

На правах рукописи

САМОТАЕВА Ирина Сергеевна

РОЛЬ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА
В РЕГУЛЯЦИИ ПИК-ВОЛНОВОЙ АКТИВНОСТИ
ПРИ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

03.03.01 «Физиология»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Лаборатории общей физиологии временных связей (заведующий – д.б.н. А.В. Богданов) и Лаборатории нейрохимических механизмов обучения и памяти (заведующий – д.б.н. А.С. Базян) Учреждения Российской Академии наук Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор Института – д.б.н., профессор П.М. Балабан).

Научный руководитель: доктор биологических наук
Ара Саакович Базян

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Леонид Максимович Мамалыга

доктор биологических наук
Марина Леонидовна Пигарева

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии медицинских наук Научно-Исследовательский Институт общей патологии и патофизиологии РАМН

Защита состоится « 2 » марта 2011 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д-002.044.01 Учреждения Российской Академии наук Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по адресу: г. Москва, 117485, ул. Бутлерова, д.5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской Академии наук Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Владимир Вячеславович Раевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных заболеваний центральной нервной системы [Niedermeyer, 1993]. Это гетерогенная группа заболеваний, различающихся по своей этиологии, фармакологическому профилю, электрографическому и поведенческому паттерну пароксизмальных приступов.

Абсансная эпилепсия относится к идиопатическим эпилепсиям. Типичные абсансные приступы (абсансы) чаще всего дебютируют в детском или подростковом возрасте. Они принципиальным образом отличаются от приступов других форм генерализованной эпилепсии, а именно абсансные пароксизмы не сопровождаются конвульсивной активностью, то есть являются неконвульсивными эпилептическими приступами. Основные клинические проявления абсансов включают внезапное и краткое нарушение сознания пациента и миоклонические подергивания мимических мышц и век [Panayiotopoulos, 1999]. Электроэнцефалографическим признаком абсансных приступов у пациентов являются генерализованные билатерально симметричные и синхронные разряды пик-волна (3-4 Гц). Считается, что основные структуры, принимающие участие в формировании пароксизмальной активности абсансной эпилепсии, это кора головного мозга и таламус.

В исследовании процессов инициации, развития, распространения и окончания эпилептических пароксизмов большую роль играет использование моделей эпилепсии на животных. Последние двадцать лет большинство исследований по абсансной эпилепсии проводится на крысах линий WAG/Rij [Coenen, van Luijtelaar, 2003] и GAERS [Danober et al., 1998; Vergnes et al., 1982], генетических моделях абсансной эпилепсии. Для электроэнцефалограммы (ЭЭГ) крыс линий WAG/Rij и GAERS, так же как и для ЭЭГ пациентов с абсансной эпилепсией, характерны спонтанно возникающие генерализованные разряды пик-волна (7-9 Гц). Многочисленные электрофизиологические и фармакологические исследования подтверждают валидность этих генетических моделей неконвульсивной эпилепсии [van Luijtelaar, Coenen, 2009].

Считается, что основную роль в формировании и генерализации пароксизмальных разрядов нейронов играет соотношение активности глутаматергической и ГАМКергической систем мозга. Однако все большее количество данных свидетельствуют о важной функции других нейромедиаторных систем в регуляции эпилептических приступов. Так, было показано, что снижение активности дофаминовой и норадреналиновой систем мозга вызывает увеличение количества разрядов пик-волна абсансной эпилепсии у крыс WAG/Rij [Midzianovskaia et al., 2001; Sitnikova, van Luijtelaar, 2005]. В других работах подтвердилось участие ацетилхолиновой и серотониновой систем в регуляции пик-волновой активности [Berdiev, van Luijtelaar 2009; Jakus et al., 2003].

Существование гистаминергической системы в мозге было показано не так давно, в 1984г. [Panula et al., 1984; Watanabe et al., 1984]. Как следствие, гистаминовая система мозга на данный момент изучена значительно меньше по сравнению с другими аминергическими системами. Тем не менее, на основании литературных данных можно заключить, что гистамин играет роль нейромодулятора в центральной нервной системе (ЦНС) и участвует в регуляции таких функций, как энергетический метаболизм, водный баланс, потребление пищи, терморегуляция и сердечнососудистая регуляция [Naas et al., 2008]. Скорость высвобождения гистамина в мозге, так же как и импульсная активность гистаминергических нейронов, меняется в зависимости от уровня поведенческой активности [Mochizuki et al., 1992], что может отражать участие гистамина в регуляции циркадных ритмов двигательной активности. Также существуют данные о том, что гистамин регулирует уровень нейронной активности в коре мозга [Lin, 2000]. Учитывая влияние гистамина на уровень возбудимости корковых нейронов и поведенческую активность, можно предположить, что гистаминергическая система принимает участие в регуляции пик-волновых разрядов абсансной эпилепсии [Coenen et al., 1991]. Для подтверждения предполагаемого влияния гистаминовой системы на пик-волновую активность и определения направления этого влияния необходимы экспериментальные исследования, поскольку имеющиеся в литературе данные по этому вопросу слишком немногочисленны [Midzyanovskaya et al., 2002, 2005].

Целью данной работы было изучение влияния повышенного эндогенного уровня гистамина на пик-волновые разряды и поведение крыс линии WAG/Rij, генетической модели абсансной эпилепсии человека. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние системного введения обратного агониста гистаминовых H₃ ауторецепторов, тиоперамида, на уровень пик-волновой активности и поведение крыс линии WAG/Rij.
2. Определить влияние системного введения ингибитора фермента деградации гистамина, метоприна, на уровень пик-волновой активности и поведение крыс линии WAG/Rij.
3. Сравнить влияние метоприна на поведение в тесте «открытого поля» и на тканевое содержание гистамина в мозге у крыс с генетической абсансной эпилепсией – крыс линии WAG/Rij – с контрольными крысами линии Wistar.
4. Оценить с помощью предварительного введения антагониста H₁ рецепторов, пириламины, участие гистаминовых H₁ рецепторов в действии метоприна на пик-волновую активность и поведение крыс WAG/Rij.

Научная новизна исследования

Впервые продемонстрировано влияние препаратов, повышающих уровень эндогенного гистамина в мозге (тиоперамида и метоприна), на пик-волновую активность крыс линии WAG/Rij, генетической модели абсансной эпилепсии. Проведена оценка влияния метоприна на тканевое содержание гистамина в мозге крыс WAG/Rij. Впервые показано влияние тиоперамида и метоприна на двигательную активность у крыс линии WAG/Rij. Впервые получены данные о том, что под влиянием ингибитора фермента деградации гистамина (метоприна) у крыс возникает стереотипное поведение. Подтверждена гипотеза о повышении в этих условиях уровня внеклеточного дофамина в стриатуме у крыс WAG/Rij. Продемонстрировано влияние антагониста H₁ гистаминовых рецепторов, пириламины, на изменение уровня пик-волновой активности абсансной эпилепсии, вызванное метоприном и галоперидолом.

Теоретическая и практическая значимость работы

В данной работе на крысах линии WAG/Rij было показано, что введение тиоперамида и метоприна, препаратов, повышающих с помощью разных механизмов эндогенный уровень гистамина в мозге, вызывает усиление пик-волновой активности абсансной эпилепсии. Этот эффект противоположен эффекту снижения судорожной активности конвульсивной формы эпилепсии, который наблюдался в ряде работ при активации гистаминергической системы [Kamei, 2001; Scherkl et al., 1991; Tuomisto, Tacke, 1986]. Противоположное влияние одного и того же фармакологического воздействия на конвульсивные и неконвульсивные эпилептические приступы может быть следствием существенного различия механизмов формирования пароксизмальной активности конвульсивной и неконвульсивной эпилепсии [Peeters et al., 1988].

Нами было обнаружено, что метоприн, кроме усиления локомоторной активности, вызывает стереотипное поведение у крыс, которое сопровождается увеличением уровня дофамина в стриатуме. Эти результаты свидетельствуют о том, что влияние метоприна на пик-волновые разряды может быть опосредовано изменением активности не только гистаминовой, но и дофаминовой системы мозга.

Практически важным результатом, который необходимо учитывать при проведении внутримозговых микроинъекций, стало возникновение волны распространяющейся депрессии в ответ на введение инъекционной канюли. Более того, с помощью таких чувствительных показателей, как пик-волновые разряды мы смогли оценить длительность восстановления после волны распространяющейся депрессии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Основным действием тиоперамида (обратного агониста гистаминовых НЗ ауторецепторов) и метоприна (ингибитора фермента деградации гистамина) на пароксизмальную активность при абсансной эпилепсии у крыс WAG/Rij является усиление пик-волновых разрядов.
2. С увеличением доз тиоперамида и метоприна к основному действию добавляется эффект снижения уровня разрядов пик-волна.
3. Такая сложная зависимость эффекта гистаминовых препаратов от дозы может быть следствием взаимодействия гистаминергической и

дофаминергической систем. Это означает, что характер модуляции неконвульсивной эпилептической активности под воздействием гистаминовых препаратов определяется комплексным влиянием двух дозозависимых процессов: изменением уровня гистамина и дофамина в мозге.

Апробация работы

Основные материалы диссертации докладывались на международных конференциях: 37th European Histamine Research Society (EHRS-2008); 9th European Congress on Epileptology (ECE-2010); 7th Forum of European Neuroscience (FENS-2010), на конференции с международным участием (ИВНДиНФ РАН, 2010) и на ежегодных Конференциях молодых ученых (ИВНДиНФ РАН, 2007-2010).

Апробация диссертации проведена 19 ноября 2010 года на совместном заседании лаборатории общей физиологии временных связей (зав. – д.б.н. А.В. Богданов) и лаборатории нейрохимических механизмов обучения и памяти (зав. – д.б.н. А.С. Базян) Учреждения Российской Академии наук Института ВНД и НФ РАН.

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, глав с изложением методов, результатов исследования и их обсуждения, а также заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 187 источников. Работа изложена на 134 страницах, иллюстрирована 25 рисунками и 2 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Работа выполнена на самцах крыс линий WAG/Rij и Wistar. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и температуре 22±2 °С. Доступ к пище и воде не ограничивался. Всего в работе было использовано 174 животных весом 310-360 г.

Было поставлено 10 серий экспериментов: 8 основных и 2 дополнительных. Комплексное исследование действия препаратов, адресованных к гистаминергической системе мозга, включало несколько методов: 1) регистрацию ЭЭГ с последующим анализом пик-волновой активности абсансной эпилепсии; 2) видеорегистрацию поведения, в том числе в тесте «открытого поля»; 3) определение тканевого содержания гистамина в мозге крыс; 4) определение, с помощью метода микродиализа, уровня внеклеточного дофамина в стриатуме крыс. Опыты проводили с 11:00 до 18:00 ч. Всех крыс перед началом экспериментов подвергали воздействию звукового раздражителя с целью определения предрасположенности к аудиогенному судорожному припадку в соответствии с методикой, описанной в работе Г. Д. Кузнецовой [Кузнецова, 1998].

Регистрация электроэнцефалограммы

Электрофизиологические эксперименты были проведены на бодрствующих свободноподвижных животных. Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью хронически вживленных эпидуральных электродов, располагающихся над лобной, теменной и затылочной областями коры (рис. 1 А, Б). Электроды, представляющие собой стальные микровинты, были вживлены под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутривенно).

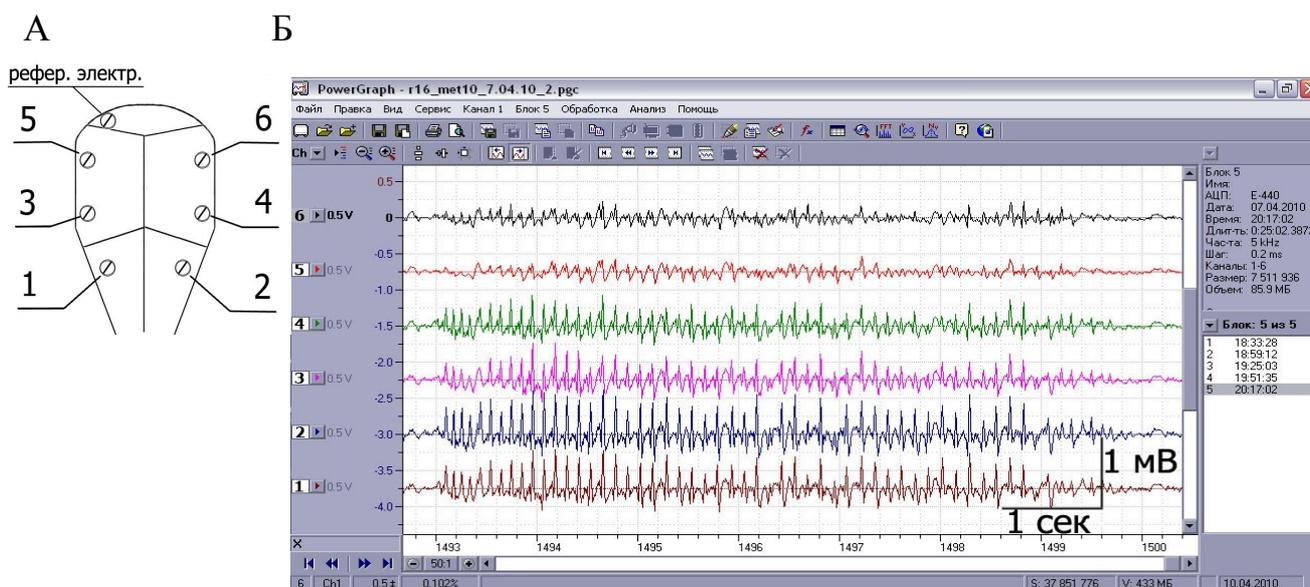


Рис. 1. Регистрация ЭЭГ. А – схема расположения электродов на черепае крысы. Б – пример разряда пик-волна, зарегистрированного в шести отведениях (программа PowerGraph 3.3.6).

Референтный электрод помещали над мозжечком. Восстановительный послеоперационный период составлял как минимум 10 дней. На время регистрации ЭЭГ крысу помещали в камеру размером 60 x 40 x 40 см. Для записи ЭЭГ использовали: усилитель с 6 каналами, многоканальный аналогово-цифровой преобразователь с USB-интерфейсом (E-440, L-card), а также компьютер с установленным программным обеспечением (рис. 1 Б), необходимым для регистрации поступающего сигнала и хранения данных (PowerGraph 3.3.6, Dmitry Yu. Izmailov, 2002-2007). Частотный диапазон регистрации ЭЭГ составлял 1 - 200 Гц. Частота опроса – 830 Гц на канал. Основное внимание при анализе записей ЭЭГ уделялось разрядам пик-волна абсансной эпилепсии.

Регистрация поведения

Поведение во время записи ЭЭГ

Видеозапись поведения крыс осуществляли одновременно с регистрацией ЭЭГ. Для анализа поведения был использован, с некоторыми изменениями, метод, описанный в работе [Kitanaka et al., 2005]. Видеозапись разбивали на 10-секундные интервалы. Выделяли поведение следующих типов: локомоторная активность (перемещение всех четырех лап), принюхивания (возможны перемещения двух передних лап), умывания и спокойное бодрствование (периоды неподвижности) и сон. Тому типу поведения, которое преобладало в данный 10-секундный интервал, присваивали значение «1», а остальным «0». Количество единиц для каждого типа поведения суммировалось за 30-минутные периоды. Кроме того, подсчитывали количество стоек.

Тест «открытое поле»

Для регистрации поведения в тесте открытого поля использовали камеру цилиндрической формы с диаметром основания 1 метр и высотой стенок 40 см. Освещение в экспериментальной комнате осуществлялось с помощью одного центрально расположенного источника (40Вт). Во время эксперимента крысу помещали в центр открытого поля, после этого регистрировали поведение животного с помощью видеокамеры (DCR-DVD7E, Sony Corporation). В ходе анализа видеозаписей подсчитывали суммарную длительность (за экспериментальную сессию) поведения тех же типов, что и в серии опытов с одновременной регистрацией ЭЭГ и поведения.

Определение тканевого содержания гистамина в мозге методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для определения влияния внутрибрюшинного введения метоприна (20 мг/кг) на тканевое содержание гистамина в отдельных структурах головного мозга крысу декапитировали и извлекали мозг. Затем выделяли следующие структуры мозга: стриатум, таламус, гипоталамус, гиппокамп и мозжечок. Образцы указанных структур мозга гомогенизировали, помещали в холодную (0 °С) 0,4 М хлорную кислоту и центрифугировали при 100 000 g в течение 45 минут (4 °С). Надосадочная жидкость (супернатант) была использована для определения содержания гистамина при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией и использованием о-фталевого альдегида, как описано в работе [Yamatodani et al., 1985].

Определение уровня внеклеточного дофамина методом внутримозгового микродиализа

За сутки до проведения эксперимента крысам под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг внутрибрюшинно) вживляли микродиализную канюлю в область дорсального стриатума. Были использованы концентрические микродиализные зонды с пропускной способностью полупроницаемой мембраны до 20 кДа (Spectrum). Внешний диаметр зонда составлял 200 мкм. Координаты вживления канюли определяли по стереотаксическому атласу мозга крыс [Paxinos, Watson, 1998]: AP = 0,0 мм, LM = 3,0 мм, Н = 6,0 мм. В день эксперимента крысу помещали в экспериментальную камеру, диализную канюлю подсоединяли к системе, состоящей из шприцевого насоса (B. Braun perfusor VI, 50ml, type 871222/O), силиконовой трубки и гамильтонового шприца (V = 250 мкл), заполненного раствором Рингера. Скорость протока раствора через указанную систему составляла 1 мкл/мин. Каждый образец диализата собирали в течение 20 минут (V=20 мкл). До введения препарата проводили сбор и анализ 3 образцов диализата с целью определения базального уровня дофамина и его метаболитов ДОФУК (дигидроксифенилуксусной кислоты) и ГВК (гомованилиновой кислоты). Далее следовало внутрибрюшинное введение метоприна (10 мг/кг) либо контрольного раствора (1%-ый раствор молочной кислоты в 1мл 0,9% NaCl). После инъекции метоприна проводили сбор 5 образцов диализата (за 5

последовательных 20-минутных интервалов). Полученный диализат анализировали на содержание дофамина, ДОФУК и ГВК с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления с электрохимической детекцией.

По окончании эксперимента животных декапитировали и проводили морфологический контроль для определения области локализации микродиализного зонда.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения STATISTICA 6.0. Сравнение средних величин в случае независимых выборок проводили по U-критерию Манна-Уитни или t-критерию Стьюдента, а в случае зависимых выборок по T-критерию Вилкоксона. Кроме того, использовали точный критерий Фишера и дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим применением критерия Ньюмана-Кеулса. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние тиоперамида на разряды пик-волна и поведение крыс WAG/Rij

Введение тиоперамида вызвало значительное увеличение количества разрядов пик-волна. При этом время начала усиления разрядов и длительность усиления зависели от дозы препарата (внутрибрюшинно (в/б) 5, 20 мг/кг; рис. 2Б). После введения тиоперамида в дозе 5 мг/кг увеличение количества разрядов пик-волна происходило в течение первых 30-ти минут, а затем следовало постепенное снижение. Усиление пик-волновой активности под влиянием более высокой дозы тиоперамида (20 мг/кг) возникало позже (во вторые 30 минут после введения), чем под влиянием низкой дозы (5 мг/кг). Повышенный уровень разрядов сохранялся в течение всего второго часа после введения 20 мг/кг тиоперамида.

Кроме повышения количества пик-волновых разрядов, введение тиоперамида привело также к увеличению средней длительности одиночного разряда. Однако статистически значимым этот эффект был только под влиянием более высокой дозы тиоперамида (20 мг/кг; данные не приведены).

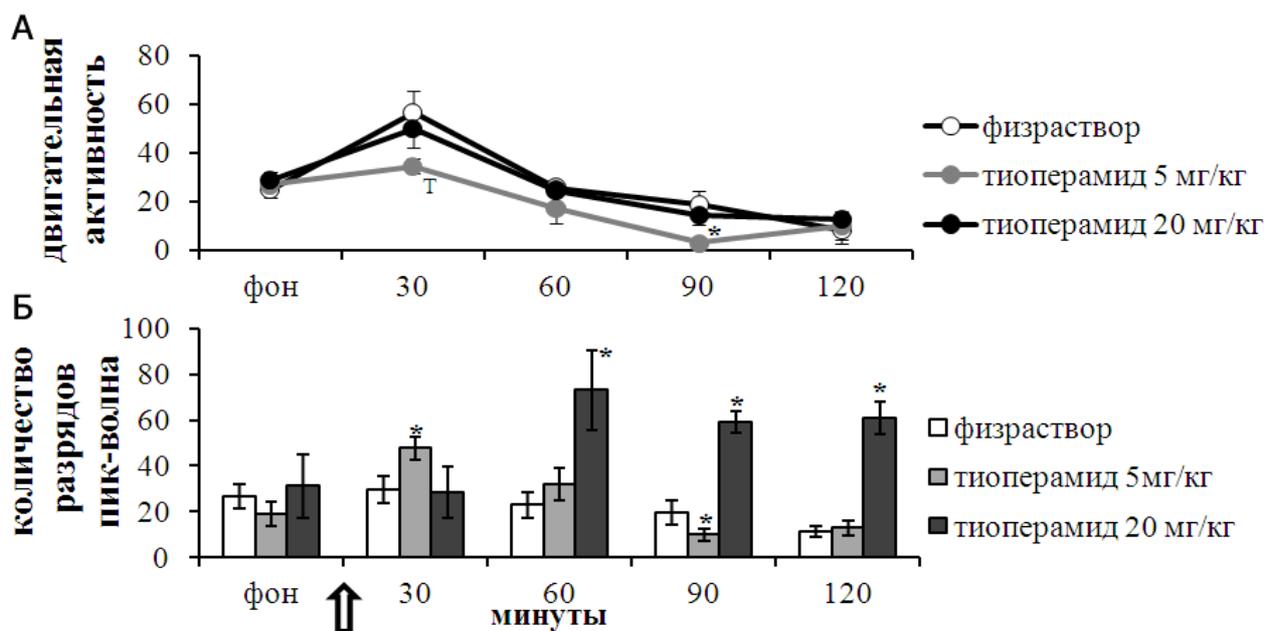


Рис. 2. Влияние тиоперамида на уровень общей двигательной активности (А; по оси ординат количество 10-секундных интервалов с преобладанием двигательной активности) и количество разрядов пик-волна (Б). В каждой группе n=6. * - $p < 0.05$, ^T - $p = 0.08$, по сравнению с физраствором.

Поведение крыс WAG/Rij под влиянием тиоперамида практически не изменилось. Наблюдалось только небольшое снижение суммарной длительности общей двигательной активности (локомоция + принюхивания + умывания) при низкой дозе тиоперамида (5мг/кг; рис. 2А).

Влияние метоприна на разряды пик-волна и поведение крыс WAG/Rij

Метоприн вызвал изменение уровня пик-волновой активности. Причем в зависимости от дозы препарата наблюдалось усиление или подавление разрядов (рис. 3Б). После введения 5мг/кг метоприна нарастание количества разрядов происходило в течение первого часа после инъекции, затем следовало постепенное снижение уровня пик-волновой активности. Метоприн в дозе 10 мг/кг в первые 30 минут после введения вызвал достоверное снижение количества разрядов пик-волна. Далее количество разрядов постепенно увеличивалось и к четвертому 30-минутному интервалу уровень пик-волновой активности при метоприне (10мг/кг) превышал таковой в контрольной группе (1%-ый раствор молочной кислоты). Совершенно другой эффект наблюдался после введения 20 мг/кг метоприна. Уже в первые 30 минут после инъекции

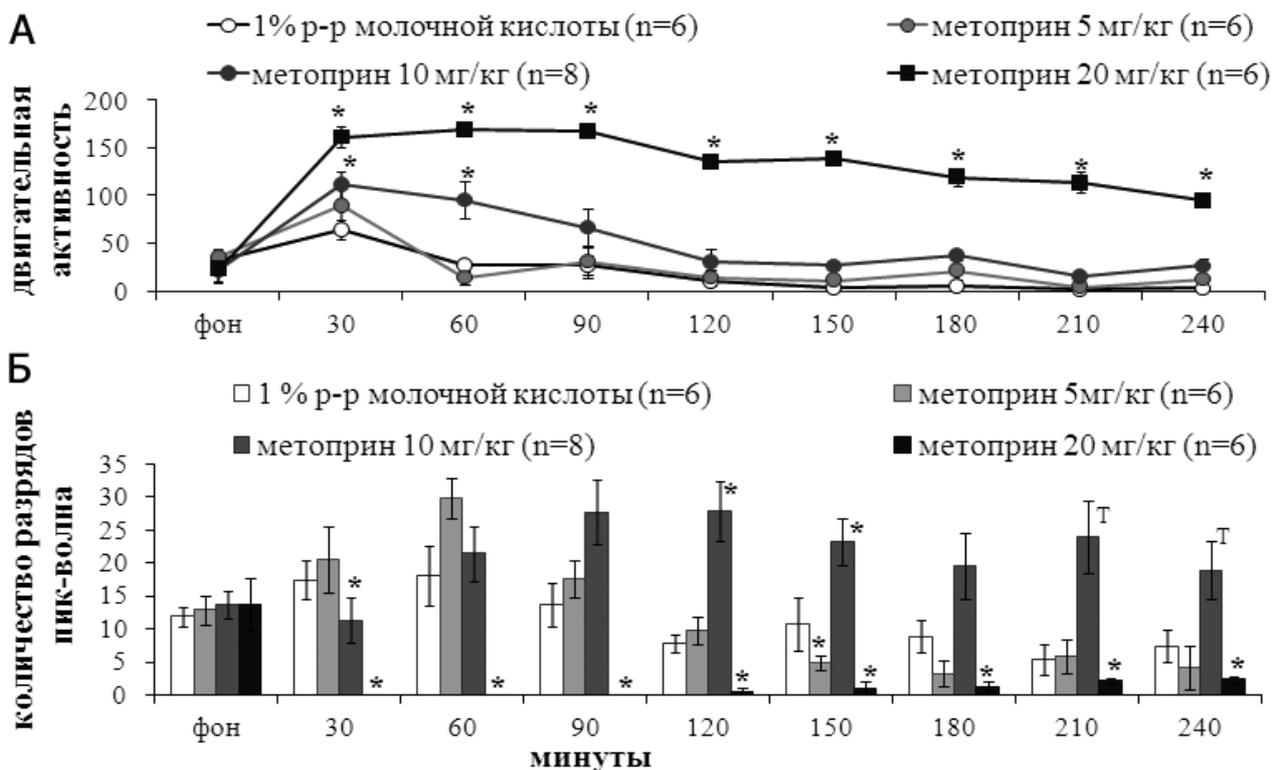


Рис. 3. Влияние метопролина на уровень общей двигательной активности (А; по оси ординат количество 10-секундных интервалов с преобладанием двигательной активности) и количество разрядов пик-волна (Б). * - $p < 0.05$, T - $p = 0.07$, по сравнению с 1% раствором молочной кислоты.

разряды полностью исчезли и стали вновь появляться только к третьему часу после введения.

Изменений средней длительности одиночного пик-волнового разряда под влиянием метопролина установлено не было.

Анализ поведения крыс WAG/Rij показал, что усиление пик-волновой активности (5 и 10 мг/кг метопролина) происходило на фоне сравнительно спокойного поведения животных (рис. 3А). Тогда как снижение количества разрядов в течение первых 30 минут после введения 10 мг/кг и четырех часов после введения 20 мг/кг метопролина сопровождалось сильной двигательной активацией (локомоцией и принохиваниями) крыс. Кроме того, неожиданно обнаружилось, что под влиянием метопролина (10 и 20 мг/кг) возникало стереотипное поведение, заключающееся в постоянных поворотах крысы при передвижении и ярко выраженных повторяющихся движениях головы в вертикальной плоскости.

Поскольку около 30 % популяции крыс WAG/Rij предрасположены не только к абсансной эпилепсии, но и к аудиогенным судорогам, возник вопрос о

том, будет ли отличаться эффект метоприна у субпопуляций крыс линии WAG/Rij. В отдельной серии электрофизиологических экспериментов было показано, что метоприн в дозе 20 мг/кг вызывает подавление пик-волновых разрядов у крыс WAG/Rij вне зависимости от их предрасположенности к аудиогенным судорогам (в каждой группе n=5). Сравнение влияния метоприна на двигательную активность у двух субпопуляций крыс WAG/Rij было проведено в специальной серии экспериментов с использованием теста «открытого поля».

Сравнение влияния метоприна на уровень двигательной активности у крыс линии WAG/Rij с чистой абсансной и смешанной (абсансной и аудиогенной) формой эпилепсии в тесте открытого поля

У крыс WAG/Rij со смешанной формой эпилепсии (n=5), также как и у крыс WAG/Rij с чистой абсансной эпилепсией (n=6) после введения метоприна (в/б 20 мг/кг) наблюдалась гиперлокомоция. Усиление локомоторной активности сопровождалось ярко выраженным стереотипным поведением тех же типов, что и в серии опытов с одновременной регистрацией ЭЭГ и поведения.

Кроме того, было проведено сравнение эффекта метоприна (20 мг/кг) у крыс линии WAG/Rij с контрольными крысами линии Wistar, не предрасположенными к абсансной эпилепсии. У крыс линии Wistar метоприн также вызывал достоверное усиление локомоторной активности (табл. 1).

Таблица 1. Изменение локомоторной активности у крыс линий WAG/Rij и Wistar под влиянием метоприна в дозе 20 мг/кг (данные в процентах от общей длительности регистрации поведения в тесте открытого поля)

	метоприн 20 мг/кг	1-% раствор молочной кислоты
WAG/Rij	64±8 *†	19±2†
Wistar	28±9 *	6±3

В каждой группе $n \geq 10$. Приведены усредненные данные за четыре последовательных интервала регистрации поведения в 1,2,3 и 4-й часы после инъекции (длительность каждого интервала двенадцать минут). * - $p < 0.05$ – для сравнения со своей контрольной группой (1-% раствор молочной кислоты); † - $p < 0.05$ – для сравнения с крысами линии Wistar.

возникновение стереотипии. При сравнении линий можно отметить, что локомоторная активность у крыс WAG/Rij была выше, чем у крыс Wistar как после введения метоприна, так и после введения контрольного вещества.

У крыс двух субпопуляций (предрасположенных и не предрасположенных к аудиогенной эпилепсии) линии Wistar в отличие от крыс двух субпопуляций линии WAG/Rij влияние метоприна (20 мг/кг) на поведение различалось. А именно у аудиогенных крыс Wistar после введения метоприна была достоверно увеличена суммарная длительность принохождений (данные не приведены).

Увеличение тканевого содержания гистамина в мозге крыс линий WAG/Rij и Wistar под влиянием метоприна

Метоприн (в/б 20 мг/кг) вызвал достоверное увеличение тканевого содержания гистамина в стриатуме, таламусе, гипоталамусе и гиппокампе крыс линий WAG/Rij (n=5) и Wistar (n=5). Полученные результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные других авторов о том, что под влиянием метоприна происходит существенное повышение уровня гистамина в головном мозге крыс [Hough et al., 1986; Itoh et al., 1991]. Кроме того, мы обнаружили, что эффект метоприна в стриатуме и таламусе у крыс линии Wistar был выражен сильнее ($325 \pm 39\%$ в стриатуме и $318 \pm 12\%$ в таламусе), чем у крыс линии WAG/Rij ($180 \pm 10\%$ в стриатуме и $170 \pm 4\%$ в таламусе). В контрольной группе (введение 1% раствора молочной кислоты) существенных отличий между линиями крыс выявлено не было.

Влияние метоприна на уровень внеклеточного дофамина в стриатуме крыс линии WAG/Rij

На основании данных о возникновении под влиянием более высоких доз метоприна выраженного стереотипного поведения у крыс возникло предположение об активации дофаминергической системы в этих условиях. С целью проверки этого предположения было проведено измерение уровня внеклеточного дофамина в стриатуме крыс линии WAG/Rij.

С помощью метода внутримозгового микродиализа и последующего хроматографического анализа диализных проб было показано, что метоприн (в/б 10 мг/кг, n=6) вызывает достоверное повышение уровня внеклеточного

дофамина в дорсальном стриатуме крыс WAG/Rij. Существенное увеличение концентрации дофамина (144 ± 19 % от базального уровня, $p < 0.05$) наблюдалось уже в первые 20 минут после введения метоприна. Во вторые 20 минут после введения уровень дофамина оставался повышенным (159 ± 24 %, $p = 0.05$), а затем следовало постепенное снижение. Повышение уровня дофамина в стриатуме в течение сорока минут после введения метоприна соответствует по времени периоду ярко выраженного стереотипного поведения, вызванного данной дозой препарата у крыс WAG/Rij.

Внеклеточное содержание метаболитов дофамина (ДОФУК и ГВК) в стриатуме крыс WAG/Rij после введения метоприна существенно не изменилось.

Влияние антагониста H1 гистаминовых рецепторов, пирирамина, на антиабсансный эффект высокой дозы метоприна

Данная серия экспериментов была проведена для того, чтобы оценить участие H1 рецепторов в таких эффектах высокой дозы метоприна, как подавление пик-волновых разрядов и усиление двигательной активности у крыс WAG/Rij.

Сам по себе пирирамин не оказывал существенного влияния на уровень пик-волновой активности и поведение крыс.

Предварительное введение пирирамина (в/б 20 мг/кг, за 30 минут до метоприна) не привело к ослаблению эффекта подавления пик-волновых разрядов, вызванного метоприном (в/б 20 мг/кг). И даже наоборот, подавление пик-волновых разрядов под влиянием пирирамина и метоприна было более длительным, чем после введения метоприна без предварительной инъекции пирирамина (рис. 4Б).

Кроме того, пирирамин продлил стереотипное поведение и усиление двигательной активности (локомоции и принюхиваний), вызванные метоприном (рис. 4А).

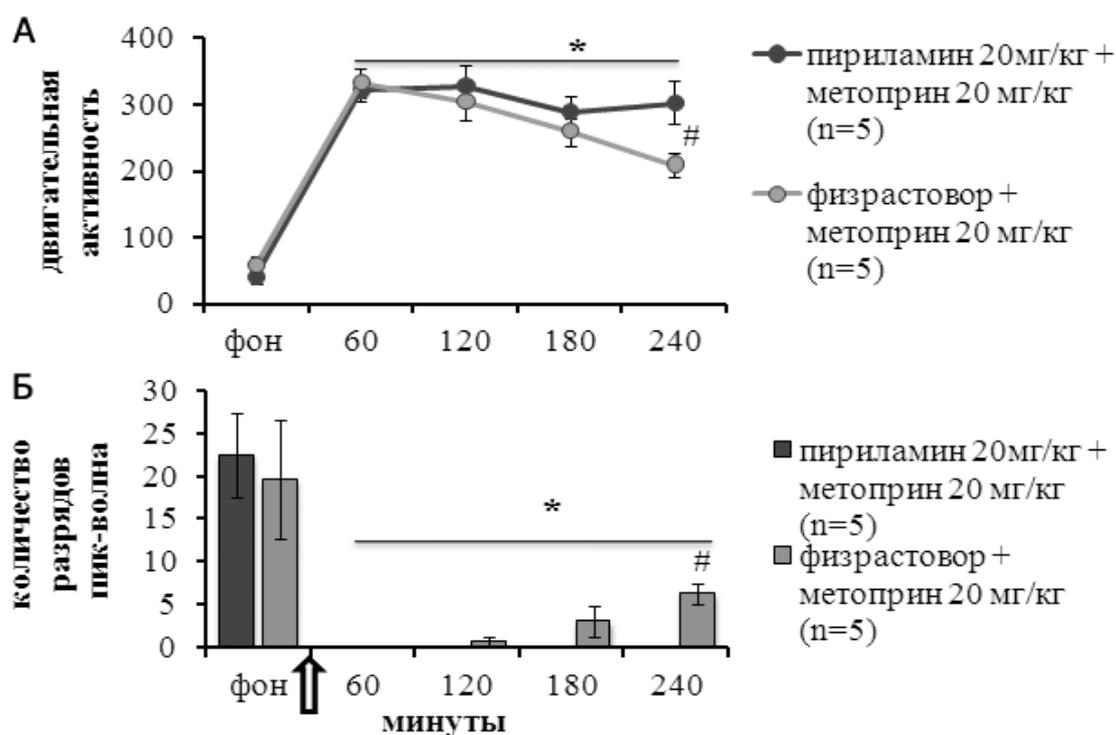


Рис. 4. Влияние пирамина на изменение уровня общей двигательной активности (А; количество 10-секундных интервалов с преобладанием двигательной активности) и на изменение количества разрядов пик-волна (Б), вызванные метоприном. * - $p < 0.05$, по сравнению с фоном; # - $p < 0.05$, по сравнению с группой «пирирамин + метоприн».

Влияние пирамина на усиление пик-волновой активности, вызванное галоперидолом

В связи с тем, что пирирамин усиливает такие эффекты метоприна как: подавление пик-волновых разрядов, двигательная активация и стереотипное поведение, можно предположить, что пирирамин потенцирует действие метоприна на дофаминергическую систему. Если это предположение верно, то пирирамин, вероятно, будет влиять и на эффект антагонистов дофаминовой системы. Известно, что антагонисты дофаминовых рецепторов вызывают усиление пик-волновой активности у крыс WAG/Rij [Midzianovskaia et al., 2001]. Целью данной серии экспериментов было оценить влияние пирамина на усиление пик-волновой активности, вызванное антагонистом дофаминовых рецепторов второго типа, галоперидолом.

Как и ожидалось, пирирамин (в/б 20 мг/кг, за 30 мин до галоперидола) значительно ослабил эффект усиления пик-волновой активности, вызванный галоперидолом (в/б 1 мг/кг; рис. 5).

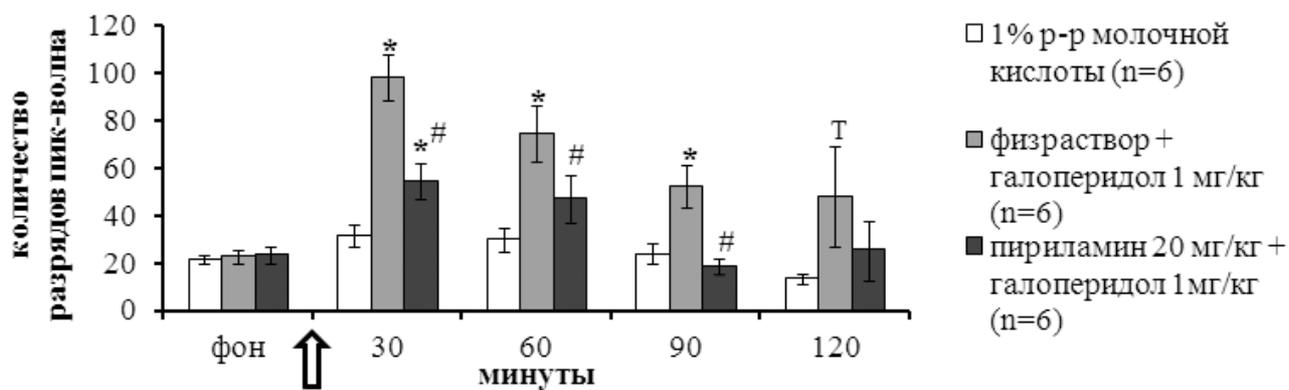


Рис. 5. Снижение эффекта галоперидола под влиянием пириламина. * - $p < 0.05$, ^T - $p = 0.06$, по сравнению с контрольной группой (1% р-р молочной кислоты); # - $p < 0.05$, по сравнению с группой «физраствор + галоперидол». Стрелкой отмечено введение галоперидола.

Внутрикорковые микроинъекции (дополнительные эксперименты)

Во всех предыдущих экспериментах препараты вводили системно. Однако системное введение вещества вызывает изменения тех или иных характеристик во многих отделах центральной нервной системы, что усложняет интерпретацию полученных результатов. Известно, что локальное введение одного и того же препарата в разные структуры мозга может вызывать противоположные эффекты. Эксперименты с локальным введением веществ в головной мозг крыс линии WAG/Rij были запланированы в данной работе, но на этапе проведения контрольных микроинъекций в кору мозга нами были получены неожиданные и интересные результаты.

Выяснилось, что само по себе введение инъекционной канюли в кору мозга вызывает волну распространяющейся депрессии (РД), за которой следует длительное (по крайней мере, до 90 минут) снижение уровня пик-волновой активности у крыс WAG/Rij. В тех случаях, когда введение канюли не запускало РД, количество разрядов пик-волна существенно не изменялось. Учитывая то, что и в повторных экспериментах процент инициации РД оставался высоким ($\geq 50\%$), для адекватного анализа уровня пик-волновой активности после проведения внутримозговых микроинъекций представляется необходимым контроль возникновения волны распространяющейся депрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о сложной дозозависимости действия гистаминовых препаратов на пик-волновую активность у крыс линии WAG/Rij. С увеличением доз тиоперамида (обратного агониста H3 ауторецепторов) и метоприна (ингибитора фермента деградации гистамина) к их основному действию, усилению пик-волновых разрядов, добавился эффект снижения количества разрядов. Проследить динамику изменения уровня эпилептической активности в зависимости от дозы используемых веществ нам позволило свойство спонтанного возникновения (с довольно высокой частотой на протяжении суток) разрядов пик-волна у крыс генетических моделей абсансной эпилепсии [Coenen et al., 1991]. Возможность определения изменяющегося во времени влияния гистаминергических препаратов на спонтанную эпилептическую активность является особенностью настоящего исследования. В большинстве известных нам работ других авторов оценка изменения уровня пароксизмальной активности (вызванной химическим или электрическим воздействием) проводилась только в отдельные моменты времени после введения гистаминовых веществ [Kamei, 2001; Scherkl et al., 1991; Zhang et al., 2003].

Сложная динамика изменения количества пик-волновых разрядов, обнаруженная в наших экспериментах, может быть следствием активации под воздействием гистаминергических препаратов не только гистаминовой, но и дофаминовой системы мозга. Данное предположение основано на наблюдении за поведением крыс во время записи ЭЭГ. Под влиянием метоприна происходило существенное изменение поведенческой активности животных. А именно метоприн вызывал двигательную активацию и стереотипию, которые сопровождалась снижением количества разрядов пик-волна. С помощью метода внутримозгового микродиализа удалось установить, что указанная двигательная активация и стереотипное поведение совпадали по времени с повышением уровня дофамина в стриатуме у крыс WAG/Rij. Последние результаты стали подтверждением нашего предположения о вовлечении дофаминергической системы в действие метоприна на пик-волновую активность.

Авторы большинства известных нам исследований связывают действие метоприна и тиоперамида на эпилептическую активность с их влиянием на

уровень гистамина в мозге [Harada et al., 2004; Tuomisto et al., 1987; Yokoyama et al., 1992, 1993]. Тиоперамид, являясь обратным агонистом гистаминовых H₃-ауторецепторов, усиливает синтез и высвобождение гистамина из аксонных утолщений гистаминергических нейронов [Arrang et al., 1987]. Метоприн вызывает увеличение уровня гистамина в мозге за счет ингибирования фермента его деградации (гистамин-N-метилтрансферазы) [Hough et al., 1986]. Увеличение концентрации внеклеточного гистамина может оказывать действие на epileptическую активность на разных уровнях ЦНС, поскольку проекции гистаминергических нейронов присутствуют практически во всех отделах мозга.

Сходство влияния метоприна и тиоперамида на уровень пик-волновой активности свидетельствует в пользу того, что наблюдаемые нами изменения количества разрядов отражают влияние указанных препаратов на уровень гистамина в мозге крыс WAG/Rij. Важно отметить, что обнаруженное нами под влиянием тиоперамида и метоприна усиление пик-волновой активности абсансной эпилепсии противоположно эффекту ослабления судорожных приступов, наблюдаемому другими авторами на моделях конвульсивной эпилепсии [Kamei, 2001; Harada et al., 2004; Yokoyama et al., 1992, 1993]. В основе эффекта ослабления конвульсивной активности под влиянием веществ, увеличивающих уровень гистамина, в том числе тиоперамида и метоприна, может лежать усиление ГАМКергической системы мозга. Показано, что гистамин оказывает воздействие на ГАМКергическую систему за счет влияния на высвобождение основного тормозного нейротрансмиттера [Soria-Jasso, Arias-Montaño, 1996; Waśkiewicz, Rafałwska, 1992], а также за счет потенциации действия ГАМК на ГАМК-А рецепторы [Okuma et al., 2001; Saras et al., 2008]. Следует подчеркнуть, что в отличие от конвульсивной формы пароксизмальной активности усиление ГАМК системы при абсансной эпилепсии приводит к увеличению количества и средней длительности пик-волновых разрядов [Coenen et al., 1995; Peeters et al., 1989]. Таким образом, эффект тиоперамида и метоприна, выражающийся в усилении пик-волновой активности у крыс WAG/Rij в нашем исследовании, может быть, по крайней мере, отчасти, следствием активации ГАМКергической системы.

Однако, как уже упоминалось, при увеличении доз метоприна (10 мг/кг) и тиоперамида (20 мг/кг) кроме увеличения количества разрядов мы наблюдали

также и снижение уровня пик-волновой активности у крыс WAG/Rij. Последний эффект выражался в том, что усиление разрядов под воздействием более высоких доз метоприна и тиоперамида наступало позже, чем при введении низких доз (5 мг/кг). А при увеличении дозы метоприна до 20 мг/кг преобладал, очевидно, эффект снижения уровня пик-волновой активности и мы наблюдали подавление разрядов в течение как минимум трех часов. Это может быть связано с влиянием гистаминергических препаратов на активность других нейромодуляторных систем. Из литературных данных известно, что тиопирамид вызывает увеличение уровня внеклеточного дофамина в стриатуме у крыс [Сорокин, 2004]. В свою очередь, в наших экспериментах на крысах WAG/Rij было показано, что введение метоприна также приводит к повышению концентрации внеклеточного дофамина в стриатуме. Известно, что введение агонистов дофаминовых рецепторов первого и второго типа крысам линий, представляющих генетическую модель абсансной эпилепсии, вызывает подавление пик-волновых разрядов [Deransart et al., 2000]. Указанное действие дофаминовых агонистов может осуществляться за счет их влияния на активность нейронов, посылающих проекции из стриатума в ретикулярную часть черной субстанции, ГАМКергические нейроны, которой, как было показано, участвуют в регуляции пик-волновой активности [Depaulis, 1990]. Таким образом, наблюдаемое в наших экспериментах при использовании более высоких доз метоприна и тиоперамида снижение пик-волновой активности может быть следствием увеличения уровня дофамина в стриатуме крыс WAG/Rij. Тем не менее, нельзя исключать участие в осуществлении этого эффекта других нейромедиаторных и нейромодуляторных систем мозга.

Значительное снижение разрядов пик-волна, наблюдаемое нами у крыс WAG/Rij во время сильной двигательной активации, вызванной метоприном (в течение первых сорока минут после введения 10 мг/кг и четырех часов после 20 мг/кг), соответствует литературным данным, по которым только 9% разрядов пик-волна возникает во время активного бодрствования [Drinkenburg et al., 1991]. Усиление локомоторной активности под влиянием метоприна может быть связано с увеличением уровня эндогенного гистамина [Kitanaka et al., 2007; Sakai et al., 1992]. Однако введение тиоперамида не вызвало изменения суммарной длительности локомоции у крыс WAG/Rij. Несоответствие влияния метоприна и тиоперамида на локомоторную активность может быть следствием

различия механизмов действия этих препаратов. Метоприн, ингибируя гистамин-N-метилтрансферазу, вызывает увеличение уровня гистамина и снижение уровня его метаболита (теле-метилгистамина) в мозге. В свою очередь, тиоперамид снижает спонтанную активность H3 ауторецепторов и таким образом усиливает синтез и высвобождение гистамина. Под влиянием тиоперамида происходит повышение уровня теле-метилгистамина. Кроме того, тиоперамид связывается с H3 гетерорецепторами и постсинаптическими H3 рецепторами [Vrabant et al., 2009]. Известно, что усилению локомоторной активности способствует активация дофаминовой системы базальных ганглиев [Pennartz et al., 1994]. Выше уже было высказано предположение о вовлечении дофаминергической системы в эффекты гистаминовых препаратов. Возможно, эффект усиления локомоции под влиянием метоприна связан с более сильным, по сравнению с тиоперамидом, воздействием на дофаминергическую систему. Обнаружение стереотипного поведения у крыс после введения метоприна в наших экспериментах служит подтверждением этого предположения. Следует отметить, что другие авторы не сообщали о возникновении стереотипного поведения под влиянием метоприна. Нам известны только данные, в соответствии с которыми метоприн модулирует стереотипное поведение, вызванное метамфетамином у мышей [Kitanaka et al., 2007].

Влияние гистамина на уровень дофамина в мозге, согласно литературными данными, опосредовано H1 гистаминовыми рецепторами [Dringenberg et al., 1998; Galosi et al., 2001]. В нашей работе антагонист H1 рецепторов, пириламин, продлил эффекты подавления разрядов пик-волна и усиления поведенческой активности, вызванные введением метоприна крысам WAG/Rij. Таким образом, пириламин усилил влияние метоприна на дофаминергическую систему. Эти результаты подтверждают данные Galosi и соавт. [Galosi et al., 2001], которые показали, что при введении как гистамина (естественного агониста H1 рецепторов), так и пириламина в прилежащем ядре может наблюдаться увеличение концентрации внеклеточного дофамина. Однако механизм этого воздействия пока не известен.

Пириламин достоверно снизил усиление пик-волновой активности у крыс WAG/Rij, вызванное введением галоперидола, антагониста дофаминовых рецепторов второго типа. Этот результат свидетельствует в пользу предположения об активирующем действии пириламина на

дофаминергическую систему. Тем не менее, сам по себе пириламид (20 мг/кг) в целом не изменил уровень пик-волновых разрядов у крыс WAG/Rij.

Предполагая возможное влияние факторов генетической предрасположенности к абсансной и/или аудиогенной эпилепсии, мы провели сравнение эффектов метоприна у двух субпопуляций (аудиогенных и неаудиогенных) крыс линий WAG/Rij и Wistar. Различие, обнаруженное между линиями крыс, заключалось в том, что эффект повышения тканевого содержания гистамина под влиянием метоприна в стриатуме и таламусе у крыс линии WAG/Rij был выражен значительно слабее, чем у крыс линии Wistar. Полученные результаты могут быть следствием того, что у крыс линий WAG/Rij и Wistar в стриатуме и таламусе существуют различия в скорости метаболизма гистамина. С другой стороны, пониженная скорость «накопления» гистамина после ингибирования фермента его деградации может быть результатом более высокой плотности H3 ауторецепторов в этих структурах мозга у крыс линии WAG/Rij.

Сравнение эффектов метоприна у крыс двух субпопуляций линии WAG/Rij не выявило существенных отличий. А при сравнении аудиогенных крыс линий WAG/Rij и Wistar удалось обнаружить, что если для аудиогенных крыс WAG/Rij характерным поведением после введения метоприна была гиперлокомоция, то у аудиогенных крыс Wistar преобладали постоянные (навязчивые) принохивания. Учитывая влияние метоприна на уровень дофамина в мозге, можно предположить, что гиперлокомоция и навязчивые принохивания являются разными проявлениями активации мезолимбической дофаминергической системы [de Bruin et al., 2001; Schulz et al., 1981].

ВЫВОДЫ

1. Тиоперамид (5, 20 мг/кг) и метоприн (5, 10 мг/кг), вещества с помощью разных механизмов повышающие уровень эндогенного гистамина в мозге, вызывают дозозависимое усиление пик-волновой активности абсансной эпилепсии у крыс линии WAG/Rij. Отмечено сходство динамики изменения количества разрядов пик-волна при указанных дозах препаратов.
2. В более высокой дозе метоприн (20 мг/кг) оказывает противоположное действие, а именно вызывает длительное подавление пик-волновых разрядов у крыс WAG/Rij.

3. Усиление пик-волновых разрядов, вызванное тиоперамидом или метоприном (при более низких дозах), сопровождается нормальным, сравнительно спокойным поведением крыс WAG/Rij, тогда как снижение количества разрядов пик-волна под влиянием метоприна происходит на фоне сильной двигательной активации крыс.
4. Влияние метоприна (20 мг/кг) на уровень пик-волновых разрядов и на локомоторную активность не отличается у двух субпопуляций крыс линии WAG/Rij – с чистой абсансной и смешанной (абсансной и аудиогенной) эпилепсией.
5. Впервые показано, что метоприн, ингибитор фермента деградации гистамина, вызывает стереотипное поведение как у крыс двух субпопуляций линии WAG/Rij, так и у аудиогенных и неаудиогенных крыс линии Wistar.
6. Сравнение тканевого содержания гистамина в мозге у крыс линий WAG/Rij и Wistar показало, что метоприн вызывает достоверное увеличение уровня гистамина в стриатуме, таламусе, гипоталамусе и гиппокампе крыс обеих линий. Однако эффект увеличения уровня гистамина в стриатуме и таламусе у крыс линии Wistar выражен сильнее, чем у крыс линии WAG/Rij. Эти результаты указывают на то, что у крыс линий WAG/Rij и Wistar в стриатуме и таламусе существуют различия в скорости метаболизма гистамина.
7. Методом внутримозгового микродиализа показано, что метоприн повышает концентрацию внеклеточного дофамина в стриатуме у крыс линии WAG/Rij. Увеличение уровня дофамина в стриатуме по времени совпадает с периодом ярко выраженного стереотипного поведения у крыс. Активация дофаминергической системы может лежать в основе подавления пик-волновых разрядов, наблюдаемого под влиянием высокой дозы метоприна (20 мг/кг).
8. Антагонист Н1 рецепторов, пирирамин, продлевает эффект подавления пик-волновых разрядов, вызванный метоприном, и снижает усиление разрядов пик-волна, вызванное галоперидолом. Эти результаты свидетельствуют об активации дофаминергической системы мозга под влиянием пирирамина.
9. Наблюдаемые при действии гистаминовых препаратов специфические эффекты, а именно: сложная динамика изменения уровня пик-волновой активности, возникновение стереотипного поведения, повышение уровня дофамина в стриатуме и снижение вызванного галоперидолом усиления разрядов пик-волна у крыс WAG/Rij, указывают на взаимодействие

гистаминовой и дофаминовой нейромодуляторных систем в регуляции пароксизмальной активности при абсансной эпилепсии.

Публикации автора по материалам диссертации:

1. Габова А.В., Гнездицкий В.В., Боснякова Д.Ю., Жарикова А.В., Самотаева И.С., Обухов Ю.В., Кузнецова Г.Д. Частотно-временная динамика разрядов «пик-волна» у пациентов с абсансной эпилепсией. Технологии живых систем. 2008.Т.5. №5-6. С.72-81.
2. Самотаева И.С. Влияние тиоперамида, обратного агониста H3 гистаминовых рецепторов, на разряды пик-волна крыс линии WAG/Rij. Фундаментальные исследования. 2010. №10. С. 9-17.
3. Samotaeva I.S., Kuznetsova G.D., Tuomisto L. Immediate and delayed effects of metoprine injection in WAG/Rij rats. EHRS-2008 (37th meeting of European Histamine Research Society, Stockholm). Abstracts. O4. P.31.
4. Gabova A., Kuznetsova G., Samotaeva I., Bosnyakova D., Obukhov Y., Gnezditski V., Coenen A., van Luijtelaaar G. Coexistence of two types nonconvulsive discharges in absence epilepsy patients and genetic absence epilepsy WAG/Rij rats. Epilepsia. 2010. Vol.51. SI Suppl. 4.P.130.
5. I.S. Samotaeva, G. van Luijtelaaar, G. D. Kuznetsova, L.V. Vinogradova. Simple experimental manipulation can cause a spreading depression wave and as a result suppression of absence seizures. FENS-2010 (7th Forum of European Neuroscience). Abstr., vol.5, 106.37.
6. Irina S. Samotaeva, Lyudmila V. Vinogradova. Simple experimental manipulation can cause a spreading depression wave and as a result suppression of absence seizures. Shaping spike-wave discharges: genetic and epigenetic factors. Conf. with internation. particip.-М.: Изд. дом «Русский врач», 2010. С.23-26.