

ISSN 1682-0363

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Приложение 2

2008

Влияние кортексина на структурно-функциональное состояние межнейронных синапсов развивающейся коры большого мозга белых крыс после внутриутробной острой ишемии

Правдухина Г.П.

Influence of cortexin on structural-functional state of interneuronic synapses of developing cerebral cortex in white rats after acute prenatal ischemia

Pravdukhina G.P.

Омская государственная медицинская академия, г. Омск

Омский НИЦ СО РАМН, г. Омск

Медицинская академия последипломного образования, г. Санкт-Петербург

© Правдухина Г.П.

Введение

Изучение закономерностей развития пато- и саногенетических структурных изменений межнейронных синаптических контактов различных отделов головного мозга в процессе онтогенеза после его ишемического повреждения имеет большое теоретическое и практическое значение. Это связано с тем, что ишемия существенно влияет на формирование объемной нейронной сети головного мозга, а следовательно, и на формирование его функциональных систем [6]. Несмотря на актуальность проблемы защиты незрелого головного мозга в постишемическом периоде, исследований, направленных на изучение закономерностей становления межнейронных отношений, проведено недостаточно. Особенно мало информации о специфических особенностях реализации пато- и саногенетических механизмов незрелого мозга в отдаленном пост-ишемическом периоде. Отсутствуют данные об эффективности целого ряда препаратов, которые уже давно применяются для защиты зрелого мозга. Так, в настоящее время очень большое внимание уделяется активаторам и ингибиторам эффектов нейромодуляторных факторов (регуляторные пептиды), которые рассматриваются как медиаторы и модуляторы синаптической активности [1]. В этой связи перспективным для предупреждения ишемического повреждения головного мозга является использование компонентов

регуляторного континуума мозга — пептидных биорегуляторов. Достаточно эффективным препаратом этого класса является кортексин, который представляет собой комплекс полипептидов с молекулярной массой от 1 000 до 10 000 Да. В составе препарата преобладают глутаминовая, аспарагиновая кислоты, пролин и аланин. Нейропротекторный эффект кортексина обусловлен его антиоксидантной и ноотропной активностью, регуляцией соотношения тормозных и возбуждающих аминокислотных нейромедиаторов, а также ГАМК-ергическим действием [2, 4].

Кортексин оказывает модулирующее действие практически на все нейромедиаторные системы головного мозга, стабилизируя их функциональное состояние. Действие кортексина на синапсы и нейроны обусловлено, вероятно, посредством многочисленных рецепторов пептидергической системы мозга [2].

Имеются данные о положительном клиническом эффекте применения кортексина при закрытой черепно-мозговой травме, эпилепсии, органических психических и интеллектуально-мнестических расстройствах, острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения, головных болях напряжения, нейроинфекции и различных экстремальных воздействиях [2, 4].

Цель настоящего исследования — изучение влияния кортексина на структурно-функциональное состояние межнейронных синаптических контактов развивающейся

коры большого мозга белых крыс, перенесших острую внутриутробную ишемию, и экспериментальное обоснование целесообразности применения этого препарата для защиты незрелого головного мозга в клинической практике.

Материал и методы

Для решения поставленных в работе задач формировались две статистические гипотезы: нулевая гипотеза H_0 — гипотеза об отсутствии эффекта постиншемического использования кортексина на динамику структурно-функциональных изменений синапсов (нет различий изученных параметров между группами) и альтернативная гипотеза H_1 — гипотеза о существовании эффекта данного способа защиты головного мозга (есть различия изученных параметров между группами).

Острая внутриутробная ишемия головного мозга моделировалась путем 15-минутной окклюзии магистральных артерий матки на 18-е сут эмбриогенеза (Барашкова С.А., 1998). Соблюдались правила гуманного обращения с животными (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977), эксперимент проводили под эфирным наркозом. Животным основной группы (группа I, $n = 25$) после рождения в хвостовую вену вводили кортексин в дозе 10 мг/кг массы животного. Животным группы сравнения (группа II, $n = 25$) препарат не вводили. Контролем служило потомство ложнопериорированных животных ($n = 5$).

Изучали синаптоархитектонику молекулярного слоя сенсомоторной коры (СМК) большого мозга новорожденных животных в остром периоде (1-е и 3-и сут) и в процессе их созревания — отдаленном (1, 2 мес) постиншемическом периоде. СМК экспериментальных животных фиксировали иммерсионным способом в смеси 4%-го раствора параформальдегида, 1%-го раствора глутарового альдегида, 5%-го раствора сахарозы на фосфатном буфере с концентрацией 0,1 моль ($pH = 7,4$) в течение 3 ч [5].

Для электронной микроскопии ориентированные в виде пирамид кусочки СМК контрастировали в 1%-м растворе четырехоксида осмия и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие (70—100 нм) срезы СМК в тангенциальной плоскости готовили на ультрамикротоме «Ultracut-E» (фирма «Reichert-Jung»), помещали на сетки и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование срезов производили на электронном микроскопе «Hitachi-600H».

У животных обеих групп определяли: 1) общую численную плотность синапсов; 2) содержание деструктивно измененных синапсов; 3) размеры поперечного сечения постсинаптического уплотнения; 4) содержание перфорированных и неперфорированных синапсов.

Статистическую обработку результатов морфометрического анализа проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6 [3]. Проверку гипотез осуществляли непараметрическими методами статистики (ANOVA Краскала—Уоллиса, критерий Колмогорова—Смирнова). Нулевая гипотеза отвергалась, а альтернативная принималась при α -ошибке 0,05 и β -ошибке 0,25. При этом мощность исследования была на уровне 0,7—0,9, что вполне достаточно для получения достоверных данных [3].

Результаты и обсуждение

У новорожденных животных группы II (без кортексина) кратковременная тотальная внутриутробная ишемия приводила к развитию в СМК большого мозга полиморфных структурных изменений межнейронных связей, которые могли быть морфофункциональной причиной патологической реорганизации межнейронных отношений и формирования нетипичных для нормального развития нейронных цепей.

Внутриутробная ишемия приводила к увеличению количества неспециализированных (незрелых, десмосомоподобных) контактов в 1,5—2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Это, вероятно, усиливало механическую прочность межнейронных связей и нарушало процессы миграции созревающих нейронов. Торможение миграции нейронов, вызванное увеличением количества и протяженности адгезивных и коммуникационных межнейронных контактов у животных, перенесших ишемическое воздействие, вызывало разряжение нейронов преимущественно в нижних слоях неокортекса.

В постнатальном периоде у животных группы II (без лечения) выявлялось выраженное повреждение функционально зрелых синапсов по светлому типу деструкции (рис. 2). Это касалось всех типов возбуждающих и тормозных синапсов. Поэтому через 60 сут постнатального периода в СМК животных группы II общая численная плотность синапсов была в 1,7 раза ниже ($p < 0,01$, критерий Колмогорова—Смирнова), чем у животных группы I ($38,8 \pm 2,9$ на 100 мкм^2 нейропилы). На этом фоне отмечалось прогрессивное увели-

чение содержания гипертрофированных (на 25–35%; $p < 0,001$, критерий Колмогорова–Смирнова) и перфорированных (на 18–26%, $p < 0,001$) синапсов. В гипертрофированных синапсах статистически значимо увеличивались площадь терминали (на 15–24%; $p < 0,01$, критерий χ^2), длина (на 16–28%; $p < 0,01$), толщина (на 10–15%; $p < 0,05$) постсинаптического уплотнения и площадь шипика (на 12–28%; $p < 0,01$).

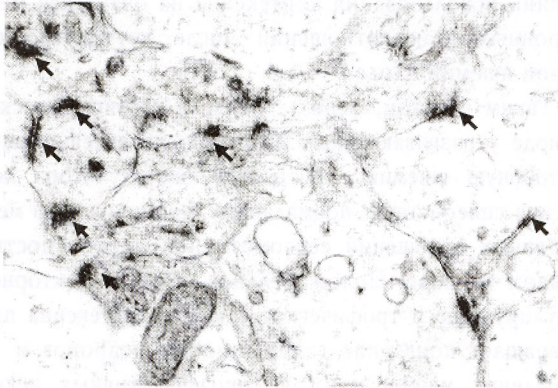


Рис. 1. Увеличение количества десмосомоподобных (функционально незрелых) межнейронных контактов (стрелки) в постинемическом периоде, 21-е сут эмбриогенеза

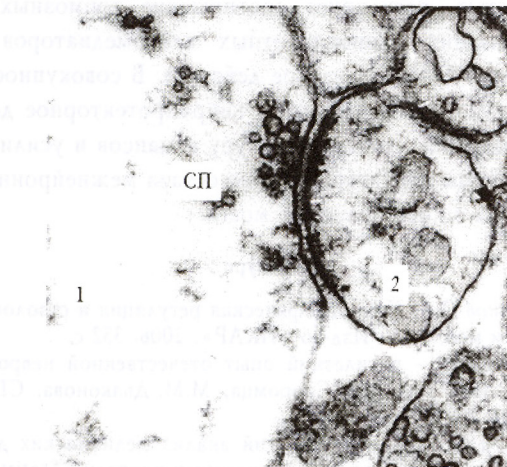
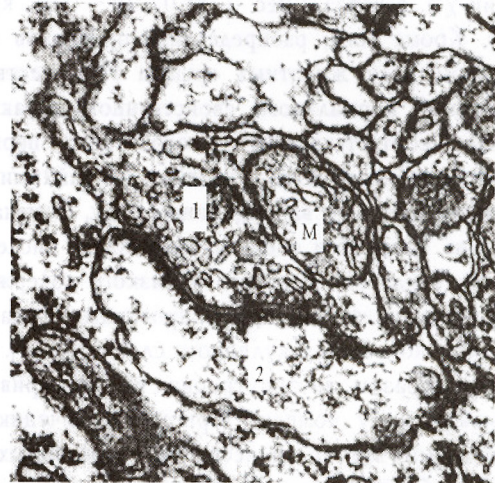


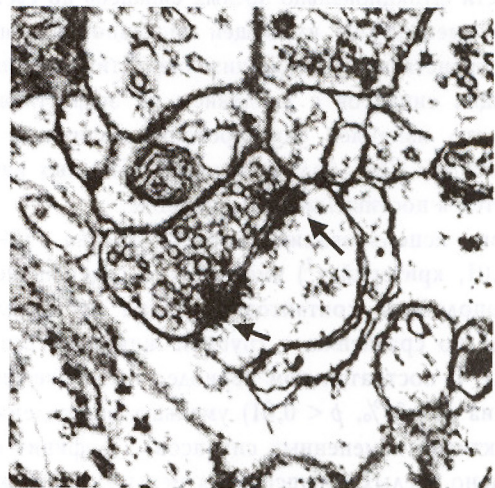
Рис. 2. Светлый (отечный) тип разрушения аксошипового синапса сенсомоторной коры большого мозга белой крысы, 3-и сут после ишемии (постнатальный период). Отек-набухание терминали, агглютинация и разрушение СП, разрушение цитоскелета: 1 — пресинаптическая часть (терминаль); 2 — постсинаптическая часть (шипик) синапса; СП — синаптические пузырьки. Ув. 48 000

Все это свидетельствует о том, что разрушение части синапсов после ишемии приводит к активации сохранившихся межнейронных контактов и, как следствие, включению механизмов гиперплазии, гипертрофии синапса (рис. 3,а), расщепления синаптического контакта на автономные активные зоны с образова-

нием перфорированных синапсов (рис. 3,б). В результате компенсаторной реорганизации синапсов усиливалось дивергентное воздействие на нейрон и увеличивалась эффективность отдельного синаптического входа. Это способствовало переходу нейронов и их синапсов в режим более интенсивного функционирования (аналогичному феномену длительной потенциации). На таком фоне любое дополнительное раздражение мозга неизбежно приводит к появлению признаков его гиперактивности и дестабилизации взаимоотношений тормозных и возбуждающих систем.



а



б

Рис. 3. Постинемическая компенсаторная реорганизация функционально зрелых активно функционирующих синапсов, 60-е сут после ишемии (постнатальный период): а — гипертрофия и положительное искривление плоскости синаптического контакта; б — простой перфорированный синапс с двумя активными зонами (стрелки); 1 — пресинаптическая часть (терминаль); 2 — постсинаптическая часть (шипик) синапса; М — митохондрия. Ув. 35 000

В отдаленном периоде у животных группы II не выявлялась стабилизация структурно-функционального состояния синаптоархитектоники СМК. По данным дисперсионного анализа (ANOVA Краскала—Уоллиса), все параметры в течение 2 мес исследования статистически значимо изменялись в большей степени, чем у животных, получавших кортексин. В наибольшей степени различались общая численная плотность синапсов, содержание деструктивно измененных и перфорированных синапсов. Через 1 мес дефицит синапсов по сравнению с контролем составлял 17,5% ($p < 0,05$, критерий χ^2), а через 2 мес — 15,0% ($p < 0,01$, критерий χ^2). Кроме того, распределение признаков в вариационном ряду животных группы II существенно отличалось от нормального, свойственного интактным животным соответствующего возрастного периода. Увеличивалось количество животных с крайними значениями показателя в вариационном ряду. Отмечались зоны очень высокой и очень низкой общей численной плотности синапсов, высокого и низкого содержания гипертрофированных и перфорированных синапсов, что не типично для молекулярного слоя СМК [6].

Таким образом, внутриутробная ишемия приводит: 1) к выраженному компенсаторному увеличению общей численной плотности неспециализированных десмосомоподобных контактов; 2) деструкции значительной части функционально зрелых синапсов по светлomu типу и уменьшению их общей численной плотности; 3) пространственной реорганизации активно функционирующих синапсов с усилением их эффективности; 4) все это изменяет формирование типичных (нормальных) для СМК большого мозга объемных нейронных сетей в постшемическом периоде.

При использовании кортексина на 50—60% ($p < 0,01$, критерий χ^2) уменьшалось содержание десмосомоподобных контактов в раннем постнатальном периоде по сравнению с группой животных без кортексина. В постнатальном периоде статистически значимо (на 15—25%, $p < 0,01$) уменьшалось содержание деструктивно измененных синапсов, а дефицит функционально зрелых синапсов был меньше, чем у животных без лечения, на 22—28% ($p < 0,01$). Не было выявлено грубых очаговых изменений нейропиля, в меньшей степени проявлялся отек-набухание. В данной

группе животных содержание гипертрофированных и перфорированных синапсов было лишь на 11—15% выше, чем в контроле ($p < 0,05$), что свидетельствовало о меньшей компенсаторной реорганизации сохранившихся синапсов и достаточных резервах синаптического пула СМК при использовании кортексина. Все это позволило отвергнуть нулевую и принять альтернативную статистическую гипотезу о положительном влиянии использования кортексина на онтогенез межнейронных взаимоотношений после внутриутробной острой ишемии плода.

Таким образом, использование в постишемическом периоде у развивающихся животных, перенесших внутриутробную ишемию, пептидного биорегулятора кортексина способствует нормальному формированию межнейронных отношений сенсомоторной коры в постнатальном периоде. Положительное нейропротекторное, модулирующее и трофическое влияние кортексина предотвращает появление гиперактивных нейронов и установление между ними высокоэффективных неконтролируемых связей. Вероятно, это связано с тем, что кортексин обладает антиоксидантной и ноотропной активностью, регулирует соотношение тормозных и возбуждающих аминокислотных нейромедиаторов и оказывает ГАМК-ергическое действие. В совокупности все вышеназванное оказывает нейропротекторное действие, сохраняет ультраструктуру синапсов и усиливает механизмы структурного гомеостаза межнейронных отношений в коре большого мозга.

Литература

1. Гомазков О.А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга. М.: Изд-во «ИКАР», 2006. 332 с.
2. Кортексин — пятилетний опыт отечественной неврологии / Под ред. А.А. Скоромца, М.М. Дьяконова. СПб.: Наука, 2005. 160 с.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М.: МедиаСфера, 2002. 305 с.
4. Рыжак Г.А., Малиши В.В., Платонова Т.Н. Кортексин и регуляция функций головного мозга. СПб.: ИКФ «Фолиант», 2003. 208 с.
5. Семченко В.В., Барашкова С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: Учебное пособие. 2-е изд., стереотип. Омск: Омская мед. акад., 2003. 152 с.
6. Семченко В.В., Степанов С.С., Алексеева Г.В. Постаноксическая энцефалопатия. Омск: Омская област. типография, 1999. 448 с.