



І.В. Смірнов

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ВОГНИЩЕВОГО ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗУ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ (ЛПС) ТА РОЛЬ ОПІАТЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ МОЗКУ В ВИНИКНЕННІ ПРОТИЕПІЛЕПТИЧНОГО ВПЛИВУ ЛПС

Одеський державний медичний університет

Ключові слова: бактеріальний ліпополісахарид, каїнова кислота, пеніцилін, стрихнін, налоксон, епілептичний синдром

В гострих дослідах на щурах лінії Вістар встановлено, що бактеріальний ліпополісахарид (ЛПС) (1,0 мг/кг, в/очер) викликає ефект полегшення виникнення та розвитку каїнат- і пеніцилін-індукованих вогнищ епілептогенезу в структурах вентрального гіпокампу, що спостерігається через 4,0 г з моменту його застосування. Через 12 г з моменту введення ЛПС реєструються ефекти гальмування каїнат-, пеніцилін- і стрихнін-індукованих вогнищ. Гальмівний протиепілептичний ефект блокується застосуванням налоксону в дозі 10,0 мг/кг, що свідчить про участь капа-опіатних рецепторів в його розвитку.

Встановлено функціональний взаємозв'язок між чинниками імунологічної реактивності організму та функціональним станом нервової системи [2]. Так, в дослідженнях [6,9] показано, що прозапальні цитокіни здатні підвищувати збудливість мозку за умов відтворення хронічного епілептогенезу- моделі кіндлінгу. Також раніше було показана залежність характеру впливу ЛПС на генералізовану пеніцилін-викликану епілептичну активність з моменту застосування ЛПС [3,5]. До сьогоднішнього дня, однак, не з'ясовано механізмів впливу ЛПС на епілептогенне збудження головного мозку.

Мета – дослідження особливостей перебігу вогнищового епілептогенезу, який було індуковано епілептогенами з різним нейрохімічним механізмом дії, а також особливостей виникнення протиепілептичного впливу ЛПС (12-14 г з моменту його застосування) на тлі блокування опіатних рецепторів налоксоном.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проведені за умов гострого досліду на щурах-самцях лінії Вістар масою 180-250 г. Під кетаміновим наркозом (100,0 мг/кг, в/очер) тваринам імплантували канюлі в вентральні відділи гіпокампу лівої півкулі головного мозку відповідно до координат атласу [8]: AP=-4,8; L= 5,0; H=7,8. Канюлі кріпили до поверхні черепу за допомогою пластмаси "Норакріл". Щурів використовували в спостереженні через 7-10 діб з моменту операції.

Вогнища епілептичної активності викликали за допомогою внутрішньогіпокампальної ін'єкції розчину епілептогену, що проводили за умов вільної поведінки тварин. Зокрема, для подібної ін'єкції застосовували мікроінєктор "Hamilton" (США) за допомогою якого вводили епілептоген в об'ємі 1,0 мкл на протязі 1 хв. В якості групи контролю слугували інтактні щури, яким здійснювали аналогічні введення епілептогенів. Використовували наступні розчини конвульсантів, які готували *ex tempore*: розчин натрієвої солі бензилпеніциліну (10.000 МО/мл), каїнової кислоти ("Sigma",

США) (2,0 мг/мл) та азотнокислого стрихніну (30,0 мг/мл).

Електричну активність реєстрували за допомогою хлор-срібних електродів (вентральний гіпокамп та лобні відділи кори мозку білатерально) монополярно, для чого індиферентний електрод укріплювали в носових кістках черепа.

Електричну активність реєстрували за допомогою комп'ютерної системи "DX-5000" (Харків). При цьому частота опитування каналів складала 256 імг/с, дані візуалізувалися на екрані й записувалися на жорсткий диск для наступної off-line обробки. Частотний діапазон сигналів склав 0,5-40 Hz.

ЛПС "Пірогенал (НДІ ім.М.Ф.Гамалеї РАМН, Росія) застосовували в дозі 1,0 мг/кг, в/очер [3]. Тваринам групи контролю за аналогічних умов вводили фізіологічний розчин NaCl.

Потужність вогнищової епілептичної активності виражали в умовних одиницях, яку розраховували шляхом множення середньої частоти генерування спайкових розрядів (коливання за 1 с) на їх середню амплітуду (в мВ) протягом 1 хв [1]. Тривалість існування вогнищ визначали від моменту появи першого і до останнього спайкового потенціалу. При цьому до уваги приймали тільки тварин, у яких не визначалось розвитку іктальних розрядів.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням критеріїв ANOVA+Newman-Keuls за допомогою комп'ютерної програми "Biostatistics" (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження електричної активності в зоні застосування епілептогену довело, що в задіяних дозах викликалися спайкові інтеріктальні потенціали амплітудою від 0,5 до 2,5 мВ та частотою генерування від 10-15 до 40-50 в хв (табл.1). Максимальна за частотою та амплітудою активність спостерігалась у вогнищах, утворених за допомогою каїнової кислоти в період з 20-ї по 45-у хв з моменту застосування епілептогену (табл.1).



Показники епілептогенного збудження,
викликаного введенням епілептогену в утворення вентрального гіпокампу (M±m)

	Параметри епілептогенезу		
	Латентний період появи розрядів (секунди)	Максимальна потужність епілептогенезу (у.о.)	Тривалість існування вогнищ (хв)
Натрієва сіль бензилпеніциліну (10.000 МО/мл) (n= 7)	142,5 ± 11,2	65,2 ± 7,4	157,6 ± 18,9
Каїнова кислота (2,0 мг/мл) (n= 9)	62,1 ± 9,0	84,7 ± 13,2	240,8 ± 27,3
Азотнокислий стрихнін (30,0 мг/мл) (n= 10)	75,7 ± 8,6	53,0 ± 5,4	110,6 ± 10,5

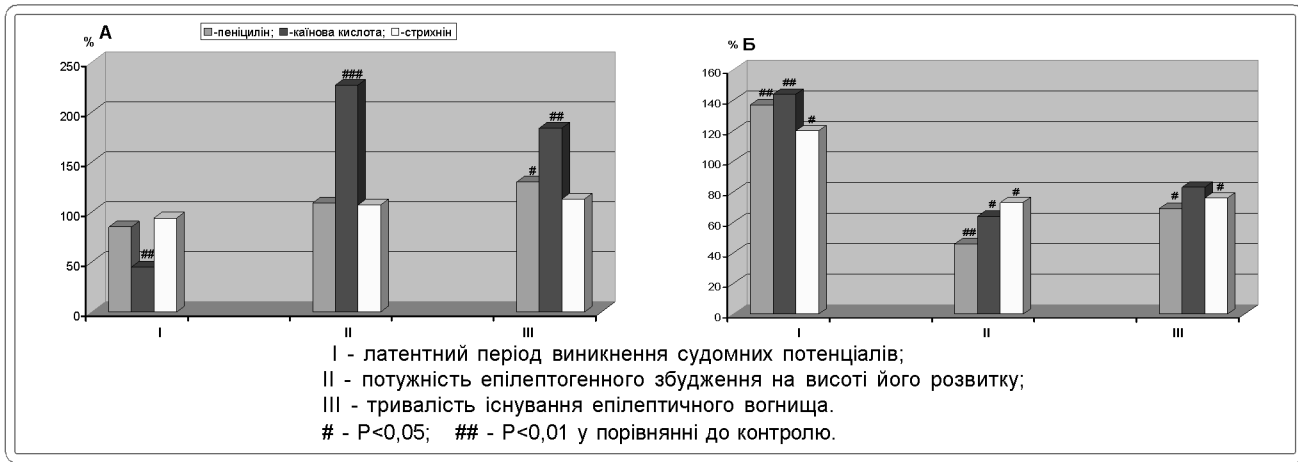


Рис. 1 Вплив ЛПС на чутливість вентрального гіпокампу щурів до впливу різних за своєю дією епілептогенів

A - 4 години та Б - 12 годин від моменту застосування ЛПС (1,0 мг/кг, в/очер)

Через 4 г з моменту застосування ЛПС латентний період виникнення пеніцилін-індукованих судом зменшувався у порівнянні до контролю (внутрішньогіпокампальне застосування розчину натрієвої солі бензилпенициліну та в/очер введення фізіологічного розчину NaCl) на 14,7% ($P>0,05$) (рис. 1, А). За цих умов також мало місце незначне (на 9,4%, $P>0,05$) підвищення максимальної потужності епілептичних вогнищ, а також збільшення тривалості їх існування - на 29,1% ($P<0,05$) (рис. 1, А). Латентний період виникнення вогнищ епілептогенезу, які було індуковано застосуванням розчину каїнової кислоти, зменшувався у порівнянні до відповідного контролю більше, ніж удвічі (на 54,6%, $P<0,01$), коли епілептоген застосовували через 4 г з моменту використання ЛПС. Причому, максимальна потужність генерування епілептогенного збудження збільшувалась в 2,3 рази у порівнянні до контролю ($P<0,001$) – у трьох з семи експериментальних щурів на висоті епілептогенного збудження реєструвались іктальні генералізовані клоніко-тонічні судоми. Також збільшувалась тривалість існування епілептогенних вогнищ – в 1,84 рази ($P<0,01$) (рис. 1, А). Формування епілептогенних вогнищ за допомогою внутрішньогіпокампаального застосування

розчину стрихніну на тлі попереднього застосування ЛПС не супроводжувалось змінами досліджуваних показників вогнешцевого епілептогенезу у порівнянні до контролю ($P>0,05$) (рис. 1, А).

Аналогічне відтворення епілептичних вогнищ за допомогою внутрішньогіпокампаального введення розчину пеніциліну, яке проводили через 12 г з моменту в/очер застосування ЛПС, супроводжувалось виникненням спайкових розрядів, латентний період яких перевищував відповідний показник в контролі на 36,5% ($P<0,01$) (рис. 1, Б). За цих умов зменшувався показник максимальної потужності вогнищевого пеніцилін-викликаного епілептогенезу – на 35,7% у порівнянні до контролю ($P<0,01$) (рис. 1, Б), а також скорочувалась (на 31,3%) тривалість існування епілептичних вогнищ ($P<0,05$) (рис. 1, Б). Латентний період виникнення каїнат-індукованих вогнищ також подовжувався на 44,2% у порівнянні до контролю ($P<0,01$) (рис. 1, Б). Потужність епілептогенного збудження на його максимумі склала 64,3% від такої в групі контролю ($P<0,05$), а тривалість існування була на 16,7% меншою від контрольних значень ($P>0,05$) (рис. 1, Б). Стрихнін – індуковані вогнища виникали з латентним періодом, який був на 20,3 більшим від та-

кого в групі контролю ($P < 0,05$), а максимальна потужність вогнищ та їх тривалість існування були відповідно меншими, ніж в групі контролю на 26,8% та 24,4% ($P < 0,05$) (рис.1,Б).

Завданням наступної частини експериментальних досліджень стало вивчення особливостей протіепілептичних ефектів ЛПС на моделі пеніцилін- викликаних вогнищ епілептогенезу за умови попереднього застосування блокатора опіатних рецепторів- налоксону.

Під впливом застосування налоксону в дозі 1,0 мг/кг (в/очер) латентний період виникнення вогнищевого епілептогенезу скорочувався на 6,6% у порівнянні до контролю ($P > 0,05$) (рис.2). За цих умов також незначно збільшувались показники максимальної потужності епілептогенного збудження та тривалості його існування (відповідно на 5,2% та 7,6%, $P > 0,05$) (рис.2). Під впливом налоксону, застосованого в дозі 10,0 мг/кг, в/очер спостерігалось зменшення латентного періоду виникнення пеніцилін індукованих вогнищ – на 27,3% у порівнянні до відповідного показника в групі контролю ($P < 0,05$), а також збільшення показника потужності епілептогенного збудження та тривалості існування вогнищ- на 19,3 та 22,4% вище від контролю ($P < 0,05$) (рис.2).

Застосування розчину пеніциліну на тлі попереднього введення ЛПС (12 г з моменту його введення) та налоксону (1,0 мг/кг в/очер) супроводжувалось виникненням перших спайкових розрядів, латентний період появи яких був на 27,6% більшим від відповідного показника в групі контролю ($P < 0,05$) (рис.2). За цих умов також показники максимальної потужності епілептогенезу та тривалості існування вогнищ були меншими від таких в групі контролю відповідно на 42,2% та 35,8% ($P < 0,05$) (рис.2). Відтворення фокального епілептогенезу за допомогою внутрішньогіпокампального введення розчину пеніциліну на тлі використання ЛПС та налоксону в

дозі 10,0 мг/кг, в/очер. супроводжувалось виникненням спайкових потенціалів, латентний період появи яких склав 81,4% від такого ж показника в групі контролю ($P < 0,05$) (рис.2). За цих умов також спостерігалось подовження періоду існування вогнищ епілептогенезу- на 14,2% у порівнянні до контролю ($P < 0,05$) (рис.2). Показник максимальної потужності епілептогенного збудження не відрізнявся від відповідного показника в групі контролю ($P > 0,05$)

Таким чином, наведені результати свідчать про те, що за умов застосування ЛПС і в залежності від часу з моменту його застосування у щурів можна спостерігати як полегшення, так і пригнічення судомної готовності утворень головного мозку по відношенню до локальної дії різних за механізмом дії епілептогенів. Так, в короткий термін (4 г з моменту застосування ЛПС) спостерігається підвищення чутливості структур вентрального гіпокампу до епілептогенного впливу агоністів збуджуючих амінокислот каїнової кислоти, що виявляється скороченням латентного періоду виникнення вогнищ епілептогенезу, збільшенням потужності епілептичної активності та підвищенням тривалості існування вогнищ. Слід також зазначити, що в цей період певною мірою збільшуються епілептогенні впливи пеніциліну, що виявлялось в збільшенні тривалості існування вогнищ епілептогенезу. Таким чином, можливим є залучення до ефектів полегшення епілептогенезу в ранньому періоді як системи збуджуючих амінокислот, так і ГАМКергічної системи, хоча і меншою мірою. Подібний результат, а саме значне підвищення функціонального стану системи збуджуючих амінокислот, але за відсутності порушення ГАМКергічного контролю, має місце за умов відтворення у тварин моделі хронічного епілептогенезу – кіндлінгу [4]. Слід також зазначити, що ЛПС у ранньому періоді сприяє полегшенню виникнення пеніцилін-індукованих генералізованих судом [3].

Разом з тим, у віддаленому в часі періоді дії ЛПС (12 г з моменту його застосування) реєструються ефекти пригнічення фокального епілептогенезу. Причому, в цей період йдеться про пригнічення всіх видів вогнищ епілептичної активності, які були викликані впливом пеніциліну, каїнової кислоти, та стрихніну. Зважаючи на подібний неспецифічний протіепілептичний вплив ЛПС, можливим було вважати залучення ендогенної опіатної системи мозку до його виникнення – активація каппа опіатних рецепторів супроводжується пригніченням різних за своїм нейропатохімічним генезом форм епілептичної активності [4]. Отримані результати засвідчили, що за умов застосування налоксону у значній дозі (10,0 мг/кг) усувається протіепілептична ефективність ЛПС, що є свідченням про можливість участі саме капа-опіатних рецепторів у виникненні

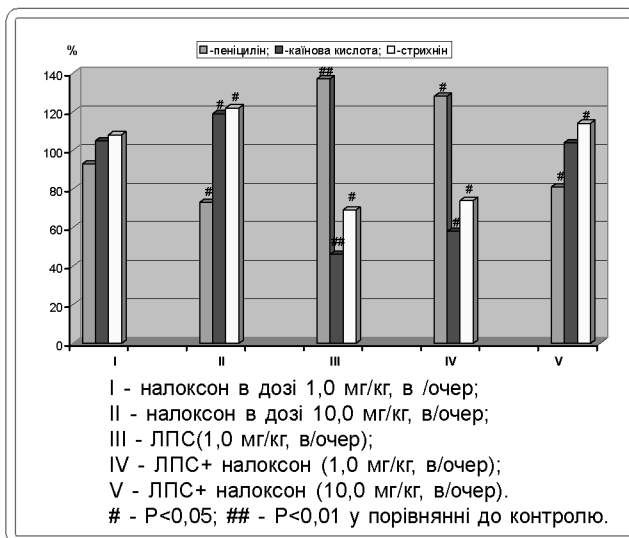


Рис. 2 Вплив налоксону на виразність протіепілептичних ефектів ЛПС



зниженої судомної готовності мозку тварин у цей період.

Виразність зазначених ефектів є найбільшою у відношенні до збуджуючих амінокислот, що, можливо, є основною ланкою впливу ЛПС. Впливи на пеніцилін та стрихнін-індуковану вогнищеву активність можуть бути вторинними, так як для дії каїнової кислоти є також характерним зменшення функціональної активності ГАМКергічної системи мозку та наявність стрихнін-чутливої ділянки рецепторів збуджуючих амінокислот [10].

ВИСНОВКИ

1. Отримані результати свідчать про провідне патогенетичне значення підвищеної активності системи збуджуючих амінокислот, а саме метаболічних рецепторів вентрального гіпокампу в патогенезі порушень, викликаних застосуванням ЛПС. Разом з тим, підвищення судомної готовності мозку в ранньому періоді його дії спостерігається недостатність ГАМКергічного контролю, що також може являти собою патогенетичний елемент впливу ЛПС.

2. У віддаленому в часі (12 г з моменту застосування ЛПС) періоді відбувається зниження судомної чутливості мозку до впливу епілептогенів, які викликають свою дію як за рахунок активації рецепторів збуджуючих амінокислот, так і завдяки порушенню ГАМКергічної протиепілептичної системи мозку.

3. Протиепілептичні впливи ЛПС на вогнищеві форми епілептичної активності, викликані в гіпокампі, є результатом активації каппа-опіатних рецепторів.

И.В.Смирнов

Особенности развития фокального эпилептогенеза в условиях применения бактериального липополисахарида (ЛПС) и роль опиатергической системы мозга в возникновении противозепилептического влияния ЛПС

В острых опытах на крысах линии Вистар установлено, что бактериальный липополисахарид (ЛПС) (1,0 мг/кг, в/бр) вызывает эффект облегчения возникновения и развития каинат- и пенициллин-индуцированных очагов эпилептогенеза в структурах вентрального гиппокампа, что наблюдается через 4,0 ч с момента его применения. Через 12 ч с момента введения ЛПС регистрируются эффекты подавления каинат-, пенициллин- и стрихнин-индуцированных очагов. Тормозный противозепилептический эффект устраняется применением налоксона в дозе 10,0 мг/кг, что свидетельствует об участии каппа-опиатных рецепторов в его развитии.

Ключевые слова: бактериальный липополисахарид, каиновая кислота, пенициллин, стрихнин, налоксон, эпилептический синдром

I. V. Smirnov

Peculiarities of the focal epileptogenesis under condition of bacterial lipopolysaccharide (LPS) administration and opiate brain system role in the precipitation of antiepileptic LPS action

In acute experiments on Wistar male rats it was established that bacterial lipopolysaccharide (LPS) (1,0 mg/kg, i.p.) caused the facilitation of the development of kainate and penicillin-induced epileptogenic foci induced in ventral hippocampus. That effect was observed in 4,0 h from the moment of LPS administration. In 12,0 h from the moment of LPS administration the effect of suppression of kainate-, penicillin-, and strychnine induced foci was observed. The inhibitory antiepileptic effect was abolished by naloxone in a dosage of 10,0 mg/kg, i.p., which is in favour of kappa-opioid receptors involvement.

Key words: bacterial lipopolysaccharide, kainic acid, penicillin, strychnine, naloxon, epileptic syndrome

Відомості про авторів:

Смирнов І.В., асистент кафедри біофізики, інформатики та медичної апаратури Одеського державного медичного університету.

Адреса для листування:

Смирнов Ігор Володимирович, 65082, м.Одеса, Валіховський пров. 2, Одеський державний медичний університет, кафедра біофізики, інформатики та медичної апаратури. Тел.: 48-7178916.

ЛІТЕРАТУРА

1. Годлевский Л.С., Коболев Е.В., Смирнов И.В. Стимуляция мозга: механизмы прекращения судорожной активности.- Одесса: Нептун-Технология, 2006.-184с.
2. Годлевський Л.С., Ненова О.М. Нейроімунологічні механізми контролю збудливості головного мозку // Досягнення біології та медицини.-2006.-№1.-С.75-92.
3. Смирнов І.В. Вплив бактеріального ліпополісахариду на генералізовані клоніко-тонічні та клонічні судоми у щурів // Досягнення біології та медицини.-2008.-№1.-С.26-30.
4. Шандра А.А., Годлевский Л.С., Брусенцов А.И. Киндлинг и эпилептическая активность.-Одесса: Астропринт, 1999.-272с.
5. Akarsu E.S., Ozdayi S., Algan E., Ulupinar F. The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: possible role of cyclooxygenase-2 induction // Epilepsy Res.-2006.-Vol.71, N2-3.-P.181-187.
6. Godlevsky L.S., Shandra A.A., Oleinik A.A., Vastyanov R.S., Kostyushov V.V., Timchishin O.L. TNF-a in cerebral cortex and cerebellum is affected by amygdalar kindling but not by stimulation of cerebellum // Polish J.of Pharmacology.-2002.-Vol.54.-P.655-660.
7. Mrangoz C., Bagrici F. Effects of L-arginine on penicillin-induced epileptiform activity in rats // Jpn.J.Pharmacol.-2001.-Vol.86, №3.-P.297-301.
8. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates / / Sydney: Academic Press Inc.-1998.
9. Shandra A.A., Godlevsky L.S., Vastyanov R.S., Oleynik A.A., Konovalenko V.L., Rapoport E.N., Korobka N.N. The role of TNF- in amygdala kindled rats // Neuroscience Research.-2002.-Vol.42.-P.147-153.
10. White H.S., Wolf H.H., Swinyard E.A., Skeen G.A., Sofia R.D. A neuro-pharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant // Epilepsia.-1992.-Vol.33, №3.-P.564-572.

Надійшла 26.02.2008р.