

# Исследование протекторного эффекта нейрогормонов гипоталамуса "С" и PRP-1 на нейроны спинного мозга в условиях интоксикации змеиными ядами *Vipera Lebetina Obtusa* и *Naja Naja Oxiana*

Дж.С. Саркисян, Р.М. Срапионян, В.А. Чавушян, Ж.Г. Абемян, З.Х. Паронян,  
Ф.Н. Саакян, М.Ш. Мурадян, А.А. Галоян

*Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА,  
Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА*

*375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1*

**Ключевые слова:** нейроспецифический кардиоактивный белок-гормональный комплекс "С", гипоталамический нейрогормон-цитокин PRP-1, вызванная активность мотонейронов, змеиные яды, нейропротекция

Открытие акад. Галояном А.А. и Срапионян Р.М. семейства нейроспецифических кардиоактивных белок-гормональных комплексов (БГК) [9] и нейрогормонов - цитокинов, продуцируемых супраоптическим и паравентрикулярным ядрами гипоталамуса, а также исследования опосредуемой PRP-1 (praline-rich peptide) ингибции проапоптотических каспаз -3 и -9 и активации каспаз -2 и -6 [11] явились началом изучения универсальных протекторных свойств PRP-1 при нейродегенеративных процессах. Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о протекторном эффекте PRP-1 на интернейроны (ИН) и мотонейроны (МН) спинного мозга (СМ) после перерезки седалищного нерва [13] и латеральной гемисекции СМ [12]. В отдельном исследовании изучены также сравнительные протекторные эффекты гипоталамических кардиоактивных БГК "С" и "Г" - специфических регуляторов коронарного кровообращения в условиях перерезки седалищного нерва, и на основании разнонаправленной (иммунотропной - PRP и кардиотропной - БГК "С" и "Г") специфичности проявляемых эффектов было выдвинуто допущение самостоятельного и комбинированного применения указанных нейрогормонов в клинической практике [5]. Выявлены характерные сдвиги эндогенных уровней металлопротеинов про- и антиоксидантного действия (МПД и МАД соответственно) в крови, печени, сердце и мозге при интоксикации змеиным ядом (ЗЯ), свидетельствующие о развитии окислительного стресса, обусловленного повышением дисбаланса между МПД и МАД [4]. Предварительное использование БГК "С" и PRP-1 предотвращало изменения антиоксидантного и прооксидантного статуса в указанных органах в условиях хронической интоксикации, что позволило сделать предположение об антиоксидантной роли указанных

нейрогормонов, опосредованной регуляцией метаболизма важнейших металлопротеинов, влияющих на обмен  $O_2^-$  и предотвращающих развитие деструктивных процессов в крови и тканях [4]. Результаты исследований, подтверждающие влияние БГК и PRP-1 на метаболизм известного фермента каскадного механизма - фактора Ха [7], свидетельствуют об их участии в молекулярных механизмах свертывания крови. Учитывая тесную связь между нарушением кровотока и состоянием активности структур мозга, а также специфическую направленность воздействия кардиотропных нейрогормонов на сосудистую систему и иммуномодулирующие и нейропротекторные свойства PRP-1, представляло очевидный интерес испытание протекторной эффективности кардиоактивного нейрогормона БГК как при самостоятельном, так и сочетанном с PRP-1 системном (в/м) применении при острых и хронических токсикозах, вызванных применением ЗЯ (за 1, 3, 7 и 20 дней до электрофизиологического эксперимента) на примере экстраклеточного исследования потока фоновой и вызванной импульсной активности одиночных МН СМ.

## Материал и методы

Эксперименты проведены на 22 зрелых крысах-самцах Альбино ( $230 \pm 30$  г) с предварительным (за 24 часа до интоксикации ЗЯ) применением БГК и PRP-1 (в/м  $10 \mu/100$ г). Через 1, 3, 7 и 20 дней после введения ЗЯ гюрзы (*Vipera Lebetina Obtusa* - VLO, LD50=1 мг/кг) и среднеазиатской кобры (*Naja Naja Oxiana* - NOX, LD50=1,9 мг/кг) в остром эксперименте крысу обездвигивали 1% дитилином (25 мг/кг в/б), переводили на искусственное дыхание и производили сечение СМ

под новокаином с помощью ультразвукового скальпеля на T2-T3 спинальном уровне. После фиксации пояснично-крестцового отдела позвоночника в стереотаксическом аппарате производилась ламинэктомия данной области с вскрытием СМ. Стереотаксически ориентированный стеклянный микроэлектрод с кончиком 1-2  $\mu\text{M}$ , заполненный 2M NaCl, вводили в вентральные рога серого вещества СМ в сегментах L4-L5 для регистрации одиночной активности МН, вызванной на раздражение экстензорного (*n. peroneus communis* - P) и флексорного (*n. gastrocnemius* - G) нервов задних конечностей, с ипси (i)- и контралатеральной (c) стороны (Pi, Pc, Gi, Gc соответственно).

Производили *on line* селекцию и программный анализ импульсной активности отдельных МН СМ. Вычисляли PETH (Peri-Event Time Histogram) межспайковых интервалов для соответствующего статистического анализа возбуждающих и тормозных периодов нейрональной активности. Вычисляли постстимульную нейрональную тоническую активность (ТА) посредством их средних уровней (M) и 2-стандартного отклонения (SD) с исключением интервалов, превышающих пределы средней. Составляли кумулятивные кривые для фоновой (ФА) и ТА. Наклон линий, аппроксимирующих данные кривые, определяли методом квадратических отклонений. Значения различия ( $p$ ) между этими наклонами вычисляли посредством двустороннего  $t$ -теста Стьюдента. Для оценки частот постстимульной гистограммы, которые попадали за пределы  $M \pm 2SD$ , применяли тот же метод подсчета наклона тонической кривой. Все заключения статистически значимы.

Электрофоретические гомогенные препараты БГК получены по методу Срапионян Р.М. и сотр. [3]. Препарат PRP-1 получен биотехнологическим способом в отделении биохимии нейрогормонов Института биохимии им. Г.Х. Бунятыан НАН РА. Стандартизация и хранение указанных ядов осуществлено научно-исследовательской лабораторией по пурификации и стандартизации физиологически активных веществ Института физиологии им. Л.А.Орбели.

## Результаты и обсуждение

В норме компоненты активации пре- и постстимульных реакций МН СМ распределялись в следующих временных пределах: первичный ранний ответ (ПРО) возникал на 3 - 15 мс; первичный поздний ответ (ППО) - от 8-10 до 20-30 мс; вторичный ранний ответ (ВРО) - от 25-30 до 50-60 мс; вторичный средний ответ (ВСО) - от 50 до 200-250 мс; вторичный поздний ответ (ВПО) - до 500-550 мс.

Рассмотрим характерные примеры временной последовательности и процентной выраженности различных компонентов отмеченных ответов на различ-

ных глубинах области МН поясничного отдела СМ (пластины VIII-IX по Рекседу) на раздражение ипси- и контралатеральных флексорного и экстензорного нервов в условиях патологии с учетом особенностей постстимульных проявлений нейрональной активации в интактном препарате.

На рис. 1 представлены проявления перистимульных активностей двух одиночных МН СМ на глубине 1400  $\mu\text{M}$  (А-Г) и 1100  $\mu\text{M}$  (Д, Е) при раздражении нервов Gc (А), Pc (Б), Gi (В, Д), Pi (Г, Е) спустя 1 день после введения VLO (протекция посредством изолированного применения БГК за 24 часа до интоксикации). Раздражение нерва Gc (А) вызывает первичные ответы (ПО) до 80 мс, затем выраженный ВСО и ВПО на период с 200 по 400 мс. На стимуляцию нерва Pc (Б) регистрировались ПРО до 20 мс, вторичные ответы (ВО) на тот же период с последующим спадом активности до ТА. В том же МН раздражение Gi (В) вызывает незначительную активацию на 10 мс, затем выраженное торможение на период ВО с последующим облегчением ТА до уровня ФА. Стимуляция Pi (Г) вызвала формирование лишь ПО без выраженного пика активности и далее с 80 мс - выраженную ТА. Второй МН (глубина 1100  $\mu\text{M}$ ) проявляет незначительную активность в виде ПО с удлинённой латенцией (до 10 мс) на раздражение как Gi (Д), так и Pi (Е). ВО, следующий за периодом торможения до 160 мс, проявляет незначительную выраженность по сравнению с ТА. Таким образом, спустя один день после ядирования компонентный состав вызванной активности МН проявляет сохранность с отставленными временными параметрами ПО и ВО на фоне высокого уровня ФА в данной модели ядирования с предварительной (за 24 часа) протекцией посредством БГК.

Характерный пример PETH спайковой активности одиночного МН СМ (на глубине 1250  $\mu\text{M}$ ) спустя 20 дней после введения VLO (протекция посредством изолированного применения БГК за 24 часа до ядирования) иллюстрирует рис. 2. На раздражение нерва Pi (А) после сильно выраженного ПО с латенцией 2-3 мс и незначительного ВРО наступает резкий спад до уровня ТА. Стимуляция Gi (Б) формирует коротколатентный ПРО, торможение на период ВО. Таким образом, спустя 20 дней отмечается приближение к норме во временной последовательности и взаимоотношении формирования ответов на стимуляцию ипсилатеральных флексорных и экстензорных нервов, что может свидетельствовать о нормальном статусе синаптической активации. Рис. 2 (В, Г) рассматривает особенности постстимульной активации МН (на глубине 1600  $\mu\text{M}$ ) при раздражении Gi (В), Pi (Г) спустя 3 дня после введения VLO (протекция посредством комбинированного применения БГК и PRP-1 за 24 часа до ядирования). На рис. 2В после ПО, с латенцией 5-8 мс и выраженным пиком на 30 мс, наступает кратковременный спад до уровня ТА, сопровождаемый подъемом



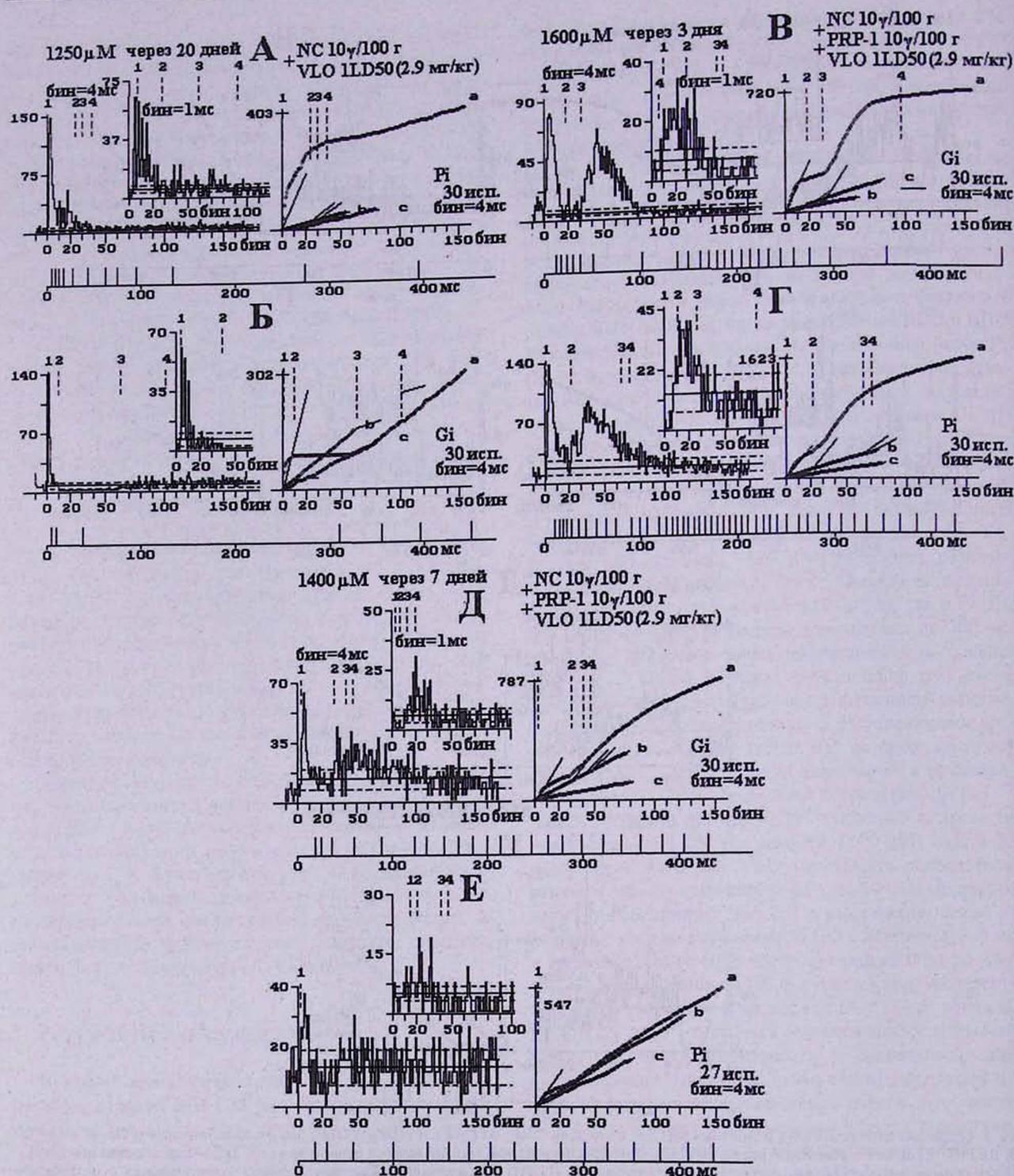


Рис. 2. Спайковая активность одиночного МН СМ (на глубине 1250  $\mu\text{M}$ ) при раздражении нервов Рi (А), Gi (Б) спустя 20 дней после введения VLO (протекция посредством изолированного применения БНС за 24 часа до ядрования); МН (на глубине 1600  $\mu\text{M}$ ) при раздражении нервов Gi (В), Рi (Г) спустя 3 дня после введения VLO (протекция посредством комбинированного применения БНС и PRP-1 за 24 часа до ядрования) и МН (на глубине 1400  $\mu\text{M}$ ) при раздражении нервов, Gi (Д), Рi (Е) спустя 7 дней после введения VLO (протекция посредством комбинированного применения БГК и PRP-1 за 24 часа до ядрования)



активности в виде ВО с пиком на 200 мс. На раздражение Pi (Г) ПО более выражен по сравнению с ВО, с аналогичным проявлением временной последовательности.

На рис. 3 на примере МН СМ (глубина 1600  $\mu\text{M}$ ) при раздражении ипси- и контралатерального экстензорного и флексорного нервов рассматриваются характерные особенности динамики изменения компонентного состава РЕТН под воздействием яда NOX (в/б введением LD50=1 мг/кг в процессе острого эксперимента) в условиях предварительного (за 24 и 3 часа соответственно) применения PRP-1 и БНС. На раздражение Gi (А) после сильно выраженных коротколатентного ПРО и ППО регистрируется активация в виде выраженного суммарного ВРО, ВСО и ВПО отклонений. На рис. 3В показано, что уже с первой минуты ядирования все компоненты ответов (на 32 испытания) уменьшаются в процентной выраженности без изменений во временной последовательности. Раздражение Pi (Б) в том же МН выявляет одинаковой выраженности ПРО и ППО в той же временной последовательности и ВО начиная с 120 мс, которые незначительно превышают уровень ТА. На рис. 3 (Г,Д) сравнительно с 3Б демонстрируется превалирование ранних постстимульных проявлений активации с резким подавлением ТА и ФА спустя 3 и 21 минуты, соответственно, после ядирования. Испытание ответоспособности данного МН на стимуляцию контралатеральных нервов (Е-И) спустя 25–28 мин после ядирования (З, И) также демонстрирует превалирование ПО (сравни с Е и Ж – до ядирования). Таким образом, комбинированная протекция в данном случае с применением яда семейства *Elapidae* оказалась менее эффективной.

Обобщая вышеотмеченные результаты исследования компонентного состава РЕТН постстимульных ответов и не вдаваясь в детальный анализ нейронной организации, лежащей в основе отмеченных ответов, отметим следующее: ПО являются результатом вовлечения ИН и МН данного сегмента, в частности МН в двухнейронную рефлекторную дугу или через посредство ИН аппарата. Разделение ВО обосновывается вовлечением определенных рефлекторных дуг. ВРО, по-видимому, объясняется активацией паттерна внутриспинального флексорного рефлекса. Последующие ВО, согласно латенции, вероятно, формируются благодаря вовлечению нейронных элементов близлежащих сегментов.

Согласно литературным данным, исследованные яды (в существенно меньшей степени яд кобры) стимулируют процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ). Это важно в том аспекте, что многие геморрагические заболевания тромбоцитарного генеза сопровождаются процессами ПОЛ, протекающими по свободнорадикальному пути. Интенсификация ПОЛ в тромбоцитах, в свою очередь, может привести к по-

вреждению клеточных мембран посредством дегградации фосфолипидов, снижения активности мембраносвязанных ферментов и проницаемости мембран. Имеется предположение, что PLA2, отщепляя арахидоновую кислоту, способствует ее поступлению в цикл ПОЛ и таким образом стимулирует его. Яды змей, содержащие гемокоагулирующие компоненты, делятся на активирующие фактор крови X, активирующие протромбин (фактор II) или коагулирующие фибриноген [1]. Геморрагическое же действие ядов связано с наличием протеолитических ферментов, а гемолиз эритроцитов и стимуляция свертывания крови – наличием фосфолипазы [2]. Выявлено, что металлопротеины ЗЯ прямо воздействуют на капилляры кровеносных сосудов, вызывая отек и высвобождая TNF- $\alpha$  [14]. Отравление ЗЯ из семейства *Elapidae* (*Crotalus durissus terrificus*) вызывало нейтрофилию и лимфопению, повышало уровни мукопротеинов и С-реактивного протеина, цитокинов IL-6 и IL-8 в сыворотке крови, в то же время понижая тотальные сывороточные протеины и альбумины, что напоминает острую травму в острой фазе ответа [6]. Исследуется роль ЗЯ в апоптозе, в частности вклада PLA2 в высвобождение арахидоновой кислоты и других биоактивных липидов, являющихся модуляторами синаптической функции [15]. Показана индукция апоптоза посредством генерации ROS в эндотелиальных клетках, обработанных ЗЯ. Причем апоптотическая гибель предотвращается претритментом TNF [16]. Здесь уместно отметить, что PRP-1 является ингибитором активности PLA2 – основного триггера ряда тяжелых последствий интоксикации [10], иммуномодулятором и стимулятором иммунокомпетентных клеток (пролиферация Т-клеток; активация натуральных киллеров, макрофагов, моноцитов и нейтрофилов; пролиферация астроцитов и экспрессия провоспалительных цитокинов), активирует образование IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  в астроцитах [11], регулирует окислительный взрыв в эффекторных клетках иммунной системы [8]. Более того PRP-1 является нейротрофиноподобным соединением, стимулирующим секрецию таковых из нейроглиальных элементов [11]. Все вышеотмеченное позволяет с определенной долей вероятности предположить возможный механизм протекторного эффекта изученных в настоящем исследовании нейрогормонов.

Не останавливаясь на деталях особенностей нейродегенеративных сдвигов в МН СМ можно сделать утверждение об успешном протекторном эффекте индивидуального и сочетанного применения нейрогормонов “С” и PRP-1 в отношении последствий интоксикации ядами VLO и NOX. Протекторный эффект при токсической нейродегенерации, сопровождающей изменение кроветворения и кровообращения, проявлялся в более или менее стабильном восстановлении исходного уровня вызванной электрической активно-

сти нейронов в результате предполагаемого предот-  
вращения высвобождения физиологически активных  
соединений, провоцирующих повышение сосудистой  
проницаемости, геморрагический отек, внутрисосуди-  
стый гемолиз, понижение кислородсвязывающих  
свойств гемоглобина и потенцированных активирующе-  
щим действием PLA2 на мембранные цитотоксины и

фактор Ха. Вышеотмеченное позволяет предположить  
перспективу изучения механизмов действия с учетом  
опосредования эффектов не только через гумораль-  
ные, но и соответствующие нервные проекции от ги-  
поталамических ядер, вырабатывающих указанные  
нейрогормоны.

Поступила 20.05.06

## Նիպոթալամիկ նյարդահորմոններ PNC և PRP-1 նյարդապաշտպանիչ ազդեցության ն ուսումնասիրությունը ողնուղեղային նյարդաքցիզների Vipera Lebetina Obtusa և Naja Naja Oxiana օձերի թույներով ինտոքսիկացիայի պայմաններում

Զ.Ս.Սարգսյան, Ռ.Մ.Սրապիոնյան, Վ.Ա.Չավուշյան, Ժ.Գ.Աբելյան, Զ.Խ.Պարոնյան,  
Ֆ.Ն.Սահակյան, Մ.Շ.Մուրադյան, Ա.Ա.Գալոյան

Նախկինում հայտնաբերված են PNC (protein-neurohormone "C" complex) և PRP-1 (proline rich peptide) ընդհանուր առմամբ նյարդահորմոնների նյարդապաշտպանիչ հատկությունները տրավմատիկ ծագման ուղիով նյարդաղեղեղեղային ենթարկված ողնուղեղային Ռ(ՌՌ) շարժիչ նեյրոնների (ՇՆ) նկատմամբ, ինչպես նաև օձերի թույներով (ՕԹ) առաջացված խրոնիկական ինտոքսիկացիայի պայմաններում PNC և PRP-1 նախնական օգտագործմամբ ուղեղի և արյան պերիտոքսիդանտ և հակաօքսիդանտ ստատուսի փոփոխությունները կանխարգելելու հնարավորությունները:

Տվյալ աշխատանքում ներկայացված են փաստերը Vipera Lebetina Obtusa և Naja Naja Oxiana ՕԹ նեյտարկման (միանվագ LD<sub>50</sub> չափաբաժնով) հետևանքով

ինտոքսիկացիայի (1, 3, 7 և 20 օրերի ընթացքում) պայմաններում նշված նյարդահորմոնների նախնական (թունավորումից 24 ժամ առաջ, անցատ և գուգորդված) կիրառման ազդեցության արդյունավետ նյարդապաշտպանիչ առկայության վերաբերյալ ՌՌ ՇՆ հրահրված էլեկտրական բնականոն ակտիվությանը բավականաչափ համապատասխանող իմպուլսային հոսքի գրանցման օրինակով: Ելնելով ստացված տվյալներից՝ ենթադրվում է PNC-ի և PRP-1 ուղղակի մասնակցությունը արյան մակարդեղիության մեխանիզմի հիմնական ֆերմենտ X<sub>2</sub>-ի մետաբոլիզմին, ինչպես նաև PRP-1-ի ճնշող ազդեցությունը ինտոքսիկացիաների հիմնական տրիգեր՝ PHLA<sub>2</sub>-ի ակտիվության վրա:

## The study of protective effect of the hypothalamic neurohormone "C" and PRP-1 on the spinal cord neurons at snake venoms Vipera Lebetina Obtusa and Naja Naja Oxiana intoxication

J.S. Sarkissian, R.M. Srapionyan, V.A. Chavushyan, J.G. Abelyan, Z.Kh. Paronyan,  
F.N.Sahakyan, M.Sh.Muradyan, A.A. Galoyan

There have been conducted semichronic experiments on rats in conditions of preliminary (over 24 hours) administration of the cardioactive protein-neurohormone "C" complex (PNC) singly or in combination with the new hypothalamic immunomodulator PRP-1 with subsequent administration (LD50) of snake venoms gjurza (Vipera lebetina Obtusa - VLO) and Central Asian cobra (Naja naja Oxiana - NOX) in conditions of bilateral stimulation of the hind limbs extensor and flexor nerves and long-term registration of frequency changes of the spinal cord (SC) motoneurons (MN) single activity flow at 1, 3, 7, 20 days of survival. On the base of the developed soft mathematical operative "on-line" analysis the significance and temporary succession of the component composition of

the early and late manifestations of poststimulus activity of MN in lumbar segments of SC in pathology were investigated. It has been revealed the successful protective effect of PNC and PRP-1 in all the mentioned cases. Earlier it has been demonstrated that PNC inhibits the aggregation of thrombocytes. It should be mentioned the important role of PRP-1 at inhibition of the PHLA<sub>2</sub> - the basic trigger of a number of heavy complications induced by intoxication. These data make a contribution to the study of the effect of PNC and PRP-1 on the cascade enzymatic system of blood clotting. The results demonstrate the possibility of application the PNC singly or in combination with the PRP-1 as neuroprotectors at toxic neurodegenerative pathologies of central nervous system.

## Литература

1. *Калмыкова И.Б., Славянова Т.И., Шадыбекова О.Б. и др.* Процессы перекисного окисления липидов и жирнокислотный состав липидной фазы тромбоцитов под влиянием ядов среднеазиатских змей. Пробл. гематол., 1977, т. 2, с. 20–23.
2. *Любимцева Г.Е., Юкельсон Л.Я.* Исследование яда степной гадюки *Vipera ursini renardi*. II. Химическая и биологическая характеристика фракций. Химия природ. соединений, 1980, 1, с. 73–75.
3. *Срапионян Р.М.* Нейроспецифические белок-гормональные комплексы. Успехи физиологических наук, 1996, т. 27, 1, с. 21–31.
4. *Срапионян Р.М., Бабаян М.А., Симонян М.А. и др.* Исследование индивидуального и сочетанного влияния гипоталамо-нейрогипофизарных гормонов и яда змеи (*Vipera Lebetina Obtusa*) на уровни про- и антиоксидантных металлопротеинов в крови и ряде органов крыс. Нейрохимия (РАН и НАН РА), 2004, т. 21, 2, с. 125–128.
5. *Чавушян В.А., Срапионян Р.М., Паронян З.Х. и др.* Протекторный эффект кардиоактивных гипоталамических белок-гормональных комплексов «С» и «Г» при повреждении периферического нерва. В сб. Информационные технологии и управление, Энциклопедия – Армения, Ереван, 2004, 2, с. 218–230.
6. *Barraviera B., Lomonte B., Tarkowski A., Hanson L.E., Meira D.A.* J. Venom Anim. Toxins Botucatu, 1995, v. 1, p. 1.
7. *Coggin H.H., Srapionian R.M., Galoyan A.A., Brecher A.S.* J. Invest. Medicine, 5, (Suppl.) Abstract 2002, 129, p. 234A.
8. *Davtyan T.K., Manukyan H.M., Hakopyan G.S., Mkrtchyan N.R., Avetisyan S.A., Galoyan A.A.* Neurochem. Res., 2005, 30(3), p. 297–309.
9. *Galoyan A.A., Srapionian R.M.* Neurochem. Research, 1983, v. 8, 12, p. 1511–1535.
10. *Galoyan A.A., Kazaryan A.P., Kazaryan P.A.* Neurokhimia, 2001, 18, 4, S. 279–286.
11. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. N.Y., 2004.
12. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Chavushyan V.A., Sulkhanyan R.M., Avakyan Z.E., Avetisyan Z.A., Grigorian Y.Kh., Abrahamyan D.O.* Neurochem. Research, 2005, 30, 4, p. 507–525.
13. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Sulkhanyan R.M., Chavushyan V.A., Gevorgyan A.J., Avetisyan Z.A., Avakyan Z.E., Abrahamyan D.O., Grigorian Y.Kh.* Neurochem. Res., 2005, 30, 4, p. 487–505.
14. *Gutierrez J.M., Rucavado A.* Biochimie, 2000, 82, 9-10, p. 841–850.
15. *Kolko M., DeCoster M.A., de Turco E.B., Bazan N.G.* J. Biol. Chem., 1996, 271, 51, p. 32722–32728.
16. *Suzuki K., Nakamura M., Hatanaka Y., Kayanoki Y., Tatsumi H., Taniguchi N.* J. Biochem. (Tokyo), 1997, 122, 6, p. 1260–1264.