

## SUMMARY

O. I. Bolshakova, D. I. Rodin, S. I. Timoshenko,  
E. M. Latypova, S. V. Sarantseva

Effect of nicotinic acid on the survival rate, and neurodegeneration of transgenic *Drosophila melanogaster* with overexpression of human APP gene

Transgenic *Drosophila melanogaster* lines modeling the main neuromorphological markers of Alzheimer's disease were used to study the neuroprotective properties of nicotinic acid. Thirty days old flies treated with nicotinic acid showed better survival rate and reduced neurodegeneration.

**Key words:** nicotinic acid, *Drosophila melanogaster*, Alzheimer's disease.

© В. Н. Очколяс, 2013 г.  
УДК [616.83]-005.1-06:616.831.31-009.24]-08.739.6

В. Н. Очколяс

## ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮТАМАТА ПРИ УЛУЧШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА В БАСЕЙНЕ ВНУТРЕННЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ У БОЛЬНЫХ С ПОСТИНСУЛЬТНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

### ВВЕДЕНИЕ

Снижение мозгового кровотока при острой церебральной ишемии вследствие стеноза или окклюзии брахиоцефальных артерий при отсутствии структурных и функциональных механизмов компенсации мозгового кровотока приводит к функциональной и аноксической деполяризации нейронов в пораженном сосудистом бассейне [7]. Основным патогенетическим механизмом формирования ишемического очага при критическом снижении мозгового кровотока является феномен эксайтотоксичности [15]. Данный патогенетический механизм реализуется через глутамат-кальциевый каскад: избыточное высвобождение глутамата из окончаний ишемизированных нейронов в межклеточное пространство и синаптическую щель приводит к активации и последующей альтерации NMDA- (N-methyl-D-aspartate) и АМРА- ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) рецепторов глутамата [9, 11].

Согласно современным представлениям о механизмах эпилептогенеза, в основе эпилептического разряда лежит формирование пароксизмального деполяризационного сдвига (ПДС) мембранного потенциала [13]. Большая роль в формировании ПДС отводится ионным каналам натрия и кальция АМРА-рецепторов глутамата [1, 2, 4, 14].

По данным аналитических работ, оперирующих большим количеством клинических наблюдений, у лиц старше 60 лет развитие эпилептических приступов в 30 % случаев связано с нарушением мозгового кровообращения [10, 12]. Частота встречаемости постинсультной эпилепсии составляет от 4,12 до 9,8 % [5, 6].

**Целью** исследования является изучение особенностей альтерации и темпа восстановления АМРА-рецепторов глутамата у больных с постинсультной эпилепсией в условиях улучшения кровотока в бассейне внутренней сонной артерии (ВСА).

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 92 больных с ишемической болезнью головного мозга, оперированных по поводу гемодинамически значимых стенозов ВСА в отделении сердечно-сосудистой хирургии городской больницы № 26 Санкт-Петербурга. Мужчин было 70 (76,1 %), женщин – 22 (23,9 %). Возраст больных варьировал от 36 до 74 лет, средний возраст –  $58,5 \pm 8,1$  года. Исследуемую группу составили 8 (8,7 %) больных, в клинической картине заболевания которых регистрировались эпилептические приступы, контрольную – 84 (91,3 %) больных, у которых эпилептических приступов не наблюдалось.

Больные обследованы в рамках диагностического комплекса, включающего оценку соматического и неврологического статуса ( $n = 92$ ), КТ ( $n = 50$ ), МРТ с МР-ангиографией ( $n = 42$ ), УЗДГ с определением параметров цереброваскулярной реактивности ( $n = 92$ ), дуплексное сканирование ( $n = 38$ ), ЭЭГ ( $n = 42$ ), церебральную ангиографию ( $n = 92$ ).

Больным была произведена каротидная эндартерэктомия (КЭАЭ) по классической и эверсионной методике [8]. Время пережатия ВСА составило  $35,42 \pm 0,69$  мин при классической КЭАЭ и  $33,82 \pm 0,63$  мин при эверсионной КЭАЭ.

Достоверных различий в группах по полу, возрасту, стороне поражения, тактике и технике оперативных вмешательств не выявлено.

В качестве оценки степени альтерации АМРА-рецепторов глутамата использован иммуноферментный метод полуколичественного определения уровня аутоантител в периферической крови (ААТ) к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов (GluR1) –

«ПА-тест» [3, 4]. Образцы крови больных отбирали из вены. Сыворотку получали путем центрифугирования (4000g) в течение 5 мин при + 4 °С. Образцы хранили до момента анализа при температуре – 70°С. В качестве антигена для определения уровня ААТ в сыворотке крови использовали синтетические пептиды, соответствующие последовательностям аминокислот субъединиц GluR1 AMPA (15 а.о.), полученные методом твердофазного синтеза на NPS-400 полуавтоматическом синтезаторе (*Neosystem Laboratory*, Франция) с использованием метил-бутил-гидроацетилового основания и N-терт-бутоксикарбонил/бензиловой методики для первых двух аминокислот. Препаративная очистка пептида осуществлялась методом HPLC на DeltaPac C<sub>18</sub> Column (*Waters Chromatography, Milford, MA, США*) в системе «вода/ацетонитрил/0,015 М трифторуксусная кислота». Чистота пептида была определена аналитическим HPLC и варьировала от 90 до 98 %. Последовательности пептида были проверены анализом аминокислот после гидролиза пептида. Иммуноферментный анализ проб сывороток проводили стандартным методом ELISA. Нормальный уровень ААТ определен в 75 – 110 % [3, 4]. Определение уровня ААТ производилось до операции, через 30 мин после пережатия ВСА, через 3 часа после операции, через 3 и 14 суток после операции. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием лицензионной программы «Statistica 6.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В общей серии наблюдений у 8 больных в клинической картине заболевания регистрировались эпилептические припадки. Все больные относились к подгруппе больных с перенесенными острым нарушением мозгового кровообращения в бассейне средней мозговой артерии.

Частота эпилептических припадков составила от 2 до 4 в месяц. По структуре эпилептических припадков у больных исследуемой группы регистри-

ровались первично-генерализованные припадки у 2 (25 %) больных, вторично-генерализованные – у 2 (25 %), парциальные соматомоторные – у 4 (50 %). Ни в одном из наблюдавшихся случаев не была зарегистрирована аура.

Уровень ААТ к (GluR1) до операции в контрольной группе находился в пределах нормальных значений, в исследуемой группе существенно превышал нормальные значения – 105,45±1,55 и 128,12±3,69 % соответственно.

В контрольной группе больных повышение уровня ААТ к (GluR1) на 25 % регистрировалось только через 3 часа после начала основного этапа операции (p<0,05). При этом стабильно высокий уровень ААТ к (GluR1) сохранялся достаточно длительно, и медленное снижение его регистрировалось к 14-м суткам после операции до близких к нормальным значений (p<0,05).

В исследуемой группе больных повышение уровня ААТ к (GluR1) на 10 % также регистрировалось только через 3 часа после начала основного этапа операции (p<0,05). К 3-м суткам после операции уровень ААТ к (GluR1) был выше исходного на 14,1 %. К 14-м суткам после операции уровень ААТ к (GluR1) достигал значений исходного, оставаясь при этом выше нормальных значений (p<0,05).

При сравнительном анализе в группах по периодам контроля выявлена разница уровней ААТ к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата (p<0,05), при этом уровень ААТ к (GluR1) был существенно выше во 2 группе (таблица).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе динамики уровней ААТ к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата на фоне изменения мозгового кровотока в общей серии наблюдений (n = 92) выявлены определенные закономерности. Как в контрольной, так и в исследуемой группе больных динамика уровней ААТ как критерия степени альтерации и восстановления AMPA-рецепторов глутамата носила стереотипный характер.

Реакция AMPA-рецепторов глутамата на гипоксию во время пережатия магистрального сосуда во время операции развивалась с латентным периодом. Повышение уровня ААТ к (GluR1) регистрировалось только через 3 часа – 3-е суток после операции (p<0,05). При восстановлении и последующем улучшении мозгового кровотока в пораженном сосудистом бассейне восстановление AMPA-рецепторов глутамата происходило медленно. Через 14 суток после операции в обеих группах уровень

**Сравнительная динамика уровня ААТ к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата у больных, оперированных по поводу гемодинамически значимых стенозов ВСА**

Период контроля	Контрольная группа (n=84)		Исследуемая группа (n=8)			p	
	М	σ	М	М	σ		m
До операции	105,45	14,22	1,55	128,12	10,44	3,69	p<0,05
Через 30 мин после пережатия ВСА	106,96	13,96	1,52	127,50	8,63	3,05	p<0,05
Через 3 часа после операции	132,51* **	13,79	1,50	140,87* **	9,26	3,27	p>0,05
Через 3-е суток после операции	130,17* **	13,15	1,43	146,25**	6,23	2,20	p<0,05
Через 14 суток после операции	114,30* **	12,42	1,35	127,87*	6,47	2,29	p<0,05

Примечание: \* – достоверно по сравнению с предшествующим уровнем (p<0,05); \*\* – достоверно по сравнению с уровнем ААТ до операции (p<0,05).

ААТ к (GluR1) превышал нормальные показатели, а в контрольной группе больных превышал исходный уровень ( $p < 0,05$ ).

В исследуемой группе больных, в клинической картине у которых регистрировался эпилептический синдром, альтерация АМРА-рецепторов глутамата преобладала: уровень ААТ к (GluR1) до операции в группе превышал нормальные значения и был выше, чем в 1 группе ( $p < 0,05$ ). При однотипном характере динамика уровней ААТ к (GluR1) в обеих группах в исследуемой группе во все периоды контроля уровень ААТ к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов глутамата был выше, чем в контрольной ( $p < 0,05$ ).

Результатом проведенных реконструктивных операций во всех рассмотренных случаях как в контрольной, так и исследуемой группах больных было объективно подтвержденное улучшение мозгового артериального кровотока в пораженном сосудистом бассейне. При этом при существенном улучшении артериального кровотока у больных исследуемой группы нормализации или достоверно значимого снижения уровня ААТ к (GluR1) не наблюдалось. Уровень ААТ к (GluR1) через 14 дней после операции оставался существенно выше нормальных значений —  $127,87 \pm 2,29\%$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гранстрем О. К., Дамбинова С. А. Роль глутаматных рецепторов в механизмах формирования эпилепсии // Нейрохимия. — 2001. — Т. 18. — № 1. — С. 19–29.
2. Дамбинова С. А. Нейрорецепторы глутамата. — Л.: Наука, 1989. — 279 с.
3. Пат. 2112243 Российская Федерация, МПК<sup>6</sup> G01N33/53, С12Q1/04, А61К39/00. Набор «ПА-тест» для диагностики неврологических заболеваний / заявитель и патентообладатель Дамбинова С. А. — № 95120299/13; заявл. 29.11.1995; опубл. 27.05.1998. — Бюл. № 6.
4. Поляков Ю. И. Диагностика эпилепсии и оценка степени компенсации болезни в процессе терапии методом биохимического тестирования пароксизмальной активности головного мозга: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — СПб., 1997.
5. Прохорова Э. С. Эпилептические припадки при нарушениях мозгового кровообращения у больных гипертонической болезнью и атеросклерозом: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М., 1982.
6. Рудакова И. Г., Котов С. В., Котов А. С. Возрастные аспекты эпилепсии у взрослых // Нервные болезни. — 2007. — № 4. — С. 2–9.
7. Astrup J., Symon L., Branston N. M. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia // Stroke. — 1977. — Vol. 8 (1). — P. 51–57.
8. Chevalier J. M., Gayral M., Duchemin J. F. et al. Reverse endarterectomy of the internal carotid // J. Mal. Vasc. — 1994. — Vol. 19. — Suppl. A. — P. 18–23.
9. Haddad G. G., Jiang C. O<sub>2</sub> deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury / G. G. Haddad, C. Jiang // Prog. Neurobiol. — 1993. — Vol. 40. — P. 277–318.

10. Hauser W. A., Anntgers J. F., Kurland L. T. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Richester. Minnesota: 1935–1984 // Epilepsia. — 1993. — № 34. — P. 453–468.

11. Hegstad E., Berg-Johnsen J., Haugstad T. S. et al. Amino-acid release from human cerebral cortex during simulated ischaemia in vitro // Acta Neurochir. (Wien). — 1996. — Vol. 138 (2). — P. 23.

12. Luhdorf K. L., Jensen K., Plesener A. M. Epilepsy in elderly: prognosis // Acta Neurol. Scand. — 1986. — № 74. — P. 409–415.

13. Matsumoto H., Ajmone-Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: interictal manifestations // Exp. Neurol. — 1964. — № 9. — P. 286–304.

14. Najm I. M., Ying Z., Babb T. et al. Epileptogenicity correlated with increased N-methyl-D-aspartate receptor subunit // Epilepsia. — 2000. — № 41 (8). — P. 971–976.

15. Olney J. W. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity // J. Neural. Transm. — Suppl. — 1994. — Vol. 43. — P. 47–51.

16. Obrenovitch T. P., Zilkha E., Urenjak J. Evidence against high extracellular glutamate promoting the elicitation of spreading depression by potassium // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1996. — Vol. 160. — P. 923–931.

17. Obrenovitch T. P., Zilkha E., Urenjak J. et al. Excitotoxicity in neurological disorders — the glutamate paradox // Int. J. Dev. Neurosci. — 2000. — Vol. 18 (2–3). — P. 281–287.

18. Siesjo B. K., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1989. — Vol. 9. — P. 127–140.

## РЕЗЮМЕ

*В. Н. Очколяс*

**Особенности реакции АМРА-рецепторов глутамата при улучшении мозгового кровотока в бассейне внутренней сонной артерии у больных с постинсультной эпилепсией**

Обследованы 92 больных, оперированных по поводу гемодинамически значимых стенозов внутренней сонной артерии. Изучены частота и клинические особенности постинсультной эпилепсии. Показаны особенности восстановления АМРА-рецепторов глутамата у больных с постинсультной эпилепсией на фоне улучшения артериального кровотока.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, каротидная эн-дартерэктомия, постинсультная эпилепсия, АМРА-рецепторы глутамата.

## SUMMARY

*V. N. Ochkoilyas*

**Peculiarities of the reaction of the AMPA-receptors of glutamate in improvement of the cerebral blood flow in the basin of the internal carotid artery in patients with post-stroke epilepsy**

The patients (n = 92) who had been operated for hemodynamically significant stenoses of the internal carotid artery were under examination. Attention was paid to frequency and clinical features of the post-stroke epilepsy and to specificity of restoration of the AMPA-receptors of glutamate in the post-stroke patients with improving arterial blood flow.

**Key words:** ischemic stroke, carotid endarterectomy, post-stroke epilepsy, AMPA glutamate receptors.