. К. Гранстрем, Н. П. Ларионова,
член-корреспондент РАН Л. М. Чайлахян

Поступило 27.01.2009 г.

Передача сигналов от нейрона к нейрону, как известно, осуществляется посредством нейромедиаторов, которые, выделяясь из синаптических пузырьков и взаимодействуя с соответствующими постсинаптическими рецепторами, осуществляют передачу импульса в химическом синапсе. Однако возможен и другой тип передачи, когда, диффундируя в межклеточных пространствах, нейромедиаторы связываются с внесинаптическими рецепторами. Этот тип передачи сигналов считается эволюционно более древним и его нередко называют нейромодуляторным. В настоящее время известно, что эндогенные пептиды, являющиеся сигнальными агентами в межнейрональной и нейроэффektorной передаче, могут выполнять функцию нейромодуляторов, нейротрансмиттеров и физиологически активных веществ, оказывающих церебропротекторное и противосудорожное действие [1]. Таким же действием обладает и оксид азота (NO), если его концентрация не превышает пределов физиологической формы [1, 2].

Имеются многочисленные исследования, свидетельствующие о том, что пептиды и, в частно-

сти пептидный препарат – кортексин, способны оказывать положительное влияние на процессы адаптации организма в экстремальных стрессовых ситуациях [3–5]. Кортексин обладает тканеспецифическим действием на кору головного мозга и оказывает церебропротекторное, противосудорожное и ноотропное действие [3, 5]. Защитным действием так же обладает и NO-генерирующее соединение – нитрат Na, если его вводить в относительно низких дозах (0.5 мг/100 г массы тела), которые не вызывают образования дополнительного количества метгемоглобина [6–8]. В связи с тем, что кортексин часто назначают больным, хронически принимающим сосудорасширяющие нитропрепараты, целесообразно было исследовать влияние как самого кортексина, так и кортексина в сочетании с нитритами на ультраструктуру нейронов мозжечка крыс, у которых акустический стресс вызывал развитие геморрагического инсульта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали крыс-самцов в возрасте 4.5 мес. линии Крушинского–Молодкиной. Стандартизацию животных осуществляли отбором крыс линии КМ по возрасту, массе тела, полу. Опыты по изучению влияния пептида кортексина на развитие геморрагического инсульта были проведены на 26 крысах-самцах массой 260 ± 40 г. Животные были разделены на 2 группы. Опытные животные получали нейропептид кортексин, растворенный в физиологическом растворе в дозе 0.2 мг/1000 г, внутрибрюшинно в течение 10 сут. Крысы содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, с естественной сменой дня и ночи, $t = 20^\circ\text{C}$, по 6–7 животных в клетке. Предварительно внутрибрюшинно вводили кортексин в течение 10 суток тринадцати опытным крысам линии КМ. Группа контрольных животных (13 крыс) получала в это же время в виде внутрибрюшинных инъекций физиологический раствор в эквивалентном объеме.

*Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии
Российской Академии наук, Москва
Институт проблем передачи информации
им. А.А. Харкевича
Российской Академии наук, Москва
Онкологический научный центр
Российской академии медицинских наук, Москва
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова
Национальный центр здоровья детей
Российской академии медицинских наук, Москва
ООО “Герофарм”, Санкт-Петербург
Институт теоретической и экспериментальной
биофизики
Российской Академии наук, Пушкино Московской обл.*

Моделирование нарушений мозгового кровообращения геморрагического типа проводили по стандартной схеме [9]. Крыс линии КМ помещали в камеру и подвергали действию звонка по следующей схеме: звуковое раздражение начинали с 1.5-минутного непрерывного воздействия сильного электрического звонка (110–115 дБ); затем в течение 15 мин следовала серия чередующихся сильных и слабых (80–90 дБ) звуковых сигналов длительностью 10 с с 10-секундными интервалами между ними; далее следовал трехминутный перерыв, в течение которого звонок в экспериментальной камере был выключен; после трехминутного перерыва в камере снова включали звонок, который непрерывно давал в течение 1 мин сильный звуковой сигнал (110–115 дБ).

Сразу после окончания экспериментов животных декапитировали, а мозжечки выделяли из мозга и фиксировали. Фиксацию осуществляли 2.5%-ным раствором глутарового альдегида, приготовленном на 0.1 М Na-какодилатном буфере pH 7.2, содержащем 0.5% таниновой кислоты и 3% сахарозы. Далее материал дофиксировали в 1%-ном OsO₄ pH 7.2 в том же буфере в течение 1 ч при 4°C. Материал обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации, абсолютном спирте и ацетоне с последующим заключением в смесь эпон-812 и аралдита по методике, описанной в работах [10]. Срезы окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Просмотр срезов осуществляли с помощью электронного микроскопа JEM-1200EX-11 (Япония) при ускоряющем напряжении 90 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали пограничный слой зернистых клеток и клеток Пуркинье в трех группах животных. На рис. 1а представлены зернистые клетки (ЗК) мозжечка, выделенного из мозга группы животных, получавших физиологический раствор после акустического стресса. Ядра этих клеток характеризуются плотными сгустками примембранного и центрального хроматина. В цитоплазме клеток отсутствуют неповрежденные митохондрии, цистерны эндоплазматического ретикула (ЭР), рибосомы, шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР). Такая картина разрушения клеток – следствие отека, который, как правило, развивается в условиях геморрагического инсульта. Другие клеточные структуры, например терминалы дендритов ЗК, также характеризуются набуханием митохондрий (МХ), а в некоторых имеются локальные разрушения мембран (рис. 1б).

В мозжечке опытной группы крыс, получавших кортексин, отмечены существенные изменения, свидетельствующие о положительном влия-

нии этого пептида на нейроны мозжечка крыс линии КМ. На рис. 1в представлены ЗК мозжечка крыс, получавших кортексин. В отличие от контрольной группы животных, получавших физиологический раствор, ЗК мозжечка не имеют столь ярко выраженного набухания клеток, в них сохраняются митохондрии и цепочки рибосом ЭР.

В мозжечке опытной группы крыс, получавших кортексин и нитрит, также отмечены изменения, свидетельствующие о том, что сочетание кортексина и нитрита может в значительной степени улучшить структуру ЗК мозжечка. На рис. 1г представлены ЗК мозжечка крыс из третьей серии экспериментов. Ядра ЗК не претерпевают существенных изменений: глыбки хроматина более или менее равномерно распределены по ядру. В цитоплазме ЗК можно видеть митохондрии, ЭР, цепочки рибосом, ШЭР. Также хорошо сохраняются дендриты ЗК, их митохондрии, а также структура терминалей мшистых волокон (МШВ). Особо следует сказать о структуре МШВ. В первой серии экспериментов на поперечных сечениях МШВ можно видеть повреждения (“разволокнение”) миелиновой оболочки и гибель нейрофиламентов (рис. 1а). Таких изменений было меньше во второй серии экспериментов и практически совсем мало в третьей серии экспериментов. Таким образом, вывод, который можно сделать на основании полученных данных, состоит в том, что кортексин и нитрит в сочетании с кортексином способны предотвращать отек ЗК и разрушение структуры нервных клеток при геморрагическом инсульте.

Естественно возникает вопрос: каковы механизмы защитного действия кортексина на крыс линии КМ, генетически предрасположенных к геморрагическому инсульту и аудиогенных в условиях звукового стресса? В настоящее время известно, что нейропептиды, взаимодействуя со своими пептидэргическими рецепторами, способны влиять на генерацию NO в мозге и миокарде млекопитающих [2–4], а NO в свою очередь активизирует процессы заживления ран и другие повреждения различных тканей [11]. Это влияние может опосредоваться ионами Ca²⁺, которые, активируя конститутивные NO-синтазы, повышают концентрацию NO и продуктов его метаболизма [2, 3].

Исследование действия различных NO-генерирующих соединений позволили сделать некоторые выводы, которые могут указывать на следующие механизмы благотворного действия NO: 1) снижение артериального давления у животных вследствие вазодилаторной активности NO-генерирующих соединений [6, 12]; 2) улучшение доставки кислорода вместе с током крови и снижение тем самым гипоксии/ишемии [6, 13]; 3) перераспределение белков из цитоплазмы клеток в

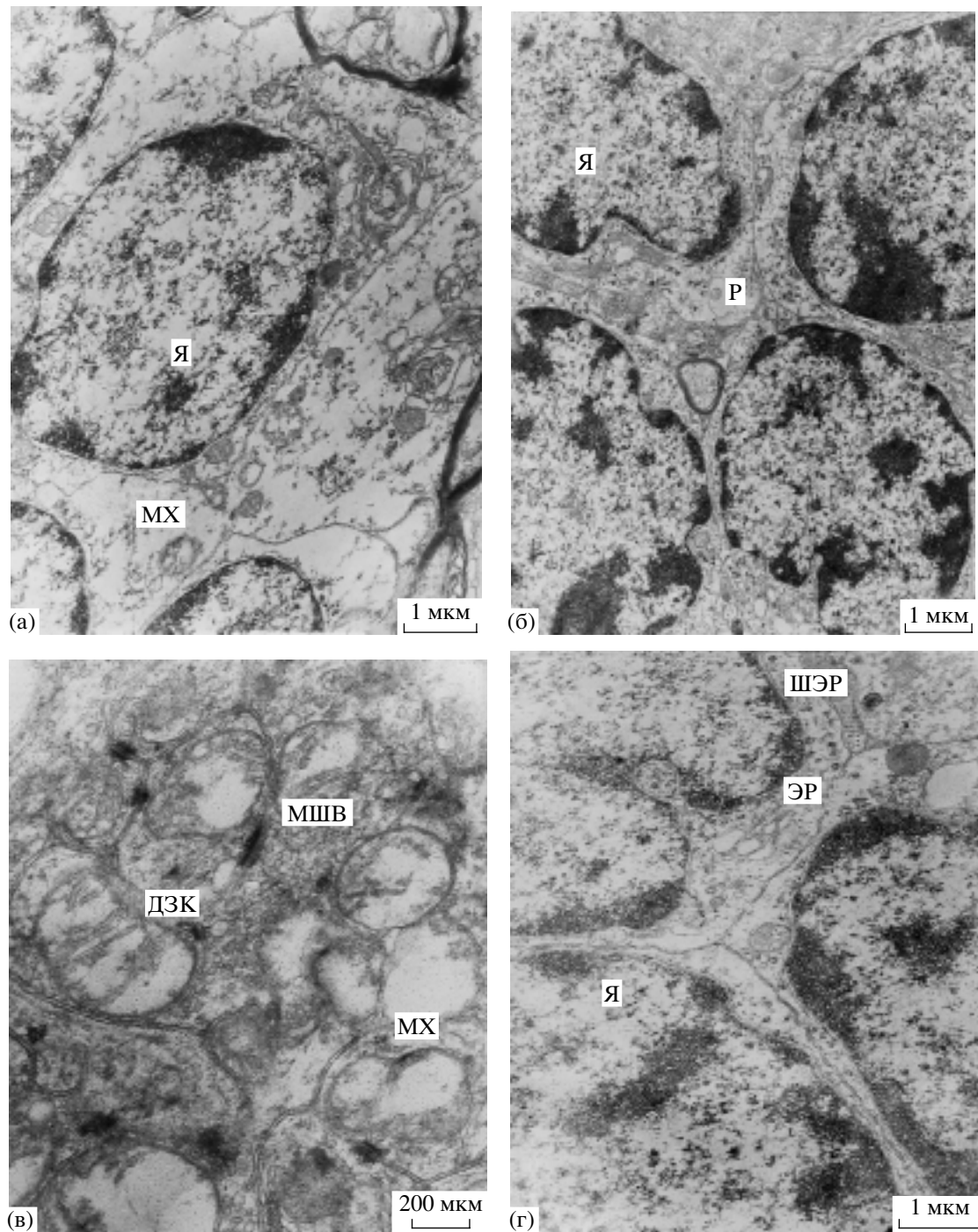


Рис. 1. Влияние введения физиологического раствора (а, б), кортексина (в) и нитрита в сочетании с кортексином (г) на ультраструктуру зернистых клеток мозжечка крыс линии КМ при геморрагическом инсульте, вызванном акустическим стрессом. ДЗК – дендрит зернистой клетки, МХ – митохондрия, МШВ – мшистое волокно, Р – рибосомы, ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Я – ядро; а – зернистая клетка мозжечка (контроль – вводили физиологический раствор); обнаруживается набухание цитоплазмы, повреждение МХ, ЭР, миелиновой оболочки и нейрофиламентов МШВ; б – синаптический контакт мшистого волокна с дендритом зернистых клеток мозжечка (контроль – вводили физиологический раствор); митохондрии ДЗК значительно повреждены; в – зернистые клетки мозжечка после предварительного введения кортексина; отек клетки не обнаруживается, видна хорошая сохранность Я, цитоплазмы и цитоплазматических органелл, в цитоплазме видны цепочки рибосом; г – зернистые клетки мозжечка после предварительного введения нитрита в сочетании с кортексином, отмечается хорошая сохранность ЗК, видны цистерны ЭР и ШЭР.

мембранно-связанное состояние и уменьшение вероятности повреждения (окисления) наиболее уязвимых компонентов мембран клеток и субклеточных структур – ненасыщенных жирных кислот [13]; 4) способность ионов NO_2^- , образующихся из NO или поступающих вместе с лекарственными препаратами, продуктами питания и водой, акцептировать электроны с дыхательной цепи митохондрий и тем самым повышать содержание АТФ в нейронах [14]. И, наконец, следует еще раз подчеркнуть, что активация пептидэргических рецепторов, как правило, сопряжена с мобилизацией ионов Ca^{2+} , активацией конститутивных NO-синтаз, изменением содержания NO и продуктов его метаболизма [2–4]. В последние годы стали появляться работы, которые свидетельствуют о том, что существует феномен дистантного ишемического preconditionирования [15]. Суть этого феномена сводится к тому, что после 1–3 сеансов кратковременной ишемии-реперфузии мозг и миокард становятся более устойчивыми к действию длительной ишемии-реперфузии. Последовательность событий и механизмов, включающихся в клетках органов при феномене дистанционной ишемии-реперфузии до конца еще не ясны, но уже сейчас с уверенностью можно говорить, что в эффектах дистанционного ишемического preconditionирования принимают активное участие пептиды, ядерный фактор NF κ B и NO [15]. Учитывая все эти данные, представляется целесообразным в дальнейшем более детально рассмотреть возможность сочетанного и раздельного применения пептидных препаратов, в том числе и кортексина, на фоне действия NO-генерирующих соединений или ингибиторов NO-синтаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А.* От нейрона к мозгу. М.: Едиториал УРСС, 2003. 672 с.
2. *Garthwaite J.* // Trends Neurosci. 1991. V. 14. № 2. P. 60–67.
3. *Brain S.D., Cox H.M.* // Brit. J. Pharmacol. 2006. V. 147. (S. 1) S. 202–211.
4. *Das D.K., Kalfin R., Maulik N., Engelman R.M.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. V. 865. P. 297–308.
5. *Скорыходов А.П.* В кн.: Кортексин – пятилетний опыт отечественной неврологии. СПб.: Наука, 2006. С. 68–81.
6. *Реутов В.П., Кузенков В.С., Крушинский А.Л. и др.* // Вести нац. академии наук Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2002. № 1. С. 5–10.
7. *Крушинский А.Л., Реутов В.П., Кузенков В.С. и др.* // Изв. РАН. Сер. биол. 2007. № 37 С. 329–335.
8. *Фадюкова О.Е., Кузенкова В.С., Реутов В.П. и др.* // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2005. Т. 91. № 1. С. 89–96.
9. *Крушинский Л.В.* Формирование поведения животных в норме и патологии. М.: Наука, 1960. 360 с.
10. *Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П., Чайлахян Л.М.* // Цитология. 2005. Т. 47. № 3. С. 214–219.
11. *Шехтер А.Б., Грачев С.В., Милованова З.П. и др.* В кн.: NO-Терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. М.: Русский врач, 2001. 192 с.
12. *Манухина Е.Б., Машина С.Ю., Власова М.А. и др.* В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. М.; Воронеж: Истоки, 2004. С. 138–155.
13. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С.* циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1998. 156 с.
14. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Сенилова Я.Е. и др.* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007. № 4. С. 419–422.
15. *Li G., Labruto F., Sirsjo A. et al.* // Europ. J. Cardiothorac. Surg. 2004. V. 26. № 5. P. 968–973.