

9. Dose K. Die anwendung der hochspannungsspherographie bei der quantitativen totalanalyse von proteinhydrolysaten. II. Mitteilung // Biochem. Z.— 1957.— 329, N 2.— S. 416—419.
10. Roberts E., Frankel S. Gamma-aminobutyric acid in brain, its formation from glutamic acid // J. Biol. Chem.— 1950.— 187.— P. 55—61.
11. Sytinsky I. A., Priyatkina T. N. Effect of certain drugs on gamma-aminobutyric acid system of central nervous system // Biochem. Pharmacol.— 1966.— 15, N 1.— P. 49—54.

Ин-т физиологии им. А. И. Караева
АН Азерб. ССР, Баку

Материал поступил в редакцию 10.08.90

УДК 616.831.31—009.24:616—003.282

А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. М. Мазарати, Нгуен Тхи Тхань

Влияние цереброспинальной жидкости крыс, подвергнутых пикротоксиновому киндлингу, на двигательную активность и судорожную готовность животных-реципиентов

Показано, что при максимальных электрошоковых генерализованных судорожных приступах в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) животных происходит накопление эндогенных факторов пептидной природы, действующих подобно опиатам и обладающих антиэпилептическими свойствами [2, 10, 15, 16]. Накопление эндогенных антиэпилептических веществ может индуцироваться не только развитием судорог, но и непосредственной стимуляцией структур антиэпилептической системы, в частности, мозжечка [2, 10]. Цель нашей работы состояла в том, чтобы изучить, обладает ли указанными свойствами ЦСЖ животных, у которых состояние хронической эпилептизации формировали методом фармакологического киндлинга, т. е. с помощью повторных введений эпилептогена в первоначально субконвульсивной дозе [3—5, 11]. Поскольку эндогенные опиоиды [12], а также близкие к ним по биологическому действию вещества обладают способностью снижать спонтанную двигательную активность, изучали также двигательную активность у животных при осуществлении фармакологического киндлинга и влияние ЦСЖ этих животных на подвижность крыс-реципиентов.

Методика

Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 270—300 г. Каждая группа включала не менее 10 животных. Состояние киндлинга вызывали с помощью ежедневных однократных внутрибрюшинных введений пикротоксина (фирма «Serva», ФРГ) в первоначально субконвульсивной дозе (1,2 мг/кг, растворенного в 0,3—0,5 мл 0,9 %-ного раствора NaCl) [5]. Интенсивность судорог оценивали по принятой шкале [4]. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили столько же по объему 0,9 %-ного раствора NaCl. В отдельной серии экспериментов судороги вызывали однократным внутрибрюшинным введением пикротоксина в судорожной дозе (5 мг/кг, растворенного в 0,3—0,5 мл 0,9 %-ного раствора NaCl). Забор ЦСЖ производили под эфирным рауш-наркозом субокципитальной пункцией через 24 ч после последнего (20-го) введения пикротоксина (или физиологического раствора) и острых однократных пикротоксин-индуцированных судорог. К 2/3 объема взятой ЦСЖ добавляли гордскс (фирма «Gedeon Richter», Венгрия, 100 Ед/мл) и контрикал (фирма «Arzneimittelwerk», ГДР, 1 мг/мл). Животным-реципиентам предварительно, за 7—10 сут до ис-

© А. А. ШАНДРА, Л. С. ГОДЛЕВСКИЙ, А. М. МАЗАРАТИ,
НГУЕН ТХИ ТХАНЬ, 1991

следования поведенческих реакций, под гексанолевым наркозом (100 мг/кг) по координатам стереотаксического атласа [13] в правые боковые желудочки мозга имплантировали проводящие канюли (AP=-1,0; I=1,5; H=3,5). ЦСЖ (10 мкл) вводили с помощью микроинъектора в течение 3 мин. Введение пикротоксина (5 мг/кг) производили внутрибрюшинно через 15—20 мин после микроинъекции ЦСЖ. Налоксон (фирма «DuPont», США, 1,0 мг/кг) вводили внутрибрюшинно за 30 мин до микроинъекции ЦСЖ. Двигательную активность изучали методом «открытого поля», определяя число пересеченных квадратов и вертикальных стоек в течение 2 мин [1], а также методом прямой актометрии с помощью подсчета колебаний сейсмодатчика, сигналы которого после предварительного усиления подавали на счетчик Ф5264. Счет вели в течение 2 мин. У «киндлинговых» животных и крыс контрольной группы двигательную активность исследовали через 24 ч после каждого 4-го введения (перед очередной инъекцией), а у животных с однократно индуцированными судорогами — за 24 ч до введения пикротоксина и через 24 ч после инъекции этого препарата. У крыс-реципиентов двигательную активность исследовали через 10—15 мин после микроинъекции ЦСЖ. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента [6].

Результаты и их обсуждение

Повторные введения пикротоксина приводили к возникновению и постепенному нарастанию выраженности судорог: от отдельных миоклонических вздрагиваний до генерализованных клонико-тонических припадков с падением животных на бок и развитием постсудорожной депрессии. По окончании курса формирования киндлинга генерализованные судороги наблюдались у 16 животных из 20.

Исходные значения показателей двигательной активности у крыс опытной и контрольной групп существенно не различались (табл. 1). Достоверное снижение значений показателей прямой актометрии по сравнению с исходным отмечалось, начиная с 8-го введения пикротоксина. Последующие введения конвульсанта приводили к дальнейшему снижению значения этого показателя. Снижение числа пересеченных квадратов и вертикальных стоек «открытого поля» наблюдалось после 16-го введения пикротоксина (см. табл. 1).

После однократного внутрибрюшинного введения пикротоксина (5 мг/кг) у всех 10 крыс развивались острые клонико-тонические судороги, средняя интенсивность которых составляла $(4,0 \pm 0)$ балла. Значения показателей двигательной активности до введения пикротоксина и через 24 ч после его инъекции были соответственно следующими: показателя прямой актометрии — 300 ± 30 и 225 ± 45 , числа пересеченных квадратов — $21 \pm 3,5$ и $16,0 \pm 2,5$, вертикальных стоек — $3,4 \pm 0,2$ и $3,0 \pm 0,5$ (за 2 мин регистрации). Средние значения этих показателей до и после применения эпилептогена достоверно не различались ($P < 0,05$).

В следующей серии экспериментов изучали влияние ЦСЖ животных в состоянии пикротоксинового киндлинга или перенесших острые пикротоксиновые судороги на двигательную активность и судорожные реакции, вызванные у крыс-реципиентов введением того же конвульсанта (5 мг/кг). Средняя интенсивность судорожных проявлений у животных, которым вводили ЦСЖ «киндлинговых» крыс, была достоверно ниже, чем в группе животных-реципиентов с ЦСЖ крыс контрольной группы. Предварительное введение налоксона (1 мг/кг) блокировало антиэпилептический эффект ЦСЖ «киндлинговых» крыс по отношению к судорожным реакциям, вызванным введением пикротоксина. В то же время, если для внутрижелудочкового введения животным-реципиентам использовали ЦСЖ «киндлинговых» крыс, не обработанную ингибиторами протеаз, то изменений выраженности пикротоксининдуцированных судорог не наблюдали (табл. 2).

Таблица 1. Изменения судорожных реакций и двигательной активности у крыс при повторном введении 1,2 мг/кг пикротоксина ($M \pm m$)

После введения пикротоксина

До начала киндлинга

Показатель

Таблица 1. Изменения судорожных реакций и двигательной активности у крыс при повторном введении 1,2 мг/кг пикротоксина ($M \pm m$)

Показатель	До начала киндлинга	После введения пикротоксина				
		4-е сутки	8-е сутки	12-е сутки	16-е сутки	20-е сутки
Интенсивность судорог, баллы контроль опыт	—	0 0,5±0,5	0 2,2±0,4	0 2,5±0,6	0 3,0±0,5	0 3,5±0,5
Число пересеченных квадратов открытого поля (за 2 мин) контроль опыт	23,1±3,0 19,6±3,0	27,8±8,5 21,3±2,0	22,3±1,35 18,5±2,6	24,0±3,4 14,3±2,2	23,0±2,2 10,1±2,3*	17,4±1,2 9,1±2,4*
Число вертикальных стоек открытого поля (за 2 мин) контроль опыт	3,7±0,3 3,2±0,5	4,2±0,2 3,5±0,6	4,3±0,6 3,0±1,2	4,2±0,5 1,7±0,8	4,3±0,5 0,9±0,5**	3,9±0,4 0,8±0,3**
Прямая актометрия (за 2 мин) контроль опыт	261±45 344±20	268±62 351±42	248±35 206±64*	284±56 137±10***	249±34 103±16,4***	255±33 89±17***

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с исходными значениями двигательной активности.

Таблица 2. Влияние цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) крыс со сформированным пикротоксиновым киндлингом и крыс, перенесших острые пикротоксиновые судороги, на судорожную готовность и двигательную активность реципиентов ($M \pm m$)

Показатель	Эффект внутримышечной инъекции ЦСЖ после				
	киндлинга	киндлинга и введения реципиентам налоксона	киндлинга (ЦСЖ не обработана ингибиторами протеаз)	острых пикротоксических судорог	повторных введений 0,9 %-ного раствора NaCl
Интенсивность судорог, баллы					
Число пересеченных квадратов (за 2 мин) до введения ЦСЖ	2,0±0,4	3,8±0,5	3,6±0,5*	3,7±0,2*	3,5±0,5*
после введения ЦСЖ	19,6±2,3	21,8±2,6	18,7±3,1	22,0±2,0	19,1±1,5
Число вертикальных стоек (за 2 мин) до введения ЦСЖ	9,4±3,7*	25,4±4,0	16,3±2,2	20,4±1,8	19,4±1,9
после введения ЦСЖ	3,0±0,4	2,9±0,3	3,6±0,5	3,4±0,3	2,0±0,5
Прямая актометрия (за 2 мин) до введения ЦСЖ	0,5±0,3**	3,4±0,6	3,1±0,4	3,1±0,5	2,0±0,4
после введения ЦСЖ	391±108	269±64	287±20	325±32	360±35
после введения ЦСЖ	66±30***	304±43	274±32	301±46	327±37

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — достоверные различия для интенсивности судорог по сравнению со значениями для «киндлинга», для показателей двигательной активности — по сравнению с исходными значениями.

Исходные значения показателей двигательной активности у реципиентов разных групп достоверно не различались (см. табл. 2). Внутривентрикулярное введение реципиентам ЦСЖ крыс, подвергнутых киндлингу, приводило к гипокинезии, что выражалось существенным снижением числа пересеченных квадратов и вертикальных стоек в «открытом поле», а также уменьшением значения показателя прямой актометрии. Снижения двигательной активности не отмечалось у реципиентов, которым вводили налоксон, а также при введении ЦСЖ «киндлинговых» животных, не обработанной гордоксом и контрикалом — ингибиторами протеаз. Внутривентрикулярное введение реципиентам ЦСЖ крыс контрольной группы, а также ЦСЖ, взятой у животных после однократных пикротоксининдуцированных судорог, не приводило к изменениям изученных показателей двигательной активности (см. табл. 2).

Итак, на основании анализа полученных в настоящей работе результатов следует заключить, что при формировании пикротоксинового киндлинга у животных отмечалось постепенное снижение спонтанной двигательной активности в межприступный период. По-видимому, это явление не связано с возникновением генерализованных судорог как таковых, поскольку оно не наблюдалось у животных после вызванных пикротоксином однократных судорожных реакций. Такие результаты согласуются с данными других авторов [7—9, 14], которые показали снижение двигательной активности в межприступный период при электростимуляционном киндлинге миндалины, гиппокампа, прилежащего ядра.

Гипокинезия, развивающаяся при введении реципиентам ЦСЖ «киндлинговых» животных, указывает на то, что снижение двигательной активности при киндлинге может быть обусловлено накоплением в ЦСЖ эндогенных соединений пептидной природы, близких по своему действию к опиатам. В пользу такого предположения свидетельствует блокирование снижения двигательной активности, вызванного ЦСЖ «киндлинговых» крыс, под действием антагониста опиатов — налоксона. Весьма показательным, что изменений, обусловленных введением ЦСЖ «киндлинговых» животных, не наблюдалось, если ЦСЖ не была обработана ингибиторами протеаз. Объяснение этого явления состоит в том, что в данной ситуации развивается инактивация эндогенных пептидных факторов. Накопление эндогенных опиоидных пептидных соединений в ЦСЖ, очевидно, является специфичным только для киндлинга, поскольку при введении крысам-реципиентам ЦСЖ интактных животных, так же, как и ЦСЖ крыс, перенесших однократные пикротоксининдуцированные судороги, не наблюдалось ни снижения двигательной активности, ни изменения выраженности пикротоксиновых судорог.

Снижение двигательной активности у животных после введения им ЦСЖ «киндлинговых» крыс сочеталось, как указывалось выше, с уменьшением выраженности судорожных реакций, вызванных применением пикротоксина. Эти результаты согласуются с установленными ранее противосудорожными свойствами ЦСЖ после выраженных электрошоковых судорог, а также после электростимуляции мозжечка [2, 10, 15, 16], и свидетельствуют, что активация опиатергических механизмов мозга при киндлинге является одним из звеньев в сложной цепи, обеспечивающей работу антиэпилептической системы мозга.

A. A. Shandra, L. S. Godlevsky, A. M. Mazarati, Nguen Tkhi Tkhan

THE INFLUENCE OF CEREBRO-SPINAL FLUID OF PICROTOXIN-KINDLED RATS ON LOCOMOTOR ACTIVITY AND SEIZURE SUSCEPTIBILITY OF RATS-RECIPIENTS

Experiments on rats have shown that repeated administration of primarily subthreshold dose of picrotoxin leads to the occurrence and progressive enhancement of seizure manifestations. During picrotoxin kindling the decrease of locomotor activity in interictal pe-

riods was recorded. Microinjection of cerebro-spinal fluid (CSF) of kindled rats into lateral brain ventriculi of recipients resulted in decrease of locomotor activity and acute primarily generalized picrotoxin induced seizures. These effects of CSF were blocked by naloxone administration and were observed only if injecting CSF which was preliminarily treated with protease inhibitors. It is concluded that endogenous opioid substances accumulate in CNS during kindling and evoke a decrease in the locomotor activity. These substances act as anticonvulsant factors which control the development of epileptic activity.

N. I. Pirogov Medical Institute, Ministry of Public Health
of the Ukrainian SSR, Odessa

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Ж. Г., Суворов Н. Б., Шалин Ю. Н., Цыган В. Н. Индивидуальные особенности поведения, обучения и адаптации крыс к экстремальным воздействиям // Физиол. журн. СССР.— 1984, 70, № 9.— С. 1294—1300.
2. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С. Противосудорожные свойства ликвора при активации антиэпилептической системы мозга // Бюл. эксперим. биологии.— 1988, 106, № 8.— С. 146—148.
3. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Макулькин Р. Ф. Киндлинг как модель формирования эпилептической активности // Успехи физиол. наук.— 1988, 17, № 4.— С. 10—32.
4. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Макулькин Р. Ф., Годлевский Л. С. Гиппокамп как детерминантная структура, генерирующая эпилептическую активность при коразоловом киндлинге // Бюл. эксперим. биологии.— 1985, 99, № 5.— С. 527—532.
5. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С. и др. Формирование двигательных и эмоциональных расстройств у крыс при ежедневном введении пикротоксина в подпороговую дозу // Там же.— 1989, 108, № 7.— С. 17—21.
6. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях.— М.: Медицина, 1968.— 419 с.
7. Caldecott-Hazard S., Ackerman S., Engel J. Opioid involvement in postictal and interictal changes in behavior // Neurotransmitters, seizures and epilepsy.— New York: Raven press, 1984.— P. 305—314.
8. Caldecott-Hazard S., Engel J. Limbic postictal events: anatomical substrate and opioid receptors involvement // Progr. Neuropsychopharmacol. and biol. psychiatr.— 1987, 11, N 4.— P. 389—418.
9. Ehlers C. L., Koob J. F. Locomotor behavior following kindling in three different brain sites // Brain. res.— 1985, 326, N 1.— P. 71—81.
10. Kryzhanovsky G. N., Shandra A. A., Godlevsky L. S., Karganov M. Y. Antiepileptic properties of the CSF after activating of antiepileptic system of the brain // Epilepsia.— 1989.— 30, N 5.— P. 631—635.
11. McNamara J. O. Kindling model of epilepsy // Adv. in neurol. Vol. 44. Basic mechanisms of the epilepsies: molecular and cellular approach.— New York: Raven press, 1986.— P. 303—309.
12. Olson I., Olson J., Kastin G. Endogenous opiates, 1986: a review // Peptides.— 1987, 18, N 6.— P. 1135—1164.
13. Paxinos C., Watson D. The rat brain in stereotaxic coordinates.— Sydney: Acad. press, 1982.— 255 p.
14. Post R. M., Squillace K. M., Pert A., Sass W. The effect of amygdala kindling on spontaneous and cocaine induced motor activity and lidocaine seizures // Psychopharmacology.— 1981, 72, N 1.— P. 189—196.
15. Tortella F., Long J., Holaday J. Endogenous opioid systems: physiological role in self-limitation of seizures // Brain Res.— 1985, 332, N 1.— P. 174—178.
16. Tortella F., Long J. Characterization of opioid peptide like anticonvulsant activity in rat cerebrospinal fluid // Ibid.— 1988, 456, N 1.— P. 139—146.

Одес. мед. ин-т им. Н. И. Пирогова
М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил
в редакцию 18.03.90