

В.А. Полясный

ИЗМЕНЕНИЯ NMDA- ИНДУЦИРОВАННЫХ СУДОРОГ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ

*Одесский национальный медицинский университет,**650082, Валиховский пер., д. 2, тел.: +380-48-717-89-16, e-mail: godlevsky@odmu.edu.ua, г. Одесса*

Резюме

Исследования проведены на крысах – самцах линии Вистар, у которых в условиях свободного поведения моделировали судорожный синдром путем в/жел применения раствора NMDA. В опытной группе на протяжении 4 нед. животных содержали на кетогенной диете (КД) (80% липидов, 3,3% углеводов и 16,7% белков). Проведенные исследования показали, что среднеэффективная доза ED₅₀ NMDA, вызывавшая клонические судороги у крыс, удерживаемых на КД, составила 0,69 мкг и превышала таковую у интактных животных в 2,3 раза. Определение ED₅₀ NMDA, которая вызывала тоническую экстензию передних конечностей в условиях четырехнедельного удерживания животных на КД, показало, что ее величина составила 11,36 мкг, что было больше, чем у интактных животных в 4,27 раза. Введение NMDA (5,0 мкг, в/жел) на фоне применения КД вызывала в электрокортикограмме у крыс спайковые разряды, в то время как у интактных животных отмечалась генерализованная судорожная активность. Таким образом, кетогенная диета предотвращает развитие NMDA – индуцированного судорожного синдрома, причем в большей степени эффект отмечается в отношении генерализованных судорожных реакций в сравнении с клоническими судорогами.

Ключевые слова: NMDA, судорожная активность, кетогенная диета.

V.A. Polyasny

CHANGES OF NMDA- INDUCED SEIZURES IN RATS MANTAINED ON KETOGENIC DIET

Odessa National Medical University, Odessa

Summary

Investigations was performed on male Wistar rats having been injected intracerebroventricularly with NMDA for seizures modeling under conditions of free animal behavior. Animals of experimental group had been kept on ketogenic diet (KD) (80% of lipids, 3,3% of carbohydrates and 16,7% of proteins) for four weeks before observation. The ED₅₀ of NMDA, causing clonic seizures in rats fed with KD was 0,69 mcg exceeded the analogous dosage determined in intact rats 2,3 times. The ED₅₀ of NMDA, which induced tonic extension of the limbs in KD treated rats was 11, 36 mcg, and exceeded analogous dosage determined in intact rats 4,27 times. NMDA (5,0 mcg, i.c.v.) induced spike discharges in electrocorticogram of rats kept on KD, while in intact rats generalized seizure activity was caused. Obtained data revealed that KD protects against NMDA- induced seizures and this effect was more pronounced with regard to genralized seizures when compared with the effect on clonic type of NMDA- induced seizures.

Key words: NMDA, seizure activity, ketogenic diet.

Одним из существенно важных механизмов патогенеза эпилептического синдрома является активирование системы возбуждающих аминокислот [1-3]. На модели киндлинга, вызываемого введением подпороговой дозы коразола, показано снижение среднеэффективных доз каиновой кислоты, оказывающей эпилептогенное действие путем активации метаботропных глутаматергических рецепторов [3]. Поэтому блокирование функциональной активности системы эндогенных возбуждающих аминокислот может представлять собой один из важных механизмов реализации противоэпилептической активности кетогенной диеты (КД).

КД состоит преимущественно из липидов (80-90%), с небольшим, но достаточным количеством белков и недостаточным для осуществления обычных метаболических нужд углеводов [4, 5]. В подобных условиях липиды метаболизируются в печени с образованием кетоновых тел – ацетоацетата, бета-гидроксibuтирата и ацетона, создавая альтернативу глюкозе в обеспечении энергией тканей. В отличие от жирных

кислот, кетоновые тела – гиброксibuтират, ацетоацетат, проникают через гемато-энцефалический барьер [7]. Центральные эффекты кетоновых тел могут быть связаны с активированием пуринергических, ГАМКергических механизмов мозга, а также снижением эффектов глутаматергической и аспартатергической возбуждающей медиации [5, 8]. Представляет интерес исследование состояния N-метил-D-аспартат (NMDA) – зависимых механизмов контроля возбудимости мозга в условиях КД [4, 8].

Целью данного исследования было определение особенностей развития NMDA - индуцированного судорожного синдрома у животных, которых содержали на кетогенной диете.

Материалы и методы

Исследования проведены в условиях острого эксперимента на крысах-самцах линии Вистар массой 180- 270 г. Наблюдения осуществлены в соответствии с требованиями GLP и Комиссии по биоэтике Одесско-

го национального медицинского университета (протокол № 84 от 10 октября 2008 г.). В исследовании наблюдали 36 крыс линии Вистар.

С целью введения NMDA в левый боковой желудочек имплантировали канюли в соответствии с координатами стереотаксического атласа ($AP = 0,8$; $L = 1,5$; $H = 3,5$) [6]. Канюли фиксировали к поверхности черепа с помощью быстротвердеющей пластмассы типа «норакрил», и животных использовали в экспериментальных наблюдениях через 14 дн. с момента оперативного вмешательства. NMDA растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили в объеме 10 мкл в течение 10-15 с с помощью микроинъектора «Hamilton» («SGE», Австралия). После микроинъекции животных помещали в пластмассовую камеру, в которой их наблюдали на протяжении 30 мин.

В отдельной группе животных осуществляли имплантацию регистрирующих электродов. Для этого крысам под нембуталовым наркозом (40,0 мг/кг) вживляли электроды во фронтальные ($AP=1,8$; $L=2,0$) [6] отделы неокортекса обоих полушарий, индифферентный электрод крепили в носовых костях с помощью пластмассы «норакрил». Через 7 дн. с момента наблюдения крыс использовали в эксперименте. Электрическую активность структур мозга регистрировали монополярно с помощью компьютерной системы DX-5000 (Харьков, Украина). При этом частота опроса каналов составила 256 имп/с, данные визуализировали на экране и записывали на жесткий диск для последующей off-line обработки.

На КД, которая включала 80% липидов, а также 3,3% углеводов и 16,7 % белков [4], крыс удерживали в течение 4 нед. Животные группы контроля в течение такого же периода времени находились в обычных условиях содержания и кормления.

Расчет эффективных доз NMDA (ED_{16} , ED_{50} , ED_{84} , ED_{100}), вызывающих клонические судороги и характерную тоническую экстензию передних конечностей [9] у 16; 50; 84 и 100 % животных, соответственно, осуществляли по методу пробит-анализа. При этом для расчета доз, индуцирующих клонические судороги, вводили следующие дозы NMDA: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мкг, а для тонической экстензии передних конечностей – 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,5; 10,0 мкг. Кроме расчета указанных доз вычисляли стандартную ошибку дозы ED_{50} . Сравнение исследуемых показателей (среднеэффективных доз) между группами животных с применением КД и группой контроля проводили с применением метода one-way ANOVA и критерия Newman-Keuls.

Результаты и обсуждение

Исследование эффектов NMDA у крыс группы контроля показало, что через 5-15 с с момента инъекции относительно невысокой дозы NMDA (0,5 мкг на крысу) у животных развивались кратковременные замирания, сопровождающиеся увеличением амплитуды и частоты дыхательных движений, развитием экзофтальма и повышением тонуса хвоста. Клонические судороги мышц конечностей, подпрыгивания и быстрый бег возникали на протяжении последующих 10-30 с у 90% экспериментальных животных. Расчет-

ная величина ED_{50} NMDA, которая вызывала клонические судороги, составила 0,30 мкг (рис. 1). Изучение эффектов NMDA у животных, которых удерживали на кетогенной диете, показало, что в условиях его применения введение относительно невысокой дозы NMDA (0,5 мкг) приводит к возникновению быстрого бега, экзофтальма, повышенного тонуса хвоста через 7- 30 с с момента микроинъекции. В течение последующих 15- 40 с наблюдения клонические судороги и быстрый бег отмечались у 3 из 10 крыс. Расчетная величина ED_{50} NMDA, которая вызывала клонические судороги, составила 0,69 мкг, что было в 2,3 раза выше, чем у животных группы контроля ($p<0,05$) (рис. 1).

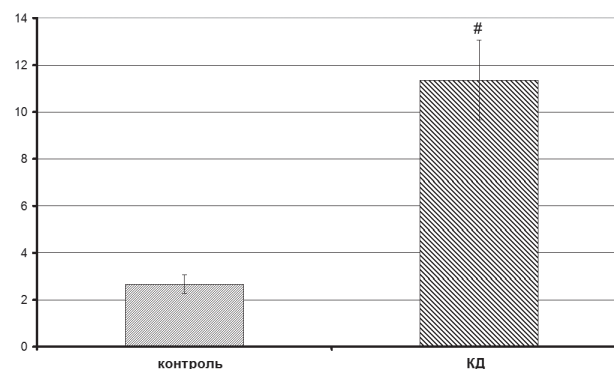


Рис. 1. Среднеэффективные дозы NMDA, вызывающие клонические судороги у крыс: по оси абсцисс – группы наблюдения; по оси ординат – доза NMDA (мкг).

Примечание. #- $p<0,05$ в сравнении с группой контроля (ANOVA + Newman – Keuls тест).

Применение относительно высокой дозы NMDA (5,0 мкг) у интактных крыс вызывало выраженные прыжки, стремительные пробежки в течение 5- 20 с с момента введения препарата. У животных также отмечались вокализация, экзофтальм, повышенный тонус хвоста, ротационные движения. На протяжении 1- 5 мин с момента введения NMDA у всех животных наблюдалась характерная экстензия передних конечностей с экстензией пальцев кисти длительностью от 1 до 5 с, после чего отмечались длительные флексии передних лап, экстензии и флексии задних конечностей, потеря равновесия. У крыс отмечались повторные судороги с тонической экстензией передних конечностей, не приводившие животных к гибели. ED_{50} NMDA, вызывавшая тоническую экстензию передних конечностей, составила 2,66 мкг (рис. 2). Относительно высокая доза NMDA (5,0 мкг) у крыс, удерживаемых на КД вызывала прыжки и быстрый бег у крыс через 15-50 с с момента введения, и на 5 и 8 мин отмечены тонические экстензии передних конечностей у 2 из 10 крыс. У животных отсутствовали повторные экстензии. ED_{50} NMDA, вызывавшая тоническую экстензию, составила 11,36 мкг, что было больше, чем у интактных крыс в 4,27 раза ($p<0,05$) (рис. 2).

Введение NMDA животным группы контроля (интактные крысы) сопровождалось через 5-11 мин с момента применения эпилептогена формированием генерализованной эпилептической активности (ЭПА) с охватом коры головного мозга животных обоих полушарий (рис. 3, А). При этом частота разрядов составляла от 5 до 12 в с, а их амплитуда – от 120 до 300 мкВ.

Подобная генерализованная ЭпА сопровождалась тонико-клоническими судорогами на протяжении 10-30 мин, после чего в течение последующих 20-40 мин отмечалось постепенное снижение частоты и амплитуды разрядов, генерализованные судорожные реакции замещались клоническими судорогами мышц туловища и конечностей.

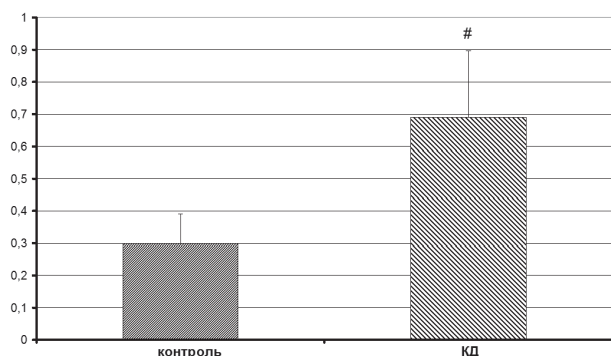


Рис. 2. Среднеэффективные дозы NMDA, вызывающие клонические судороги у крыс: по оси абсцисс – группы наблюдения; по оси ординат – доза NMDA (мкг).

Примечание. [#] – $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля (ANOVA + Newman – Keuls test).

В аналогичный период времени – через 5-15 мин с момента введения NMDA крысам, которых удерживали на КД, у животных отмечалось развитие спайковых потенциалов амплитудой 125-250 мкВ и частотой генерирования от 25 до 45 в мин (рис. 3, Б). Подобные разряды регистрировались на протяжении 15-30 мин, после чего на протяжении 20-50 мин происходило снижение частоты генерирования и их амплитуды.

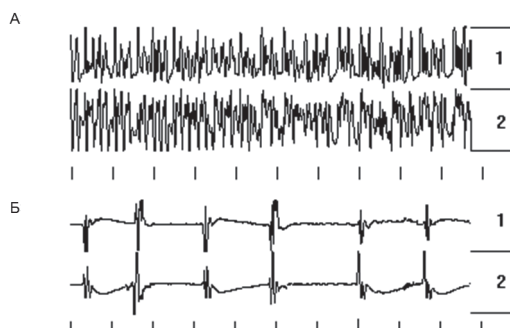


Рис. 3. ЭЭГ-активность фронтальных отделов коры головного мозга крыс с применением NMDA в контроле (интактные крысы) (А) и в условиях содержания животных на кетогенной диете (Б).

Примечание. 1 и 2 – фронтальные отделы коры головного мозга левого и правого полушарий соответственно. Калибровка сетки – 250 мкВ, отметка времени – 1 с.

Таким образом, представленные результаты показали, что применение кетогенной диеты способствует

снижению судорожной готовности животных по отношению к действию NMDA. При этом удержание крыс на КД обеспечивает протективный эффект как в отношении поведенческих, так и электрографических проявлений судорожной активности.

Следует подчеркнуть, что под влиянием КД в большей мере снижалась чувствительность к провоцируемой NMDA тонической экстензии передних конечностей в сравнении с клоническими судорогами – соответственно в 2,3 и в 4,27 раза. Подобные различия могут объясняться тем, что повышение порога развития клонических судорог рассматривается как местный процесс усиления торможения в зоне очага эпилептогенеза, в то время как повышение порога тонической экстензии обусловлено подавлением транссинаптических путей распространения возбуждения, т.е. в механизмах развития противозипилептического эффекта участвуют механизмы пространственной суммации [1]. Данное положение также иллюстрируется значительно большим увеличением, в сравнении с интактными крысами, соотношений среднеэффективных доз NMDA, индуцирующих клонические судороги и тоническую экстензию, которое составило в контроле 8,87 раза, а в условиях применения КД – 16,46 раза.

Одной из структур, принимающей участие в генерализации эпилептогенного возбуждения, является ретикулярная часть черного вещества среднего мозга [2]. Введение в это образование противозипилептических препаратов блокирует судорожные реакции при сохранении выраженных эпилептиформных электрографических проявлений [1, 3]. Выявленное в нашей работе подавление синхронизированной биоэлектрической активности в структурах коры головного мозга может свидетельствовать о прямом противозипилептическом действии кетоновых тел на нейрональные образования головного мозга, которые способны проникать через гемато-энцефалический барьер [7]. Также полученные результаты позволяют полагать, что одной из мишеней действия кетоновых тел и развития противозипилептического эффекта КД являются образования ретикулярной части черного вещества.

В целом приведенные данные показывают возможность подавления эпилептогенных эффектов NMDA под влиянием КД, что может представлять значительный интерес для применения КД при различных состояниях и нейропатологических синдромах, в основе которых находятся механизмы гиперактивации эндогенной системы возбуждающих аминокислот.

Вывод: кетогенная диета предотвращает NMDA-индуцированные судороги, что в большей степени выражено в отношении их тонического генерализованного компонента в сравнении с клоническими судорогами.

Литература

1. Годлевский Л.С., Коболев Е.В., Мустяца В.Ф. и др. Моделирование и механизмы подавления экспериментального эпилептического синдрома. - Одесса: КП ОГТ, 2010. - 350 с.
2. Крыжановский Г.Н., Шандра А.А., Годлевский Л.С. и др. Антиэпилептическая система // Успехи физиол. наук. -1992. - Т. 23, № 3. - С. 38-59.
3. Шандра А.А., Годлевский Л.С., Брусенцов А.И. Киндинг и эпилептическая активность. - Одесса: Астропринт, 1999. - 270 с.
4. Freeman J., Veggiotti P., Lanzi G. et al. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects// Epilepsy Res. - 2006. - Vol. 68. - P. 145-180.
5. Nylen K., Likhodii S., McIntyre W. The ketogenic diet: proposed mechanisms of action// Burnham

Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. - 2009. - Vol. 6. - P. 402-405.

6. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. N.Y. Academic Press. - 1982.

7. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function // J. Neurochem. - 2005. - Vol. 94. - P. 1-14.

8. Thaler S., Choragiewicz T.J., Rejdak R. et al. Neuroprotection by acetoacetate and β -hydroxybutyrate against NMDA-induced RGC damage in rat-possible involvement of kynurenic acid // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. - 2010. - Vol. 248. - P. 1729-1735.

9. White H.S., Wolf H.H., Swinyard E.A. et al. A neuropharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant // Epilepsia. - 1992. - Vol. 33, № 3. - P. 564-572.

Координаты для связи с автором: Полянский Вячеслав Алексеевич – канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики, информатики и мед. аппаратуры ОНМУ, тел.: +380-48-717-89-16, e-mail: godlevsky@odmu.edu.ua.



УДК 616.011.2-001.8-018:612.015.8]:599.323.4-053.3-092.9

Е.Н. Сазонова¹, О.А. Лебедько^{1,2}, Ю.Б. Малофей¹, И.М. Мальцева³, С.С. Тимошин¹

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИД-АНИОН-РАДИКАЛА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ПУЛЬМОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ БЕЛЫХ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ АНТЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,

680000, ул. Муравьева-Амурского, д. 35, тел.: 8(4212) 32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства, 680022, ул. Воронежская, д. 49, кор.1, e-mail: iomid@yandex.ru;

³Медико-эстетический центр «Биарриц», 680000, ул. Дзержинского, д. 71, г. Хабаровск

Резюме

Исследовали первичную культуру пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, подвергнутых тяжелой антенатальной гипоксии. Оценивали пролиферативную активность клеточной культуры с помощью автордиографии с меченым тритием тимидином; количество ядрышек в ядрах фибробластов; с помощью хемилюминесцентного метода измеряли интенсивность генерации супероксид-анион-радикала. Выявлено, что в культуре пульмональных фибробластов новорожденных крыс, перенесших антенатальную гипоксию, генерация супероксид-аниона на 80 % превышала аналогичный показатель в контроле; имело место достоверное уменьшение количества ядрышек; отсутствовала характерная для контактного торможения отрицательная корреляция между плотностью культуры и ее пролиферативной активностью. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что первичная культура фибробластов, выделенная из легких новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, имеет существенные отличия от контроля.

Ключевые слова: антенатальная гипоксия, культура фибробластов, пролиферативная активность, супероксид-анион-радикал.

E.N. Sazonova¹, O.A. Lebedko^{1,2}, Y.B. Malofei¹, I.M. Maltzeva³, S.S. Timoshin¹

PROLIFERATIVE ACTIVITY AND SUPEROXIDE ANION GENERATION IN PULMONARY FIBROBLASTS PRIMARY CULTURE FROM NEONATAL RATS AFTER ANTENATAL HYPOXIA

¹The Far Eastern state medical university;

²Mother and Child Institute of Siberian Branch of Russian Academy for Medical sciences;

³Medical esthetic center «Biarritz», Khabarovsk

Summary

Antenatal hypoxia is a universal damaging factor in “mother-fetus” system and one of the leading pathogenetic elements of respiratory organs pathology formation. The primary culture of pulmonary fibroblasts of newborn albino rats subjected to a severe antenatal hypoxia was investigated. The proliferative activity of fibroblasts was estimated by autoradiography with ³H-thymidine; quantity of nucleolar in fibroblasts nucleus was analyzed; superoxide-anion generation