

Динамика экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в коре головного мозга крыс и влияние препарата «Семакс» на его продукцию при моделировании ишемического инсульта

Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
e-mail: evgenia.kulaga@gmail.com

Реферат

В работе исследовали динамику экспрессии мозгового нейротрофического фактора в условиях ишемии и нейропротекторное действие «Семакса» через возможное влияние этого пептида на продукцию BDNF в коре больших полушарий у крыс с ишемическим инсультом. В исследовании показана сложная динамика экспрессии мРНК BDNF: снижение в поврежденном полушарии через 3 и 7 часов после ОСМА (окклюзия средней мозговой артерии) и увеличение экспрессии в интактном полушарии через 3 часа по сравнению с результатами через один час после окклюзии. Применение «Семакса» у крыс в острую стадию ишемии мозга и ишемии, осложненной ишемией-реперфузией сонных артерий, приводит к снижению размера некроза и увеличивает продукцию BDNF при ишемии в коре головного мозга поврежденного и интактного полушарий. Обнаруженные нами эффекты «Семакса» могут являться одним из возможных этапов нейропротекторного действия препарата.

Ключевые слова: мозг, ишемия, реперфузия, нейропротекция, BDNF, «Семакс».

Kulaga E. A., Gavrilova S. A., Buravkov S. V., Koshelev V. B.

Dynamics of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the rats cerebral cortex and the effect of the drug «Semax» for BDNF production after ischemic stroke

Faculty of Basic Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University
e-mail: evgenia.kulaga@gmail.com

Abstract

In our work the dynamics of brain-derived neurotrophic factor expression and neuroprotective effects of Semax were investigated for the focal ischemia and focal ischemia with carotid artery reperfusion. BDNF mRNA expression dynamics is complex: BDNF reduced in the injured hemisphere at 3 and 7 hours after ischemia and increased expression of BDNF in the intact hemisphere after 3 hours, compared with the results of one hour after the occlusion. Using «Semax» in an acute ischemic stage and focal ischemia, complicated with carotid artery reperfusion, causes involution of the necrosis size. «Semax» increases the production of BDNF in ischemia in the cerebral cortex of damaged and intact hemispheres. The observed effects of «Semax» may be one of the possible neuroprotective stages of this drug.

Keywords: brain, ischemia, reperfusion, neuroprotection, BDNF, «Semax».

Введение

Европейские рекомендации предписывают скорейшую транспортировку больного с ишемическим инсультом в специализированные центры для проведения тромболизисных мероприятий. Медикаментозная терапия в таких ситуациях является симптоматической и не спасает пациента от развития инфаркта мозга.

Современный поиск физиологически активных соединений опирается на исследования свойств эндогенных веществ, обладающих нейропротекторным действием.

Семейство нейротрофинов и в этом ряду мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) представляет особый интерес.

Показано участие BDNF в дифференцировке, увеличении выживаемости клеток, в формировании новых связей между нервными клетками и поддержании функций различных популяций периферических и центральных нейронов. Отсутствие нормально работающего гена BDNF вызывает потерю нейронов в различных отделах мозга и раннюю постнаталь-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ную гибель животных [8]. Интересно, что введение мозгового нейротрофического фактора животным с ишемическим инсультом уменьшает объем очага некроза [20]. Между тем в доступной нам литературе представлено небольшое число работ о динамике BDNF в коре головного мозга или крови во время развития ишемического инсульта как в модельных экспериментах, так и у людей; так же скудно представлены сведения о прямых активаторах продукции этого фактора.

С другой стороны, научный коллектив под руководством И. А. Гривенникова развивает и экспериментально проверяет идею о возможном действии пептидов меланокортинового ряда через увеличение продукции нейротрофических факторов [4, 14, 15]. «Семакс», фрагмент аденокортикотропного гормона 4-10 а.к., стабилизированный последовательностью Pro-Gly-Pro (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, MENFPGP) и лишенный его гормональной активности, был разработан коллективом советских ученых как препарат, стимулирующий работоспособность мозга [1]. Оказалось, что «Семакс» влияет фактически на все механизмы отсроченной смерти нейронов — активацию микроглии и цитокиновый дисбаланс, воспаление, синтез оксида азота, оксидантный стресс, трофическую дисфункцию — и защищает мозг от ишемического поражения [2, 3]. Монография Е. И. Гусева и В. И. Скворцовой содержит результаты подробнейшего исследования влияния «Семакса» как в экспериментальных моделях, так и у людей с ишемическим инсультом. Нейропротекторное действие пептида при ишемическом поражении мозга не вызывает сомнений, его успешно применяют в острую стадию развития ишемического инсульта у людей и терапии дегенеративных заболеваний мозга. Однако ввиду того, что рецепторы, через которые осуществляет действие «Семакс», не охарактеризованы, тонкие механизмы действия пептида не изучены [3].

В связи с вышеизложенным настоящее исследование посвящено изучению динамики BDNF в коре головного мозга крыс с ишемическим инсультом и нейропротекторного действия пептида «Семакс» через возможное влияние на этот процесс.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на самцах белых беспородных крыс весом 200–300 г (n=170) с соблюдением правил работы с лабораторными животными. Животных содержали в стандартных условиях с регулируемым световым режимом «12 часов – день, 12 часов – ночь», с постоянной вентиляцией; доступ к пище и воде не ограничен. Работа выполнена с соблюдением регламента по работе с экспериментальными животными, определенного приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г. На проведение экспериментов получено разрешение комиссии по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова.

Ишемический инсульт моделировали под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг) двумя способами: в первом случае необратимо электрокоагулировали левую ветвь средней мозговой артерии с одновре-

менной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии для стабилизации объема поражения (модель необратимой ишемии — НИ); во втором — вместе с необратимой коагуляцией средней мозговой артерии пережимали две сонные артерии на 2 часа с последующей реперфузией (модель ишемии-реперфузии — ИР) [11]. Эвтаназию глубоко наркотизированных хлоралгидратом крыс проводили методом декапитации.

«Семакс» вводили внутривентрикулярно (в/в) в дозе 150 мкг/кг в объеме 1 мл/кг через 15 минут и через 2 часа 15 минут от начала ишемии; контрольные животные получали воду для инъекций эквивалентно.

В первой серии эксперимента оценивали влияние «Семакса» на объем поражения коры головного мозга крыс через 72 часа в моделях необратимой ишемии и ишемии-реперфузии. Размер некроза подсчитывали в срезах мозга толщиной 1,5 мм, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ, 0,5 %-й раствор на 0,1 М фосфатном буфере, pH=7,4) [9], планиметрически рассчитывали процент суммы площадей пораженной ткани от общей площади коры левого полушария мозга.

В эксперименте было 40 животных, случайным образом разделенных на 4 группы: 1-я группа (n=10) — необратимая ишемия (НИ); 2-я группа (n=10) — НИ + «Семакс»; 3-я группа (n=10) — ишемия-реперфузия (ИР); 4-я группа (n=10) — ИР + «Семакс».

Во второй серии экспериментов изучали динамику экспрессии мРНК мозгового нейротрофического фактора методом ОТ-ПЦР в перифокальной зоне ишемии левого полушария и симметричного участка правого полушария через 1, 3 и 7 часов от начала необратимой ишемии. В эксперименте было 33 животных, разделенных на 4 группы: 1-я группа (n=10) — НИ 1 час; 2-я группа (n=10) — НИ 3 часа; 3-я группа (n=10) — НИ 7 часов; 4-я группа (n=3) — интактные животные.

При ишемии, осложненной реперфузией двух сонных артерий, экспрессию BDNF оценивали через 3, 7 и 24 часа от начала ишемии. В эксперименте было 33 животных, разделенных на 4 группы: 1-я группа (n=10) — ИР 3 часа; 2-я группа (n=10) — ИР 7 часов; 3-я группа (n=10) — ИР 24 часа; 4-я группа (n=3) — интактные животные.

В исследовании применяли метод полуколичественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Участки коры переднего мозга размером 3×4 мм (средняя масса = 70 мкг) отбирали из перифокальной зоны ишемии левого полушария, не затрагивая зону некроза и из симметричного участка правого полушария. Перед выделением РНК ткань измельчали с помощью микрохирургических ножниц, затем пропускали через инсулиновый шприц, выдавливая через иглу однородную массу, которую сразу помещали в 500 мкл TRI-реагента (Sigma).

Выделение РНК, ДНК-азную обработку и обратную транскрипцию проводили согласно методике, описанной ранее [5, 6]. Тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, затем осаждали изопропанолом и дважды промывали 75 %-м этанолом, приготовленным на деионизирован-

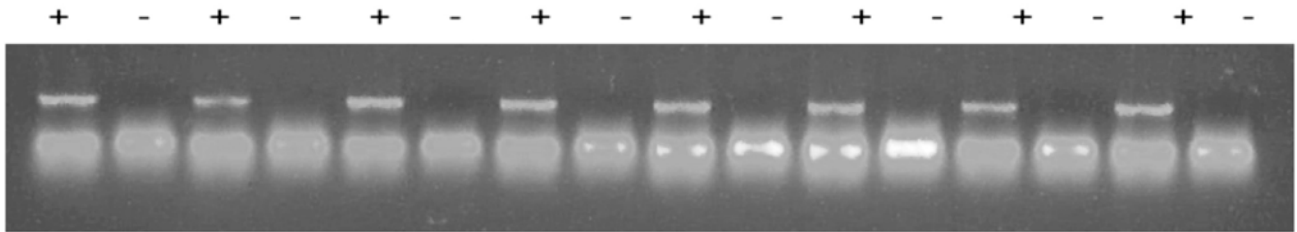


Рис. 1. Пример электрофореграммы результатов ПЦР гена β -актина в пробах RT+ и RT- (после обратной транскрипции и с пробах без добавления ревертазы соответственно)

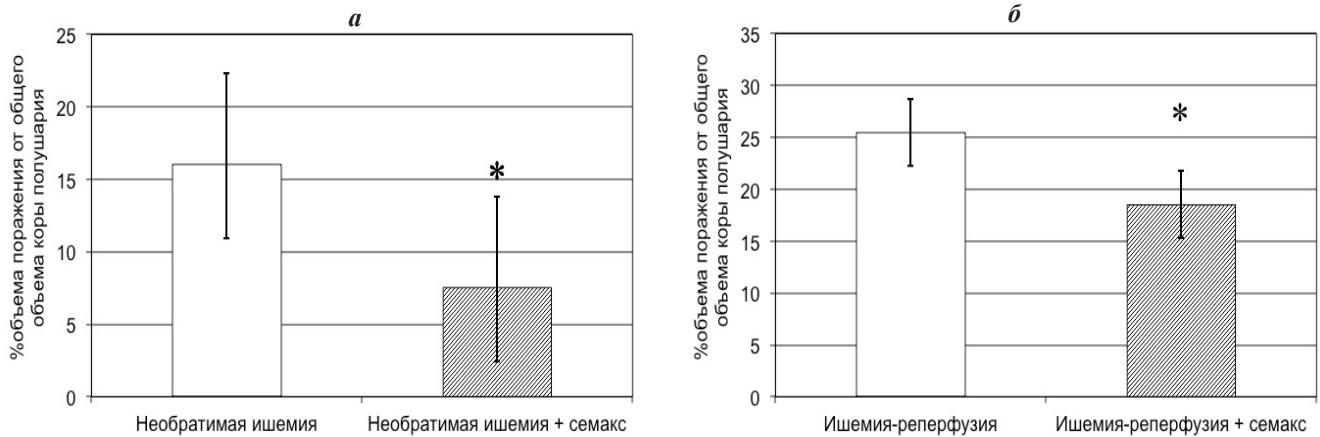


Рис. 2. Влияние внутрибрюшинного введения «Семакса» на объем некроза коры полушарий крыс через 3-е суток после необратимой окклюзии средней мозговой артерии (а); влияние внутрибрюшинного введения «Семакса» на объем некроза коры полушарий крыс через 3-е суток после ишемии-реперфузии (б): * — статистически значимые различия между контрольной группой и группой, получавшей препарат, $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни

ной H_2O , обработанной диэтилпиракарбонатом. Относительное содержание и качество РНК в пробах оценивали электрофоретически. Пробы растворяли в соответствии с содержанием РНК, ДНК-азную обработку проводили с помощью DNase I, RNase-free, согласно инструкции фирмы производителя (Fermentas). Качество ДНК-азной обработки оценивали по ПЦР на β -актин (рис. 1).

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Fermentas) согласно инструкции производителя. Данные ПЦР для BDNF нормировали по результатам ПЦР для GAPDH. В работе использовали специфические праймеры, синтезированные в ЗАО «Синтол». Праймеры подбирали самостоятельно к пятому, кодирующему, экзону гена BDNF и к кодирующему экзону гена GAPDH, для β -actin использовали ранее подобранные праймеры: BDNF прямой (TCGAAGAGCTGCTGGATGAGGACC); BDNF обратный (TGCGAGTTCCAGTGCCTTTTGTCTATG); GAPDH прямой (GGGTGGGGCCAAAGGGTC); GAPDH обратный (CAGTGGATGCAGATGATGTTCT); β -актин прямой (AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC); β -актин обратный (TCGGCCGTGGTGGTGAAGC). ПЦР проводили при следующих условиях: BDNF — 53 цикла ($95^\circ C$ — 22 с; $60^\circ C$ — 25 с; $72^\circ C$ — 30 с); GAPDH — 43 цикла ($95^\circ C$ — 22 с; $58,5^\circ C$ — 25 с; $72^\circ C$ — 30 с); β -актин — 39 циклов ($95^\circ C$ — 22 с; $59^\circ C$ — 25 с; $72^\circ C$ — 30 с).

В третьей серии эксперимента изучали возможное действие препарата на продукцию BDNF в коре больших полушарий у крыс при необратимой ишемии. В эксперименте было 70 животных, разделенных на 7 групп: 1-я группа (n=10) — НИ 7 часов; 2-я группа (n=10) — НИ 7 часов + «Семакс»; 3-я группа (n=10) — НИ 24 часа; 4-я группа (n=10) — НИ 24 часов + «Семакс»; 5-я группа (n=10) — ложнооперированные животные 7 часов; 6-я группа (n=10) — ложнооперированные животные 24 часа; 7-я группа (n=10) — интактные животные. В этом эксперименте контрольными группами служили группа интактного возрастного контроля и группа ложнооперированных животных.

Для иммуногистохимического исследования через 7 и 24 часа от начала ишемии мозг забирали и фиксировали 2,5 часа в смеси Карнуа. Стандартно выполняли проводку и заливку в парафин. Срезы толщиной 5 мкм (микротом HM-200, Microm, Германия) окрашивали на BDNF (поликлональные антитела кролика anti-BDNF (IgGfraction) (ChemiconInternational) согласно методике производителя. Для визуализации использовали UltraVision ONE HRP Polymer&DAB PlusChromogen (LabVisionCorp.); докрасивали 0,1 %-м крезильовым фиолетовым. Материал заключали под покровные стекла с помощью ShandonSyntheticMountant (ThermoElectronCorporation). Просмотр и захват изображений осуществляли на микроскопе Imager (Zeiss, Германия) цифровой камерой AxioCam MRc5,

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

программное обеспечение Axiovision 4.5 (Zeiss, Германия).

В этой же серии рассчитывали нейроглиальный показатель как количество нейроглиальных клеток, приходящихся на один нейрон в 5-м слое коры головного мозга в перифокальной зоне левого полушария и в симметричном участке правого полушария (микроскоп Leica, увеличение $\times 40$, программа «ImageJ») на 18–20 срезах мозга каждого животного, в одинаковых по размеру ($0,087 \text{ мм}^2$) полях зрения.

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли в пакете программ «SPSS», version 10, и «STATISTICA», version 6, StatSoft. Inc. (2001) для Windows. Результат представлен в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Различия между группами оценивали критерием Mann–Whitney. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Влияние «Семакса» на размер инфаркта коры левого полушария

Необратимая окклюзия средней мозговой артерии и вены с одновременной необратимой коагуляцией ипсилатеральной общей сонной артерии через трое суток после операции приводила к образованию очага некроза размером $16,01 \pm 6,3 \%$ от общего объема коры

левого полушария. Внутривенное введение препарата «Семакс» в дозе 150 мкг/кг в острый период ишемического инсульта снизило размер поражения на 56% по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$ (рис. 2, а). Ишемия-реперфузия сонных артерий привела к увеличению размера области некроза в группе контроля до $25,5 \pm 3,23 \%$. «Семакс» снизил размер инфаркта на $27,45 \%$ по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$ (рис. 2, б).

Оценка уровня экспрессии mPHKBDNF в коре головного мозга крыс

Через час после ОСМА в оперированном полушарии экспрессия BDNF примерно в 30 раз превысила экспрессию BDNF в неоперированном полушарии, $p < 0,05$ (рис. 3). Через 3 часа после ОСМА в оперированном полушарии количество мРНК нейротрофического фактора снизилось, в то время как в неоперированном полушарии экспрессия BDNF статистически значимо возросла, $p < 0,05$. Через 7 часов экспрессия BDNF в обоих полушариях статистически не различалась.

В модели, осложненной реперфузией двух сонных артерий, через 3, 7 и 24 часа после ОСМА во всех группах в каждом из полушарий значения экспрессии мРНК мозгового нейротрофического фактора были близки к нулю и статистически не различались. Пример результатов определения уровня экспрессии мРНК генов BDNF и GAPDH коры переднего мозга представлены на электрофореграммах (рис. 4).

Влияние «Семакса» на продукцию BDNF в коре головного мозга крыс

У интактных крыс в гомологичной перифокальной зоне ишемического инсульта оперированного полушария и в зеркальном регионе коры интактного полушария головного мозга крыс единицы клеток в поле зрения продуцируют BDNF. Ложная операция не повлияла на продукцию BDNF в обоих полушариях.

Через 7 часов после моделирования необратимой ишемии количество нейронов, в которых определялся продукт реакции, осталось на уровне значений интактной группы. Введение «Семакса» не повлияло на продукцию белка ни в перифокальной зоне очага ишемии, ни в симметричном участке правого полушария.

Через 24 часа после необратимой ишемии выявлено увеличение числа клеток, продуцирующих BDNF в оперированном полушарии, их число составило $18,47 \pm 2,54$ клетки в поле зрения. «Семакс» в этот срок увеличил продукцию BDNF по сравнению с контрольной группой как в перифокальной зоне очага ишемии до $33,1 \pm 4,1$ клетки в поле зрения, так и в симметричном участке интактного полушария до $5,3 \pm 1,5$ клетки в поле зрения (рис. 5; 6).

Оценка нейроглиального показателя

У интактных животных нейроглиальный показатель в области 5-го слоя коры головного мозга составил $0,8 \pm 0,05$ глиальной клетки на один нейрон. Моделирование ишемического инсульта не привело

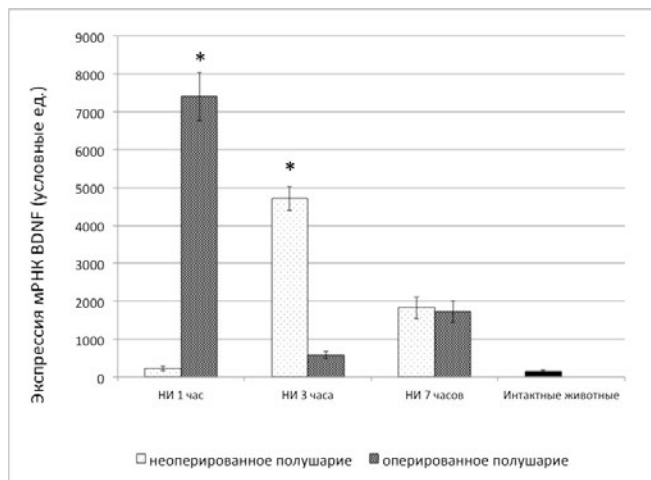


Рис. 3. Динамика экспрессии мРНК BDNF коре головного мозга крыс через 1, 3 и 7 часов после моделирования фокального инсульта: * — статистически значимые различия между оперированными и неоперированными полушариями, $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни

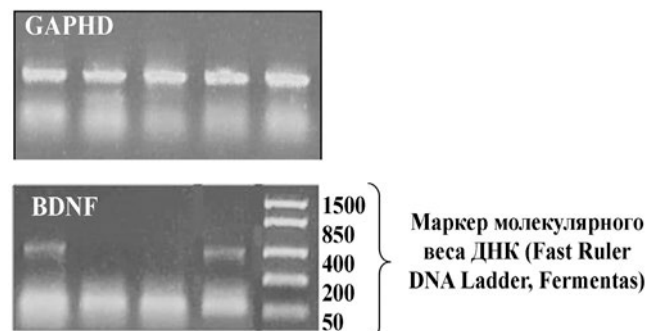


Рис. 4. Пример электрофореграммы результатов ПЦР GAPDH и BDNF

Нейроглиальный показатель в области 5-го слоя коры головного мозга крыс

Таблица

Группа	Глия	Нейроны	Нейроглиальный показатель
Интakтные (ОП)	66,2±3,27	75,4±3,44	0,88±0,06
Интakтные (НП)	65,8±4,32	76,2±2,95	0,86±0,04
7 часов			
«Семакс» (ОП)	71,2±5,97	82,2±4,44	0,87±0,06
«Семакс» (НП)	71,4±5,03	80±2,83	0,89±0,05
Дистиллят (ОП)	68,4±3,36	79,4±2,88	0,86±0,06
Дистиллят (НП)	66,4±2,61	77,4±2,3	0,86±0,03
Ложнооп. (ОП)	65,8±2,49	74,2±4,66	0,89±0,1
Ложнооп. (НП)	67,4±3,05	77,8±5,4	0,87±0,05
24 часа			
«Семакс» (ОП)	69,4±3,36	80,4±2,19	0,86±0,07
«Семакс» (НП)	67,2±3,42	78,6±2,7	0,86±0,05
Дистиллят (ОП)	69,6±4,56	78,2±2,28	0,89±0,04
Дистиллят (НП)	67,8±3,42	78,2±2,77	0,87±0,07
Ложнооп. (ОП)	65,6±3,85	76,2±3,11	0,86±0,08
Ложнооп. (НП)	69,2±2,86	78,6±2,97	0,88±0,03

Примечание: размер поля зрения — 0,087 мм², об. — 40X; ок. — 10X; ОП — оперированное полушарие; НП — неоперированное полушарие.

к изменению нейроглиального показателя через 7 и 24 часа после операции. Влияния «Семакса» на гибель клеток в эти экспериментальные сроки не обнаружено (таблица).

Обсуждение результатов

Для моделирования ишемического инсульта модифицировали методику, предложенную S. T. Chen et al. [11]. Место коагуляции средней мозговой артерии (СМА) подобрано с таким расчетом, чтобы зона некроза формировалась в лобно-теменной области коры головного мозга без распространения в подкорковые структуры, с малой вариабельностью размера поражения.

Сочетание окклюзии средней мозговой артерии с постоянной окклюзией ипсилатеральной сонной артерии приводит к формированию более глубокого некроза и снижению вариабельности его размера [11].

Стабильность расположения очага некроза позволила проводить отбор проб для определения мРНК в области пенумбры — «ишемической полутени» — даже в ранние сроки ишемии, когда некроз на глаз не удается определить [3].

Реперфузионное повреждение добавляли к необратимой ОСМА пережатием двух сонных артерий на 2 часа с последующим восстановлением в них кровотока.

В данной модели преследовали 2 цели: сохранить очаг некроза для оценки размера поражения и приблизить длительность ишемии к клиническим условиям, чтобы за этот период накопились изменения, приводящие к реперфузионному повреждению [3].

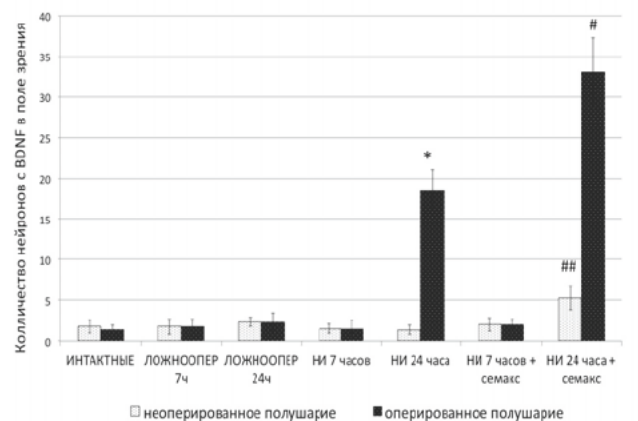
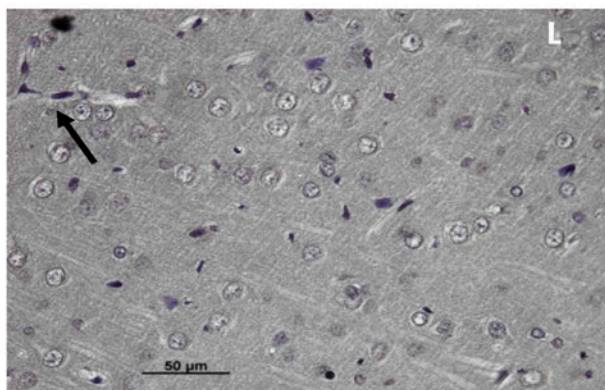
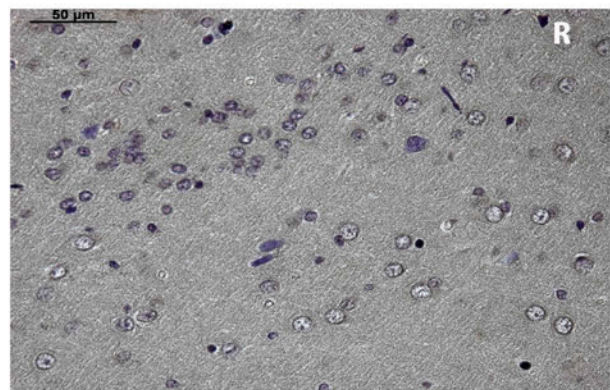


Рис. 5. Количество нейронов в области 5-го слоя коры головного мозга крыс, в которых определяется продукт ИГХ-реакции — BDNF (размер поля зрения — 0,087 мм², об. — 40X, ок. — 10X): * — статистически значимое отличие в группе необратимой ишемии (НИ 24 часа) от группы ложнооперированных животных 24 часа, оперированное полушарие, $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; # — статистически значимые отличия от группы НИ 24 часа, оперированное полушарие, $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; ## — статистически значимые отличия от группы НИ 24 часа, неоперированное полушарие, $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни

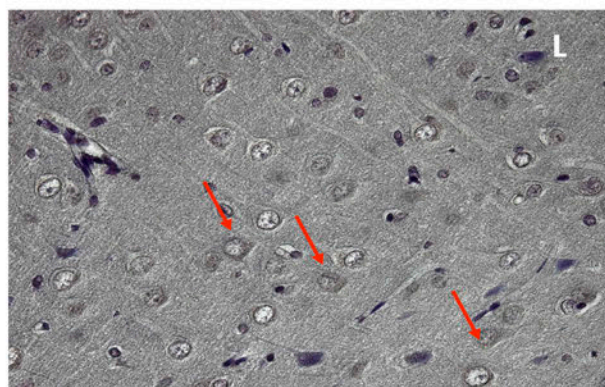
Реперфузионное повреждение при ишемии-реперфузии двух сонных артерий развивается диффузно, зона пенумбры во время ишемии еще сильнее обедняется кровоснабжением, что закономерно после реперфузии приводит к расширению очага некроза, зона пенумбры отдалается от ядра ишемии.



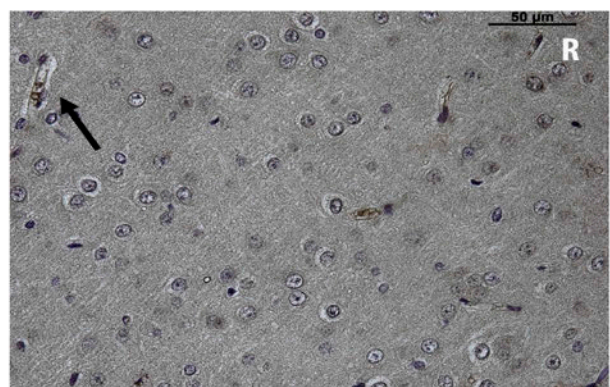
Ложнооперированные 24 часа
оперированное полушарие



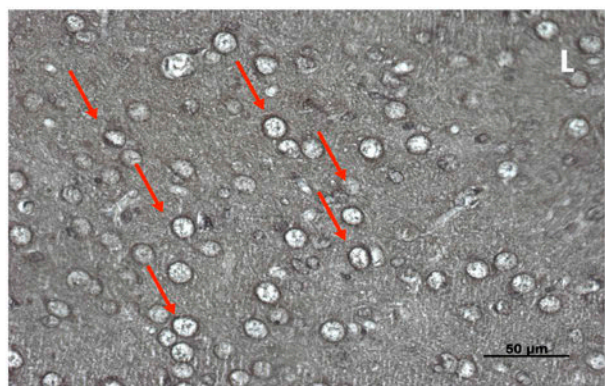
Ложнооперированные 24 часа
неоперированное полушарие



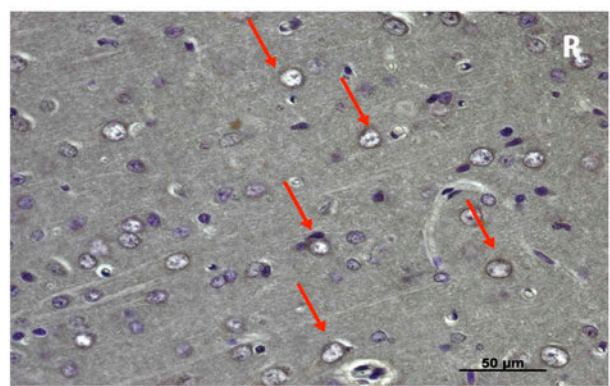
НИ 24 часа
оперированное полушарие



НИ 24 часа
неоперированное полушарие



НИ 24 часа + семакс
оперированное полушарие



НИ 24 часа + семакс
неоперированное полушарие

Рис. 6. Иммуногистохимическое определение BDNF в области 5-го слоя коры головного мозга крыс. Докрашивание срезов по Ниссля: L — левое полушарие (оперированное); R — правое полушарие (неоперированное); НИ — необратимая ишемия. Красными стрелками указана локализация продукта реакции в пирамидных нейронах, черными стрелками — сосуды; размер поля зрения — 0,087 мм²; об. — 40X; ок. — 10X

Через 72 часа после моделирования локального ишемического инсульта, на момент полного формирования некроза, процесс ишемии-реперфузии приводит к увеличению поражения за счет свободно-радикальных процессов и развития воспаления [3, 12].

Клеточные события в мозге и динамика воспалительных реакций во время развития ишемического инсульта подробно освещены в монографии Е. И. Гусева и В. И. Скворцовой. Часть повреждающих эффектов объяснена дефицитом защитных противо-

воспалительных факторов, а также показано, что введение «Семакса» в пределах «терапевтического окна» устраняет дисбаланс цитокинов путем уменьшения уровня индукторов воспаления и увеличения противовоспалительных и нейротрофических факторов, что приводит к угнетению локальной воспалительной реакции и улучшению трофического обеспечения мозга [2, 3], что в нашем исследовании проявлялось уменьшением объема гибели ткани, как при необратимой ишемии, так и при ишемии-реперфузии.

При выборе модели эксперимента и временных рамок для измерения уровней мРНК и белка BDNF в коре при ишемии учитывали развитие клеточных реакции и патологических процессов в мозге на фоне острой фокальной ишемии.

Информация об экспрессии нейротрофического фактора при ишемии в коре поврежденного полушария в научной литературе ограничивается работами нескольких авторов. Исследования I. Feger показали увеличение по сравнению с контролем экспрессии мРНК BDNF в коре головного мозга рядом с областью ишемии через 12 часов после необратимой окклюзии средней мозговой артерии, через сутки экспрессия мРНК в этой области уже снижалась [16]. T. Tsukahara et al. в своей работе зафиксировали высокие значения экспрессии мРНК BDNF в гиппокампе через 2 и 4 часа и незначительное усиление экспрессии в коре только через 4 часа после ишемии после пережатия двух сонных артерий на 8 мин [22]. В нашей работе мы наблюдали изменения количества мРНК BDNF не только в зоне пенумбры, но и в симметричном участке интактного полушария в модели необратимой ишемии и ишемии-реперфузии.

Известно, что первой, но неспецифической реакцией на повреждающее воздействие является индукция генов раннего реагирования [10, 17]. В экспериментальных моделях ишемического инсульта с постоянной окклюзией средней мозговой артерии было показано, что экспрессия мРНК c-fos и zif/268 быстро нарастает в течение часа от начала ишемии [16, 18], поэтому полученный нами результат — высокое значение мРНК BDNF как гена раннего реагирования в проблемной зоне через 1 час от начала ишемии — является закономерным.

Через один, три, семь часов от начала ишемии уменьшение количества мРНК нейротрофического фактора в исследуемой области в оперируемом полушарии, скорее, связано с нарушением кровотока, а увеличение в зеркальном участке — с перераспределением кровотока в мозге при выпадении из кровоснабжения сосудистого региона средней мозговой артерии, чем с генерализованным воспалительным ответом и продукцией провоспалительных факторов.

Дополнительное реперфузионное повреждение мозга активными формами кислорода в модели с реперфузией сонных артерий могло привести к уменьшению синтеза BDNF ниже чувствительности метода. Кроме того, в исследованиях C. Iadecola показано, что в постишемическом периоде церебральная циркуляция находится в состоянии «паралича», реактивность сосудов мозга малого и среднего калибра к гиперкапнии резко снижена, цереброваскулярная ауторегуляция нарушена [19]. Несоответствие кровоснабжения потребностям мозга может служить дополнительным стимулом или быть причиной уменьшения продукции BDNF.

Большая часть исследований по изучению экспрессии мозгового нейротрофического фактора выполнена в области гиппокампа (на срезах и в культурах гиппокампальных клеток), так как данная зона мозга содержит чувствительные к гипоксии нейроны и пластично реагирует на ишемическое повреждение [4, 15]. Нейроны коры головного мозга избирательно продуцируют BDNF и секретируют белок удаленно от места увеличения мРНК, поэтому тотальные оценки, например, иммуоферментный анализ, не выявляют этих изменений. В связи с этим изучение уровня белка BDNF в коре головного мозга и влияния на него пептида «Семакс» проводили иммуногистохимическим методом в перифокальной области зоны ишемии и симметричном участке условно интактного правого полушария. Поскольку увеличения мРНК BDNF не выявили у крыс с реперфузией сонных артерий, продукцию белка оценивали только в модели необратимой ишемии.

Обнаруженная нами способность «Семакса» увеличивать продукцию BDNF в нейронах в области пенумбры коры головного мозга поврежденного полушария и в интактном полушарии может являться одним из возможных механизмов нейропротекторного действия препарата, основными компонентами которого являются торможение глиальных реакций воспаления, улучшение трофического обеспечения мозга, торможение синтеза оксида азота и других реакций оксидантного стресса [7]. Наши результаты согласуются с работами М. И. Шадринной, В. Г. Дмитриевой и О. В. Долотова, в которых было показано, что интраназальное введение препарата «Семакс» в дозе 50 мкг на 1 кг массы животных приводит к длительной и специфичной для разных отделов мозга (гиппокамп и кора переднего мозга крыс) активации экспрессии гена BDNF [13, 14, 21].

Отсутствие различий величины нейроглиального показателя через 7 и 24 часа между контрольной группой и животными, получавшими «Семакс», является ожидаемым результатом, так как в эти сроки данный показатель показывает равномерность гибели нейронов и глии путем некроза, и на эти процессы «Семакс» не повлиял, а нейрональная гибель путем апоптоза в зоне пенумбры происходит в отставленный период.

При ишемическом инсульте вокруг некротического очага поражения формируется область нейронов, гибнущих по пути апоптоза, этот путь программированной клеточной гибели может быть обратим на начальных стадиях с помощью создания повышенных концентраций нейротрофинов. «Семакс» может оказывать защитное действие на мозг в условиях ишемии и ишемии-реперфузии, одним из возможных путей реализации эффектов служит увеличение продукции BDNF.

Работа поддержана РФФИ, 11-04-01974-а.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Литература

1. Ашмарин И. П., Левицкая Н. Г., Каменский А. А., Мясоедов Н. Ф. Семакс — новое лекарственное средство для коррекции кровообращения мозга, гипоксических состояний и повышения умственной трудоспособности // Фарматека. 1997. № 4. С. 32–33.
2. Гусев Е. И., Долотов О. В., Журавлева Е. Ю. и др. Изучение механизмов действия лекарственного препарата «Семакс» при остром ишемическом инсульте: отчет о НИР РФФИ № 98-04-48744.
3. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001.
4. Долотов О. В., Дубынина Е. В., Марков Д. Д. и др. Влияние меланокортинов на экспрессию ряда нейротрофических факторов в клетках гиппокампа крысы *in vitro* // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. 2011. № 4. С. 10–16.
5. Жданов А. В., Сосулина Л. Ю., Курбанова Д. Ф. и др. Экспрессия генов цитокинов мононуклеарными клетками крови женщин с гнойно-воспалительными заболеваниями придатков матки // Бюлл. эксперимент. биол. 2002. № 134 (11). С. 555–559.
6. Жданов А. В., Сухих Г. Т., Давыдова М. П. и др. Особенности корреляционных связей в системе цитокинов при гиперплазии эндометрия // Бюлл. эксперимент. биол. 2003. № 136 (9). С. 309–311.
7. Скворцова В. И., Насонов Е. Л., Журавлева Е. Ю. и др. Клинико-иммунобиохимический мониторинг факторов локального воспаления в остром периоде полушарного ишемического инсульта // Журнал неврол. и психиатрии им. С. С. Корсакова. 1999. № 99 (27). С. 102–131.
8. Bibel M., Barde Y. A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system // Genes. Dev. 2000. № 23 (4). P. 2919–2937.
9. Bederson, J. B. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination // Stroke. 1986. № 17. P. 472–476.
10. Bravo R. Growth factor-responsive genes in fibroblasts // Cell. Growth. Differ. 1990. № 1 (6). P. 305–309.
11. Chen S. T., Hsu C. Y., Hogan E. L. et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // Stroke. 1989. № 17 (4). P. 738–743.
12. Dirnagl U. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Germany Trends Neurosci. 1999. № 22 (9). P. 391–397.
13. Dmitrieva V. G., Povarova O. V., Skvortsova V. I. et al. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia // Cell Mol. Neurobiol. 2010. № 1 (30). P. 71–79.
14. Dolotov O. V., Karpenko E. A., Seredenina T. S. et al. Semax, an analogue of adrenocorticotropin (4-10), binds specifically and increases levels of brain-derived neurotrophic factor protein in rat basal forebrain // J. Neurochem. 2006. № 97 (Suppl. 1). P. 82–86.
15. Dolotov O. V., Seredenina T. S., Levitskaya N. G. et al. The heptapeptide SEMAX stimulates BDNF expression in different areas of the rat brain in vivo // Dokl. Biol. Sci. 2003. № 391. P. 292–295.
16. Ferrer I., Krupinski J., Goutan E. et al. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat // Acta Neuropathol. 2001. № 101 (3). P. 229–238.
17. Herschman H. R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters // Annu Rev. Biochem. 1991. № 60. P. 281–319.
18. Hsu C. Y., An G., Liu J. S. et al. Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat // Stroke. 1993. № 24 (12 Suppl). P. 178–181.
19. Iadecola C. Neurogenic control of the cerebral microcirculation: is dopamine minding the store? // Nat. Neurosci. 1998. № 1 (4). P. 263–265.
20. Schabitz W. R., Steigleder T., Cooper-Kuhn C. M. et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis // Stroke. 2007. № 7 (38). P. 2165–2172.
21. Shadrina M., Kolomin T., Agapova T. et al. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action // J. Mol. Neurosci. 2010. № 1 (41). P. 30–35.
22. Tsukahara T., Iihara K., Hashimoto N. et al. Increases in levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and its promoters after transient forebrain ischemia in the rat brain // Neurochem. Int. 1998. № 2 (33). P. 201–207.