

ВЛИЯНИЕ ЯДА КОБРЫ НА ПРОЦЕСС ВЕСТИБУЛЯРНОЙ КОМПЕНСАЦИИ ПОСЛЕ ОДНОСТОРОННЕЙ ЛАБИРИНТЭКТОМИИ

*Н.Халаджи**, *Л.Э. Амбарцумян***, *Л.П. Манукян***, *В.А. Саргсян***

*Университет медицинских наук Урмии, кафедра физиологии, Урмия, Иран

**Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА, Ереван, Армения,

vsargsyan@neuroscience.am

Проблема вестибулярной компенсации (ВК) остается одной из актуальных задач современной нейронауки, непосредственно связанной с восстановлением активности вестибулярных ядер (в частности ЛВЯ) на травмированной стороне. Электрофизиологические исследования показывают, что VIII нерв не подвергается функциональному восстановлению, поэтому ВК была отнесена к пластичности центральной нервной системы. Было показано, что вестибулоспинальные нейроны ЛВЯ Дейтерса имеют широкие взаимоотношения с многочисленными структурами мозга и выступают в качестве основного центра верхней сегментарной регуляции позы, равновесия и ориентации в пространстве [10]. В свою очередь, гипоталамус, являясь высшем интегративным звеном в регуляции вегетативных функций, осуществляет свою деятельность посредством многочисленных реципрокных прямых и полисинаптических связей с ядрами продолговатого мозга и грудных сегментов спинного мозга. Среди упомянутых структур мозга особый интерес представляют гипоталамические нейроэндокринные центры, такие как ПВЯ и СОЯ, благодаря своим прямым связям с нейронами ЛВЯ. Ранее, методом ретроградного аксонного транспорта HRP, нами исследованы прямые билатерально организованные гипоталамо-ЛВЯ проекции [7].

В биомедицинских исследованиях последнего десятилетия интенсивно изучается терапевтические возможности влияния ядов [3, 8]. В настоящем исследовании представлены данные о характеристиках нейронов деафферентированного ядра Дейтерса после обработки ядом среднеазиатской змеи NOX, а также динамику их восстановления после ОЛ.

У односторонне лабиринтэктомированных (ОЛ) крыс изучали эффект инъекции яда кобры *Naja Naja Oxiana* (NOX) на изменения импульсной активности и гистохимически выявляемой Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (КФ) нейронов латерального вестибулярного ядра Дейтерса (ЛВЯ). Белые крысы были разделены случайным образом на три группы (n=16): контрольную, с ОЛ и с ОЛ, получившие лечение NOX. На 9-й день лечения регистрировали электрическую активность нейронов ЛВЯ в ответ на высокочастотную стимуляцию (ВСЧ) паравентрикулярного (ПВЯ) и супраоптического (СОЯ) ядер гипоталамуса. Постстимульную активность

нейронов ЛВЯ определяли как тетаническую потенциацию (ТП) и депрессию (ТД). В группах с ОЛ и ОЛ с NOX, компенсаторное увеличение ТД и ТП сравнивалось с данными контрольной группы. Гистохимические свойства нейронов ЛВЯ были протестированы с помощью выявления активности Ca^{2+} -зависимой КФ. В группе животных с ОЛ в нейронах ядра Дейтерса наблюдалась картина медленного центрального хромотолиза, приводящая к нейродегенеративному образцу клеточной “тени”, вплоть до полного ее исчезновения.

Эксперименты проводились на нормальных ОЛ животных (взрослых самцах- белых крыс - 230 ± 30 г) без (плацебо контроль) и с введением NOX (5% LD50, 1 мг/кг, в/м через три дня после ОЛ). В остром эксперименте животное обездвигивали 1% дитилином (25 мг/кг в/б), переводили на искусственное дыхание и производили сечение спинного мозга на T₂-T₃ спинальном уровне, для получения препарата *encephale isole*. Стереотаксически ориентированный стеклянный микроэлектрод с кончиком 1-2 μ М, заполненный 2М раствором NaCl, вводили в ЛВЯ для отведения потока спайковой активности одиночных нейронов, вызванного на ВЧС ПВЯ и СОЯ (прямоугольными толчками тока - 0.05 мс, 0.12-0.18 мВ, 0.32 мА, частотой 50 и 100 Гц в течение 1 сек).

Анализ ранних и поздних постстимульных проявлений активности производили в режиме *on-line* селекции и программного математического анализа спайков. Использовали построения комплексных усредненных и суммированных перистимульных временных гистограмм (*peri-event time histogram* - РЕТН), и гистограмм частоты с вычислением средней частоты спайков. Постстимульная активность была выявлена по типу ТП и ТД с последующей посттетанической потенциацией (ПТП) и депрессией (ПТД) различной латенции, интенсивности и продолжительности.

Гистохимическое исследование активности Ca^{2+} -зависимой КФ проводилось согласно новым подходам [2].

Исследование импульсной активности потока отдельных нейронов ЛВЯ, вызванной билатеральной стимуляцией ПВЯ и СОЯ проводили у спинальных крыс в норме (7 крыс, 128 нейронов) и после введения NOX (9 крыс с ОЛ, 219 нейронов). Были проанализированы ТП и ТД с последующими ПТП и ПТД в ответ на стимуляцию ПВЯ и СОЯ при введении NOX (Рис.1).

Представляет интерес сравнительная оценка степени выраженности постстимульных возбуждающих и тормозных эффектов на ВЧС (50, 100 Гц) ПВЯ и СОЯ на неповрежденной стороне на 3-9-й день после ОЛ (Рис. 1).

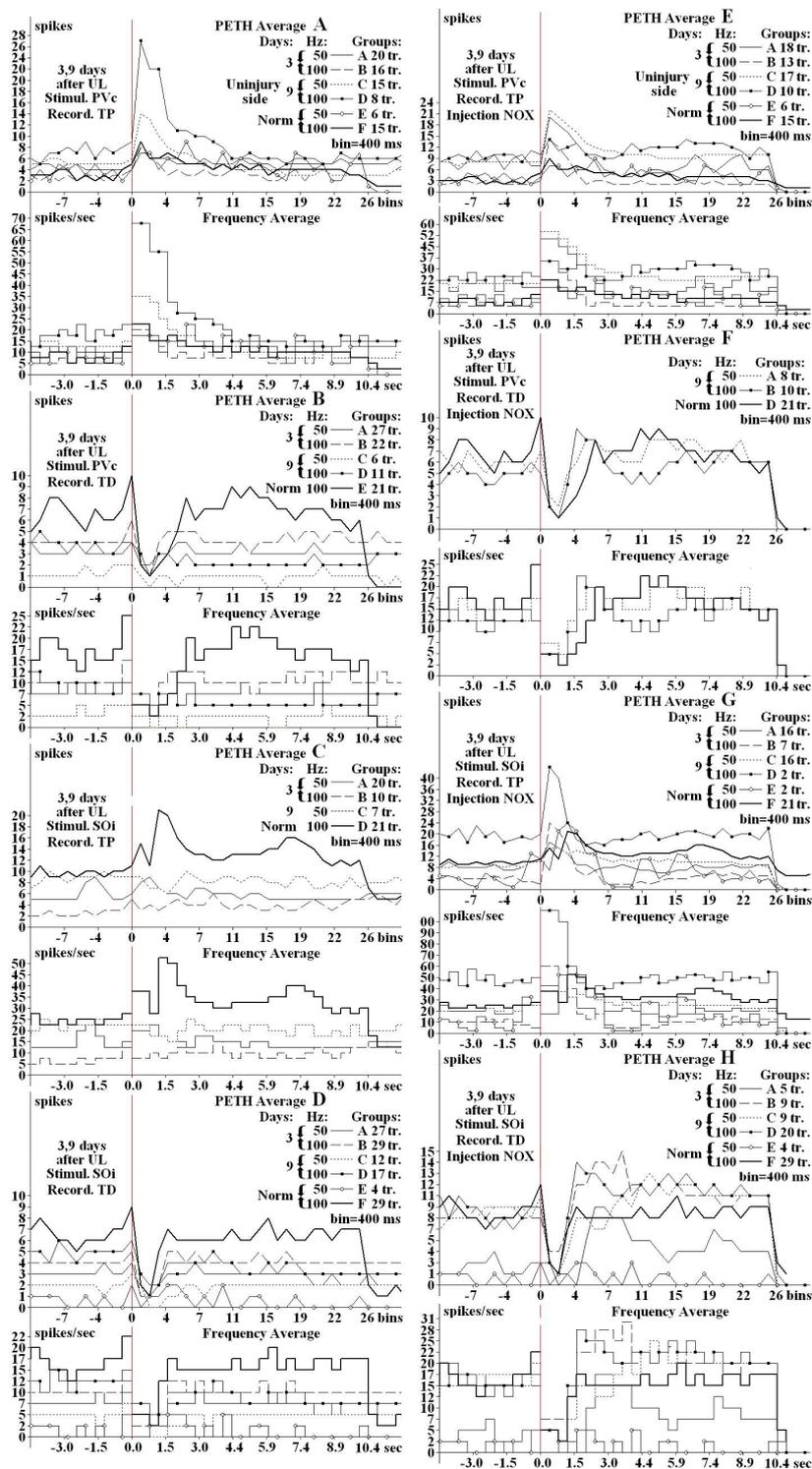


Рис. 1. А-Н - Комплексное среднее (PETH Average) и частотное (Frequency Average) гистограммы активности спайкинга нейронов на ВЧС 50 и 100 Гц контралатерального ПВЯ (А-Д) и ипсилатерального СОЯ (Е-Н) без-(АД) и (ЕН) и с использованием NOX у крыс после ОЛ. Двусторонние записи возбуждающей (А, С, Е, G) и тормозной (В, D, F, H) тетанической потенции (ТП - А, С, Е и G) и депрессии (ТД - В, D, F и H) из поврежденной и неповрежденной (норма) сторон. Рядом с каждой группой указано количество тестов

В целом, относительно значительные изменения имели место на 3-ий и 9-ый дни. На 3-й день после ОЛ почти вдвое увеличивается эффект при 100 Гц в группе, получившей инъекцию NOX, по сравнению с данными без NOX. На 9-ый день после

ОЛ без инъекции NOX эффекты более чем в два раза превысили показания по сравнению с 3-им днем после ОЛ с NOX (Рис. 1 А, Е). Другими словами NOX способствует ранним проявлениям постстимульной активности на 100 Гц, в то время как за тот же период под действием NOX эффекты были относительно менее выражены (Рис. 1 А, Е). Это указывает на компенсаторное увеличение постстимульной активности после ОЛ на 100 Гц только на 9-й день без NOX, и развитие компенсаторного повышения активности на неповрежденной стороне. Кроме того, более эффективное восстановление до нормы происходит на 9-й день с применением NOX. В аналогичных условиях эксперимента не было конкретной разницы в ТД без и с NOX инъекцией, но по сравнению с нормой наблюдалось уменьшение ТД вдвое (Рис. 1 В, F). Таким образом, по сравнению с данными без NOX, когда стимулировалось СОЯ с частотой 100Гц было выявлено, что применение NOX даже втрое увеличивает активность уже на 3-ий день, приближая возбуждающие реакции к норме на 9-й день с NOX, как и в случае стимуляции ПВЯ (Рис. 1. С, G). В то же время, без NOX на 9-й день нет реакции, но при применении NOX за тот же самый период эффект возвращается к норме (Рис. 1 С, G). Наконец, ТД на стимуляцию ипсилатерального СОЯ в отличие от контралатерального ПВЯ, уже на 3-й день при 100 Гц и без NOX выражена более чем в два раза по сравнению с таковым без NOX (Рис. 1 D, H). Необходимо также отметить, что с NOX даже при частоте 50 Гц на 9-й день эффективность была выше более чем в 3,5 раза и приближалась к норме при 100Гц (Рис.1 D,H).

Таким образом, протекторное действие яда NOX после ОЛ очевидно. Однако эффект довольно выражен и часто превышает уровень нормы. Это подсказывает необходимость выяснить в будущем возможности применения NOX без нежелательных последствий.

На 15-й день после ОЛ, на стороне разрушения, морфологически наблюдалось уменьшение степени фосфорилирования. Нормальные образцы и размеры клеток восстанавливаются, в большинстве из них отростки начинают реагировать, но в основном они утолщены. Во всех нейронах четко различается несколько набухшее и светлое ядро с центральной локализацией. Усиливается зернистость отложений в цитоплазме и отростках, а также активность фермента (Рис. 2 А-В). ЛВЯ нейроны на интактной стороне (Рис. 2 С, D) морфологически выглядят как у интактных крыс (Рис.2 А, В). На 35-й день после ОЛ на стороне разрушения выявлялась активность фермента в цитоплазме клеток и отростках. Светлые ядра клеток уже не увеличены и локализованы центрально (Рис.2 Е).

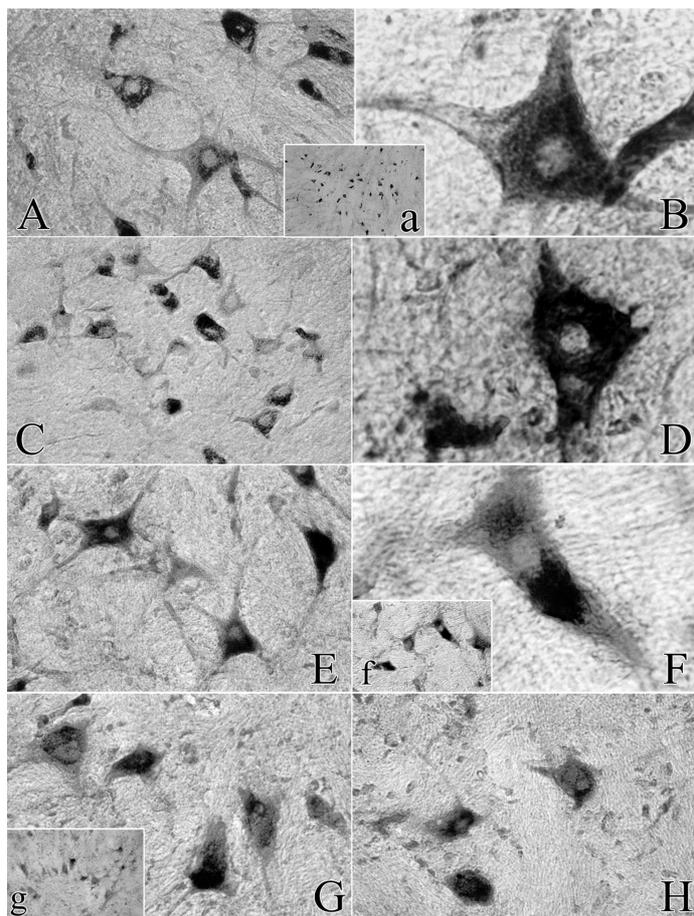


Рис. 2. Нейроны ядра Дейтерса на 15-ый (А-Д) и 35-тый (Е-Н) день после ОЛ и введения NOX; А, В, Е, F – поврежденная сторона (восстановление формы и размеров нейронов, усиление ферментативной активности); С, D, G , Н – неповрежденная сторона. Увеличение: 160 (а, g); 400 (А, С, Е, f, G, H); 1000 (В, D, F).

В результате активного состояния в цитоплазме некоторых крупных клетках наблюдается отложение гранул фосфата свинца, но они длиннее и тоньше (Рис. 2 F). Такие Натогі-положительные нитевидные образования морфологически выглядят как извилистые нейронные волокна и их внешний вид, вероятно, можно рассматривать как адаптивный ответ, препятствующий прогрессированию спутывания нейронных волокон. По сравнению с интактными крысами на 35-й день после ОЛ наблюдается значительное снижение плотности локализации нейронов ЛВЯ. Возможно, в результате глубоких нарушений обмена веществ в нервных клетках и межклеточной среде, накопленные продукты катаболизма приводят к клеточному разрушению и гибели. Вероятно, клетки, которые не могут быть восстановлены, продолжают сохранять способность отростков к регенерации длительное время, пока, наконец, изменения не приводят к дегенерации. В клеточной гибели значительная роль отводится физиологическому «истощению» нейронов, в которых уже вырисовываются, в общих чертах, изменения метаболических процессов с уменьшением окислительной способности и ферментативных функций.

На интактной стороне, вероятно, под влиянием NOX, первично стимулированные нейроны длительное время находятся в условиях гиперактивности для устранения причиняемого фактора (Рис. 2 G, H).

Большинство исследований по ВК после ОЛ посвящено изучению на стороне повреждения. Основные нейрональные изменения при ВК, по-видимому, обусловлены восстановлением активности на поврежденной стороне [11]. Было выявлено существенное стойкое повышение возбудимости деафферентированных нейронов в связи с синаптической блокадой ГАМК-, глутамат- и глицин-эргических ответов в качестве компонентов ВК [9]. Ранее было показано, что после ОЛ повышение возбудимости вестибулярных нейронов на травмированной стороне может быть объяснено подавлением ГАМК- рецепторов на этих клетках [1]. Также была показана важная роль адаптивных изменений вестибулярной комиссуральной системы в ВК и пластичности через динамическое регулирование эффективности ГАМК- рецепторов в нейронах вестибулярных ядер [4]. В заключение, следует подчеркнуть, что устойчивый рост возбудимости после деафферентации может быть важным компонентом ВК. Таким же образом, изменения эффективности синаптических входов, причастны к ВК, предположительно, с вовлечением внутриядерных проекций.

Результаты настоящего исследования указывают на наличие на стороне повреждения возбуждающих и тормозных постстимульных проявлений нейронной активности ЛВЯ на стимуляцию ПВЯ и СОЯ различной частоты, последовательности, интенсивности и латенции. Представляет интерес факт постоянного присутствия в постстимульной активности нейронов ЛВЯ депрессивных эффектов или ТД, а также ранних и поздних ПТП. Кроме того, депрессивные эффекты, в частности тетанические, могут быть совершенно различного происхождения: реальное торможение или даже дисфацилитация. Более того, данные настоящего исследования, связанные с изменениями на неповрежденной стороне при ВЧС ПВЯ и СОЯ указывают на более эффективное приближение к норме на 9-й день во время введения NOX, указывая на его протекторную эффективность не только для поврежденной, но и неповрежденной стороны. Тем не менее, уже на 3-й день наблюдается увеличение постстимульной активности выше нормы при 100 Гц, как для ПВЯ, так и для СОЯ на ВЧС. По последним данным, предполагается, что ГАМК и глицин могут играть значительную и/или, возможно, различную роль в развивающейся и зрелой центральной вестибулярной системе.

Ранее, в сериях внутриклеточных экспериментов, было показано, что при раздражении многочисленных структур головного мозга (мозжечок, тригеминальное ядро, латеральное ретикулярное ядро, нижняя олива, задний гипоталамус и др.)

регистривались ТПСР в нейронах ядра Дейтерса [10]. Более того, ЛВЯ было под постоянным тормозным действием различных структур мозга, предотвращающих преобладание тонуса разгибателей и являющихся постоянным препятствием возбуждающему входу. Стимуляция ПВЯ и СОЯ вызывает тормозные и возбуждающие реакции в нейронах ядра Дейтерса, которые имеют важное значение для предотвращения возможной активизации вестибулярного тонуса, вместе с исключением дисбаланса сгибателей-разгибателей, контролируемых со стороны моторных центров головного мозга.

Настоящее исследование представляет данные о характеристиках нейронов деафферентированного ядра Дейтерса после обработки ядом кобры NOX. Морфологические и гистохимические данные с применением NOX дают основание предположить, что в некоторых крупных нейронах происходят медленные глубокие метаболические нарушения, в результате приводящие к тотальной дегенерации. Морфологическая и гистохимическая картина показывает, что под воздействием NOX наблюдается гиперактивация фермента. Однако, можно также предположить, что резкое усиление активности фермента, вероятно, способствует очистке пораженной нервной ткани и имеет адаптационное значение. Таким образом, протекторное действие яда NOX после ОЛ очевидно.

Наконец, в последние годы был открыт нейрогенез- нормальный феномен для взрослого мозга, который проявляется при его повреждении. Механизм, ответственный за этот эффект пока неизвестен [5]. Несмотря на то, что нейрогенез стимулируется при остром повреждении, для восстановления функции этого недостаточно. В заключение, следует отметить, что широкий спектр и эффективность использования протектора NOX очевидны и не исключается возможность содействия нейрогенезу. Результаты этого исследования показывают, что после вестибулярного повреждения NOX как эффективный протектор повышает вестибулярную компенсацию при посредничестве ГАМК-рецепторов в процессе восстановления нарушенных функций.

Литература

1. Cameron S.A., Dutia M.B. Cellular basis of vestibular compensation: changes in intrinsic excitability of MVN neurones. Neuroreport 1997. V. 8. № 11. P. 2595-2599.
2. Dieringer N. Vestibular compensation: neural plasticity and its relation to functional recovery after labyrinthine lesions in frog and other vertebrates. Prog. Neurobiol. 1995. V. 46. P. 97-129.

3. Figueroa E., Gordon L.E., Feldhoff P.W., Lassiter H.A. The administration of cobra venom factor reduces post-ischemic cerebral injury in adult and neonatal rats. *Neurosci. Lett* 2005. V.380. P. 48-53.
4. Graham B.P. Dutia, M.B. Cellular basis of vestibular compensation: analysis and modelling of the role of the commissural inhibitory system. *Exp Brain Res*, 2001.V.137. № 3-4. P. 387-96.
5. Greenberg D.A., Jin K. Neurodegeneration and Neurogenesis:Focus on Alzheimer's disease," *Curr. Alzheimer Res.* 2006. V. 3, №1. P. 25-28
6. Guilding C., Dutia M.B. Early and late changes in vestibular neuronal excitability after deafferentation. *Neuroreport*. 2005. V.16. no13. P. 1415-1418.
7. Hambarzumyan L.E., Manukyan L.P., Chavushyan V.A., Meliksetyan I.B., Badalyan S.A, Khalaji N., Hovhannisyan A.L., Simon L., Sarkisian V.H., Sarkissian J.S. Hypothalamic control of the activity of Deiters' nucleus neurons. *The New Arm. Med. J.* 2009. V. 3, №1. P. 29-43.
8. Koh C., Armugam A., Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine.*Cell Mol. Life Sci.* 2006. V. 63.P.30-41.
9. Ptorossi V.E., Dutia M., Frondaroli A., Dieni C., Grassi S. Long-term potentiation and depression after unilateral labyrinthectomy in the medial vestibular nucleus of rats. *ActaOtolaryngol.* 2003.V.23, no 2, pp. 182-186,
10. Sarkisian V.H. Input-output relations of Deiters' lateral vestibulospinal neurons with different structures of the brain. *Archives Italiennes de Biologie.* 2000. V.138. P.295-353.
11. Smith F.P., Curthoys S.I. Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain Res Rev.* 1989. V. 14. P. 155-180.
- 12 Tighilet. B., Lacour M. Gamma amino-butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur. J. Neurosci.* 2001. V. 13. P. 2255-2267.

Анкета участника

Ф.И.О	Насер Халаджи
Место работы:	Институт физиологии им.Л.А.Орбели НАН РА
Должность, звание:	Аспирант
Адрес:	0028, г. Ереван, ул. Бр. Орбели 22, Республика Армения
Е-mail, телефон для связи:	vsargsyan@neuroscience.am
Название статьи/доклада, авторы:	Влияние яда кобры на процесс вестибулярной компенсации после односторонней лабиринтэктомии Н.Халаджи*, Л.Э. Амбарцумян**, Л.П. Манукян**, В.А. Саргсян**

Форма участия	Только публикация статьи
---------------	--------------------------

Форма оплаты: почтовый перевод, номер квитанции: N:0001280001, дата отправки: 07.10.2010.