

Участие гепарина и гепаринсвязывающих белков мозга крыс в процессе гипералгезии

Г. А. Ушакова, И. Н. Корниловская, Ю. Ю. Кобеляцкий

Днепропетровский госуниверситет
Переулок Науковий, 13, Днепропетровск, 49050, Украина
E-mail: ushakova@ff.dsu.dp.ua

Установлено, что состояние гипералгезии приводит к снижению степени дегрануляции тканевых базофилов, вследствие чего уменьшается количество свободного гепарина. Параллельно обнаружено увеличение гепаринсвязывающей активности белков в больших полушариях мозга. Применение морфина или кетамина за 5 мин до операции обеспечивает сохранение гепаринсвязывающей активности белков мозга на уровне дооперационного вмешательства.

Введение. Длительное время исследования гликозаминогликанов в центральной и периферической нервной системе были непопулярными, поскольку специфичность и чувствительность методов для их идентификации была настолько низка, что детектировать межклеточный матрикс в мозге было невозможно. С развитием более чувствительных методов появились факты о немаловажной роли компонентов межклеточного матрикса не только в соединительной, но и в нервной тканях.

В частности, было установлено участие гликозаминогликанов в процессах миграции нейронов [1], взаимодействия между клетками нейрональной и глиальной природы [2], синаптогенезе [3]. В настоящее время больше внимания уделяется тому, каким образом гликозаминогликаны регулируют передачу информации между клетками. Особый интерес представляет участие данных компонентов межклеточного матрикса в формировании синапсов и регуляции нейротрансмиссии. От сбалансированной работы синапсов зависит, как быстро центральная нервная система воспринимает и оценивает сигналы от периферических органов и тканей. Данная система передачи информации является важнейшим элементом в механизме самозащиты организма — оценке болевых ощущений, воспринимаемых специальными рецепторами (ноцицепторами).

Как известно, в зависимости от степени тяжести повреждения ткани или воспаления индуцируется состояние гипералгезии (превышающий ноцицептивный ответ на вредные стимулы), аллодиния (ноцицептивный ответ на невредающие стимулы) или спонтанная боль. Реализация центральных механизмов обработки болевых сигналов в большей степени зависит от возбуждающих нейротрансмиттеров и их рецепторов. Однако в последнее время большое внимание привлекают компоненты межклеточного матрикса, активно участвующие в формировании синапсов и поддержании их функционирования.

В данной работе в качестве объекта исследования выбраны гепаринсвязывающие белки мозга. Долгий период времени считалось, что основным местом синтеза гепарина являются тучные клетки, а основным его потребителем — противосвертывающая система крови. Однако сейчас уже имеются данные о том, что во взрослом мозге крыс содержится примерно 46 мкг гепарин-сульфата на 1 г свежей массы ткани, причем данное количество составляет 12—14 % от общего количества гликозаминогликанов [4].

Аналогичные данные подтвердились для мозга человека, крупного рогатого скота, овец. Показано, что около 60 % гепарина и гепарин-сульфата находится в микросомной фракции мозга млекопитающих, которая обогащена эндоплазматическим ретикуломом и плазматическими мембранами, око-

ло 4 % данного полисахарида содержится в чисто ядерной фракции. Особое внимание привлекают данные о достаточно быстром аксональном транспорте гепарин-сульфата из тела нейрона вдоль аксона [5]. Возможно, транспортируемый гликозаминогликан является одной из структурных единиц синапса или активно участвует в регуляции нейротрансмиссии.

Интересным является факт, свидетельствующий о стимуляции тирозингидроксилазы мозга низкими концентрациями гепарина [6]. Предполагается, что гепарин является одним из регуляторов биосинтеза катехоламинов, поскольку участвует в активации лимитирующего фермента — тирозингидроксилазы.

Основным механизмом действия гликозаминогликанов является взаимодействие их со специфическими белками (компонентами мембран или межклеточного матрикса), в результате чего запускается целый каскад реакций.

В настоящей работе освещены следующие вопросы: 1) каким образом изменяется гепаринсвязывающая активность белков мозга при состоянии гипералгезии, зависящем от возбуждающих механизмов мозга; 2) каким образом изменяется функциональная активность соединительнотканых тканевых базофилов (основных источников гепарина в организме).

Материалы и методы. Для исследований использовали модифицированную модель послеоперационной боли [7]. Были обследованы 44 беспородные белые крысы массой 180—220 г. При работе соблюдали этические принципы экспериментальных исследований [8]. На правой задней лапке крысы после анестезии эфиром, внутримышечного введения раствора пенициллина и обработки раствором йода производили разрез кожи, фасции и мышцы на плантарной части подошвы длиной 1 см. После этого накладывали два шелковых шва и рану повторно обрабатывали йодом. Изучение болевых порогов осуществляли по тесту вокализации [9].

Для изучения гепаринсвязывающей активности мозга были подготовлены пять групп животных, согласно вышеописанной методике (1 — контрольная группа; 2 — оперированная группа; 3 — введение кетамина (50 мг/кг массы) за 5 мин до операции; 4 — введение морфина (5 мг/кг массы) за 5 мин до операции; 5 — введение морфина и кетамина совместно за 5 мин до операции). Декапитацию крыс проводили через 24 ч после операции, в период наиболее выраженной гипералгезии (согласно тесту вокализации). Для дальнейших исследований использовали мозг и щитовидную железу животных.

Мозг извлекали, очищали от поверхностной сосудистой пленки. Для исследований брали два участка мозга: мозжечок и часть полушарий, содержащую гипоталамус, гиппокамп, средний мозг, исключая моторную, сенсомоторную и фронтальную части. Все процедуры проводили при температуре 4 °С. В дальнейшем ткань мозга гомогенизировали в 10 объемах буфера А (25 мМ трис-НСl, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ дитиотреитол, 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторид и 0,01 М мертиолят) и центрифугировали в течение 60 мин при 50000 g.

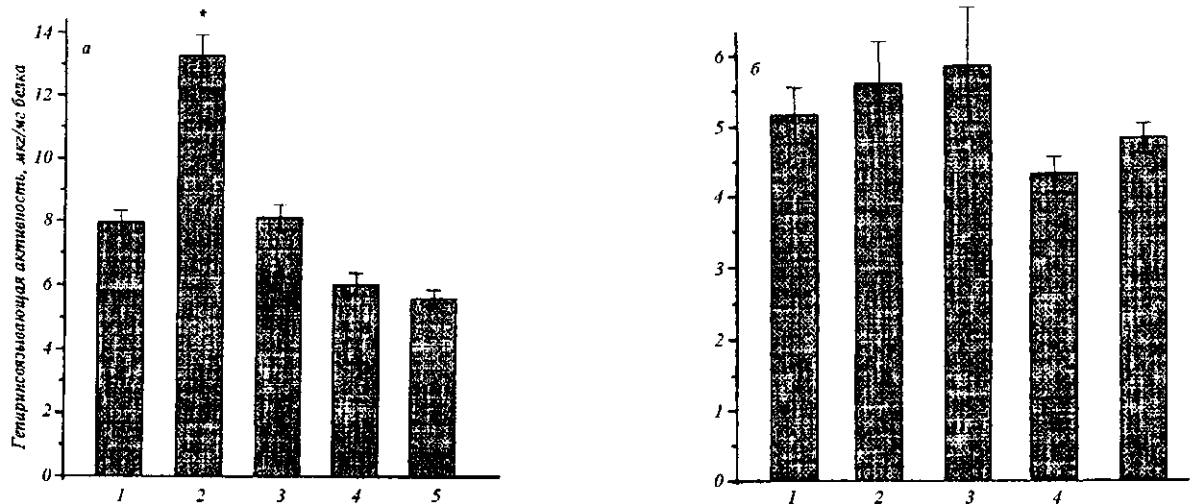
Супернатант содержал фракцию растворимых белков. Осадок несколько раз ресуспендировали соответствующим буфером и центрифугировали по 15 мин при 50000 g для удаления из экстрактов белков растворимой фракции. Отмытый осадок ресуспендировали в 10 объемах буфера А, содержащего 4 М мочевины, инкубировали в течение 12 ч при температуре 4 °С и центрифугировали в течение 60 мин при 50000 g. Супернатант, содержащий фракцию филаментных и мембранных белков мозга крыс, использовали для изучения гепаринсвязывающей активности с помощью твердофазного углевод-ферментного анализа [10].

Трахеогортанный комплекс крыс, в составе которого находится щитовидная железа, фиксировали в жидкости Буэна. Материал обезжовивали и заливали в парафин с применением стандартной гистологической техники. Блоки устанавливали в дорсовентральном направлении и изготавливали срединные срезы доли щитовидной железы толщиной 5—7 мкм.

Для изучения состояния тканевых базофилов щитовидной железы препараты окрашивали 1 %-м толуидиновым голубым. Морфометрическое изучение тканевых базофилов проводили на светооптическом уровне при $\times 1000$. На каждом гистологическом препарате производили по 20 случайных набрасываний и подсчитывали число тканевых базофилов в поле зрения, ограниченном окулярной вставкой ($S = 0,0128 \text{ мм}^2$). Степень дегрануляции тканевых базофилов определяли полуколичественным методом. Различали следующие степени дегрануляции тканевых базофилов: «0» — компактное расположение гранул клетки; «1» — вне общей массы обнаруживается от 1 до 5 отдельно лежащих гранул; «2» — отдельно лежащих гранул больше 5; «3» — диффузное расположение секреторных гранул на значительном удалении друг от друга.

Статистическую обработку результатов производили с использованием *t*-критерия Стьюдента и уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты изучения гепаринсвязывающей активности белков моз-



Гепаринсвязывающая активность белков задней части больших полушарий мозга (а) и мозжечка (б) крыс в контрольной и экспериментальных группах ($n = 5-6$): 1 — контроль; 2 — операция без анестезии; 3 — введение морфина (5 мг/кг массы за 5 мин до операции); 4 — введение кетамина (50 мг/кг массы за 5 мин до операции); 5 — введение морфина и кетамина за 5 мин до операции. *Статистически достоверные изменения при $p < 0,05$

жечка и полушарий мозга крыс представлены на рисунке, а, б. Гепаринсвязывающая активность белков в контрольной группе составляет: в полушариях — 7,95, в мозжечке — 5,16 мкг/мг общего белка. Болевое воздействие в операционной группе животных приводит к увеличению гепаринсвязывающей активности белков исследуемой части больших полушарий мозга крыс в 1,67 раза. В мозжечке исследуемый показатель достоверно не изменялся. Мозжечок был использован как один из контрольных параметров. Согласно существующим данным, клетки мозжечка непосредственно не участвуют в процессах гипералгезии [11].

Как показано ранее, болевое воздействие приводит к активации N-метил-D-аспартат рецепторов, которые могут индуцировать высвобождение гликанов, а также структурные и функциональные изменения в центральной нервной системе [12]. Для исследования возможности коррекции изменений гепаринсвязывающей активности белков в двух подопытных группах для снятия болевого воздействия использовали кетамин, являющийся неселективным антагонистом N-метил-D-аспартат рецепторов. Кроме названного препарата, использовали также морфин — агонист опиоидных рецепторов (наиболее часто применяемый в анестезиологии препарат для обезболивания).

Согласно полученным результатам, гепаринсвязывающая активность белков полушарий мозга оперированных крыс с применением анестезии сохранялась в пределах контроля. Причем наиболее эффективным оказалось введение кетамина.

Гепаринсвязывающие белки участвуют в индукции и поддержании синаптической модификации, которая зависит от активности различных рецепторов. Так, например, глутаматная активация N-метил-D-аспартат рецепторов приводит к высвобождению протеогликанов, усиливающих нейритный рост в фетальных гиппокампальных нейронах [2].

Все представители семейства факторов роста нейритов связывают гепарин/гепаран-сульфатпротеогликан, после чего происходит изменение их биологической активности. Это воздействие связано с корпротеинами протеогликанов, такими как глипиканы и синдеканы, которые могут изменять нейроэпителиальные клетки вследствие чувствительности их к факторам роста.

Синдекан через свои гепарансульфатные цепи связывает молекулы экстрацеллюлярного матрикса и гепаринозависимые факторы роста, затем взаимодействует с тирозинкиназными рецепторами, в результате чего регулируется активность клеток нервной ткани [12].

Поскольку основным источником гепарина в организме млекопитающих являются стромальные тканевые базофилы [13], параллельно проведено исследование активности популяции тканевых базофилов у экспериментальных животных.

Интерес к изучению тканевых базофилов в условиях гипералгезии основывается на нескольких фактах. Прежде всего, согласно литературным данным, применение анальгезирующих препаратов, таких как морфин и кетамин, приводит к системной реакции тканевых базофилов человека, проявляющейся в увеличении концентрации гистамина и триптазы тканевых базофилов (маркерный фермент этих клеток) в сыворотке крови [14].

Подтверждением этому служат результаты экспериментов, проведенных *in vitro*. В них показано, что тканевые базофилы в ответ на введение в среду морфина активируются и выделяют ранее синтезированные медиаторы — гистамин и триптазу, а в ответ на воздействие кетамина — гистамин [15]. Помимо вышеуказанного в модельных экспериментах с гипералгезией, вызванной системной инъекцией фактора роста нервов, все периферические эффекты опосредованы дегрануляцией тканевых базофилов и выделением этими клетками биологически активных веществ [16—18]. Показателем активности секреции гепарина тканевыми базофилами является степень их дегрануляции.

Тканевые базофилы щитовидной железы относятся к типу соединительнотканых [19], поэтому популяция этих клеток щитовидной железы может быть репрезентативным объектом изучения системной реакции организма на гипералгезию и различные способы анестезии.

В данном исследовании в щитовидной железе контрольной группы животных параметры популяции тканевых базофилов не отличались от таковых, ранее описанных в литературе [19].

Состояние гипералгезии без анестезии приводит к статистически достоверному уменьшению степени дегрануляции тканевых базофилов на 33 % (табл. 1). То есть система регуляции гомеостаза микрорайона оказывается угнетенной. При этом численность тканевых базофилов не изменяется (табл. 2). Анестезия с применением каждого из используемых в эксперименте препаратов сохраняет параметры тканевых базофилов на уровне контрольных значений. Это достигается тем, что применение в одной группе морфина, а в другой — кетамина достоверно увеличивает степень дегрануляции тканевых базофилов на 67 и 65 % соответственно при сравнении этого параметра с операционным контролем (табл. 3).

Введение в качестве анестезии сочетанно двух

Таблица 1
Изменение степени дегрануляции тканевых базофилов щитовидной железы крыс в эксперименте с гипералгезией при сравнении экспериментальных групп с интактным контролем ($n = 8-9$ в каждой группе)

Группа	$\bar{x} \pm Sx$	Дегрануляция, %	P_t
Контроль	1,2±0,12	—	—
Операция	0,8±0,11	-33	0,020*
Кетамин	1,3±0,12	11	0,434
Морфин	1,3±0,13	9	0,529
Кетамин + морфин	1,3±0,10	19	0,203

*Статистически достоверные изменения.

Таблица 2
Изменение числа тканевых базофилов щитовидной железы крыс в поле зрения микроскопа в эксперименте с гипералгезией при сравнении экспериментальных групп с интактным контролем ($n = 8-9$ в каждой группе)

Группа	$\bar{x} \pm Sx$	Число тканевых базофилов, %	P_t
Контроль	2,5±0,18	—	—
Операция	2,4±0,20	-3	0,762
Кетамин	2,2±0,21	-13	0,203
Морфин	2,4±0,22	-2	0,844
Кетамин + морфин	1,9±0,21	-24	0,015*

*Статистически достоверные изменения.

препаратов (морфина и кетамина) приводит к уменьшению числа и увеличению степени дегрануляции тканевых базофилов в щитовидной железе (табл. 1 и 2) при сравнении подопытных групп с интактным контролем. Эти же изменения проявляются при сравнении полученных данных с операционным контролем (табл. 3 и 4). Очевидно, уменьшение численности тканевых базофилов в этой экспериментальной группе обусловлено разрушением этих клеток при повышении степени дегрануляции, что, по-видимому, является следствием превышения дозы анестезирующего препарата (поскольку для данной группы животных применяли смесь кетамина с морфином в указанных ранее дозах).

Таблица 3

Изменение степени дегрануляции тканевых базофилов щитовидной железы крыс в эксперименте с гипералгезией при сравнении экспериментальных групп с операционным контролем ($n = 8-9$ в каждой группе)

Группа	$\bar{x} \pm S_x$	Дегрануляция, %	P1
Контроль-операция	$0,8 \pm 0,11$	—	—
Кетамин	$1,3 \pm 0,12$	67	0,004*
Морфин	$1,3 \pm 0,13$	65	0,007*
Кетамин + морфин	$1,4 \pm 0,10$	78	0,000*

*Статистически достоверные изменения.

Таблица 4

Изменение числа тканевых базофилов щитовидной железы крыс в поле зрения микроскопа в эксперименте с гипералгезией при сравнении экспериментальных групп с операционным контролем ($n = 8-9$ в каждой группе)

Группа	$\bar{x} \pm S_x$	Число тканевых базофилов, %	P1
Контроль-операция	$2,4 \pm 0,20$	—	—
Кетамин	$2,2 \pm 0,21$	-10	0,393
Морфин	$2,4 \pm 0,22$	1	0,312
Кетамин + морфин	$1,9 \pm 0,21$	-21	0,049*

*Статистически достоверные изменения.

Согласно полученным данным, болевой стимул вызывает снижение дегрануляции тканевых базофилов, что сопряжено с уменьшением секреции свободного гепарина в кровь. Дефицит гепарина, в свою очередь, приводит к увеличению свободных центров связывания гепарина на специфических белках, что и активирует гепаринсвязывающую активность белков мозга. Вероятно, система гепарин:гепаринсвязывающие белки является одной из регуляторных единиц в мозге в отношении индукции ответа на болевые ощущения.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии гепарина и гепаринсвязывающих белков полушарий мозга крыс в механизмах гипералгезии.

G. A. Ushakova, I. N. Kornilovska, Y. Y. Kobeliatsky

Heparin and rat brain heparin-binding proteins take part in the process of hyperalgesia

Summary

It was shown that a hyperalgesia state resulted in the decrease of the mast cell degranulation degree and therefore diminished the amount of free heparin. In-parallel, the augmentation of heparin-binding activity of the rat brain proteins in hemispheres was detected. The morphine or ketamine application 5 min prior to operation preserves the heparin-binding activity of these proteins at the preoperative level.

Г. А. Ушакова, И. Н. Корниловська, Ю. Ю. Кобеляцкий

Участь гепарину та гепаринозв'язуючих білків мозку щурів у процесі гіпералгезії

Резюме

Виявлено, що стан гіпералгезії призводить до зниження ступеня дегрануляції тканинних базофілів, внаслідок чого зменшується кількість вільного гепарину. Паралельно відмічено збільшення гепаринозв'язуючої активності білків великих півкуль мозку. Застосування морфіну або кетаміну за 5 хв до операції забезпечує збереження гепаринозв'язуючої активності білків мозку на рівні доопераційного втручання.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dou C. L., Levine J. M. Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan // J. Neurosci.—1994.—14, N 12.—P. 7616—7628.
2. Margolis R. K., Margolis R. U. Nervous tissue proteoglycans // Experientia.—1993.—49.—P. 429—446.
3. Loeb J. A., Fischbach G. D. ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain // J. Cell. Biol.—1995.—130, N 1.—P. 127—135.
4. Margolis R. U., Margolis R. K. Heparin sulfate and related complex carbohydrates of nervous tissue // Heparin: Structure, Cellular Functions, and Clinical Application / Ed. N. M. McDuffie.—New York: Acad. press, 1979.—P. 227—241.
5. Karlsson J. O., Linde A. Axonal transport of [³⁵S]sulphate in retinal ganglion cells of the rabbit // J. Neurochem.—1977.—28.—P. 293—296.
6. Kuczynski R. T., Mandell A. J. Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase // J. Biol. Chem.—1972.—247.—P. 3114—3122.
7. Brennan T. J., Vandermeulen E. P., Gebhart G. F. Characterization of a rat model of incisional pain // Pain.—1996.—64, N 3.—P. 493—521.
8. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals // Pain.—1983.—16.—P. 109—110.
9. Кобеляцкий Ю. Ю., Ушакова Г. А. Влияние морфина и кетамина на нейрональную и глиальную пластичность при послеоперационной гипералгезии // Журн. АМН України.—1999.—5, № 4.—С. 732—742.
10. Dolzhenko M. I., Lepikhin E. A., Berezin V. A. A novel method for evaluation of carbohydrate-binding activity: enzyme-linked carbohydrate-binding assay (ELCBA) // Biochem. Mol. Biol. Int.—1994.—34, N 2.—P. 261—271.
11. Лиманский Ю. П. Основные принципы функциональной организации ноцицептивных и антиноцицептивных систем мозга // Физиол. журн.—1989.—35, № 2. С. 110—121.
- 12.Coderre T. J., Katz J., Vaccarino A. L., Melzack R. Contribution of the central neuroplasticity to pathological pain: review

- of clinical and experimental evidence // *Pain*.—1993.—52, N 3.—P. 259—285.
13. Умарова Б. А., Шаниро Ф. Б., Струкова С. М. Роль катехоламинов, выделяющихся в результате стресса, в стимуляции секреции гепарина тканевыми базофилами у крыс // *Физиол. журн.*—1993.—39.—С. 52—57.
14. Withington D. E., Patrick J. A., Reynolds F. Histamine release by morphine and diamorphine in man // *Anaesthesia*.—1993.—48, N 1.—P. 26—29.
15. Marone G., Stellato C., Mastronardi P., Mazzarella B. Mechanisms of activation of human mast cells and basophils by general anesthetic drugs // *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*—1993.—12, N 2.—P. 116—125.
16. Della Seta D., de Acetis L., Aloe L., Alleva E. NGF effects on hot plate behaviors in mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.*—1994.—49, N 3.—P. 701—705.
17. Lewin G. R., Rueff A., Mendell L. M. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia // *Eur. J. Neurosci.*—1994.—6, N 12.—P. 1903—1912.
18. Kobiersky L. A. Cytokines and inflammation in the central nervous system // *Molecular neurobiology of pain* / Ed. D. Borsook.—New York: Seattle IASP press, 1997.—Vol. 9.—P. 45—58.
19. Корніловська І. М. Гетероморфність тканинних базофілів щитовидної залози щурів // *Вісн. морфології.*—1995.—1.—С. 1—3.

УДК 577.112

Надійшла до редакції 11.07.2000