



Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

## БИОХИМИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В РАЗНЫХ ОТДЕЛАХ МОЗГА КРЫС В НЕЙРОРЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ПРАВСТОРОННЕЙ ЛАБИРИНТЭКТОМИИ

А.А. НИКОЯН<sup>1</sup>, Л.Р. ТУМАНЯН<sup>2</sup>, С.Г. САРКИСЯН<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ЕГУ, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии,

<sup>2</sup>ЕГУ, НИИ биологии, лаборатория биохимии,

<sup>3</sup>ЕГУ, НИИ биологии, лаборатория физиология человека и животных  
lilitumanyan@ysu.am

Показано активирование аргиназы и ферментов биосинтеза пролина в разных отделах мозга крыс в послеоперационный период при правосторонней лабиринтэктомии. Обсуждается важная роль богатых пролином соединений в механизмах нейрорегенерации. Проведены измерения импульсной активности нейронов право- и левосторонних вестибулярных ядер в норме и после правосторонней лабиринтэктомии. Сравнительный анализ импульсной активности нейронов вестибулярных ядер выявил изначальную асимметрию в значениях средней частоты импульсации.

*Аргиназа – пролин – лабиринтэктомия – вестибулярные ядра –  
средняя частота импульсации*

Աջակողմյան լաբիրինթէկտոմիային հաջորդող հետվիրահատական շրջանում առնետի ուղեղի տարբեր հատվածներում արգինազի և պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ակտիվացումը ըստ երևույթին կապված է պրոլինով հարուստ միացությունների կարևոր դերի հետ նեյրառեգեներացիայի մեխանիզմներում: Հետազոտվել է աջակողմյան և ձախակողմյան վեստիբուլյար կորիզների նեյրոնների ակտիվությունը նորմալում և աջակողմյան լաբիրինթէկտոմիայից հետո: Վեստիբուլյար կորիզների նեյրոնների իմպուլսային ակտիվության համեմատական անալիզը ցույց է տվել իմպուլսային հաճախականության արժեքների ասիմետրիա:

*Արգինազ – պրոլին – լաբիրինթէկտոմիա – վեստիբուլյար կորիզներ –  
իմպուլսացիայի միջին հաճախականություն*

The increase in arginase activation and that of proline biosynthesis enzymes in different brain parts of right-sided labyrinthectomised rats in post-surgical period is apparently determined by the significant role of proline-rich compounds in neuroregeneration mechanisms. The impulse activation of right and left vestibular nuclei in healthy subjects have been compared with those in subjects after right-sided labyrinthectomy. The comparative analysis of impulse activation patterns of vestibular nuclei has displayed an asymmetry of impulse average frequency values.

*Arginase – proline – labyrinthectomy – vestibular nuclei – impulse average frequency*

Ранее нами исследовалось влияние правосторонней лабиринтэктомии и последующей вибрации на аргиназную активность различных органов крыс, в том числе мозга [8]. Основываясь на данных по выраженному повышению активности

аргиназы в исследованных органах лабиринтэктомированных крыс в ходе восстановительного периода после операции (за исключением участвующего в цикле мочевинообразования печеночного фермента), мы допустили, что оно может быть связано с индукцией неуретелической формы фермента, участвующей в биосинтезе пролина. Важность обеспечения необходимого уровня пролина в ходе восстановительных процессов показана в ряде исследований [1, 4]. Недавние открытия подтверждают важную роль богатых пролином соединений и в механизмах нейрогенерации [11].

В упомянутых выше исследованиях [8] эксперименты нами проводились на цельных отделах мозга. Однако, согласно литературным данным, при односторонней лабиринтэктомии реакция мозга с поврежденной и интактной стороны отличается как по изменению активности ферментов, так и по импульсной активности нейронов [6, 7, 12]. В связи с этим в представленной работе исследования проводились на двух половинках различных отделов мозга – с поврежденной (правой, ипсилатеральной) и неповрежденной (левой, контралатеральной) сторон.

**Материал и методика.** Эксперименты проводились на половозрелых крысах (самки, самцы) массой 200-230 г. Правосторонняя лабиринтэктомия наркотизированных нембуталом животных (40 мг/кг внутривенно) проводилась методом электрокоагуляции, разработанным Мокроусовой [5], с использованием источника постоянного тока. Индифферентный электрод подключали к катоду и крепили на коже головы крысы. Анестезированное животное укладывали в дорсо-латеральном положении, головой к экспериментатору. Через наружный слуховой проход в каудальном направлении вводили активный электрод, плавным покачиванием которого из стороны в сторону проверяли плотность его пролегания, затем в течение 2-3 мин подавали электрический ток (8.0-8.5мА). Через 1.5-2.0 ч после операции при пробуждении животного от наркоза наблюдали клинические признаки лабиринтэктомии: тоническое отклонение глаз вниз – на стороне разрушения, вверх – на противоположной стороне; наличие спонтанного нистагма; наклон головы и туловища в сторону разрушенного лабиринта; маневренные движения животного в ту же сторону; вращательные движения головой и туловищем при положении животного “головой вниз”. При пробуждении животного от наркоза появлялись нистагмоидальные движения головы и шеи, движения “назад”.

В условиях острого эксперимента осуществлялась экстраклеточная регистрация фоновой импульсной активности (ФИА) нейронов контра- и ипсилатеральных нижнего и медиального вестибулярных ядер (контра- и ипси-НВЯ и контра- и ипси-МВЯ соответственно). ФИА нейронов НВЯ и МВЯ отводилась стеклянными микроэлектродами, заполненными 2М раствором NaCl, с диаметром кончика 1-1.5 мкм. Стереотаксическая ориентация электродов в НВЯ и МВЯ осуществлялась по координатам атласа [14].

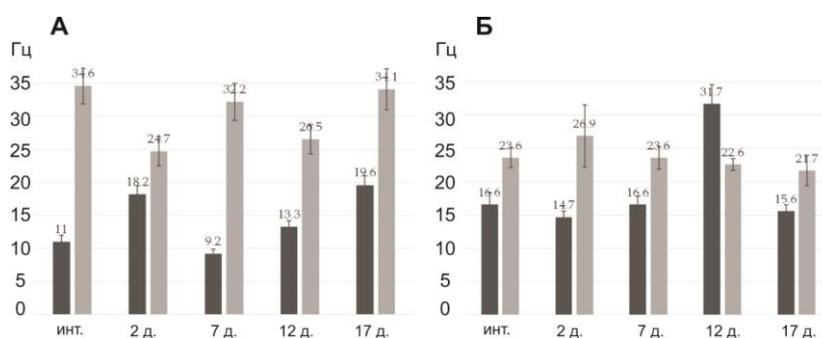
Активность ферментов определялась в гомогенатах обеих половинок разных отделов мозга. Гомогенизация проводилась в гомогенизаторе типа Поттера-Эльвейема в фосфатном буфере, рН 7.4, тефлоновым пестиком в холодных условиях. 10%-ный гомогенат центрифугировался для удаления ядерной фракции и неразрушенных клеток (3000 об/мин, 5 мин). В опытах использовалась надосадочная жидкость.

Аргиназная активность определялась по методу Ратнер и Паппас [15]. Активность выражалась в мкм мочевины. Мочевину определяли методом Арчибальда в модификации Мура (13). Пролин определяли по Блуменкрантцу [10].

**Результаты и обсуждение.** Настоящая работа посвящена исследованию импульсной активности нейронов НВЯ и МВЯ в норме и при правосторонней лабиринтэктомии крыс в двух половинках (ипси- и контралатеральной) различных отделов мозга крыс (большие полушария, мозжечок, продолговатый мозг) в ходе восстановительного периода после операции. Параллельно исследовалась также динамика активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина. Богатые пролином соединения играют важную роль в механизмах нейрогенерации.

НВЯ и МВЯ являются одним из центральных звеньев формирования вегетативных реакций, реализация которых возможна благодаря тесным связям вестибулярных ядер с вегетативными центрами продолговатого мозга. Они участвуют в обеспечении дифференцированных вестибулярных влияний на соматическую и глазодвигательную мускулатуру и в контроле сочетанных движений глаз, головы, туловища и конечностей 16.

В ходе экспериментов по средней импульсной активности нейронов НВЯ и МВЯ выяснилось, что у контрольных животных в норме существует дисбаланс между право- и левосторонними вестибулярными ядрами, т.е. импульсная активность их нейронов в достаточной степени различается (рис. 1). У интактных крыс значение средней частоты импульсной активности нейронов левостороннего НВЯ выше по сравнению с правосторонним более чем в 3 раза. В нейронах МВЯ интактных крыс этот дисбаланс выражен слабее – значение средней частоты импульсной активности нейронов левостороннего МВЯ выше правостороннего менее полутора раз.



**Рис. 1.** Изменение средней импульсной активности нейронов ипси- и контралатеральных НВЯ (А) и МВЯ (Б) после правосторонней лабиринтэктомии.  
 ■ – ипси, □ – контра.

Выявленный межядерный дисбаланс может зависеть от нескольких причин, таких как анатомическая и пространственная асимметрия полукружных каналов, проприоцептивная и межполушарная асимметрия и ряда других, обуславливающих поступление в вестибулярные ядра несимметричных экстралабиринтных сигналов [2, 3].

При правосторонней лабиринтэктомии спустя 2 дня после операции дисбаланс в импульсной активности нейронов контра- и ипсилатерального НВЯ заметно снижается, а на 7-й послеоперационный день он близок к исходному. В последующие дни средняя частота импульсации нейронов контра- НВЯ меняется незначительно, а ипси- НВЯ повышается, на 12-й и 17-й дни после операции значение средней частоты импульсной активности нейронов контра- НВЯ по сравнению с таковой ипси-НВЯ выше в 2 и 1,8 раза соответственно.

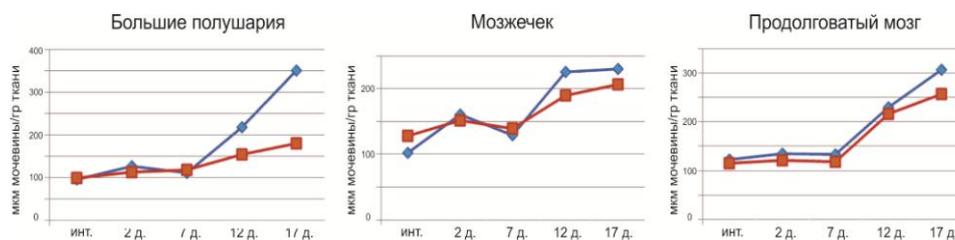
В МВЯ на 2-й день послеоперации дисбаланс более выражен по сравнению с исходным, а на 7-й день средняя импульсная активность нейронов возвращается к норме. В последующие 5 дней активность нейронов контра- МВЯ почти не меняется, а ипси- МВЯ повышается в 2 раза и наблюдается обратный дисбаланс. На 17-й послеоперационный день восстанавливается исходный дисбаланс, но более выраженный.

Таким образом, проявляющаяся пластичность, лежащая в основе вестибулярной компенсации, представляет собой одну из наиболее важных характеристик нервной системы. Принято считать, что пластические перестройки внутрицент-

ральных отношений происходят на основе изменений синаптического аппарата за счет реорганизации межнейронных связей, вследствие чего можно предположить синапсомодифицирующее действие нейропептидных модуляторов.

Согласно литературным данным, модулирующее влияние гистаминэргической системы на нейротрансдукцию в вестибулярных ядрах связано с высвобождением в них глицина и ГАМК [9]. Показано, что с развитием компенсации снижается дисбаланс в уровнях высвобождения ряда аминокислот (аспартат, глицин, таурин, аланин) за исключением глутамата [16]. Учитывая быстроту эффекта восстановления в наших экспериментах, можно предположить, что в основе их действия лежит не преобразование синаптических связей, а активация уже существующих.

Что касается динамики активности ферментов в период восстановления после операции, то, как видно из данных табл. 1 и рис. 2, во всех отделах мозга наблюдаются изменения активности аргиназы в сторону повышения, что проявляется в виде тенденции в первые 7 дней и сильно выражено в течение последующих десяти дней. К окончанию эксперимента на 17-й день активность аргиназы приблизительно в 2-3 раза превышает контрольную в обеих половинках различных отделов мозга почти во всех случаях, за исключением ипсилатеральной половинки больших полушарий, где положительная динамика чуть ниже – 1.8 раза. При сравнении уровня повышения активности аргиназы к концу опыта в ипси- и контралатеральных половинках четко видно, что во всех отделах мозга она выше в контралатеральной: в больших полушариях в 2 раза, мозжечке 1.1 раза и 1.2 раза в продолговатом мозге (рис.2).



**Рис. 2.** Динамика аргиназной активности в ипси- и контралатеральных половинках различных отделов мозга крыс в нейрорегенеративный период после правосторонней лабиринтэктомии.  
◆ – ипси, ■ – контра.

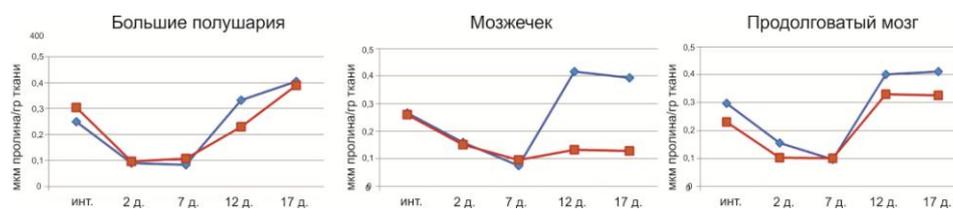
**Таблица 1.** Активность аргиназы в контра- и ипсилатеральных половинках различных отделов мозга крыс в нейрорегенеративный период после правосторонней лабиринтэктомии (мкм мочевины/гр ткани) n=6

сторона отдел	Интактные крысы		Дни после делабиринтации							
			2		7		12		17	
	левая	правая	контра	ипси	контра	ипси	контра	ипси	контра	ипси
Большие полушария	95,2 ± 1,2	98,3 ± 1,2	127,7 ± 1,3	112,6 ± 1,5	112,5 ± 1,6	118,5 ± 1,5	217,4 ± 1,4	154,2 ± 1,5	350,5 ± 3,3	179,8 ± 1,8
мозжечок	102,5 ± 1,2	118,5 ± 1,5	161,5 ± 1,4	131,5 ± 1,5	129,3 ± 1,3	139,4 ± 1,4	225,2 ± 2,3	190,6 ± 2,2	230,5 ± 2,8	206,7 ± 2,4
продолг. мозг	123,3 ± 1,2	115,5 ± 1,3	135,6 ± 1,5	121,3 ± 1,4	134,4 ± 1,8	118,2 ± 1,5	230,3 ± 2,3	216,0 ± 2,2	307,8 ± 3,8	257,3 ± 2,1

С целью выяснения возможной роли пролина в нейрорегенеративных процессах в ходе восстановления после правосторонней лабиринтэктомии нами исследовалась активность ферментов биосинтеза пролина в послеоперационный период. Как видно из данных табл. 2 и рис. 3, во всех отделах мозга и в ипси-, и в контралатеральной половинках активность ферментов биосинтеза пролина после лабиринтэктомии падает, и на 7-й день она в 2-3 раза ниже контрольной. В последующие послеоперационные дни наблюдается положительная динамика в активности ферментов биосинтеза пролина во всех случаях, хотя и есть некоторые различия между отделами мозга. На 12-й день она резко выражена в больших полушариях и продолговатом мозге, причем более в контралатеральных половинках. Если к этому сроку активность ферментов биосинтеза пролина уже выше исходной в обеих половинках продолговатого мозга, то к концу эксперимента она выше исходной и в обеих половинках больших полушарий.

**Таблица 2.** Активность ферментов биосинтеза пролина в контра- и ипсилатеральных половинках различных отделов мозга крыс в нейрорегенеративный период после правосторонней лабиринтэктомии (мкм пролина/гр ткани) n=6

Отдел	Интактные крысы		Дни после делабиринтации							
	левая	правая	2		7		12		17	
			контра	ипси	контра	ипси	контра	ипси	контра	ипси
Большие полушария	0,249±0,027	0,304±0,002	0,09±0,01	0,096±0,001	0,083±0,009	0,107±0,006	0,333±0,03	0,231±0,001	0,405±0,045	0,389±0,005
Мозжечок	0,267±0,018	0,280±0,001	0,160±0,018	0,151±0,005	0,075±0,008	0,095±0,005	0,417±0,046	0,133±0,005	0,393±0,043	0,128±0,001
Продолг. мозг	0,298±0,033	0,230±0,005	0,155±0,017	0,102±0,005	0,097±0,011	0,100±0,005	0,400±0,044	0,330±0,001	0,411±0,046	0,325±0,005



**Рис. 3.** Динамика активности ферментов биосинтеза пролина в ипси- и контралатеральных половинках различных отделов мозга в нейрорегенеративный период после правосторонней лабиринтэктомии.

■ – ипси, контра – ◆.

Что касается мозжечка, то после резкого падения активности ферментов биосинтеза пролина в течение первой послеоперационной недели в равной степени в обеих половинках (с 0.280 до 0.095 в ипси- и с 0.267 до 0.075 в контра-) в последующие дни наблюдается большая разница в динамике активности этих ферментов в разных половинках. Если на 12-й день в ипсилатеральной половинке заметен незначительный сдвиг в сторону повышения активности и до конца опыта она не достигает даже половины контрольной, то в контралатеральной активность ферментов биосинтеза пролина резко повышается – с 0.075 до 0.417 и остается почти на таком же уровне до конца эксперимента, превышая контрольную в 1.5 раза.

Положительная динамика в активности ферментов биосинтеза пролина, начиная с седьмого дня регенеративного периода после операции, может быть связана с обеспечением его необходимого уровня в ходе нейрорегенерации. Параллельное повышение активности аргиназы, очевидно, связано с индукцией участвующей в биосинтезе пролина формой фермента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А., Х. Матинян Л.А., Чавушян Е.А., Чубарян С.В., Туманян Л.Р., Никоян А.А., Мартиросян М., Агаджанян А.А. Влияние вскармливания солодкой и перерезки седалищного нерва на активность аргиназы и ферментов биосинтеза пролина в различных органах крыс. Вестник МАНЭБ 7, 54, 6, Санкт -Петербург, 2002.
2. Войтенко Л.П. Организация вестибулоспинальной системы у позвоночных. Нейрофизиология, 24, 2, с. 215-238, 1992.
3. Горгиладзе Г.И., Сомарин Г.И., Брянов И.И. Межлабиринтная асимметрия, вестибулярная дисфункция, космическая биология движения. Косм. биология и авиакосм. медицина, 3, с 19-31, 1986
4. Давтян М.А., Агаджанян А.Х., Гаспарян Х.Г. Взаимосвязь аргиназы и ферментов биосинтеза пролина кишечника при регенерации дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Биолог. журн. Армении, 35, 8, 631-635, 1982
5. Мокроусова А.В. Делабиринтация белых крыс методом электрокоагуляции. Росс. физ. журнал СССР, 66, 4, 599-602, 1980.
6. Саркисян С.Г. Меликсетян И.Б., Минасян С.М., Мелкумян К.В. Сравнительная характеристика импульсной активности ипси- и контралатеральных нейронов нижнего вестибулярного ядра у делабиринтированных крыс. Ж. Асимметрия 3, 3, с. 13-28, 2009.
7. Саркисян С.Г. Меликсетян И.Б., Минасян С.М. Сравнительная характеристика импульсной активности ипси- и контралатеральных нейронов медиального вестибулярного ядра у лабиринтэктомированных крыс. Ж. Асимметрия 5, 1, с. 46-60, 2011.
8. Туманян Л.Р., Никоян А.А., Саркисян С.Г., Давтян М.А. Активность аргиназы различных органов крыс, подвергнутых правосторонней лабиринтэктомии. Биолог. журн. Армении, 65, 4, с. 35-38, 2013.
9. Balaban C.D., Beryozkin G. Organization of vestibular nucleus projections to the caudal dorsal cap in rabbits. Neuroscience, 62, 4, p. 1217-1236, 1994.
10. Blumenkrantz N. Automated triple assay for proline, hydroxylic inactivation of beef liver arginase. Biochem. Biophys. Acta 327, p. 157-165, 1973.
11. Bonilla I., Tanobi K., Strittmater S.M. Small proline – rich repeat protein A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. J. of Neuroscience, 2, 4, 1303-1315, 2002.
12. Keer D.R., Sanson A.J., Smith P.F., Darlington C.L. Comparison of protein kinase activity and protein phosphorylation in the medial vestibular nucleus and prepositus hypoglossi in labyrinthintact and labyrinthectomized guinea pigs. J. Vestib. Res., 10, 2, p. 107-117, 2000.
13. Moore R.B., Kauffmann N.J. Simultaneous determination of citrulline and urea using diacetylmonoxime. Annal Biochem., 33, 263-272, 1970.
14. Paxinos G., Watson G. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney Acead. Press, 2005.
15. Ratner S., Puppas A. Biosynthesis of urea I. Enzymic mechanism of arginine synthesis from citrulline. J. Biol. Chem., 179, p. 1183-1198, 1949.
16. Yates B.J. Vestibular influence on the autonomic neurons system. Ann. New York Acad. Sci., 781, p. 459-473, 1996.

Поступила 23.11.2016