

ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА, ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ И АСИММЕТРИЯ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА

Конорова И.Л.

УРАМН Научный центр неврологии РАМН

konorova.irina@yandex.ru

Психологические особенности личности относят к независимым факторам риска инсульта, который при развитии на фоне ЭС заканчивается фатальным исходом [11]. Моделирование ишемического инсульта у животных, перенесших ЭС, формирует более крупные очаги повреждения и грубый неврологический дефицит [15] без признаков развития коллатерального кровообращения [4]. С одной стороны, это может быть обусловлено изменением адаптационных возможностей цереброваскулярной системы и значительным снижением мозгового кровотока при ЭС [5]. При этом у чувствительных к стрессорной нагрузке крыс выявляется межполушарная асимметрия локального мозгового кровотока (лМК), уровень которого в левом полушарии мозга снижается значительно, чем в правом [4]. Характерно, что такие животные тяжелее переносят недостаточность мозгового кровообращения. С другой стороны, при ЭС усиливается влияние возбуждающих нейромедиаторов центральной нервной системы способствующих эксайтотоксическому повреждению нейронов [12; 13], и развивается неспецифический окислительный стресс, приводящий к множественным повреждениям ДНК и запуску процессов апоптоза [10; 14]. Известно, что гибель клеток (апоптоз/некроз) в организме сопровождается появлением в плазме крови фрагментов внеклеточной ДНК [16], концентрация и молекулярные свойства которой в ходе циркуляции претерпевают значительные изменения, особенно при патологии. Однако в литературе нет данных о влиянии ЭС на свойства ДНК, свободно циркулирующей в плазме крови (пДНК). Нами получены новые, ранее неизвестные клиничко-экспериментальные данные, указывающие на важную гемодинамическую роль пДНК в патогенезе ишемических нарушений мозгового кровообращения. Установлено, что, наряду с генетическими функциями, она играет роль эндогенного биополимера крови, регулирующего гемодинамику. Изменение состояния пДНК играет важную роль в реализации ишемических нарушений мозгового кровообращения у больных с факторами риска развития инсульта (доклиническими атеросклеротическими стенозами сонных артерий и артериальной гипертонией) [6]. Её высокомолекулярные фрагменты способствуют развитию коллатерального кровооб-

ращения в ткани мозга, а повышение их содержания в составе пДНК снижает летальность в острейшем периоде церебральной ишемии. Напротив, появление большого количества низкомолекулярных фрагментов пДНК ассоциируется с тяжелым течением инсульта и плохим прогнозом [2].

Целью настоящего исследования было выявление взаимосвязи между предрасположенностью организма к эмоциональному стрессу, свойствами циркулирующей пДНК и межполушарной асимметрией мозгового кровообращения.

Методы.

Работа выполнена на 77 самцах крыс Вистар массой 320–380 г в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Опыты проводили зимой, животные содержались при естественном освещении и неограниченном доступе к корму и воде.

В работе были использованы описанные нами ранее патофизиологические методы [4]. *Индивидуальную эмоциональную реактивность крыс* определяли в тесте “открытое поле” с использованием компьютерной программы регистрации параметров двигательной активности «Open Field Sequential Test V.2» и расчета *индекса двигательной активности* (ИА) как отношения суммы пересеченных периферических и центральных секторов к сумме латентных периодов первого движения и выхода в центр. Прогностически резистентными к эмоционально-стрессорным воздействиям считали высокоактивных (ВА) особей с ИА в пределах 2-6, а эмоционально реактивными – пассивных (НА) крыс с ИА 0,2-0,6. *Эмоциональный стресс* вызывали, используя модель агрессивно-конфликтного поведения при 18-часовой фиксации крыс к стенке клетки за хвосты (с 16⁰⁰ до 10⁰⁰ ч.) при сохранении свободного доступа к еде и воде. *Ишемию головного мозга* воспроизводили сразу после стрессорного воздействия под нембуталовым наркозом (45 мг/кг, внутривенно) путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий (ООСА). До и через 20 мин после ООСА, а также через 20-30 мин после внутривенного введения раствора ДНК осуществляли забор 0,5 мл крови из бедренной артерии, центрифугированием (450g, 10 мин) отделяли плазму, замораживали её и хранили при –70°C. *Локальный мозговой кровоток* (лМК) измеряли методом лазерной доплеровской флоуметрии (Peri Flux-3, Perimed, Sweden) последовательно в обоих полушариях мозга (начиная с левого) в зоне смежного кровоснабжения в теменно-затылочной коре до, в течение 1-2 мин и через 20 мин после ООСА или внутривенного введения раствора ДНК. Игольчатый световод (диаметр 1 мм, ширина луча 0,8 мм) устанавли-

ливали на симметричных участках черепа, истончая бором кость не вскрывая его полость. Значения оценивали в условных единицах прибора – перифлюксах (Пф), соответствующих мл/100г/мин. *Электрическую активность коры больших полушарий* регистрировали одновременно с лМК монополярным отведением с металлической поверхности световода на полиграфе РМ-6000 (Nikon Kohden, Japan). В процессе регистрации каждые 5 секунд определяли интегральную величину амплитуд медленных волн, характерных для наркотизированных животных, выраженную в мкВ. Параллельно на отдельных блоках полиграфа регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС) и среднее артериальное давление (АД) с помощью катетерного микродатчика, введенного в левую бедренную артерию. Для внутривенного введения использовали промышленный препарат *низкомолекулярной ДНК Деринат* в конечной концентрации 2 нг/мл крови, представляющий собой вытяжку из молок осетровых рыб в виде 1,5% раствора дезоксирибонуклеата Na с молекулярной массой 270000–500000 Дн (0,5–0,8 т.п.н.).

Свойства пДНК определяли в плазме крови с использованием методик, описанных ранее [1]. *Выделение пДНК* осуществляли стандартным методом фенольной экстракции, причем плазму крови предварительно обрабатывали РНКазой А и протеиназой К. *Концентрацию пДНК* измеряли флуориметрически на люминесцентном спектрометре «LS 55» («Perkin Elmer», Англия) при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}}=350$ нм и флуоресценции $\lambda_{\text{флу}}=450$ нм минимум дважды для каждого образца, используя ДНК-связывающийся флуоресцентный краситель бис-бензimid (Hoechst 33258, Serva), до и после исчерпывающего гидролиза ДНКазой 1. *Длину фрагментов пДНК* определяли методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле, который затем окрашивали бромистым этидием и фотографировали. В качестве маркеров длины использовали наборы фирмы «Ферментас» (Литва). За единицу длины брали тысячу пар нуклеотидов (т.п.н.). *Нуклеазную активность плазмы* оценивали по степени фрагментации геномной ДНК человека (8 мкл) после её 2-часовой инкубации с плазмой опытных крыс (2 мкл) при 37°C. По окончании инкубации определяли длину фрагментов геномной ДНК человека: чем короче её фрагменты на электрофореграмме, тем выше нуклеазная активность плазмы крысы. Маркером служила ДНК человека, которую инкубировали в тех же условиях, но без добавления плазмы крысы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартного пакета программ Statistica 6.0. При ненормальном распределении данных результаты представляли в виде медианы значений и межквартильного интервала (Me[25%;75%]).

Для проверки гипотезы о различии независимых выборок использовали Mann-Witney *U*-test, а средних значений – *t*-test.

Результаты.

Исследование состояния пДНК в норме у животных с разной эмоциональной резистентностью показало, что концентрация пДНК в плазме крови склонных к ЭС НА крыс ($n=12$) ниже, чем у относительно устойчивых ВА особей ($n=12$) ($64,7 \pm 13,8$ и $187,0 \pm 54,2$ нг/мл соответственно, $p < 0,001$). При этом на электрофореграмме у НА крыс, наряду с высокомолекулярной, четко выявлялась низкомолекулярная фракция пДНК длиной менее 1 т.п.н., в то время как у ВА крыс практически вся пДНК была представле-

на высокомолекулярной фракцией длиной 21 т.п.н. и более (рис. 1а). По-видимому, большое количество коротких фрагментов пДНК у НА крыс обусловлено более высокой нуклеазной активностью плазмы их крови: геномная

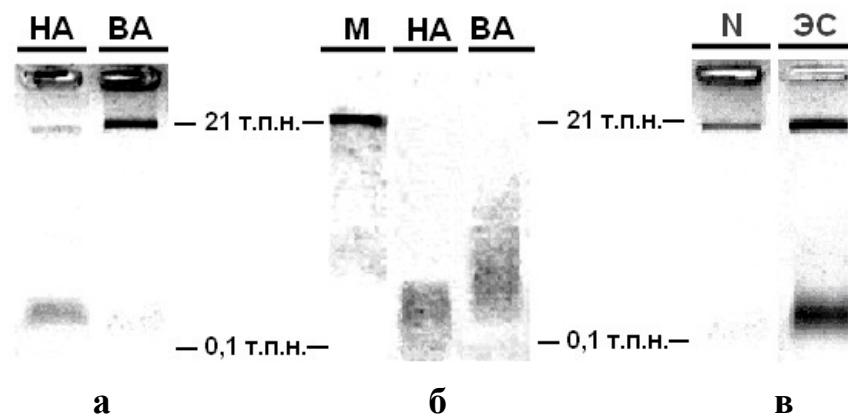


Рис. 1. Электрофореграммы (1% агарозный гель): (а) – пример пДНК НА крысы и ВА крысы (цифрами указана длина фрагментов); (б) – фрагменты геномной ДНК человека после 2ч инкубации с плазмой тех же крыс (нуклеазная активность); (в) – пример пДНК двух амбивалентных крыс с сопоставимыми величинами ИА, контрольной (N) и перенесшей эмоционально-стрессорное воздействие (ЭС). М – маркер (геномная ДНК человека).

ДНК после инкубации с их плазмой гидролизовалась до олигонуклеосом, а после инкубации с плазмой крови ВА особей содержала фрагменты большей длины (рис. 1б).

Чтобы проверить, связаны ли выявленные различия характеристик пДНК с эмоциональной реактивностью животных, был проведен сравнительный анализ состояния пДНК у нормальных и перенесших эмоционально-стрессорное воздействие амбивалентных животных с ИА 0,55 – 0,75 и 1,5 – 1,85. В контрольной ($n=9$) и опытной ($n=9$) группах соотношение животных с сопоставимыми величинами ИА было одинаковым. Результаты исследования показали, что перенесенный ЭС отражается на свойствах пДНК: её концентрация у крыс, подвергнутых эмоционально-стрессорному воздействию, была в 2,5 раза выше, чем у контрольных особей (187 [134; 251] и 74 [51; 127] нг/мл соответственно, $U = 16$, $p = 0,041$). При этом в плазме крови содержалось значительное количество коротких фрагментов пДНК (рис. 1в). Полученные данные позволя-

ют предположить, что высокая нуклеазная активность плазмы крови НА животных обусловлена интенсивно идущими в их организме процессами клеточной гибели. Ранее в опытах с внутривенным введением высокомолекулярной гомологичной ДНК мы показали, что практически вся она элиминируется из плазмы крови в течение 20 мин [9]. Совокупность полученных данных позволяет думать, что в процессе полной стрессовых событий жизнедеятельности после каждого стрессорного воздействия, если оно не слишком сильное и/или длительное, возрастающая вслед за повышением концентрации пДНК нуклеазная активность плазмы может снижать концентрацию пДНК, вероятно, до более низкого чем в норме уровня. Такое объяснение относительно низкой по сравнению с резистентными особями концентрации пДНК и большей её фрагментации у склонных к ЭС крыс кажется вполне логичным.

Для выяснения вопроса, зависит ли межполушарная асимметрия лМК, выявленная нами ранее при ЭС у склонных к нему крыс, от изменения свойств пДНК, были проведены опыты (n=12) с внутривенным введением препарата низкомолекулярной ДНК (Деринат) животным с разной эмоциональной резистентностью. Полученные результаты, отраженные в таблице, показали, что Деринат не влияет на ЧСС, но незначительно снижает АД и повышает электрическую активность коры больших полушарий мозга. К 20^й минуте АД падало на $8\pm 3\%$ от исходного уровня, а амплитуда регистрируемых на ЭЭГ волн повышалась на $18\pm 2\%$ в левом и $31\pm 3\%$ в правом полушарии.

Т а б л и ц а.

Показатели системного АД и электрической активности мозга (ЭЭГ) у крыс Вистар до и после внутривенного введения Дерината.

Время регистрации	среднее АД (мм рт. ст.)	ЭЭГ (амплитуда, мкВ)	
		левое полушарие	правое полушарие
Фон (n=12)	128,2 ± 2,8	12,83 ± 2,16	13,91 ± 2,36
1 – 2 мин после введения	126,7 ± 3,4	13,97 ± 1,73	15,08 ± 2,92
20 мин после введения	119,5 ± 3,6	15,14 ± 2,44	18,22 ± 3,89

После в/в введения Дерината в течение 20 мин у всех животных в левом полушарии мозга наблюдалось прогрессирующее снижение лМК на 30–40% от исходного уровня (рис. 2). При этом в правом полушарии лМК снижался только у НА особей, причем в меньшей степени (на $11\pm 4\%$, n=6), чем в левом полушарии. В тоже время у ВА особей (n=6) он повышался на $30\pm 6\%$. Это согласуется с данными, полученными в клинике при создании стрессовых ситуаций у женщин [см. обзор 7]. Полученные дан-

ные свидетельствуют, что в механизмах формирования межполушарной асимметрии лМК при ЭС важную роль играет низкомолекулярная фракция пДНК. Выявленные различия в реакции лМК на Деринат могут быть связаны как с различной ангиоархитектоникой правого полушария, наличием хорошо развитых межполушарных анастомозов у ВА крыс и их недостаточностью у НА особей, так и с различием исходных характеристик пДНК у них.

Внутривенное введение Дерината животным (НА крысы, $n=10$) с ишемией головного мозга (через 15 мин после ООСА) не оказывало значимого влияния на ЧСС и АД, хотя у 7 крыс уровень АД незначительно повышался. При этом в отличие от контрольных НА животных ($n=11$), которым вместо Дерината вводили равный объем физиологического раствора, после введения низкомолекулярной ДНК в обоих полушариях мозга лМК прогрессивно снижался без признаков коллатерального кровообращения (рис. 3). При этом электрическая активность мозга достоверно не изменялась, хотя имелась тенденция к снижению амплитуды регистрируемых волн в обоих полушариях. Аналогичную картину мы наблюдали ранее при воспроизведении ишемии головного мозга у животных, перенесших ЭС [4]. Введение в кровоток Дерината значительно повышало летальность животных от церебральной ишемии: в течение суток пало 7 из 10 крыс, что составило 70% при 36% в контроле (пало 4 из 11 животных). Для сравнения, в предыдущих исследованиях летальность от церебральной ишемии среди животных, перенесших предварительно ЭС, составляла 90%.

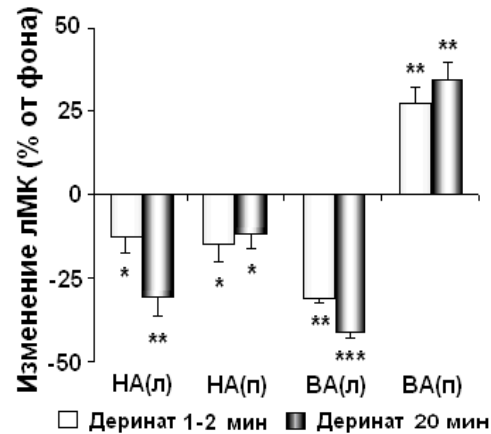


Рис. 2. Изменение локального мозгового кровотока в левом (л) и правом (п) полушариях мозга у животных с разной эмоциональной резистентностью после внутривенного введения Дерината. * - $P < 0,02$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$ по сравнению с фоном (нулевая линия).

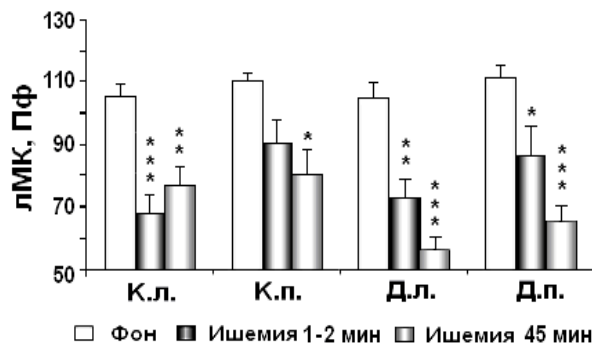


Рис. 3. Изменение лМК в левом (л) и правом (п) полушариях мозга склонных к эмоциональному стрессу крыс после ООСА. К – контрольные животные, Д – животные, получавшие Деринат.

* - $p < 0,02$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с фоном, t -тест.

Заключение.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии явной взаимосвязи между предрасположенностью организма к ЭС и межполушарной асимметрией мозгового кровообращения, выявляемой при стрессорных нагрузках. В реализации этой асимметрии важную роль играет обусловленное ЭС изменение свойств циркулирующей пДНК. Можно думать, что участие пДНК в формировании межполушарной асимметрии обусловлено не только воздействием отдельных её фрагментов на гидродинамическое сопротивление крови, но также их влиянием на функциональное состояние клеток эндотелия и ЦНС, о чем свидетельствуют результаты последних исследований *in vitro* [3; 8]. Раскрытие механизмов, посредством которых пДНК влияет на лМК, требует дальнейшего изучения данного вопроса.

Литература.

1. Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г. Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева Н.О., Ляпунова Н.А. Количественное определение повторяющихся последовательностей в геноме человека и определение повышенного числа копий рибосомного повтора у больных шизофренией (результаты молекулярного и цитогенетического анализа) Мол. Биол. 2003. Т. 37. № 3. С. 409–419.
2. Ганнушкина И.В. Патофизиология нарушений мозгового кровообращения. Очерки ангионеврологии. М.: Атмосфера. 2005. С. 9 – 40.
3. Ефремова Л.В., Алексеева А.Ю., Конькова М.С., Костюк С.В., Ершова Е.С., Смирнова Т.Д., Конорова И.Л., Вейко Н.Н. Внеклеточная ДНК влияет на количество NO в эндотелиальных клетках человека. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т. 149, № 9. С.156–162.
4. Конорова И.Л., Ганнушкина И.В., Коплик Е.В., Антелава А.Л. Профилактика Дельтараном негативных последствий перенесенного эмоционального стресса при последующей церебральной ишемии у низкорезистентных животных. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2006. Т. 141. № 5. С. 499–502.
5. Конорова И.Л., Мациевский Д.Д., Тимкина М.И. Гемодинамические механизмы негативного влияния эмоционального стресса на развитие церебральной ишемии у чувствительных к стрессорной нагрузке крыс. Патол физиол. и эксперим. терапия. 2009. № 3. С. 10–15.
6. Конорова И.Л., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Антелава А.Л., Чечеткин А.О. Гемодинамическая роль внеклеточной ДНК, циркулирующей в плазме крови, в патогене-

- незе артериальной гипертензии и облитерирующего атеросклероза сонных артерий. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2009. Т. 15. № 2. С. 19–28.
7. Червяков А.В. К вопросу об асимметрии мозгового кровотока. Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности. 2008. С. 116–125.
 8. Efremova L.V., Kostyuk S.V., Khaspekov L., Veiko N.N. Accumulating fragments of extracellular DNA (ecDNA) influence rat primary cerebellum granule cell culture. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*. Ed. Gahan P.B. Springer. 2010. Chapter 29. P. 313–218.
 9. Konorova I.L., Veiko N.N., Novikov V.E. Plasma DNA influences an acid-base balance, blood gases and oxygen transport in health and stroke. *Annals of the N. Y. Acad. of Sci.* 2008. V. 1. Issue 1. P. 278–282.
 10. Liu J., Mori A. Стресс-индуцированное оксидативное повреждение мозга и нейропротекторный эффект антиоксидантов. *Руководство по реабилитации лиц, подвергшихся стрессорным нагрузкам*. Ред. В.И.Покровский. М.: Медицина. 2004. С. 98–112.
 11. May M., McCarron P., Stansfeld S. Does psychological distress predict the risk of ischemic stroke and transient ischemic attack? The Caerphilly study. *Stroke*. 2002. V. 33. P. 7–12.
 12. McEwen B.S. From molecules to mind. Stress, individual differences, and the social environment. *Review. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 935. P. 42–49.
 13. Michaelis E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 1998. V. 54. № 4. P. 369–415.
 14. Ohta Y, Chiba S, Tada M. et al. Development of oxidative stress and cell damage in the liver of rats with water-immersion restraint stress. *Redox Rep.* 2007. V. 12. №3. P. 139–147.
 15. Sugo N., Hurn P.D., Morahan M.B. et al. Social Stress Exacerbates Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Stroke*. 2002. V. 33. P. 1660–1664.
 16. van der Vaart M., Pretorius P.J. Circulating DNA: its origin and fluctuations. *Ann N Y Acad Sci.* 2008. V. 1137. P. 18–26.