

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

БЕЛОРУССКИЙ РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ФОНД
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ

СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

*К 85-летию со дня основания кафедр физиологии
Белорусского государственного университета
и Белорусского государственного
медицинского университета*

Минск
«РИВШ»
2007

612.8.04:612.015 (082)
28.707.3
34

(4 26 2007 .)

:

. . . , . . . \
- . . . ;
- . . . , , /
. . . ;
- . . . , -
. . . ;
- . . . , -
. . . ;
. . . , . . .

34 . . . [. . .]; . . . : . . . /
ISBN-978-985-500-163-9. . . , 2007. - 346 .

« 2007 . , (.) . » (30 - 1 -
(.) -
, -
, , -
, , .

612.8.04:612.015 (082)
28.707.3

ISBN 978-985-500-163-9

©

, 2007

© , 2007

©

. «

», 200

РОЛЬ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ИОНАМИ АММОНИЯ

Жук О.Н., Лукашевич В.С.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Несмотря на то, что связь между тяжелыми нейродегенеративными процессами и дисбалансом системы аммоний-глутамат известна давно, многие аспекты ее развития и механизмы противодействия еще остаются неизученными [1]. Их выяснение исключительно важно, поскольку поддержка выживания и сохранности структуры клеток нервной ткани, регуляция синтеза и инактивации как глутамата, так и ионов аммония являются фундаментальными в становлении и функционировании нервной системы. Раскрытие механизмов эндогенной защиты обеспечит понимание этиопатогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний, будет способствовать созданию эффективных путей их коррекции и, следовательно, разработке целенаправленных терапевтических стратегий. В этой связи весьма интересным и перспективным представляется выяснение роли нейротрофинов, в частности, фактора роста нервов (ФРН).

ФРН – наиболее изученный представитель семейства нейротрофных молекул пептидной природы, включающего фактор роста нервов, мозгопроизводный фактор роста, нейротрофины 3, 4/5, 6, и опосредующего свое действие на клетки через общий низкоаффинный рецептор p75 и высокоаффинные тирозинкиназные рецепторы TrkA, TrkB, TrkC. Нейротрофины регулируют выживание и дифференциацию различных типов нейронов во время развития, а в зрелости – поддерживают их фенотип и пластичность [5]. На всех этапах развития имеет место синергическое взаимодействие между глутаматом и ФРН [3]. Пресинаптически нейротрофины повышают выделение нейротрансмиттеров – глутамата и ацетилхолина, а глутамат вызывает секрецию нейротрофинов через активацию метаботропных mGlu и ионотропных AMPA, но не NMDA рецепторов [2]. Исходя из изложенного, целью данного исследования было изучить роль ФРН при развитии гипераммонийной энцефалопатии. Для этого было поставлено две задачи: первая – создать модель экспериментальной энцефалопатии и исследовать вовлеченность ФРН в данную патологию; вторая – оценить его возможное протекторное влияние *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 6 группах половозрелых беспородных крысах-самцах массой до 200 грамм, которым вводили сульфат аммония или ацетат свинца. Контрольную группу составили интактные животные (группа I). Раствор ацетата свинца вводили через зонд внутрижелудочно (30 мг/кг в 1 мл, группа IV), раствор сульфата аммония вводили внутримышечно (17,5 мг/кг в 1 мл, группа V). Животные

группы VI получали сульфат аммония в указанной выше дозе + ФР (40мкг, однократно в межоболочечное пространство головного мозга). Параллельно животные группы II (контроль к группе V и VI) получали уксусной кислотой, группы III – воду внутривенно через зонд (контроль к группе IV). Исследовали поведенческие реакции животных в пяти-секционном устройстве “Лабиринт” и в Т-образном лабиринте, реакции на электрический раздражитель; у них определили уровень фактора роста нервов и проведен ультраструктурный анализ передней доли коры больших полушарий

Результаты и обсуждение. Проведенные эксперименты выявили, что введение половозрелым крысам сульфата аммония или ацетата свинца три раза в неделю приводило к развитию выраженного функционального дефицита со стороны ЦНС в различных проявлениях – от ослабления рефлексов, вялости животных, нарушения координации движений до недержания мочи и кала. Клиническая картина поражения нервной системы во всех экспериментальных группах разворачивалась с неодинаковой скоростью. Так, введение соли аммония приводило к появлению максимальных выраженных поражений нервной системы к 35-м сут воздействия, тогда как подобная картина при введении ацетата свинца развивалась уже на 25 сут. При 2-х кратном повышении дозы этих токсикантов развернутая картина расстройства нейробиологических функций отмечена уже на 21 и 17 сут, соответственно. При 4-х кратном повышении – поражения, несовместимые с жизнью – кома и гибель животных развивались на 7-5 сут от начала процедуры. Наиболее приемлемым вариантом для получения экспериментальной хронической энцефалопатии как модели нейродегенеративного заболевания, развивающегося у людей при нарушении детоксической функции печени – гепатоэнцефалопатии (ГЭ), оказалось введение сульфата аммония (17,5 мг/кг). При этом регистрировалась клиническая картина заболевания, характерная для хронической формы ГЭ и совместимая с жизнью животных. У крыс экспериментальных групп зарегистрировано достоверное (2,5-3 кратное) нарастание по сравнению с контролем порога ноцицептивных моторно-вокальных реакций на удар электрическим током, ($0,09 \pm 0,01$ мА, $n=16$ при введении аммония и $0,12 \pm 0,04$, $n=18$ при введении свинца, против $0,036 \pm 0,003$ мА, $n=19$ у контрольных крыс; отличия от контрольных групп были статистически значимы), что свидетельствует о развитии тормозных процессов в нервной системе. В 5-секционном лабиринте выявлено снижение двигательной активности. Количество замыканий центрального и боковых электродов во всех отсеках, формирующих сигнал об общей горизонтальной активности (ОГА) и свидетельствующих о передвижении животного по лабиринту, составило $10,3 \pm 2,1$ при введении сульфата аммония ($n=29$), $10,2 \pm 1,5$ – ацетата свинца ($n=18$), но $21,2 \pm 1,2$ у интактных особей ($n=19$). Экспериментальные животные проявили меньший интерес к исследованию места, куда они были помещены, поскольку количество переходов крыс из отсека в отсек в 3-х минутный интервал времени состави-

до $4,0 \pm 1,2$ при введении соли аммония, $4,4 \pm 1,0$ при применении соли свинца и $21,2 \pm 1,2$ – у интактных крыс (компонента НА). Количество вертикальных «стоек» (компонента ВА) составило $5,8 \pm 1,2$ при введении сульфата аммония, $5,3 \pm 0,08$ при введении ацетата свинца, тогда как интактные крысы вставали на задние лапки $10,5 \pm 0,8$ раз за этот промежуток времени. В результате интегральный показатель активности (ИПА), интегрирующий разные виды активности (это количество 5-секундных отрезков времени, в течение которых отмечались любые из компонентов активности) составил $10,2 \pm 1,9$ и $10,9 \pm 1,2$ при введении соли аммония и свинца, соответственно, против $21,8 \pm 1,4$ в контроле. Полученные результаты дают основание сделать вывод о развитии энцефалопатии во всех экспериментальных группах, поскольку и двигательная (у нас представленная компонентой ОГА) и поисковая (компоненты НА и ВА) активности рассматриваются как мера энцефалопатии. Снижение этих показателей отмечено у крыс и мышей при гепатической энцефалопатии, индуцированной введением солей аммония, некоторых антиконвульсионных препаратов, порта-кавальным шунтированием [4].

Исследования содержания ФРН в различных тканях крыс с диагностированной на основании приведенных выше критериев энцефалопатией, индуцированной ацетатом свинца выявили незначительное его увеличение в печени и почках, уменьшение в сыворотке крови и скелетных мышцах при практически неизменном уровне в мозге и сердце. Иная картина наблюдалась при энцефалопатии, вызванной введением в организм сульфата аммония. Здесь отмечено падение уровня фактора во всех изучаемых тканях при выраженном (136%), хотя и статистически недостоверном, увеличении в мозге (таблица).

Таблица. Влияние ацетата свинца и сульфата аммония на содержание ФРН (нг/г) в тканях крыс.

Ткани	ацетат свинца			сульфат аммония		
	контроль (n = 5)	опыт (n = 7)	% к контролю	контроль (n = 5)	опыт (n = 7)	% к контролю
Мозг	$0,40 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,02$	100	$0,28 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$ ↑	136
Сердце	$0,40 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,00$ ↓	98	$0,48 \pm 0,11$	$0,43 \pm 0,02$ ↓	90
Печень	$0,29 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,03$ ↑	110	$0,50 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,03$ ↓	84
Почка	$0,34 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,02$ ↑	120	$0,55 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,03$ ↓	69
Скелетная мышца	$0,37 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$ ↓	84	$0,60 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$ ↓	68
Сыворотка крови	$2,24 \pm 0,51$	$1,45 \pm 0,13$ ↓	65	$8,09 \pm 0,29$	$7,12 \pm 0,38$ ↓	88

Полученные результаты указывают, что процесс поражения нервной системы, запускаемый повышенной концентрацией в организме ионов ам-

мония, но не свинца, сопровождается стимуляцией синтеза и/или целенаправленным перераспределением ФРН из периферических тканей и сыворотки крови в мозг через поврежденный в результате аммонийной интоксикации ГЭБ, и свидетельствуют о его вовлеченности в события, индуцируемые в ЦНС ионами аммония.

Для подтверждения данного вывода была выполнена серия экспериментов по исследованию возможного протекторного влияния экзогенного ФРН на развитие гипераммонийной энцефалопатии. Крысам (группа IV) вводили сульфат аммония, но в день начала этого курса одноразово в межбололочное пространство им ввели по 40 мкг ФРН (в общем количестве 0,1 мл). Нами было обнаружено, что ФРН может оказывать выраженные эффекты по сдерживанию развития индуцируемой NH_4^+ энцефалопатии. Если у крыс, (группа IV), которым вводили сульфат аммония, под влиянием соли аммония происходит значительное снижение как двигательной, так и познавательной активностей, составляя 48% компоненты ОГА, 54% – НА, 45% – ВА и 53% их интегрального показателя по сравнению с интактными животными, то при комбинированном введении соли аммония и ФРН у экспериментальных крыс все компоненты активностей хотя и были снижены, но их абсолютные значения превышали аналогичные показатели у крыс группы IV. Разница составила по ОГА – 23%, НА – 25%, ВА – 27% и по ИПА – 19%, свидетельствуя, что ФРН смягчает деструктивное влияние аммония. Тестирование в Т-образном лабиринте показало, что у обработанных нейроростовым протеином фактически сохранялся сформированный до начала эксперимента условный рефлекс, так как количество некорректных посещений этого лабиринта лишь на 12% ($P > 0,05$) превышало таковое у контрольных, в то время как животные, получавшие инъекции только раствора сульфата аммония, эти навыки утрачивали.

Ультраструктурный анализ образцов нервной ткани передней доли коры головного мозга крыс с развивающейся экспериментальной энцефалопатией (10 сут от начала исследования) показал, что при введении сульфата аммония нервные клетки сохранены, но претерпели существенные структурные изменения. Ядра нейронов потеряли округлость, образовали лопасти и углубления, наблюдаются участки «исчезновения» ядерной мембраны, что является важным признаком процессов разрушения клетки. В теле клетки обращает на себя внимание эндоплазматическая сеть, цистерны которой расширены, местами приобретают округлую форму и имеют вид вакуолей. Некоторые клетки вследствие равномерного и повсеместного расширения ЭПР напоминают кружева. Агранулярный ретикулум извит, расширены также кристы комплекса Гольджи. Митохондрии на этом фоне выглядят неизменными. Между расширенными цистернами ЭПР происходит конденсация цитоплазмы, а также ее микровакуолизация. В астроцитах характерны отечные изменения, появление большого количества вакуолей, значительное место занимают патологические мембран-

ные комплексы, миелиноподобные структуры, в ядрах выявляются места конденсации хроматина. Перинейрональные сателлитные олигодендроциты сохраняют свою характерную форму, однако наблюдается дезинтеграция контактов между такого рода глияй и нейронами. При введении крысам ФРН на общем фоне умеренных реактивных изменений, которые также представлены в нервных клетках в виде некоторого расширения эндоплазматической сети, образования лопастей ядрами, конденсацией цитоплазмы, характерным было резкое увеличение количества мелких митохондрий по всей цитоплазме и в особенности вокруг ядра, участки цитоплазмы, находящиеся в образованных ядром углублениях, имеют повышенную насыщенность полисомами, что является признаком репаративных процессов. В астроцитах не отмечается резко выраженных признаков деструкции.

Как указывалось выше, за неврологические проявления при печеночной недостаточности и экзогенной гипераммониемии могут быть ответственны как ионы аммония, так и глутамат, концентрация которого увеличивается в межклеточном пространстве вследствие редукции астроцитами способности поддерживать баланс системы ионы аммония-глутамат. Поскольку имеет место синергическое взаимодействие между Glu и нейротрофинами, включая ФРН [3], которое сохраняется и в зрелой нервной системе, мы полагаем, что ФРН, включаясь в метаболические события нейтрализации ионов аммония и удаления избытка глутамата, способен защищать клетки нервной системы от повреждающего действия этих агентов. То, что ФРН может действовать прямо на кору мозга, было показано на модели редукции холинергической иннервации у крыс [6]. Кроме того, данный нейроростовой протеин может быть рекомендован для углубленного изучения как претендента на роль терапевтического агента при ГЭ, с одной стороны, а с другой – при обосновании применения того или иного препарата для лечения данной формы патологии следует учитывать и его способность оказывать влияние на повышение (или снижение) синтеза эндогенного ФРН

Литература:

1. Жук О.Н. // Новости медико-биологических наук. 2005. № 1. С. 122-129.
2. Blochl A., Thoenen H. // Eur. J. Neurosci. 1995. Vol. 7. № 6. P. 220-228.
3. Cohen-Cory S., Dreyfus C.F., Black I.B. // J. Neurosci. 1991. Vol. 11. P. 462-471.
4. Conjeevaram H.S., Nagle A., Katz A. et al. // Hepatology. 1994. Vol. 19. P. 1245-1250.
5. Levin G.R., Barde Y.A. // Ann. Rev. Neurosci. 1996. Vol. 19. P. 289-317.
6. Rahimi O., Juliano S.L. // J. Neurophysiol. 2001. Vol. 86. P. 2081-2096.