

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГЕПАРИНА НА МОДЕЛИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА *IN VITRO*

А. Х. Хама-Мурад<sup>1</sup>

Действие гепарина на активность нейронов мозга изучено на разработанной нами модели геморрагического инсульта *in vitro* на переживающих срезах мозга гипертонических крыс. Аутокровь вызывает блокирование параметров фокальных потенциалов в нейронах. Гепарин в концентрации 25 ЕД/мл до воздействия аутокрови препятствует ингибированию активности ионотропных глутаматергических и ГАМК-ергических рецепторов.

**Ключевые слова:** переживающие срезы, модель геморрагического инсульта, фокальные потенциалы, гепарин

#### ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость церебральным геморрагическим инсультом представляет важную социальную проблему. Ежегодно в России заболевает более 500 тыс. человек. Инсульт сопровождается значительными когнитивными расстройствами. Одной из важнейших задач практической неврологии является поиск эффективных фармакологических препаратов для защиты нервных клеток от тяжелых последствий геморрагического инсульта с тем, чтобы снизить уровень инвалидизации больных.

Гепарин используется в клинике для предупреждения тромбообразования в качестве антикоагулянта при ишемическом инсульте. В то же время его роль неоднозначна при возможности развития вторичного геморрагического инсульта. Гепарины — группа веществ эндогенного происхождения, различающихся по молекулярной массе. Они относятся к гликозаминогликанам, состоят из сульфатированных остатков D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты. Эти вещества синтезируются в организме человека и животных и содержатся в основном в тучных клетках и синаптических структурах [14]. Данные указывают на многообразную роль этих соединений. Как и в случае высокомолекулярных гепаринов действие низкомолекулярных фракций этого соединения в качестве возможных протекторных веществ является предметом многочисленных исследований. Так, введение в клинику больным инсультом низкомолекулярного гепарина было более эффективным, чем применение нефракционированного гепарина [6, 12]. В то же время подкожное введение нефракционированного гепарина не снижало смертность и инвалидизацию больных через 6 мес после ишемического инсульта [5]. Обнаруживается, что гепарины (десульфатированные), у которых значительно снижена антикоагулянтная активность, способствовали противовоспалительной протекции мозговой ткани после ишемиче-

ского и тормозили возникновение геморрагического инсульта [13, 16]. При развитии ишемического инсульта искусственные аналоги гепарина в условиях *in vivo* проявляли протекторные свойства, значительно снижали величину повреждения мозга и способствовали восстановлению неврологических функций [15] и тормозили воспалительные процессы [10]. То же было отмечено и при действии гепарина [7, 11].

В экспериментах на животных показано, что гепарин, помимо антикоагулянтной активности, обладает выраженными нейротрофическими свойствами. Так, введение крысам гепарина в малых дозах (меньше, чем используют в клинике) индуцирует каскад изменений в нервной системе, которые выражались в усилении концентрации внимания, формировании оптимальной стратегии поведения при обучении [1], а также обладает антистрессорным эффектом [2]. Кроме того, в отдельных структурах мозга гепаринизированных животных увеличивались уровни возбуждающих и тормозных медиаторов [1, 2].

Таким образом, представляет интерес исследовать прямое действие гепарина на активность нейронов мозга и выяснить, какой эффект гепарин оказывает на их активность в условиях, когда на ткань мозга оказывает негативное влияние излившаяся кровь при геморрагическом инсульте. В данной работе были исследованы свойства гепарина как препарата, который мог бы быть использован при геморрагии. Было изучено его действие на биоэлектрическую активность нервных клеток мозга гипертонических крыс в норме и в условиях длительного воздействия крови на модели геморрагического инсульта *in vitro*<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6. E-mail: dr.law@list.ru

<sup>2</sup> На предложенный метод защиты нервных клеток от последствий геморрагического инсульта с использованием гепарина получен патент на изобретение в ФИПС: Хама-Мурад А. Х. “Способ определения защитного действия гепарина при геморрагическом инсульте в эксперименте” № 2007148711/14. 2008.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самцах с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных European Communities Council Direction (86/609 ЕЕС).

Были использованы переживающие срезы обонятельной коры мозга гипертензивных крыс линии SHR, поскольку именно гипертензия является одной из причин, способствующих возникновению геморрагического инсульта. На разработанной нами модели геморрагического инсульта на переживающих срезах мозга [3, 4] изучали действие гепарина на биоэлектрическую активность нейронов.

Для этого переживающие срезы обонятельной коры выдерживали с гепарином натрия (Московский эндокринный завод, 25 ЕД/мл инкубационной среды) в течение 15 мин. Затем срезы помещали в специальную проточную камеру для регистрации компонентов фокальных потенциалов (ФП), возникающих в ответ на электростимуляцию латерального обонятельного тракта (ЛОТ) — основного афферентного входа к нейронам обонятельной коры. Частота раздражения ЛОТ была 0,003 Гц.

Для моделирования геморрагического инсульта срезы помещали в аутокровь объемом 3 мл, в которой они находились в течение 360 мин. Затем проводили регистрацию ФП. Как мы показали ранее, после этого срока наступают необратимые нарушения функционирования нервных клеток [4].

При изучении свойств гепарина на модели инсульта срезы предобработывали гепарином (25 ЕД/мл инкубационной среды) в течение 15 мин, а затем их помещали в аутокровь на 360 мин, после этого также проводили регистрацию ФП.

Анализировали амплитуды возбуждающих и тормозных компонентов ФП с соответствующими механизмами генеза и опосредуемые разными рецепторными механизмами: суммарный потенциал действия латерального обонятельного тракта (ПД ЛОТ) (пресинаптический компо-

нент ФП), AMPA и NMDA рецепторные компоненты возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП), а также поздний тормозный постсинаптический потенциал (ТПСПм), который генерируется при активации ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов.

Сопоставляя параметры активности клеток через 360 мин пребывания в аутокрови с контрольными значениями, которые получали на отдельной группе срезов ( $n = 6$ ), определяли степень их повреждения при действии аутокрови, и влияние на эти изменения преинкубации с гепарином.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по непараметрическому критерию (U-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни). Различия признавали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования представлены в таблице. Инкубация срезов в инкубационной среде с гепарином в концентрации 25 ЕД/мл не вызывала изменений амплитуд отдельных компонентов ФП в нейронах обонятельной коры мозга крыс, что указывает на сохранение механизмов электрогенеза в срезах мозга при действии гепарина в течение 15 мин. Однако было отмечено увеличение продолжительности постсинаптических процессов возбуждающих и тормозных. Так, длительность AMPA ВПСП увеличивалась в среднем на  $16 \pm 4 \%$ , длительность NMDA ВПСП возрастала на  $27 \pm 6 \%$ . Активация тормозных ГАМК<sub>B</sub>-ергических процессов ТПСПм пролонгировалась в среднем на  $23 \pm 5 \%$ .

Неизменность амплитуд отдельных компонентов ФП при воздействии гепарина натрия свидетельствует о том, что он, возможно, стабилизирует механизмы электрогенеза и, следовательно, может выполнять протекторную функцию.

В следующей серии экспериментов была изучена свойства гепарина натрия в условиях негативного действия аутокрови в переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс при моделировании геморрагического инсульта. Из приведенных данных видно, что при инкубации срезов аутокровью происходит блокирование всех постсинаптических механизмов электрогенеза, сохраняется лишь активность в проводящих волокнах ЛОТ. Эти явления соответствуют тем закономерностям развития геморрагического инсульта *in vitro*, которые были обнаружены нами ранее [4].

Предварительная инкубация срезов в растворе с гепарином и последующим действием на них аутокрови проявлялась в том, что сохранялись неповрежденными исследованные механизмы электрогенеза. Так, активность пресинаптических структур сохранялась на уровне 97 % от исходной величины ( $U = 39, p \leq 0,05$ ). На достаточно высоком уровне сохранялась активность возбуждающих и тормозных постсинаптических механизмов. Амплитуда AMPA ВПСП соответствовала 90 % от исходной величины ( $U = 31, p \geq 0,05$ ); амплитуда NMDA ВПСП составляла 81 % от исходных значений ( $U = 28, p \geq 0,05$ ). Протекция тормозных механизмов была на уровне 75 % от первоначальных данных до действия аутокрови ( $U = 27,$

**Амплитуды отдельных компонентов фокальных потенциалов (ФП) в срезах обонятельной коры мозга крыс после инкубации с гепарином натрия (25 ЕД/мл), после инкубации в аутокрови в течение 360 мин и после преинкубации с гепарином (в % к контрольным значениям).**

Компоненты ФП (% от контроля)	После инкубации			После преинкубации с гепарином и последующей инкубации в аутокрови ( $n = 12$ )
	в контрольной среде ( $n = 9$ )	с гепарином натрия ( $n = 12$ )	в аутокрови ( $n = 15$ )	
ПД ЛОТ	100 (320)	100	38 *	97
AMPA ВПСП	100 (200)	100	0 *	90
NMDA ВПСП	100 (60)	92	0 *	81
ТПСПм	100 (30)	100	0 *	75

**Примечание.** Абсолютные значения амплитуд ФП (в мкВ) в контрольных срезах даны в скобках. \* —  $\leq 0,05$  по сравнению с исходными параметрами.

$p \geq 0,05$ ). Статистически эти отличия от исходных контрольных величин недостоверны.

Полученные нами данные лишь отчасти подтверждают экспериментальные наблюдения *in vivo* о том, что гепарин обладает нейротрофическими свойствами [1, 2]. Он не оказывал влияния на амплитудные характеристики механизмов электрогенеза, но пролонгировал их длительность. Возможное объяснение этих отличий может состоять в том, что пролонгация механизмов электрогенеза способствует увеличению концентрации некоторых медиаторов, что и обуславливает нейротрофические эффекты гепарина. Наши данные соответствуют данным, обнаруженным другими исследователями *in vitro*. Так, показано, что гепарин влияет на функцию AMPA-рецепторов, что проявлялось в усилении кооперативности между ионными каналами и пролонгировании времени открытого состояния канала, но не оказывает эффекта на амплитуду токов отдельного канала. Кроме того, выявлено, что в присутствии блокатора AMPA-рецепторов CNQX гепарин не влиял на свойства AMPA-рецепторов. Эти эффекты гепарина были специфическими, поскольку применение других полисахаридов (декстран, глюкозамин 2,3-дисульфат) не вызывали изменения AMPA-рецепторов. Эти данные свидетельствуют о том, что эндогенные полисахариды, локализуемые в синапсах, модулируют активность AMPA-рецепторов в зависимости от примененной концентрации и степени десульфатирования. Таким образом, гепаринсодержащее протогликаны, которые, как известно, концентрируются в синапсах, могут взаимодействовать с AMPA-рецепторами и менять их функциональные характеристики [8, 9, 17].

В нашей работе впервые обнаружено, что подобный эффект гепарин проявляет по отношению к NMDA глутаматергическим рецепторам и тормозным ГАМК<sub>B</sub>-рецепторам. Влияние гепарина на деятельность этих рецепторов проявлялось в пролонгации их активности, что, вероятно, обуславливает его защитный эффект в условиях цитотоксического воздействия — геморрагического инсульта. Предварительное воздействие гепарином на нервные клетки срезов мозга защищает их функционирование от разрушающего действия аутокрови на модели геморрагического инсульта *in vitro*. Следовательно, гепарин выполняет функцию нейропротективного вещества при развитии негативных последствий геморрагического инсульта в эксперименте.

## ВЫВОДЫ

1. Гепарин оказывает влияние на уровень активности глутаматергических NMDA-рецепторов и тормозных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов в нейронах обонятельной коры мозга крыс.

2. Предварительное применение гепарина защищает нервные клетки срезов мозга от блокирующего действия аутокрови на модели геморрагического инсульта *in vitro*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Кондашевская, В. С. Кудрин, П. М. Клодт и др., *Бюл. экпер. биол.*, **130**(12), 613 – 616 (2000).
2. М. В. Кондашевская, В. С. Кудрин, Л. А. Маликова, и др., *Бюл. экпер. биол.*, **141**(5), 537 – 539.
3. А. А. Мокрушин, А. Х. Хама-Мурад, Л. И. Павлинова, Г. П. Смирнова, Патент на изобретение № 2307396 RU. МПК G09B 23 / 28. (2007).
4. А. Х. Хама-Мурад, А. А. Мокрушин, Л. И. Павлинова, *Бюл. экпер. биол.*, **146**(9), 355 – 358 (2008).
5. K. Asplund, *Stroke Lancet*, **349**, 1569 – 1581 (1997).
6. P. M. Bath, *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **7**(8), 1323 – 1330 (1998).
7. L. P. Carter, A. N. Guthkelch, J. Orozco, O. Temeltas, *Stroke*, **23**(6), 883 – 888 (1992).
8. L. M. Chicoine, V. Suppiramaniam, T. Vaithianathan, et al., *J. Neurosci. Res.*, **75**(3), 408 – 416, (2004).
9. R. A. Hall, V. Vodyanoy, *A. Neurosci. Lett.*, **217**(2–3), 179 – 183 (1996).
10. M. Irony-Tur-Sinai, I. Vlodavsky, S. A. Ben-Sasson, et al., *J. Neurol. Sci.*, **206**(1), 49 – 57 (2003).
11. S. Jonas, M. Sugimori, R. Llinás, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **825**, 389 – 393 (1997).
12. P. W. Kamphuisen and G. Agnelli, *Thromb. Res.*, **119**(3), 265 – 274 (2007).
13. I. C. Kiphuth, D. Staykov, M. Köhrmann, et al., *Cerebrovasc. Dis.*, **27**(2), 146 – 150 (2009).
14. P. T. Martin, *Glycobiology*, **12**(1), 1R – 7R (2002).
15. V. Mary, F. Wahl, A. Uzan, J. M. Stutzmann, *Stroke*, **32**(4), 993 – 999 (2001).
16. J. Mocco, C. E. Shelton, P. Sergot, et al., *Neurosurgery*, **61**(6), 1297 – 1303 (2007).
17. S. Sinnarajah, V. Suppiramaniam, K. P. Kumar, et al., *Synapse*, **31**(3), 203 – 209 (1999).

Поступила 02.03.10

## BIOELECTRIC ACTIVITY OF CEREBRAL NEURONS UNDER THE ACTION OF HEPARIN IN HEMORRHAGIC STROKE MODEL *IN VITRO*

A. Kh. Khama-Murad

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034, Russia;  
e-mail: dr.law@list.ru

The effect of heparin on the activity of cerebral neurons under conditions of hemorrhagic stroke model was studied *in vitro* using brain slices of hypertensive rats. The auto-blood induced blocking of the parameters of focal potentials in neurons. The treatment with heparin (25 IU/ml) prior to the auto-blood action prevented inhibition of the activity of ionotropic glutamatergic and GABAergic receptors.

**Key words:** Brain slicing, hemorrhagic stroke model, focal potentials, heparin