

УДК 612.8+591.18

С.В. АМИРЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЯДА *VIPERA RADDEI* НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ОДИНОЧНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ЗАКАЛИВАНИЯ В ХОЛОДНОЙ ВОДЕ

В острых экспериментах на интактных спинальных крысах, предварительно подверженных хронической интоксикации ядом в сочетании с закаливанием в холодной воде, испытывалось воздействие яда армянской гадюки (*Vipera raddei*) на фоновую и вызванную электрическую активность одиночных интернейронов пояснично-крестцового отдела (пластины II–VI, по Рекседу) спинного мозга. Проводился статистический анализ (*on-line*). У крыс с хронической интоксикацией и закаливанием в холодной воде отмечается лишь выраженное начальное облегчение активности.

Интерес к ядам животного происхождения обусловлен не только необходимостью борьбы с разрушительным действием таковых на жизненно важные функции, но и неограниченной перспективой использования их компонентов в качестве терапевтических как самостоятельно, так и в сочетании с медикаментозными средствами. Это обуславливается прежде всего высокой избирательностью зоотоксинов и необратимостью эффектов, обеспечивающих их длительное действие. Токсические протенны змеиных ядов сгруппированы в более чем 10 категорий соответственно химической структуре и фармакологическим свойствам. Согласно Е. Карлссону [1], выделены 4 большие группы, включающие кураремиметические нейротоксины, множество мембранных токсинов, токсины с фосфолипазной структурой, кротаминовые и пр. Змеиные яды содержат также ферменты (более 26) и практически являются наиболее концентрированными их источниками. Большинство ферментов – гидролазы, и около 12 из них обнаружены во всех ядах, хотя их содержания значительно разнятся. Из путей воздействия ферментов в змеиных ядах следует отметить следующие: локальное капиллярное повреждение и тканевой некроз вследствие активации протеиназ, фосфолипаз и др. [2–4]; острая гипотензия и боль, связанные с высвобождением вазоактивных пептидов и кининогеназы [3]. Однако ни один из этих ферментов не ответственен за острую токсичность змеиных ядов [5].

Представляет интерес тот факт, что идея холодовых тренировок "закаливания" была научно обоснована задолго до строгих данных по физиологии адаптации к холоду. К настоящему времени во многих исследованиях показана возможность использования физических стрессоров для повыше-

ния устойчивости организма [6, 7]. К тому же важным фактором в формировании нового уровня реактивности организма является изменение функционального состояния коры надпочечников в восстановительном периоде в условиях сочетанного воздействия нарастающей гипоксии и гиперкапнии [8].

В настоящей работе предпринята попытка изучения особенностей влияния предварительного холодового закаливания в сочетании с хронической интоксикацией на частоту фоновой и вызванной (на стимуляцию *nervus ischiadicus*) электрической активности одиночных интернейронов пояснично-крестцового отдела (пластины II–VI, по Рекседу) спинного мозга в острых экспериментах на спинальных крысах, подверженных воздействию яда армянской гадюки – *Vipera raddei* (VR).

Ранее опубликована работа, посвященная действию яда VR на электрическую активность нейронов спинного мозга у интактных крыс и таковых с хронической гемисекцией спинного мозга [9].

Материал и методы. Эксперименты проводились на 27 половозрелых крысах (самцах) весом 200–300г. В острых экспериментах крысы обездвигивались дитилином и переводились на искусственное дыхание. Спинной мозг перерезался под новокаиновой анестезией ультразвуковым ножом на уровнях T₂–T₃. В люмбо-сакральной части позвоночника производилась ламинэктомия после фиксации данной области в стереотоксическом аппарате. Исследовалась экстраклеточная фоновая активность (ФА) 37 одиночных нейронов спинного мозга под влиянием яда VR (в малых – 0,5, больших – 1,3, по сравнению с токсической – 0,7 мг/кг дозах внутримышечно (в/м) и аппликации лиофилизированного кристалла). Регистрация фоновой активности (ФА) производилась стеклянными микроэлектродами с диаметром кончика 2–6 мкм, заполненными 2M раствором, NaCl, стереотоксически ориентированными в дорзальные области серого вещества спинного мозга (пластины II–VI, по Рекседу). Производилась выборка спайков с помощью амплитудного дискриминатора посредством РС (*on-line*). Вычислялись скользящая частота по 10 межимпульсным интервалам (с шагом в 5 интервалов), сериальные гистограммы до 50 порядка, гистограммы межимпульсных интервалов (НИ). Аналогичные вычисления производились как до, так и через 1–5 сек. после электрической стимуляции *n. ischiadicus*. Вычислялись средняя величина спайков, приходящихся на отдельный диапазон гистограммы, и ее среднеквадратичное отклонение. Из потока исключались все диапазоны с количеством спайков, выходящим за пределы среднего $\pm 2SD$. Эта процедура повторялась для новой и полученных подобным образом последующих выборок до тех пор, пока изменения значений среднего и SD не становились меньше 2% (эта цифра учитывает возможное изменение SD для усеченных на $\pm 2SD$ нормальных распределений). Конечная выборка принималась за тоническую активность нейронов. По критерию пси-квадрат оценивалось ее соответствие нормальному, пуассоновскому или равномерному распределению. По плотности соответствующего распределения определялась значимость отклонений тех периодов активности, которые выходили за пределы конечного среднего $\pm 2SD$. С применением двухфакторного *t*-теста Стьюдента оценивалась значимость различий фоновой и тонической активности. Чтобы не совершить ошибку второго рода и не потерять значимые изменения активности (в особенности это касается торможения), мы изучали

также периоды, где амплитуды двух последовательных диапазонов отклонялись от среднего на $\pm SD$. По методу наименьших квадратов определялся наклон прямой, представляющей кумулятивную кривую этих отрезков гистограммы, и оценивалась значимость его отличия от наклона соответствующей прямой тонического остатка.

Результаты и обсуждение. На примере импульсных потоков ФА 115 одиночных нейронов спинного мозга (пластины II–VI, по Рекседу), исследовалось действие яда VR у спинальных крыс.

На рисунке 1 показано действие системного (в/м) введения большой (А) и малой (В) доз яда VR на двух фоновых-активных нейронах спинного мозга у животных, подверженных хронической интоксикации тем же ядом (А), и в сочетании с закаливанием в холодной воде (В). В зависимости от концентрации яда при фактически одинаковом исходном уровне (А1, В1 – норма) выявляется различная степень активации нейрона, ранее отмеченная при относительно высокой дозе. На А показано первоначальное 5-кратное урежение частоты импульсации на 5-ой мин. (А2), достигающее почти 10-кратного снижения ФА на 30-ой мин. (А5) с небольшими колебаниями на 10–15-ой мин. (А3, А4) после введения яда. В то же время В отражает фактическое отсутствие изменения частоты импульсации на 5–20-ой мин. (В2–В4) (лишь с 2-кратным учащением на 5-ой мин.) и резко выраженное торможение нейронной активности на 30-ой мин. после введения малой дозы яда, достигающее 14-кратного урежения частоты импульсации (В5).

Рисунок 2 демонстрирует анализ одиночного импульсного потока нейрона спинного мозга в условиях стимуляции *n. ischiadicus* после 30 мин. воздействия яда (А–С) и в период (D) от 2 до 30 мин. (суммарная пре- и постстимульная гистограммы межимпульсных интервалов). Отмечается значительное повышение частоты импульсации пароксизмального типа, несмотря на то что престаимульная активность по сравнению с нормой значительно заторможена (А). То же наблюдается на графиках скользящей частоты и сериальных коррелограммах (В). На D видно начальное возбуждение и выраженное облегчение в более поздний постстимульный период.

Рисунок 3 иллюстрирует анализ одиночного импульсного потока нейрона спинного мозга в условиях раздражения *n. ischiadicus* на 38-ой мин. (А–С) и на протяжении 5–70 мин. после начального, а также на 40-ой мин. повторного (суммарная пре- и постстимульная гистограммы межимпульсных интервалов) (D) системного введения яда малой дозы у крысы, предварительно подвергнутой хронической интоксикации тем же ядом, в сочетании с закаливанием в холодной воде. После подачи стимула заметно увеличение начального угла кумулятивной кривой (А2), которая затем принимает вид относительно стационарной активности. По графику скользящей частоты, как и по графику сериальной коррелограммы (В), можно судить об относительно стабильных колебаниях активности потока как в пре-, так и в постстимульный (через 5сек.) период. На D в отличие от предыдущего рис. 2 видно лишь выраженное начальное возбуждение.

Заключение. Проведенное нами в острых экспериментах на интактных спинальных крысах, предварительно подверженных хронической интоксикации ядом в сочетании с закаливанием в холодной воде, исследование

воздействия яда армянской гадюки (VR) на фоновую и вызванную (на стимуляцию *n. ischiadicus*) электрическую активность одиночных интернейронов пояснично-крестцового отдела (пластины II–VI, по Рекседу) спинного мозга показало, что типичным признаком влияния малых доз яда явилось небольшое начальное повышение в частоте фоновой активности с

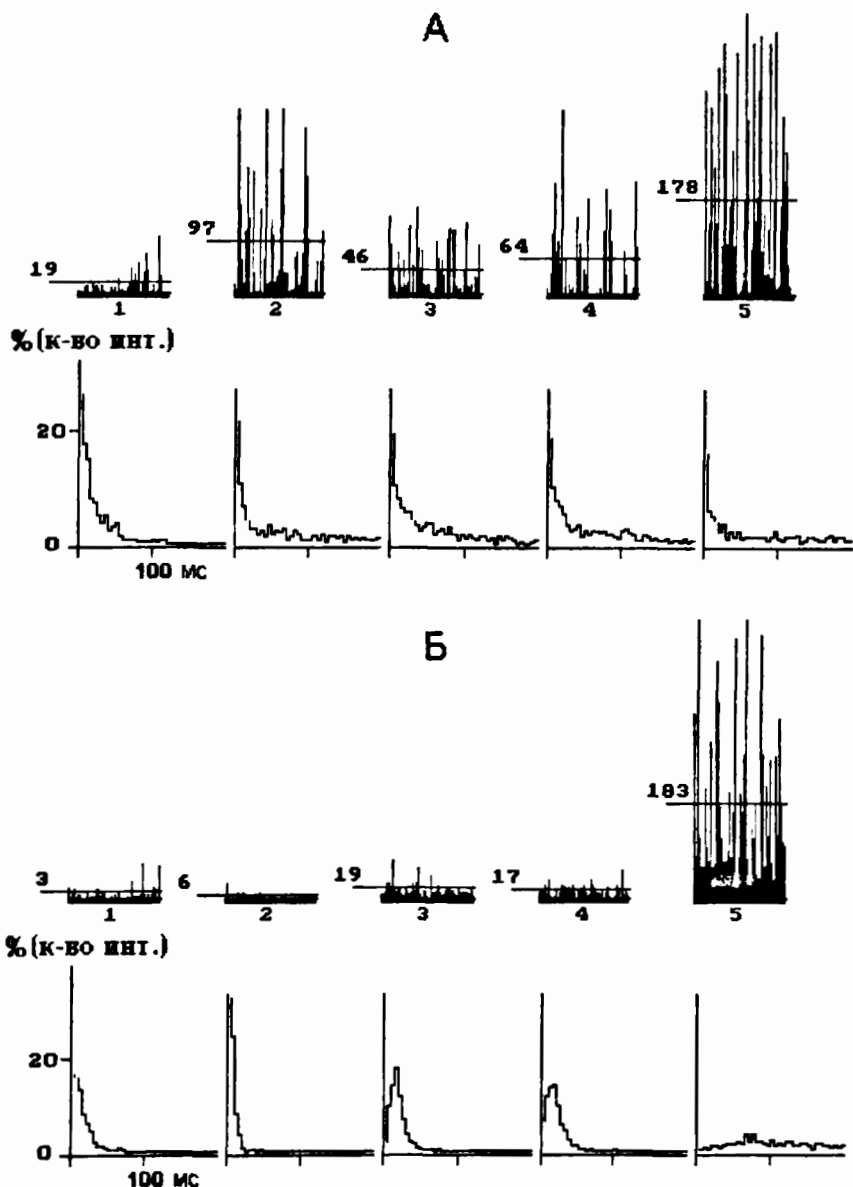


Рис. 1. Воздействие различных доз яда VR на фоново-активные нейроны спинного мозга крыс (пластины V–VI, по Рекседу), предварительно подвергшихся хронической интоксикации ядом и в сочетании с закаливанием в холодной воде. А, Б – изменения временных параметров нейрональных потоков 2 нейронов (глубина 800 и 1000 мкм соответственно) при системном (в/м) введении большой (А) и малой (Б) доз яда в норме (А1, Б1), а также на 5, 10, 15, 30-ой мин. (А2–А5 соответственно) у хронически интоксигированных и на 5, 15, 20, 30-ой мин. (Б2–Б5 соответственно) у закаленных и интоксигированных животных. Внизу – гистограммы межимпульсных интервалов (бин=5 мс).

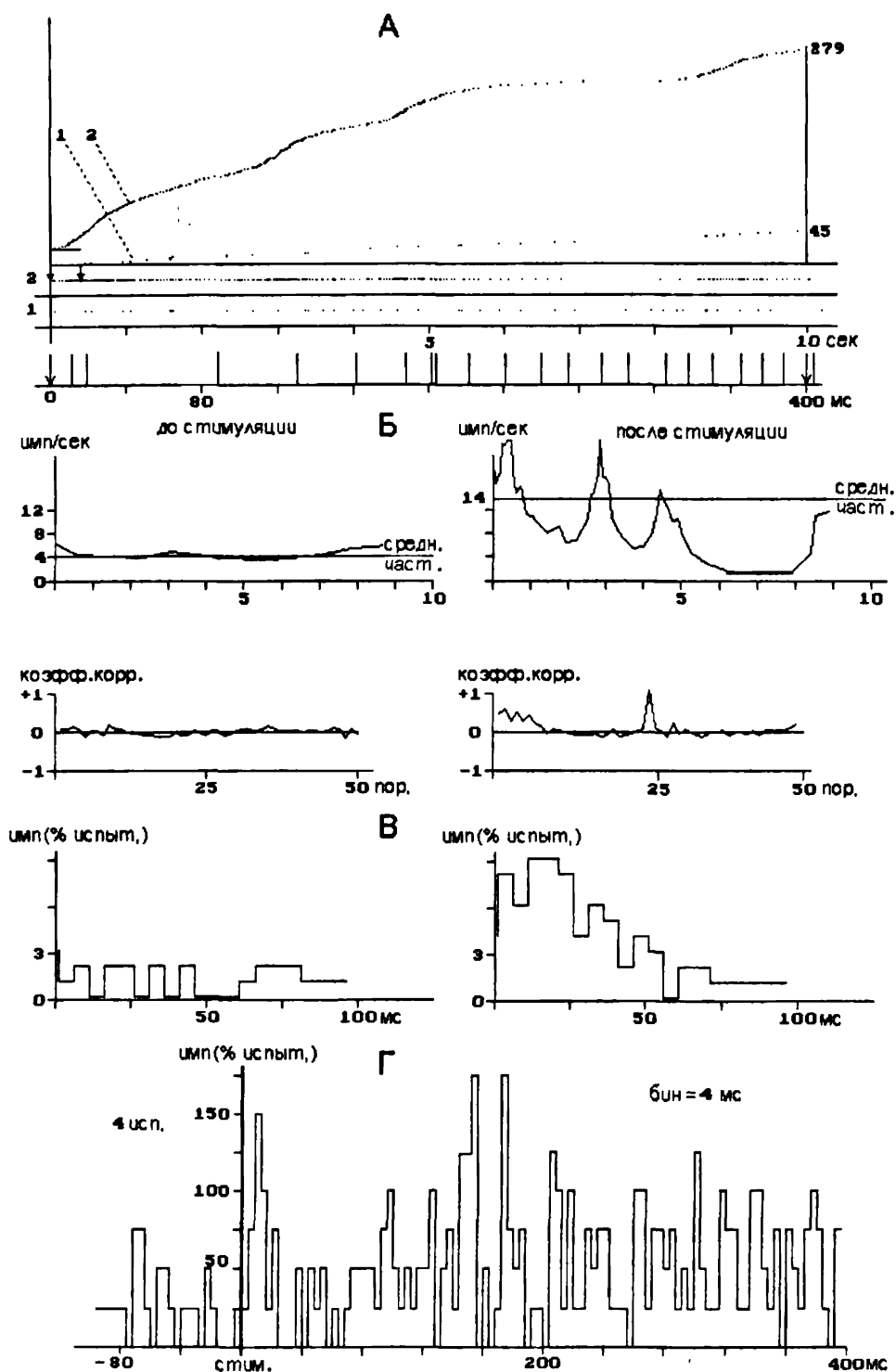


Рис. 2. Пре- и постстимульные характеристики импульсного потока нейрона спинного мозга, подвергнутого воздействию малой дозы яда VR (глубина 650 мкм). А–В – нейрон после в/м введения яда на 30-ой мин. Г – суммарная гистограмма нейрональной активности до и после стимуляции (от 2-ой до 30-ой мин.).

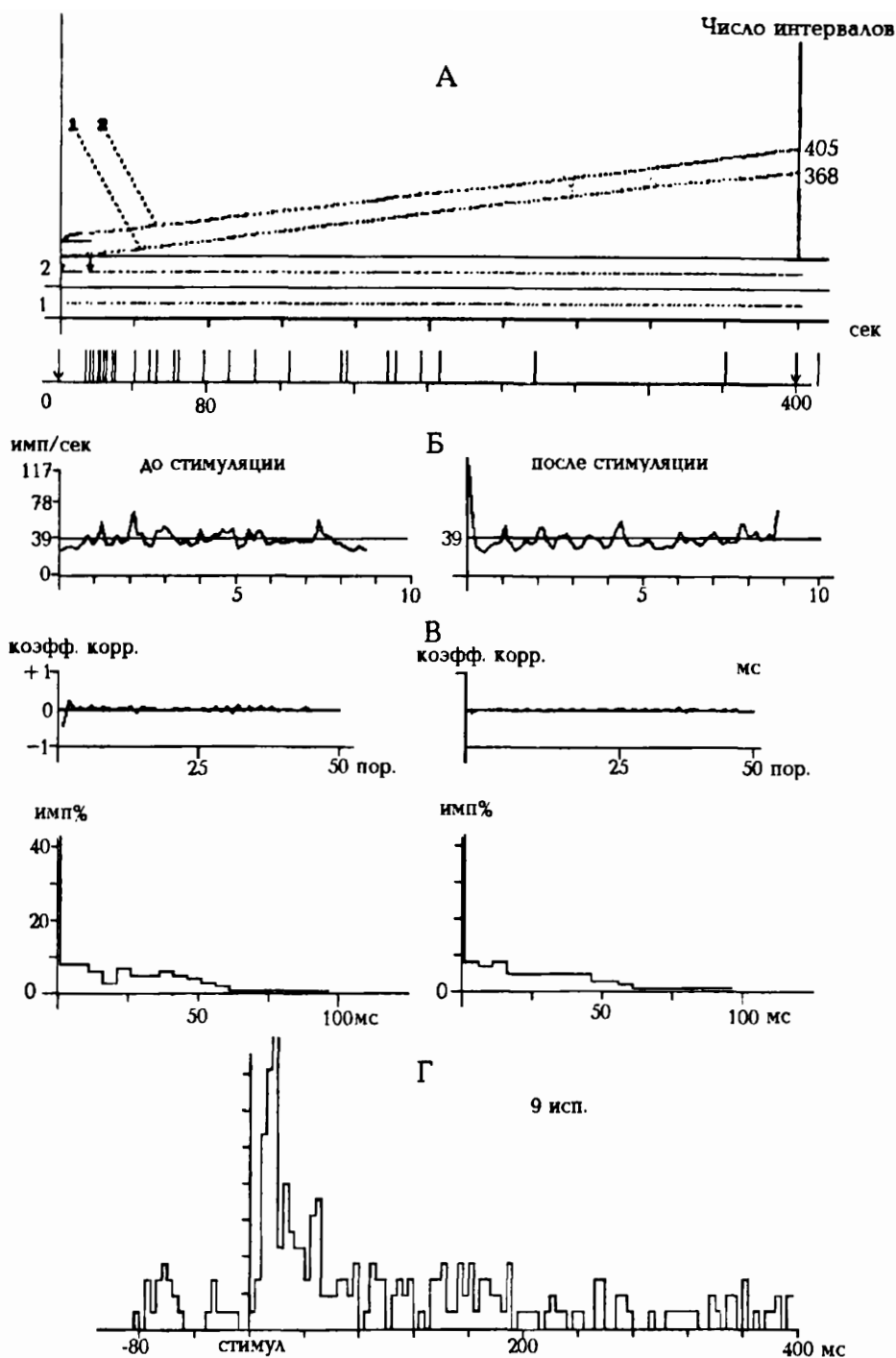


Рис. 3. Пре- и постстимульные характеристики нейронального импульсного потока у крысы, подвергшейся предварительному закаливанию и хронической интоксикации ядом VR (глубина 1000 мкм). А–В – нейрон после в/м инъекции малой дозы яда на 38-ой мин. Г – суммарная гистограмма нейрональной активности до и после стимуляции на 5–70-ой мин. после введения яда и повторного введения на 40-ой мин.

последующим выраженным торможением или поздним облегчением в зависимости от престаимпульного уровня фоновой активности. У крыс с хронической интоксикацией и закаливанием в холодной воде отмечается лишь выраженное начальное облегчение активности.

Кафедра физиологии человека и животных

Поступила 03.12.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlsson E. In: Snake venoms (ed. Chen-Yuan). Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1979, p. 159-212.
2. Slotta K. - Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 1955, v. 12, p. 406-465.
3. Kaiser E., Michel H. Die Biochemie der tierischen Gifte. Wien: Franz. Deuticke, 1958.
4. Suzuki T., Iwanaga S. In: Handbook of experimental Pharmacology (ed. E.G. Erdos). Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1970, v. 25, p. 193-212.
5. Minton S.A. In: Venom Diseases (ed. Ch.C. Thomas). N.-Y.: Springfield (III), 1974.
6. Гилинский М.А., Колосова Н.Г., Петракова Г.М. - Вестник РАМН, 1998, т. 10, с. 22-26.
7. Попова М.Ф., Капралов В.А., Семенова И.В. - ДАН СССР, 1989, т. 307, № 4, с. 1010-1012.
8. Евграфьев В.П., Берташ В.И., Могутов С.С. - В сб.: Стресс и адаптация. Кишинев: Штиинца, 1978, с. 308.
9. Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Grigorian Yu.Kh, Sarkissian E.J., Amiryan S.V., Chavushyan V.A. and Avetisyan Z.A. - Westnik JAELPS, S.-Pb., 1999, v.15, №3, p.127-132.
10. Stenlake J.B. In: Handbook of experimental pharmacology (ed. D.A. Kharkevich). Berlin: Springer-Verlag, 1986, p. 263-276.

Ս.Վ. ԱՄԻՐՅԱՆ

ԶՐՈՆԻԿ ԹՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ԵՎ ՑՐՏԱՎԱՐԺՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ
ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՂՆՈՒՂԵՂԻ ՄԵԿԱԿԱՆ ՆԵՐԴԻՐ ՆԵՅՐՈՆՆԵՐԻ
ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ *VIPERA RADDEI* ԹՈՒՅՆԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Նախապես ցրտավարժեցման և հայկական իծի (*Vipera raddei*) թույնով քրոնիկ թունավորման ենթարկված քնականոն ողնուղեղային առնետների վրա դրված սուր փորձերում հետազոտվել է այդ թույնի ազդեցությունը նրանց էլքային և հրահրված ողնուղեղի գոտկա-սրբանային բաժնի (II-VI շերտերը՝ ըստ Ռեքսեդի) մեկական ներդիր նեյրոնների էլեկտրական ակտիվության վրա: Կատարվել է համակարգչային վիճակագրական վերլուծություն (*on-line*): Դիտվել է քրոնիկ ինտոքսիկացված և ցրտավարժեցում անցած առնետների ակտիվության միայն սկզբնական արտահայտված թեթևացում:

INVESTIGATION OF INFLUENCE OF *VIPERA RADDEI* VENOM ON
ELECTRICAL ACTIVITY OF SINGLE INTERNEURONES OF THE RAT'S
SPINAL CORD IN CONDITIONS OF CHRONICAL INTOXICATION
AND COOL-HARDENING

Summary

In acute experiments on intact spinal rats with beforehand chronical venom intoxication and cool-hardening the influence 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) of spinal cord was investigated. The statistical analyses *on-line* was done. At rats with chronical intoxication and cool-hardening only pronounced simplification of activity in the beginning was revealed.