

Биология

УДК 612.8+591.18

С. В. АМИРЯН

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ОДИНОЧНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА ПОД ВЛИЯНИЕМ
РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЯДА *VIPERA RADDEI* В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

В острых экспериментах на интактных спинальных крысах и таковых, подверженных хронической гемисекции спинного мозга, исследовалось воздействие большой и малой доз яда армянской гадюки (*Vipera raddei*) на фоновую и вызванную электрическую активность одиночных интернейронов пояснично-крестцового отдела и фокальные потенциалы спинного мозга. Проводился статистический анализ (*on-line*). Типичным признаком влияния яда явилось значительное начальное повышение в частоте фоновой активности с последующей депрессией или выраженное позднее облегчение в зависимости от его доз.

Из компонентов змеиных ядов известность приобрели синтетические аналоги тубокурарина, используемые в общей анестезии, – атракуриум [1, 2] и векурониум [3] – в связи с избирательным их действием на важный нейротрансмиттер никотинового ацетилхолинового рецептора, а также аналоги ботулотоксина (типы А, В, F), предотвращающие высвобождение ацетилхолина посредством разрыва специализированных протенинов, участвующих в этом процессе; последние успешно используются для снятия локализованного мышечного спазма при блефароспазме, страбизме, тортиколлисе [4]. Чрезвычайную важность представляют токсины змеиных ядов (ЗЯ), выступающие в качестве ингибитора ангиотензин-конвертирующего энзима (АСЕ) – натурального пептида, ответственного за преобразование неактивного предшественника в локально активный гормон ангиотензин. Последний удлиняет действие локально активного гормона брадикинина, блокируя инактивирующий гормон, что приводит к расширению кровеносных сосудов [5]. При этом имеет место резкое снижение кровяного давления. В качестве аналогов ингибиторов АСЕ получены каптоприл, эналаприл, лизиноприл, широко используемые в клинической практике. Из компонентов змеиных ядов приобрели известность, в частности, аналоги ботулотоксина (типы А, В, F), предотвращающие высвобождение ацетилхолина [4]. Следует отметить, что будущее в создании новых препаратов из змеиных токсинов принадлежит веществам, названным дендротоксинами. Они впервые были обнаружены в яде *Dendroaspis* – протеиновом токсине, на основе которого синте-

зированы важные соединения, избирательно блокирующие или активирующие одни и те же нейрональные калиевые ионные каналы, чем контролируется нервная возбудимость: блокаторы калиевых ионных каналов могут повысить активность поврежденной нервной клетки при нейродегенеративных заболеваниях (Альцгеймерова болезнь); активаторы К-каналов могут уменьшить ненормальную электрическую активность мозга и быть использованы в качестве антисудорожных препаратов при эпилепсии [6, 7]. Помимо вышеотмеченных сфер терапевтического использования змеиных ядов, в настоящее время спектр их применения значительно расширился. В частности достаточно отметить успешное использование эффектов дизинтегринов (*contortrostatin*, димерический дизинтегрин ЗЯ *Agkistrodon contortrix*) в качестве антиканцерогенных средств [8]. Все больший интерес приобретают антиканцерогенные эффекты ЗЯ *Bothrops jararaca* и *Crotalus durissus terrificus*, обусловленные непрямым действием на опухолевые клетки посредством провокации воспалительного ответа, главным образом макрофагов, стимулирующих выработку цитокинов [9].

В настоящей работе исследованы эффекты малых и больших доз яда *Vipera raddei* (VR) в норме и патологии (латеральная гемисекция спинного мозга).

Ранее были опубликованы и представлены к печати работы, посвященные действию яда VR на электрическую активность нейронов спинного мозга у интактных крыс и таковых с хронической гемисекцией спинного мозга [10, 11].

Материал и методы. Эксперименты были проведены на 23 зрелых крысах (самцах) весом 200–300 г. В острых экспериментах крысы обездвиживались дитилином и переводились на искусственное дыхание. Спинной мозг перерезался под новокаиновой анестезией ультразвуковым ножом на уровнях T₂–T₃. Исследовалась экстраклеточная фоновая активность (ФА) 45 одиночных нейронов спинного мозга под влиянием яда VR в малых – 0,5 мг/кг и больших – 1,3 мг/кг (по сравнению с токсической – 0,77 мг/кг) дозах при внутримышечном введении и аппликации лиофилизированного кристалла. Проводилась также регистрация фокальных потенциалов (ФП) в дорзо-вентральном направлении спинного мозга. Часть крыс предварительно (за 3–4 недели) подвергались гемисекции спинного мозга на уровне L₁–L₂. В острых экспериментах производилось исследование ФП и ФА у интактных животных, таковых с гемисекцией (через 3–4 недели) на поврежденной (ниже места перерезки) и контрольной (аналогичный противоположный отдел) сторонах. Операционный подход в люмбо-сакральной части позвоночника, регистрация экстраклеточной фоновой активности (ФА) и анализ спайковой активности детально представлены в [1].

Результаты и их обсуждение. На примере ФП и импульсных потоков ФА 42 одиночных нейронов спинного мозга (пластины II–VI, по Рекседу) исследовалось действие яда VR у спинальных крыс и таковых с предварительной (за 3 недели) гемисекцией спинного мозга.

Рисунок 1 иллюстрирует изменение амплитуды положительного и отрицательного компонентов ФП спинного мозга в норме и на 5-ой, а также 10-ой мин. после введения яда VR. На рис. 1 видно прогрессивное уменьшение величины отдельных компонентов ФП с момента введения яда и по глу-

бине до 1 мм с последующей их реверсией. Характерно отсутствие эффекта яда на нервные волокна, что показано в G на примере афферентного залпа на раздражение седалищного нерва (*n. ischiadicus*), регистрируемого из задних корешков на месте их входа в спинной мозг в норме (1) и на 5–30 мин. (2–7) после его введения.

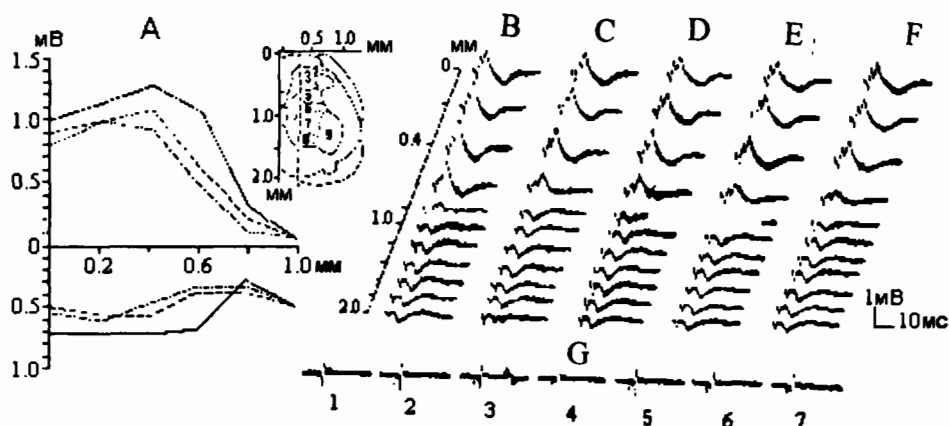


Рис. 1. Воздействие яда армянской гадюки на фокальные потенциалы спинного мозга. А – график изменения амплитуды положительного (выше 0) и отрицательного (ниже 0) отклонений ФП в норме (непрерывная линия), на 5-ой (пунктирная линия) и 10-ой (прерывистая линия) мин. после введения яда *VR*; по оси ординат и абсцисс – амплитуда в мВ и глубина в мм соответственно; справа от графика – схематическое изображение спинного мозга на уровне L_5-L_6 , цифрами показаны пластины серого вещества спинного мозга, по Рекседу; пунктирной линией – направление введения микроэлектродов; вертикальная и горизонтальная шкалы – ширина и глубина спинного мозга в мм. В–F – послойная регистрация в дорзо-вентральном направлении ФП в норме, на 5, 10, 15, 20-ой мин. соответственно; слева – глубина отведения в мм. G (1–7) – отведение афферентного залпа в месте входа дорзальных корешков в спинной мозг на раздражение *n. ischiadicus* в норме и на 5, 10, 15, 20, 30-ой мин. соответственно.

На рисунке 2 показано действие яда *VR* при его аппликации на дорзальную поверхность спинного мозга (А) и внутримышечной инъекции малых доз (В). В зависимости от исходного уровня (А1, В1 – норма) и дозы препарата видно прогрессивное увеличение частоты импульсации на 5–15-ой мин. (А2, А3, А4) после его введения (в 12 раз) с дальнейшим 6-кратным урежением частоты ФА на 20-ой мин. (А5) и последующим внезапным восстановлением до исходного уровня на 25–30-ой мин. (А6, А7). В противоположность этому на рис. 2В видно более чем двукратное урежение частоты импульсации на 5–15-ой мин. (В2, В3) после введения яда с последующим резким учащением на 20-ой мин. (В4) и повторным урежением ФА на 25-ой мин. почти вдвое по сравнению с исходным уровнем (В5).

На рисунке 3 представлены суммарные гистограммы межимпульсных интервалов до и после стимуляции *n. ischiadicus* в норме (А) и два характерных типа изменений последних под воздействием различных доз яда (В, С), где виден более выраженный его эффект при малых дозах. Более того, как показано на В и С, яд оказывает первоначальное возбуждающее и последу-

ющее тормозное действие в одном случае (В) и выраженное облегчение активности в более поздние постстимульные периоды (С) – в другом.

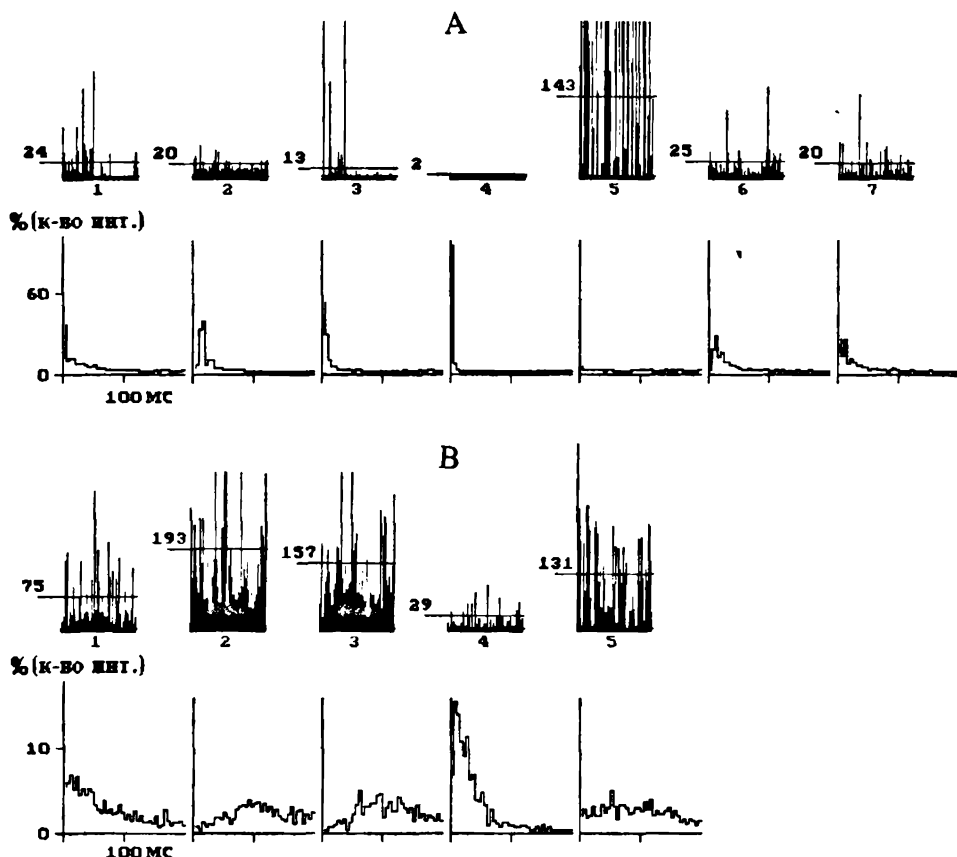


Рис. 2. Эффекты различных доз яда *VR* на фоново-активные нейроны спинного мозга (пластины II–VI, по Рекседу). А, В – изменения временных параметров нейрональных потоков 2 нейронов (глубина 300, 600 мкм соответственно): в виде произвольно взятых коротких периодов фоновой активности с указанием средних величин межимпульсных интервалов (цифры слева) по вертикали (верхний ряд). Нижний ряд – гистограммы количества межимпульсных интервалов в процентах от общего числа таковых при аппликации кристаллика яда (А) и системном (в/м) введении малой дозы яда (В) в норме (А1), с последующей регистрацией эффектов яда на 5, 10, 15, 25 и 30-ой мин. (А2–А5), 5, 15, 20, 25-ой мин. (В2–В5).

На А–С (1) (слева от ординаты) вычислены следующие параметры ФА: для А $mean=0,8$, $SD=0,74$; для В $mean=2,53$, $SD=1,58$. На А–С (1) (справа от ординаты) расчетная тоническая активность для А имеет вид пуассоновского распределения с $mean=1,86$ и $SD=1,36$, для В – также пуассоновского распределения с $mean=1,74$ и $SD=1,30$, для С – соответствует нормальному распределению с $mean=5,13$ и $SD=2,13$. На А–С (2) вид гистограмм амплитуд постспайковой активности не соответствует рассматриваемым распределениям (А, В) и близок к нормальному (С). На А–С (3) расчеты значимости отличия тонической активности от фоновой кумулятивных кривых дают для А $P<0,001$, $t=265,2$, $df=43$, для В $P<0,001$, $t=1,972$, $df=43$, для С $P<0,001$, $t=236,8$, $df=43$, а также первичных участков постстимульной гисто-

граммы ($mean \pm 2SD$) – для А $P < 0,001$, $t = 284,8$, $df = 107$, для В $P < 0,001$, $t = 312,0$, $df = 110$, для С $P < 0,001$, $t = 789,0$, $df = 77$; для С выражена вторичная активность: $P < 0,001$, $t = 280,6$, $df = 106$. Средняя латенция ответа на стимул $4,1 \pm 1,4$ (А), $5,2 \pm 1,3$ (В), $1,8 \pm 1,5$ (мс) (С) и для вторичного ответа $38,1 \pm 3,3$ (мс) (С).

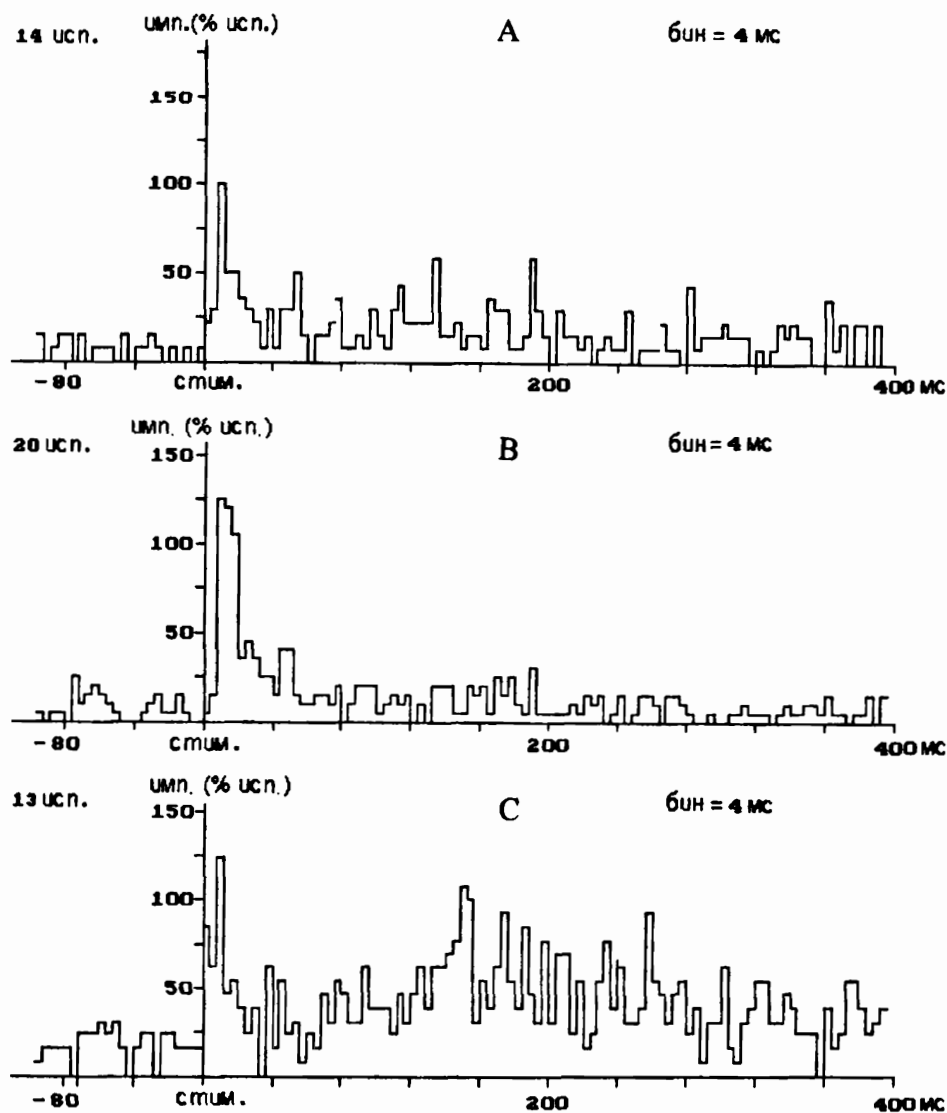


Рис. 3. Спайковая активность нейронов спинного мозга в норме и после воздействия яда (пластины III–VI, по Рекседу). А – норма; В, С – пре- и постстимульные гистограммы меж-импульсных интервалов одиночных фоновых активных интернейронов спинного мозга в норме (А) и два типа эффектов яда VR (В, С).

Как было отмечено выше, компоненты змеинного яда успешно используются в клинической практике и в качестве самостоятельных средств, и с целью стабилизации и усиления действия других препаратов посредством воздействия, в частности на прекурсоры некоторых локальных гормонов [5]. Наши эксперименты позволяют предложить в качестве такого средства

использование малых доз яда армянской гадюки. Ранее это было представлено в отношении синтетического гормона дексаметазона [10].

Заключение. На интактных спинальных крысах и таковых, подверженных травме (хроническая гемисекция спинного мозга), в острых экспериментах испытывалось воздействие различных доз яда армянской гадюки (*Vipera raddei*) на фоновую и вызванную на раздражение седалищного нерва электрическую активность одиночных интернейронов пояснично-крестцового отдела (пластины II–VI, по Рекседу) и на фокальные потенциалы спинного мозга. Проведенный статистический анализ позволил прийти к заключению, что характерным признаком влияния яда является значительное начальное повышение в частоте фоновой активности с последующей депрессией или позднее выраженное облегчение после небольшого начального урежения частоты активности в зависимости от большой и малой дозы яда соответственно. Это свидетельствует в пользу возможности применения малых доз в качестве терапевтического средства – как самостоятельно для восстановления заниженной активности нейронов спинного мозга в патологии, так и в сочетании с другими препаратами (в частности со стероидами) для коррекции, а также стабилизации и пролонгирования их действия.

Кафедра физиологии человека и животных

Поступила 03.12.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Hughes R. In: Handbook of experimental pharmacology (ed. D. A. Kharkevich). Berlin: Springer-Verlag, 1986, p. 259–543.
2. Stenlake J.B. Ibid, 1986, p. 263–276.
3. Bowman W.C., Sutherland G.A. Ibid, 1986, p. 419–443.
4. Jankovic J., Hallett M. Therapy and botulinum toxin. N.-Y.: Marcel-Decker, 1994.
5. Cushman D.W. et al. In: Enzyme inhibitors and drugs (ed. M. Sandler). London: Macmillan, 1980, p. 2310–2478.
6. Rudy B. – Neuroscience, 1988, v. 25, p. 729–749.
7. Cook N.S. Potassium channels structure, classification, function, therapeutic potential. Chichester: Ellis Horwood Ltd., 1990.
8. Zhou Q., Sherwin R.P., Parrish C., Richters V., Groshen S.G., Tsao-Wei D., Arkland F.S. – Breast Cancer Res. Treat., 2000, v. 61, № 3, p. 249–260.
9. da Silva R.J., Fecchio D., Barraviera B. – J. Venom. Anim. Toxins, 1997, v. 3, № 2.
10. Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Grigorian Y.Kh, Sarkissian E.J., Amiryan S.V., Chavushyan V.A., Avetisyan Z.A. – Westnik JAELPS. S.-Pb., (Yerevan), 1999, v. 15, № 3, p. 127–132.
11. Амирян С.В. – Ученые записки ЕГУ, 2002, № 3, с. 100.

Ս.Վ. ԱՄԻՐՅԱՆ

ՈՂՆՈՒՂԵՐԻ ՄԵԿԱԿԱՆ ՆԵՐՎԻՐ ՆԵՅՐՈՆՆԵՐԻ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՌԱՆՁԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ *VIPERA RADDEI* ԹՈՒՅՆԻ ՏԱՐԲԵՐ ԴՈՋԱՆԵՐԻ ԱՁԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ ԲՆԱԿԱՆՈՆ ԵՎ ԱԽՏԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ամփոփում

Ինտակտ (բնականոն) և հեմիսեկցիայի ենթարկված ողնուղեղային առնետների վրա դրված սուր փորձերում հետազոտվել է հայկական իժի

(*Vipera raddei*) թույնի փոքր և մեծ դոզաների ազդեցությունը նրանց ելքային և հրահրված ողնուղեղի գոտկա-սրբանային բաժնի (II–VI շերտերը՝ ըստ Ռեքսեդի) մեկական ներդիր նեյրոնների էլեկտրական ակտիվության և ֆոկալ պոտենցիալների վրա: Կատարվել է համակարգչային վիճակագրական վերլուծություն (*on-line*): Թույնի ազդեցության բնորոշ հատկությունն է ֆոնային ակտիվության սկզբնական նշանակալի մեծացումը, որը փոխարինվում է ճնշմամբ (դեպրեսիայով) կամ հետագա արտահայտված քեթևացումով՝ կախված դոզայից:

S.V. AMIRIAN

PECULIARITIES OF CHANGES OF ELECTRICAL OF ACTIVITY OF SINGLE INTERNEURONES OF THE RAT'S SPINAL CORD ON INFLUENCE OF *VIPERA RADDEI* VENOM IN NORM AND PATHOLOGY

Summary

The influence of small and large doses of Armenian adder (*Vipera raddei*) venom on the basic and evoked (stimulation of *n. ischiadicus*) electrical activity of single interneurones of lumbo-sacral area (II–VI lamines at Rexed) and focal potentials of spinal cord on intact spinal rats and rats with chronical hemisection was investigated in acute experiments. The statistical analysis on-line was done. Significant increase of fone activity rate in the beginning and following depression or pronounced late lightning of it according to the venom dose was revealed.