

УДК 616.853—092.9—07:616.155.34—008.13

РОЛЬ ФАКТОРОВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ
В ФОРМИРОВАНИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ
ПРИ ПИКРОТОКСИНИНДУЦИРОВАННОМ
КИНДЛИНГЕ У КРЫС

ШАНДРА А. А., ГОДЛЕВСКИЙ Л. С., МАЗАРАТИ А. М.,
ВОВЧУК С. В., СЕРВЕЦКИЙ К. Л.

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Фармакологический киндлинг как модель хронической эпилептизации мозга отличается устойчивостью наблюдаемых функциональных и метаболических нарушений, характеризующих собой механизмы возникновения и развития эпилептической системы [1]. Имеющаяся научная информация свидетельствует о важном значении некоторых пептидов в регуляции эпилептогенеза при киндлинге, формируемом повторными введениями коразола [2] и пикротоксина [3].

В настоящей работе приведены результаты влияния пептидсодержащих экстрактов мозга и его отдельных образований—ВОМ и гиппокампа крыс, подвергнутых фармакологическому киндлингу повторными введениями пикротоксина, на эпилептическую активность у интактных крыс-рецидивентов, а также результаты определения содержания в данных структурах β -эндорфина, Met-энкефалина и дельта-сониндуцирующего пептида.

Использовали 70 крыс-самцов линии *Wistar* массой от 180 до 250 г. У половины животных вызывали киндлинг с помощью однократных ежедневных введений пикротоксина в подпороговой (1,0—1,2 мг/кг) дозе [3]. Повторное введение конвульсанта сопровождалось появлением и нарастанием тяжести судорожных реакций от отдельных вздрагиваний до генерализованных клонико-тонических судорожных приступов. В опытах использовали животных, у которых последовательно наблюдалось не менее четырех генерализованных судорожных припадков, провоцируемых тестирующим введением пикротоксина (1,0—1,2 мг/кг). Контрольной группе животных (35 крыс) ежедневно однократно вводили 0,9%-ный физиологический раствор. Через 24 ч после последней инъекции препаратов живот-

ных декапитуровали, удаляли головной мозг со стволом, иссекали ткани гиппокампа билатерально по координатам атласа [4] от AP=2,0 до AP=3,2 и BOM—на протяжении от AP=-4,8 до AP=-6,3 [2]. В удаленный участок входили черная субстанция, паранигральное ядро, вентральная зона покрышки, ростральная часть интерпедункулярного ядра, ядро шва, а также каудальные отделы мамиллярных тел. Полученные пробы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при -20° . Образцы лиофилизировали и проводили экстракцию пептидной фракции кипящей 1 М уксусной кислотой в соотношении 1:10 в течение 20 мин и экстракт охлаждали и центрифугировали при 3000 об/мин при 4° [2, 5]. Полученный супернатант замораживали и подвергали лиофильной сушке. Сухой экстракт перед введением растворяли в 0,9%-ном физиологическом растворе. Изучение эффектов экстрактов проводили на крысах линии *Wistar* массой 180—300 г, которым по координатам атласа 4 под эфирным рауш-наркозом осуществляли внутрижелудочковое (AP = -0,8, L = 1,2, H = 3,5) введение экстрактов (20 мкг/животное) в объеме 5,0 мкл со скоростью 1,0 мкл/мин, через 10—20 мин производили внутрибрюшинное введение пикротоксина (2,0 мг/кг). За развитием судорожных реакций наблюдали в течение 45 мин. Налоксон («Dupont», США) вводили в дозе 1,0 мг/кг за 10 мин до применения пикротоксина. Учитывали латентный период первых судорожных проявлений и тяжесть судорог, которую оценивали в баллах по принятой шкале [2].

Определение содержания эндогенных пептидов проводили с помощью конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на 96-луночных полистироловых планшетах. В работе использовали кроличьи моноспецифические поликлональные антитела к Met-энкефалину, β -эндорфину и дельта-сенсибилизирующему пептиду с титрами 1:2000, 1:10000 и 1:50000 соответственно. Для количественного определения пептидов использовали соответствующие калибровочные графики, которые получали применительно к индивидуальным планшетам. Результаты обрабатывали статистически [6].

На рис. 1 представлены эффекты внутрижелудочкового введения экстрактов разных отделов мозга киддлинговых животных и животных контрольной группы на эпилептическую активность, вызванную у крыс-рецидивистов внутрибрюшинным введением пикротоксина (2,0 мг/кг). Судороги, индуцируемые у крыс пикротоксином после внутрижелудочкового введения 5,0 мкл 0,9%-ного физиологического раствора, характеризовались клонусами мышц туловища, а также судорожными вздрагиваниями (рис. 1). Как видно из рис. 1, 2, применение экстракта ткани гиппокампа киддлинговых крыс не изменяло ($p > 0,05$) тяжести судорожных реакций, провоцируемых пикротоксином, по сравнению с таковой у животных контрольных групп (внутрижелудочковое введение физиологического

раствора, а также экстракта гиппокампа крыс контрольной группы). Введение экстракта мозга (без гиппокампа) крыс, подвергнутых киндлингу, вызывало статистически достоверное усиление ($p < 0,05$) судорожных проявлений, вызванных конвульсантом (рис. 1, 3). При применении экстракта «остального» мозга у животных-реципиентов наблюдались ярко выраженные проявления клонусов мышц туловища и передних конечностей. Внутрижелудочковые инъекции интактным крысам-реципиентам экстракта ВОМ киндлинговых крыс сопровождалась развитием интенсивных пикротоксининдуцированных

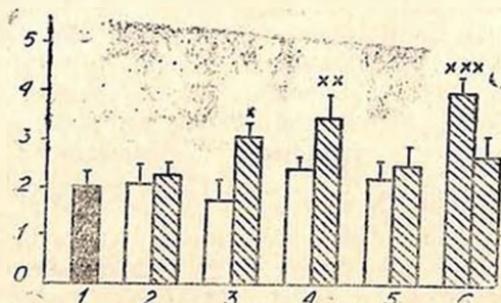


Рис. 1. Влияние экстрактов различных отделов мозга на судорожную активность, вызванную пикротоксином у крыс. Во всех группах введение пикротоксина (2,0 мг/кг) производилось через 20 мин после внутрижелудочковой инъекции экстрактов (20 мкл/животное). По оси абсцисс: 1—эффект пикротоксина у животных, которым производили внутрижелудочковое введение 5,0 мкл 0,9%-ного раствора NaCl, 2 и 3—введение экстракта гиппокампа и «остального» мозга киндлинговых крыс; 4 и 5—введение экстракта ВОМ и «остального» мозга киндлинговых крыс; 6—эффект экстрактов ВОМ до (первый столбик) и после (второй столбик) введения налоксона (1,0 мг/кг). По оси ординат: тяжесть судорог (баллы). Светлый столбик—эффект экстрактов мозга животных, контрольной и заштрихованный—киндлинговой групп. *— $p < 0,05$, **— $**p < 0,01$, *** $p < 0,001$

клонических судорог конечностей и туловища, а у 3-х из 7 животных развивались даже генерализованные клонико-тонические судорожные припадки (рис. 1, 4). Степень тяжести последних статистически достоверно превышала такую у животных контрольной группы ($p < 0,01$). В аналогичных условиях эксперимента на фоне внутрижелудочкового применения экстракта мозга киндлинговых животных без ВОМ не обнаруживались сколь-нибудь заметные изменения интенсивности проявления судорожных реакций, индуцированных у животных-реципиентов (рис. 1, 5). Как видно из рис. 1, 6 введение пикротоксина в условиях применения экстракта ВОМ киндлинговых крыс и предварительного введения налоксона (1,0 мг/кг) сопровождалось развитием судорожных реакций, степень выраженности которых статистически достоверно ($p < 0,001$) усту-

лала таковой при провоцировании судорог после внутрижелудочкового введения одного лишь экстракта ВОМ.

Изучение уровня содержания пептидов показало, что как в гиппокампе, так и в структурах ВОМ мозга киндлинговых крыс происходит его высокодостоверное снижение (рис. 2), особенно β -эндорфина в образованиях ВОМ, где оно доходило до 95% по сравнению с таковым у животных контрольной группы. Наименьшее понижение содержания дельта-соницирующего пептида в гиппокампе составляло 63% (рис. 2, 3).

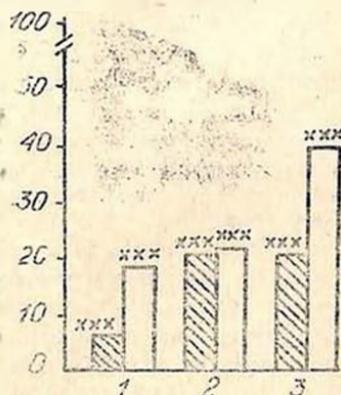


Рис. 2. Изменения содержания пептидов в структурах ВОМ и гиппокампа при пикротоксинвызванном киндлинге у крыс. 1, 2, 3—соответственно уровень β -эндорфина, Met-энкефалина и дельта-соницирующего пептида в % по сравнению с таковым у животных контрольной группы, принятым за 100% и обозначенным горизонтальной линией. Заштрихованный столбик—уровень пептидов в ВОМ, светлый столбик—в гиппокампе; *** $p < 0.001$

Таким образом, приведенные результаты показывают, что в условиях формирования киндлинга с помощью повторных введений пикротоксина в подпороговой дозе в мозгу крыс происходит накопление пептидных соединений, обладающих эпилептогенным действием. Эти вещества обнаруживаются в структурах ВОМ и их эффект устраняется введением палоксона в относительно небольшой дозе, что свидетельствует о возможном осуществлении эпилептогенного действия путем активации μ -опиатных рецепторов. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным о накоплении эпилептогенных факторов в мозгу крыс при коразолницирующем киндлинге, свидетельствующим о существовании общих патогенетических механизмов разных видов фармакологического киндлинга [2]. Обнаружение снижения уровня β -эндорфина, Met-энкефалина и дельта-соницирующего пептида в структурах ВОМ исключает роль этих веществ в обеспечении эпилептогенного эффекта экстрактов и речь может идти лишь о накоплении при киндлинге неидентифицированного μ -опиатного агониста.

Ранее нами было показано [1] ключевое значение формирования детерминантной структуры гиппокампа в развитии эпилептической активности при коразол- и пикротоксининдуцированном киндлинге. В настоящем исследовании было обнаружено, что ее формирование сопровождается снижением уровня β -эндорфина, Met-энке-

фалина и дельта-соннидующего пептида в отсутствие накопления в гиппокампе эпилептогенных пептидных соединений.

В ряде работ [7—10] показано, что при киндлинге, вызываемом пентилснететразолом, а также электрическими стимуляциями мидаллины в лимбических структурах происходит увеличение содержания Met-энкефалина. Противоположный характер настоящих данных может быть обусловлен как различиями механизмов пикротоксининдуцированного и других форм киндлинга, так и использованием в нашей работе наиболее выраженных форм эпилептического синдрома, характеризующихся повторными клонико-тоническими приступами, при развитии которых отмечается снижение содержания опиоидных пептидов в мозгу животных [8].

Нами было показано противозипилептическое действие дельта-соннидующего пептида в условиях коразолового киндлинга, а также при введении пептида в ретикулярную часть черной субстанции [11, 12]. Полученные результаты позволяют полагать, что снижение количества эндогенного дельта-соннидующего пептида может быть одним из механизмов эпилептогенных эффектов киндлинга. В этой связи представляют интерес данные о блокировании под влиянием дельта-соннидующего пептида эффектов кортикотропин-рилизинг гормона [13], однократное внутримозговое введение которого сопровождается развитием киндлингоподобной эпилептической активности [14]. Кроме того, он принимает также участие в регуляции синтеза опиоидных пептидов из проопиомеланокортина [15]. Таким образом, снижение содержания дельта-соннидующего пептида может вызывать как усиление эпилептогенного действия кортикотропин-рилизинг гормона, так и, возможно, усиливать синтез эпилептогенных агонистов μ -опиоидных рецепторов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при пикротоксининдуцированном киндлинге у крыс формирование эпилептиформных реакций обусловлено накоплением в структурах мозга эпилептогенных пептидных факторов, а также снижением в них содержания эндогенных пептидов, обеспечивающих противозипилептическое действие.

THE ROLE OF PEPTIDE FACTORS IN EPILEPTIFORM ACTIVITY DEVELOPMENT UNDER CONDITION OF PICROTOXIN-INDUCED KINDLING IN RATS

SHANDPA A. A., GODLEVSKY L. S., MAZARATI A. M., VOVCHUK S. V.,
SERVEISKY K. L.

N. J. Pirogov Odessa Medical Institute

The peptide-containing extracts were emitted from the ventral mesencephalic region (VMR) and hippocampal tissue of rats kindled with subconvulsant doses of picrotoxin. Extracts were prepared with the help

of hot acetic acid from the brain of those animals which had not less than four seizure generalized fits. The intraventricular VMR-extracts administration to intact recipient rats increased the seizures induced with systemic picrotoxin injection. This effect of VMR-extract was not observed after preliminar naloxon (1,0 mg/kg) injection. The prominent decrease of β -endorphin, Met-enkephalin and delta-sleep inducing peptide in VMR and hippocampal tissue of kindled animals was shown using the method of immunoenzyme analysis. Authors come to the conclusion that delta-sleep inducing peptide decrease is a significant mechanism of kindled epileptic activity development.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. Успехи физиол. наук, т. 21, № 4, с. 50—68, 1990.
2. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Карсанов М. Ю., Мазарати А. М., Макулькин Р. Ф. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, т. 110, № 7, с. 14—17, 1990.
3. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. Нгуен Тхи Тхань, Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 111, № 3, с. 235—239, 1991.
4. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, N. Y., 1982.
5. Bloom F. E., Rossien J., Ruffenbug A. Advanc. Biochem. Psychopharm. Med., v. 18, p. 89—109, 1978.
6. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях, М., 1968.
7. Naranjo J. R., Iadorola M. J., Costa F. J. Neurosci. Res., v. 16, № 1, p. 75—87, 1986.
8. Talavera E., Otana-Zapata I., Asai M., Condes-Lara M. Brain Res., v. 485, № 1, p. 141—148, 1989.
9. Vindrola O., Briones R., Asai M., Fernandez-Guardiola A. Neurosci. Lett., v. 21, p. 39—43, 1981.
10. Vindrola O., Asai M., Zubieta M., Talavera E., Rodriguez E., Linares G. Brain Res., v. 397, p. 121—125, 1984.
11. Шандра А. А., Крыжановский Г. Н., Годлевский Л. С., Макулькин Р. Ф., Михалева И. И., Иванов В. Т. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 106, № 9, с. 269—271, 1988.
12. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. — В сб.: II Всесоюзн. конф. по нейронаукам, Киев, с. 158, 1988.
13. Graf M. V., Kastin A. J., Coy K. H., Fishman A. J. Neuroendocrinology, v. 4-1 p. 353, 1985.
14. Weiss S. R. B., Post R. M., Gold P. M., Chrousos G., Sullivan T. L., Walker P., Pert A. Brain Res., v. 372, № 2, p. 345—351, 1986.
15. Ball R. Brit. J. Hosp. Med., v. 37, № 1, p. 49—50, 1987.

Поступила 19. VII. 1991