НЕЙРОХИМИЯ
т. 10, № 3—4, 1991

УДК 612.822.1:577.175.823;615.212.7:547.95

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТАФТСИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

ГЕРШТЕЙН Л. М., ДОВЕДОВА Е. Л., ПОПОВА Н. С., *ВЕСКОВ Р., *СТОЙЛКОВИЧ М., *ПЕКОВИЧ С., *СТУКАЛОВ П.

НИИ мозга АМН СССР, Москва
*Клинический Центр САН, Белград

В данной работе с целью выяснения особенностей взаимодействия структур мозга на системном, клеточном и субклеточном уровнях в условиях созданной экспериментальной модели—эпилепсии, а также выяснения возможности корреляции ее проявлений под действием тетрапептида тафтсина был проведен сравнительный анализ поведения животных, биоэлектрической активности структур мозга и биохимических показателей в тех же образованиях до и после введения данного пептида на фоне или до появления признаков пенициллиновой эпилепсии.

Современная, в основном отечественная, нейробиология накопила весьма разнообразные данные по действию тетрапептида тафтсина (Thr-Lys-Pro-Arg) на организм. Такие данные в основном касаются либо его влияния на поведение животных, либо на отдельные показатели нейрохимических процессов в структурах мозга. Так, известно, что тафтсин стимулирует неспецифический иммунитет, влияет на двигательную активность животных, оказывает стрессопротективное и антидепрессантное действие [1—4].

Механизм действия тафтсина на ЦНС еще не выяснен. Немногочисленные данные свидетельствуют о том, что эффект этого препарата опосредуется воздействием на катехоламинергические системы. Так, установлено его влияние на активность тирозингидроксилазы, в частности в гипоталамусе и стриатуме [5].

Для решения вопроса о целесообразности использования тафтсина в клинических условиях необходимо представить его действие не только на интактных животных, но и в условиях экспериментальной патологии. Применяя широко используемую модель эпилепсии, мы пытались изучить действие тафтсина в условиях хорошо выраженной на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) эпилептиформной активности и двигательной гиперактивности в условиях миоклонических судорог. Известно, что в механизмах пенициллиновой эпилепсии активную роль играет система глутаминовой кислоты—ГАМК, что не исключает возможности изменения и других нейромедиаторных систем (либо вторично, либо опосредованно).

В настоящем комплексном исследовании в условиях экспериментальной эпилепсии ставилась задача выяснить действие тафтсина на нейрохимические, электрофизиологические показатели в различных структурах мозга при контроле за поведением животных (крысы, кошки).

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах и кошках с вживленными электродами во все области коры и хвостатого ядра. Животные были объединены в группы по сериям эксперимента: I группа—контрольные животные (беспородные крысы массой 250—300 г, кошки массой 3,0—3,5 кг); II группа—экспериментальные животные, подвергнутые фармакологическому воздействию: одноразовое внутримышечное введение пенициллина (кристаллический препарат калий-бензилпенициллин, «Galenika», СФРЮ), доза 400 000 Е/кг массы тела кошки, 100 000 Е/кг—для крысы.

Во всех случаях развитие эпилептической активности наблюдали в течение 1—1,5 ч. III группа—экспериментальные животные, которым вводили тафтсин внутрибрюшинно в дозе 0,3 мг/кг через 45 мин после введения пенициллина, IV группа—экспериментальные животные, которым вводили тетрапептид тафтсин за 30 мин до действия пенициллина.

Введение тафтсина до появления эпилептиформной активности либо на фоне ее полного развития производили под постоянным контролем ЭЭГ каждой из структур мозга. Эффекты пептида прослеживали в течение 30 мин, после чего животных декапитировали и мозг использовали для биохимических и морфологических исследований.

Для биохимического исследования служили субфракции «легких» и «тяжелых» синаптосом (С и Д) и свободных митохондрий нейронов (Е), выделенные в градиенте плотности сахарозы 0,8—1,4 М [6], а также срезы сенсомоторной коры и хвостатого ядра. В указанных образованиях мозга спектрофотометрически определяли содержание белка по Lowry [7], активность молекулярных форм МАО типа А при 250 нм (субстрат—серотонин) по методу Горкина [8] и типа Б при 450 нм (субстрат—пара-нитрофенилэтиламин) по методу Попова [9].

Для гистохимического исследования мозг фиксировали в жидкости Карнуа и после гистологической проводки заключали в парафиновые блоки. Методом интерферометрии на микроскопе «Интерфако» (ГДР) в нейронах слоев III и V сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра определяли сухую массу плотных веществ (при 535 нм), которые на фиксированном материале отражают содержание структурированных белков [10].

Одновременно измеряли площадь профильного поля цитоплазмы и ядер нейронов с помощью окуляр-микрометра МОВ—1—15. Морфологический контроль осуществляли на срезах, окрашенных крезил-виолетом [11].

Введение пенициллина животным через 30—45 мин вызывало на ЭЭГ эпилептиформные циклические разряды, регистрирующиеся одновременно во всех исследованных структурах мозга как у кошек, так и у крыс. Эпилептиформные разряды у всех животных сопровождались миоклоническими сокращениями мышц шеи и мордочки.

Результаты и обсуждение

Не останавливаясь на подробном описании самих эпилептиформных разрядов в структурах мозга, обусловленных введением пенициллина, напомним, что их частота, длительность, амплитуда во многом зависят от функционального состояния животных [12, 13].

В наших экспериментах у бодрствующих животных (кошки, крысы) эпилептиформные циклические разряды имели длительность от 1 до 1,5 с, следовали с интервалом 8—25 с и проявлялись на протяжении 4 ч и более (рис. 1, *а*). После этого у большинства животных они переходили в генерализованные эпилептические приступы, которые могли привести к гибели животных. До появления генерализованных припадков разряды сопровождались миоклоническими сокращениями мышц шеи и мордочки животных. Наблюдалась коррекция между эпилептиформной активностью и миоклоническими сокращениями мышц.

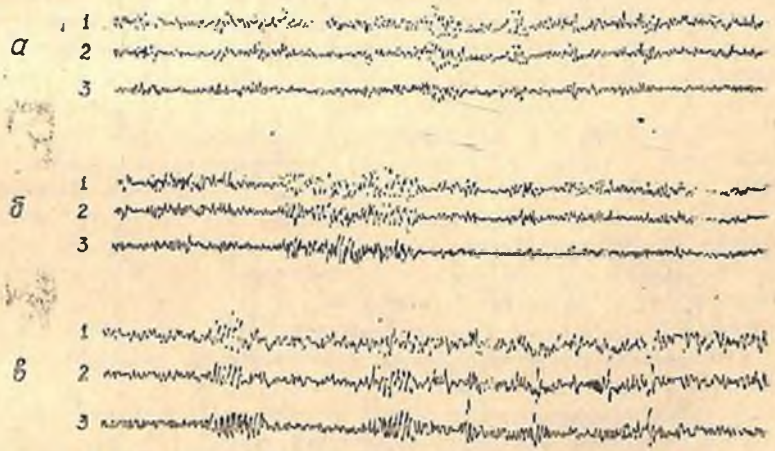

Рис. 1. Электроэнцефалограмма различных областей коры больших полушарий мозга крыс. *1*—зрительная кора (левая), *2*—зрительная кора (правая), *3*—сенсомоторная кора (правая); *а*—эпилепсия, *б*—тафтсии на фоне эпилепсии, *в*—тафтсии до развития эпилептиформной активности

При биохимическом определении активности У. А. МАО типов А и Б сенсомоторной области коры и хвостатого ядра мозга крыс на субклеточном уровне в условиях опытов, описанных выше, было обнаружено, что экспериментальная эпилепсия по сравнению с нормой практически не изменяла ферментной активности (рис. 2).

Под влиянием пенициллина происходило также уменьшение размеров цитоплазмы и ядер нейронов, сопровождающееся снижением содержания и концентрации белков, что позволяет предполагать преобладание процессов распада белка над его синтезом (табл. 1).

Введение тафтсина на фоне развившихся эпилептиформных разрядов у кошек и крыс приводило (через 25—30 мин) к их учащению,

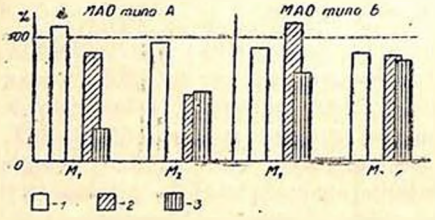

Рис. 2. Изменение величины У. А. МАО типа А и Б во фракциях митохондрий сенсомоторной коры (M_1) и хвостатого ядра (M_2) мозга крыс под влиянием тафтсина в условиях экспериментальной эпилепсии (%). *1*—эпилепсия, *2*—тафтсин до развития эпилептиформной активности, *3*—тафтсин на фоне эпилепсии

интервалы между разрядами укорачивались до 4—10 с, сами разряды удлинялись во времени до 2,5 с, захватывая, как и прежде, все структуры мозга (рис. 1, *б*). В этих условиях эффект тетрапептида тафтсина приводил к снижению величины У. А. МАО типа А во фракциях митохондрий (М) обоих образований мозга по сравнению с нормой. Это подавление было выражено более в сенсомоторной коре (M_1) для активности МАО А (рис. 2). По цитохимическим показателям введение тафтсина на фоне развившейся эпилептической активности стабилизировало выраженные изменения при пенициллине, в некоторых случаях появлялась тенденция к их уменьшению.

Введение тафтсина до появления эпилептиформной активности приводило к некоторому удлинению латентного периода появления первых разрядов (45 мин—1 ч), однако, после того как возникали эпилептиформные разряды, они становились несколько более длительными и следовали более часто, то есть эффект совпадал с тем, который наблюдался при введении тафтсина на фоне развившейся эпилептиформной активности (рис. 1, *в*).

Вместе с тем, после введения тафтсина даже через 4—5 ч больших губительных генерализованных эпилептических приступов не наступало ни у крыс, ни у кошек.

По биохимическим показателям при использовании тафтсина до развития эпилепсии обнаружен некоторый стабилизирующий эффект пептида, особенно в субфракциях коры мозга крыс; в мозгу кошек, как при действии пенициллина, так и при действии тафтсина, введенного до или на фоне пенициллина, обнаружено подавление ферментной активности МАО типа А (рис. 3).

В этих условиях тафтсин не оказывал влияния, а в некоторых случаях усугублял имеющиеся структурные изменения в цитоплазме (размеры, содержание и концентрация белка). При этом ядра нейронов увеличивались в размерах; имеющиеся литературные данные

Таблица 1

Изменение морфохимических показателей в нейронах сенсомоторной коры в норме и при экспериментальных воздействиях

Слой III				Слой V			
Контроль	Пенициллин	Пенициллин + тафтсин	Тафтсин + пенициллин	Контроль	Пенициллин	Пенициллин + тафтсин	Тафтсин + пенициллин
Площадь цитоплазмы (мкм²)							
70,15±1,14 100%	60,85±1,35 87%	62,55±1,00 88,5%	59,11±1,13 84,2%	168,87±3,88 100%	162,70±3,31 96,4%	154,69±4,09 91,7%	155,00±2,57 91,7%
Площадь ядра (мкм²)							
54,07±0,85 100%	45,08±0,83 83,3%	54,14±0,79 100%	72,14±1,17 133,3%	92,75±2,45 100%	96,49±1,93 104,3%	95,23±26,08 102,1%	117,60±2,13 126,8%
Сухой вес цитоплазмы (пг)							
82,17±2,16 100%	68,53±1,87 82,9%	69,6±2,65 85,3%	65,84±1,64 80,4%	217,41±5,14 100%	192,3±4,9 88,4%	180,05±5,25 82,9%	183,13±4,56 84,3%
Концентрация белка в цитоплазме (пг/мкм³)							
1,18±0,01 100%	1,15±0,016 97,5%	1,09±0,008 92,3%	1,14±0,017 96,6%	1,25±0,01 100%	1,17±0,014 93,6%	1,20±0,01 96,0%	1,210±0,018 96,8%

и полученные нами ранее [14, 15] свидетельствуют об активации обменных процессов в ядрах.

Указанные цитохимические изменения наиболее выражены в хвостатом ядре и в слое III сенсомоторной коры.

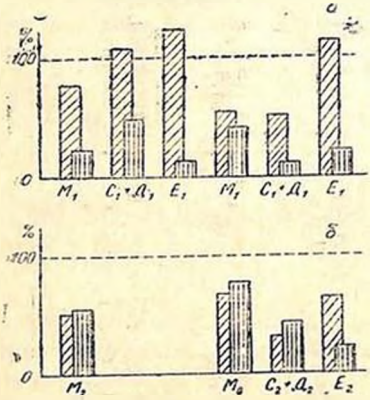

Рис. 3. Изменение величины У. А. МАО типа А в субфракциях синаптосом С+Д и митохондрий Е сенсомоторной коры (M_1) и хвостатого ядра (M_2) мозга крысы (*а*) и кошки (*б*). Уровень активности при эпилепсии принят за 100%. Остальные обозначения как на рис. 2.

В заключение можно сделать вывод, что эпилептиформная активность, вызванная большими дозами пенициллина, сопровождается определенными нейрохимическими и морфологическими изменениями мозга. А именно, наблюдается уменьшение размеров ядра и цитоплазмы нейронов слоев III и V, сенсомоторной коры и хвостатого ядра, а также содержания и концентрации в них белков. При этом

Таблица 2

Изменение морфохимических показателей в нейронах хвостатого ядра мозга крыс в норме и при экспериментальных воздействиях

Контроль	Пенициллин	Пенициллин + тафтсин	Тафтсин + пенициллин
Хвостатое ядро			
Площадь цитоплазмы (мкм²)			
59,34±0,82 100%	45,5±0,72 76,2%	41,27±0,64 69,5%	38,27±0,77 64,4%
Площадь ядра (мкм²)			
46,5 ±0,77 100%	40,49±0,53 86,9%	47,26±0,68 102,1%	54,12±0,67 117,3%
Сухой вес цитоплазмы (пг)			
74,10±1,34 100%	52,10±1,54 70,2%	46,38±1,09 62,1%	44,24±1,01 59,4%
Концентрация белка в цитоплазме (пг/мкм³)			
1,26±0,02 100%	1,14±0,01 90,4%	1,15±0,02 91,2%	1,150±0,008 91,2%

отмечается полная морфологическая сохранность отдельных компонентов нейрона (тигроидное вещество, хроматиновые структуры ядра).

Из ранее полученных данных видно, что внутрибрюшинное введение пенициллина кошкам через 60 мин приводит к реципрокным изменениям ферментной активности МАО: снижению МАО А и нарастанию МАО Б [13]. У крыс эти изменения не обнаружены, ферментная активность сохраняется на обычном уровне, что свидетельствует о большей устойчивости этих животных к экспериментальному воздействию.

Действие тафтсина на так называемую пенициллиновую эпилепсию показало, что эффект пептида имеет место и проявляется в большей мере при его введении до начала появления эпилептиформной активности у животных. Введение тафтсина до развития эпилептиформной активности оказывает превентивный эффект, что особенно проявляется в субклеточных структурах коры больших полушарий. Первичным в эффекте тафтсина, по некоторым литературным, а также нашим данным, является активация ДА-ергической системы.

Сравнивая цитохимические показатели, также можно сделать вывод о том, что выявленные изменения после введения тафтсина как бы стабилизируются или имеют тенденцию к усилению.

На системном уровне превентивный эффект сочетается с удлинением латентного периода проявления эпилептиформной активности, отсутствием губительных эпилептических припадков, а также с тем, что фокальные разряды не переходят в генерализованные.

На основании проведенного нами комплексного исследования не представляется возможным использовать тетрапептид тафтсин в качестве седативного препарата при эпилепсии. Однако для окончательного решения этого вопроса целесообразно исследовать более длительное воздействие тафтсина в условиях данной экспериментальной патологии.

NEUROCHEMICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN INDUCED BY TETRAPEPTIDE TUFTSIN IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL EPILEPSY

GERSHTEIN L. M., DOVEDOVA E. L., POPOVA N. C., VESKOV R., STOILCOVICH M., PETOVICH S., STUKALOV P.

Brain Research Institute of the USSR Academy of Medical Science, Moskow
Clinical center, SAS, Belgrad

The aim of the work was to study the peculiarities of brain structure interactions in conditions of experimental epilepsy on systemic, cellular and subcellular level and to evaluate the possibility to correct its manifestions by means of tetrapeptide tuftsin. For this purpose a comparative analysis of animals behaviour, bioelectric activity of brain structures and some biochemical parameters in the same brain structures before and after tuftsin injection to epileptic and healthy animals was performed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреев С. О., Анохин К. В., Антонова Л. В.* и др. Докл. АН СССР, т. 253, № 2, с. 498—500, 1980.
2. *Вальдман А. В., Бондаренко Н. А., Козловская М. М., Минеева М. Ф., Анохин К. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, № 4, с. 49—52, 1982.
3. *Вальдман А. В., Козловская М. М.*—В кн.: Физиологически активные пептиды, Пущино, с. 51—68, 1988.
4. *Сарычева Н. Ю., Калихевич В. Н., Каменский А. А., Власова Т. И.* Биол. науки, № 3, с. 70—75, 1989.
5. *Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, № 7, с. 31—33, 1981.
6. *Robertis de E., Pellegrino de Iiardi A., Rodriges de Lopes Arnais R., Salganicoff L., J.* J. Neurochem, v. 9, p. 23—25, 1962.
7. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—269, 1951.
8. *Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченкова Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.* — В кн.: Современные методы в биохимии, т. 2, с. 155—161, М., 1968.
9. *Popov V., Roster V., Thiemann C., Mattics H.* Acta biol. med. Germ., Bd 26, S. 139—245, 1971.
10. *Бродский В. Я.* — В кн.: Трофика клетки, М., 1966.
11. *Викторов И. В.* — В кн.: Современные методы морфологических исследований, с. 7—10, М., 1969.
12. *Адрианов О. С., Доведова Е. Л., Весков Р., Ракич Л., Врбанова Л., Панушева Н.* Материалы трудов I съезда психиатров соц. стран, с. 162—168, М., 1987.
13. *Попова Н. С., Адрианов О. С., Весков Р., Янкович И.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 108, № 8, с. 175—180, 1989.
14. *Казакова Н. Б., Незлина Н. Н.* Нейрофизиология, т. 4, № 1, с. 41—46, 1972.
15. *Пигарева З. Д., Буснюк М. М., Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Узбеков М. Г.*—В кн.: Развивающийся мозг и среда, с. 142—192, М., Наука, 1980.
16. *Доведова Е. Л.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 102, № 8, с. 155—157, 1986.
17. *Доведова Е. Л., Качалова Л. М., Орлова Е. И.* Невропатология и психиатрия, т. 86, № 7, с. 1025—1028, 1986.

Поступила 25. X. 1990