

# ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СУДОРОЖНОЙ ГОТОВНОСТЬЮ И СОДЕРЖАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЖИВОТНЫХ

Савченко В.Н., Максименко Е.Г.

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## РЕЗЮМЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что у крыс с высокой генетически детерминированной судорожной готовностью, по сравнению с крысами других групп, отмечается снижение уровня норадреналина (НА) в гипоталамусе и стволе мозга, а в полушариях, стволе мозга и мозжечке существенно повышено содержание дофамина (ДА). Статистически достоверно также снижался уровень тирозина в стволе и мозжечке. Это дает основания предполагать, что повышение судорожной готовности корреляционно связано с процессами, оказывающими влияние на систему катехоламинов, так и серотонина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** серотонин, триптофан, норадреналин, дофамин, фенилкетонурия, судорожная готовность

## ВВЕДЕНИЕ

В серии экспериментов, целью которых являлось изучение взаимосвязи между судорожной готовностью и содержанием биологически активных веществ в мозге животных, была использована модель аудиогенной эпилепсии. Эксперименты выполнены на белых лабораторных крысах линии Крушинского-Молодкиной с высокой аудиогенной судорожной готовностью, беспородных крысах, отобранных по уровню судорожной готовности.

Сравнительный анализ полученных в эксперименте данных, свидетельствует, что головной мозг высоковозбудимых линейных крыс характеризуется дефицитом СТ (серотонин), НА (норадреналин; 3,4-диоксифенилксиэтиламин) и превалированием ДА (дофамин). Возможно, что повышение судорожной готовности корреляционно связано с процессами, оказывающими влияние на систему КА (катехоламины) и СТ.

В этих условиях возможно преимущественное направление метаболизма фенилаланина в сторону повышенного образования ингибиторов декарбоксилазной активности.

Установленная взаимосвязь между метаболизмом фенилаланина и содержанием биологически активных веществ в головном мозге может объяснить, почему фенилкетонурия часто сопровождается развитием эпилептиформных процессов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения взаимосвязи между судорожной готовностью и содержанием БАВ (биологически активных веществ) в мозге животных мы воспользовались широко при-

меняемой в экспериментальной практике моделью аудиогенной эпилепсии. Данная модель, в отличие от многих других (фармакологические воздействия, пенициллиновая, кобальтовая, электрошоковая и др. модели эпилепсии), является особенно удобной для исследования нейрохимических особенностей мозга, обуславливающих его высокую судорожную готовность, так как дает возможность изучить мозг до возникновения судорог и тем самым исключить сомнение, что наблюдающиеся изменения в биохимическом статусе являются следствием приступов, а не предшествуют таковым. Кроме того, очень важно, что аудиогенные судорожные припадки имеют много общих признаков с эпилептическими припадками у людей [5].

Данная серия экспериментов выполнена на белых лабораторных крысах линии Крушинского-Молодкиной с высокой аудиогенной судорожной готовностью, а также беспородных крысах, предварительно отобранных по уровню судорожной готовности, согласно методике, описанной в литературе [2, 4, 5].

Отбор животных по уровню судорожной готовности производили в металлической камере размером 80\*40\*30 см с крышкой из органического стекла. В качестве звукового раздражителя использовали звучание электрического звонка. Длительность звука была 120 с, громкость на уровне пола камеры равнялась 96 дБ. Реакцию животных оценивали в баллах по следующей шкале: 0 баллов - отсутствие двигательного возбуждения и судорожной реакции, 1 балл - вздрагивания и незначительная беговая реакция, 2 балла - выраженная беговая реакция, заканчивающаяся падением животного на живот, 3 бал-

ла - выраженное двигательное возбуждение, заканчивающееся падением животного на бок и клоническими судорогами, 4 балла - судорожный припадок с тоническим напряжением всей мускулатуры.

Из тестированных животных мы сформировали две группы: 1-я группа - животные с высоким порогом аудиогенных судорог (0 баллов, контроль) и 2-я группа - животные с выраженной эпилептиформной реакцией и, соответственно, высокой аудиогенной судорожной готовностью (3-4 балла). Животных использовали для биохимических исследований не ранее, чем через две недели после определения судорожной готовности.

## БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Животных забивали путем декапитации, мозг быстро извлекали и на холоду разделяли на отделы - полушария, гипоталамус, ствол (продолговатый мозг варолиев мост) и мозжечок. Ткань взвешивали, размельчали и тщательно растирали в 0,4 М  $\text{HClO}_4$  в соотношении 1:10. Гомогенаты выдерживали 60 минут при 4  $^{\circ}\text{C}$ , затем центрифугировали в течение 5 мин. при 3000 об/мин. при температуре 0  $^{\circ}\text{C}$ . Надосадочную жидкость переносили в пробирки и доводили до pH 5-6 с помощью 2 N KOH (на холоду). Вторично центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин. и температуре 0  $^{\circ}\text{C}$ . Для определения аминов и некоторых аминокислот в экстрактах мы воспользовались методом Endo и Oguга, применявшим для разделения аминокислот и аминов колонку из карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Метод Endo и Oguга позволяет в одной пробе определить тирозин, ДОФА (3,4-диоксифенилаланин), А (адреналин; 3,4-диоксифенилоксиметилэтилмин), НА, ДА, тирамин, триптамин и ряд других соединений, обладает высокой чувствительностью и сравнительной простотой.

Разделение проводили на КМЦ типа CM-52 фирмы Whatman Biochemical (Англия). КМЦ-колонку (0,6 \* 10 см) уравнивали 0,01 М фосфатным буфером (pH 6,2) и наносили нейтрализованный тканевой экстракт в количестве 1-4 мл. Элюцию проводили при комнатной температуре буфером 1 (0,01 М фосфатный буфер, pH 6,2) и буфером 2 (0,03 М фосфатный буфер, pH 6,2). Буфер 1 (фракция 15 мл) элюировал тирозин, ДОФА; буфер 2 (фракция 15 мл) элюировал А, НА, ДА, тирамин, мет-А и мет-НА, лизин, гистидин и аргенин.

Аминокислоты и некоторые амины определяли флуорометрически по собственной люминесценции на спектрофлуорометре МПФ-4А Хитачи (щели первичного и вторичного монохроматоров устанавливали на величинах,

не превышающих 3 нм). Для анализа использовали следующие длины волн ( $\lambda_1$  - длина волны возбуждения и  $\lambda_2$  - длина волны люминесценции): тирозин  $\lambda_1=285$  нм,  $\lambda_2=315$  нм.

ДОФА, ДА, НА, А окисляли по методу Carlsson и Waldeck [8] в модификации, описанной С. Юденфренд. При этом образуется специфический стабильный в течение 24 часов флуорохром. В данных условиях ДОФА и ДА дают идентичные по спектральным характеристикам ( $\lambda_1=330$  нм,  $\lambda_2=375$  нм) флуорохромы, однако, взаимно не искажают результаты, так как находятся в различных фракциях элюата. А, НА и эпинен (N - метилированный ДА) также не искажают результаты, так как их флуоресценция при данных длинах волн не отличается от контроля (окисленного буфера). А и НА образуют флуорофоры с иными спектральными характеристиками, а именно: для НА  $\lambda_1=395$  нм,  $\lambda_2=485$  нм, для А  $\lambda_1=445$  нм,  $\lambda_2=490$  нм.

В качестве стандартов были использованы следующие препараты: тирозин, триптофан и ДОФА фирмы BDH (Англия), ДА-гидрохлорид фирмы Fluka AG (Швейцария), НА-гидрохлорид и А-гидрохлорид производства Харьковского завода эндокринных препаратов.

Кроме того, была проведена адсорбция аминокислот и аминов на КМЦ не только в хроматографических колонках, но и в пробирках. С этой целью в центрифужную пробирку помещали 1,25 г КМЦ, предварительно уравновешенной с 0,01 М фосфатным буфером (pH 6,2). В пробирку вносили 4 мл нейтрализованного тканевого экстракта, тщательно перемешивали, оставляли на 15 минут при комнатной температуре, центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали. Элюцию проводили при комнатной температуре теми же буферными растворами, что и при комнатной температуре теми же буферными растворами, что и при работе с КМЦ-колонкой. Для этого к КМЦ добавляли соответствующий буфер, тщательно перемешивали и оставляли на 15 мин. Пробирки центрифугировали в течение 5 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали и использовали для последующего флуорометрического анализа.

Контрольные эксперименты показали, что использованный нами метод позволил адсорбировать на КМЦ (как на колонке, так и в пробирках) практически 100% исследуемых веществ, элюция также происходила достаточно полно (определялось 83-90% добавленного вещества).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Во всех исследованных нами областях мозга и группах животных содержание ДОФА и А было очень низким и находилось в пределах ошибки метода. В связи с этим в таблице цифровые данные относительно уровня этих соединений не представлены и в дальнейшем не обсуждаются.

Как видно из таблицы 1 и рис. 1-4, у крыс с высокой генетически детерминированной судорожной готовностью (линия КМ), по сравнению с крысами группы Н, отмечено снижение уровня НА в гипоталамусе (на 40-50%,  $p < 0,01$ ) и стволе мозга (на 40-50%,  $p < 0,05$ ). У этих же животных в полушариях, стволе мозга и мозжечке отмечено существенное повышение (в 5-6 раз,  $p < 0,01 + 0,001$ ) уровня ДА. В стволовой части мозга и моз-

жечке статистически достоверно был снижен также уровень тирозина ( $p < 0,01 + 0,02$ ).

У крыс с высокой аудиогенной судорожной готовностью (группа В), по сравнению с крысами группы Н, в стволе и мозжечке значительно (в 1,5-3,0 раза,  $p < 0,01 + 0,001$ ) снижен уровень НА. У этих же животных наблюдалось изменение распределения в мозге ДА - в гипоталамической области его уровень снижен ( $p < 0,01$ ), а в мозжечке повышен ( $p < 0,001$ ).

Об относительном увеличении (по отношению к тирозину) уровня ДА и снижении (по отношению к ДА) содержания НА в мозге животных с высокой судорожной готовностью свидетельствуют и рассчитанные нами из экспериментальных данных коэффициенты  $K_2 = \text{тирозин/дофамин}$  и  $K_3 = \text{дофамин/норадреналин}$  (табл. 2).

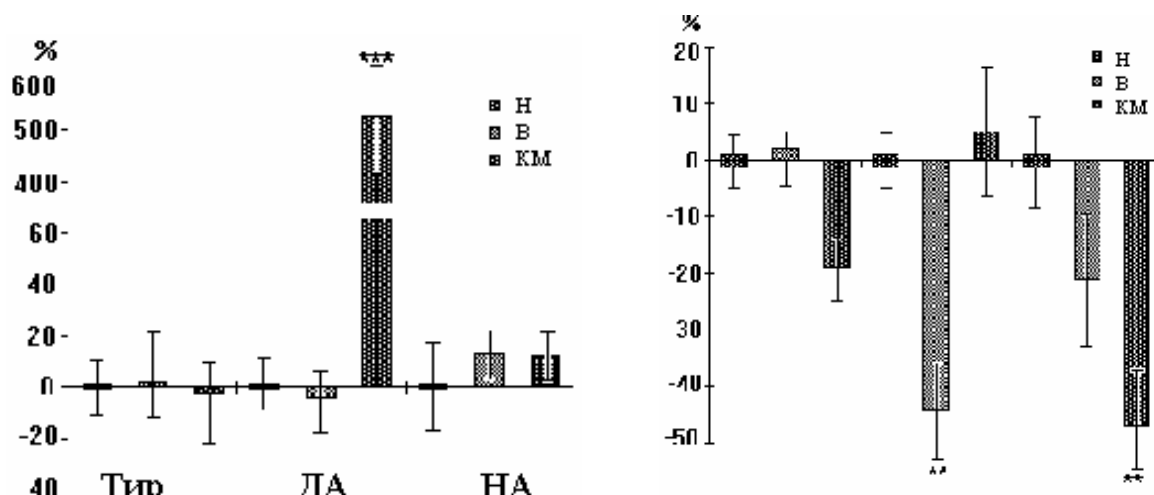
Таблица 1

Содержание тирозина, дофамина и норадрена (нМ/г) в различных участках головного мозга крыс с низкой (Н) и высокой (В) аудиогенной судорожной готовностью, а также крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ)

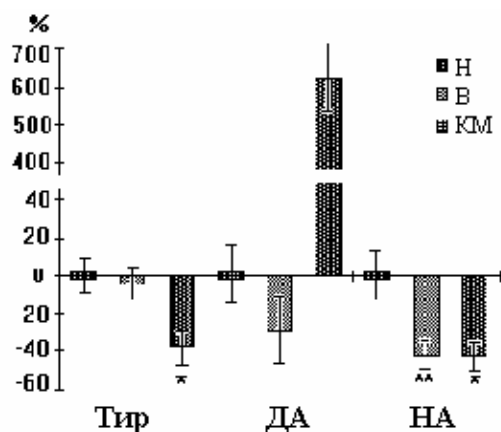
Область мозга	Substance	Группа животных				
		Н нМ/г	В нМ/г	Р (В-Н)	КМ нМ/г	Р (КМ-Н)
Полушария	Тирозин	0.61 ± 0.05	0.62 ± 0.01	> 0.05	0.58 ± 0.07	> 0.05
	Дофамин	0.54 ± 0.04	0.05 ± 0.13	> 0.05	2.74 ± 0.52	< 0.001
	НА	1.75 ± 0.29	2.20 ± 0.35	> 0.05	2.19 ± 0.41	> 0.05
Гипоталамус	Тирозин	2.96 ± 0.25	2.99 ± 0.18	> 0.05	2.41 ± 0.15	> 0.05
	Дофамин	21.90 ± 2.4	12.60 ± 1.6	< 0.01	22.98 ± 3.53	> 0.05
	НА	11.60 ± 1.50	9.2 ± 1.1	> 0.05	6.15 ± 1.12	< 0.01
Ствол	Тирозин	1.63 ± 0.18	1.60 ± 0.17	> 0.05	1.00 ± 0.14	< 0.02
	Дофамин	3.32 ± 0.85	2.51 ± 0.69	> 0.05	20.43 ± 4.76	< 0.01
	НА	8.10 ± 1.12	4.60 ± 0.37	< 0.01	4.61 ± 1.02	< 0.05
Мозжечок	Тирозин	2.06 ± 0.33	2.06 ± 0.37	> 0.05	0.84 ± 0.12	< 0.01
	Дофамин	3.34 ± 0.78	7.40 ± 1.30	< 0.05	18.41 ± 3.07	< 0.01
	НА	4.54 ± 0.58	1.58 ± 0.13	< 0.001	3.72 ± 0.41	> 0.05

n - количество определений (во всех сериях опытов n=6)

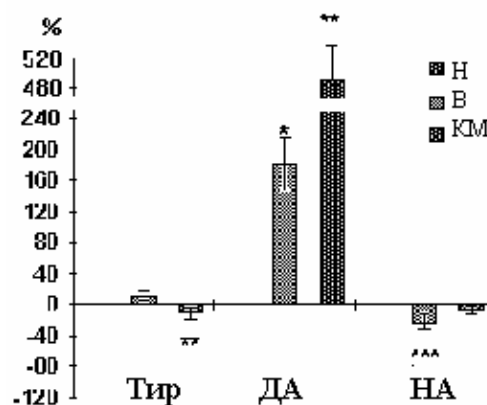
P - достоверность различия между соответствующими группами



**Рис. 1.** Относительное содержание тирозина (Тир), ДА и НА в полушариях крыс групп Н, В, и КМ. Данные выражены в % по отношению к группе Н. Условные обозначения: \*\*\*-  $p < 0,001$ .



**Рис.2.** Относительное содержание тирозина (Тир), ДА и НА в гипоталамусе крыс групп Н, В, и КМ. Данные выражены в % по отношению к группе Н. Условные обозначения: \*\*-  $p < 0,001$ .



**Рис. 3.** Относительное содержание тирозина (Тир), ДА и НА в стволе крыс групп Н, В, и КМ. Данные выражены в % по отношению к группе Н. Условные обозначения: \*-  $p < 0,05$ , \*\*-  $p < 0,001$ .

**Рис. 4.** Относительное содержание тирозина (Тир), ДА и НА в мозжечке крыс групп Н, В, и КМ. Данные выражены в % по отношению к группе Н. Условные обозначения: \*-  $p < 0,05$ , \*\*-  $p < 0,01$ , \*\*\*-  $p < 0,001$ .

**Таблица 2**

**Отношение содержания тирозина к дофамину ( $K_2$ ) и дофамина к норадреналину ( $K_3$ ) у крыс с различным уровнем аудиогенной судорожной готовности**

Область мозга	Параметр	Группа животных		
		Н	В	КМ
Полушария	$K_2$	1.13	1.24	0.21
	$K_3$	0.31	0.23	1.25
Гипоталамус	$K_2$	0.13	0.24	0.10
	$K_3$	1.89	1.37	3.74
Ствол	$K_2$	0.49	0.64	0.05
	$K_3$	0.41	0.55	4.43
Мозжечок	$K_2$	0.43	0.28	0.04
	$K_3$	0.74	4.68	4.94

Учитывая данные литературы о наличии противосудорожных свойств у НА, а также наблюдающееся в наших экспериментах статистически достоверное снижение уровня НА у крыс с высокой судорожной готовностью, можно предполагать, что содержание этого медиатора в мозге является одним из существенных факторов, принимающих уча-

стие в формировании уровня судорожной предрасположенности. Представляется интересным и важным выявленное у крыс линии КМ значительное повышение уровня ДА.

Возможно, что увеличение концентрации ДА в мозге также является одним из факторов, способствующих повышению судорожной готовности. Если принять это пред-

положение, тогда снижение содержания ДА в гипоталамусе крыс группы В можно рассматривать как компенсаторное явление.

Обращает на себя внимание, что снижение уровня тирозина в стволе мозга и мозжечке крыс линии КМ сопровождалось значительным повышением уровня ДА. Повышение уровня ДА при одновременном снижении количества тирозина и НА (как это имело место, например, в стволе крыс линии КМ) или же изменение концентрации одного или двух компонентов (как это имело место в других случаях) может быть связано с изменением активности ферментов биосинтеза и метаболизма КА - усилением активности тирозингидроксилазы и (или) ДОФА - декарбоксилазы, уменьшением активности дофамин-бета-оксидазы, изменением процессов дезаминирования, С-метилирования и др. Важно отметить, что, как и в описанной нами ранее серии экспериментов по определению содержания СТ, у крыс с генетически детерминированной высокой судорожной готовностью (линия КМ), как правило, изменения в содержании КА выражены сильнее, чем у крыс группы В.

На основании вышеуказанного можно констатировать, что мозг высоковозбудимых линейных крыс (группа КМ) характеризуется относительным дефицитом СТ и НА и превалированием ДА (табл. 3, коэффициенты  $K_3, K_4$  и  $K_5$ ).

Весьма вероятно, что повышение судорожной готовности корреляционно связано с фактором или процессом, оказывающими влияние как на систему КА, так и СТ. В связи с этим представляется очень важным наблюдение Колемана, который обнаружил у мышей линии более низкий уровень активности фенилаланин-гидроксилазы печени. Можно предполагать, что в этих условиях метаболизм фенилаланина будет направлен в сторону повышенного образования фенилпирувата, фениллактата и фенилацетата - ингибиторов декарбоксилазной активности [9, 11]. В свою очередь, подавление активности декарбоксилаз должно привести к уменьшению содержания СТ, НА и ГАМК в мозге и соответствующему снижению судорожного порога. Увеличение в содержании фенилаланина иногда приводит также к нарастанию количества в мозге фенилэтиламина, фактора, оказывающего влияние на механизмы освобождения мз везикул и обратного захвата КА. Показано, что при неоднократном введении крысам внутрибрюшинно 100 мг/кг фенилэтиламина он оказывает неодинаковое влияние на систему БА, снижая через один час уровень НА на 74,4%, ДА - на 25,7%, СТ - на 13,5%, причем влияние на систему ДА оказывается преимущественно через механизмы его освобождения, а на систему НА - через ингибирование его обратного захвата [3].

**Таблица 3**

**Отношение содержания серотонина к дофамину ( $K_4$ ) и серотонина к норадреналину ( $K_5$ ) у крыс с различным уровнем аудиогенной судорожной готовности**

Область мозга	Параметр	Группа животных		
		Н	В	КМ
Полушария	$K_4$	2.63	4.2	0.29
	$K_5$	0.81	0.95	0.36
Гипоталамус	$K_4$	0.54	0.63	0.20
	$K_5$	1.01	0.87	0.74
Ствол	$K_4$	2.79	2.60	0.15
	$K_5$	1.14	1.42	0.65
Мозжечок	$K_4$	2.55	0.84	0.14
	$K_5$	1.87	3.92	0.67

В связи с вышесказанным становится очевидным, что нарушение обмена фенилаланина может привести к существенным изменениям содержания отдельных МА, нарушению их нормальных соотношений и, как результат, к сдвигам в работе синаптического аппарата. Учитывая роль фенилаланина, можно объяснить, почему фенилкетонурия (фенилпировиноградная олигофрения) - заболевание, при котором нарушается процесс гидроксирования фенилаланина и в организме накапливаются фенилаланин и его метаболиты, часто сопровождается развитием эпилептиформных процессов [1, 6, 10]. При

этом у больных фенилкетонурией нарушается обмен не только КА (снижение экскреции НА, ДА, ДОФА, увеличение экскреции ВМК), но и 5-оксииндолов (снижение в крови уровня СТ на фоне повышенной экскреции 5-ОИУК). Отмечается корреляция между наличием судорожного синдрома у больных и степенью падения уровня СТ в крови [1].

Таким образом, в мозге животных с высокой судорожной готовностью существует качественно отличная нейрхимическая (МА-ергическая) организация, представления о которой, мы в этом уверены, по мере разработки этого научного направления бу-

дуг значительно усложняться. Можно предполагать, что качественно новое функциональное состояние, характерное для мозга с высокой судорожной готовностью, обусловлено не конкретным влиянием определенного нейрхимического компонента, однознач-

но сдвигающего возбудимость в ту или иную сторону, а связано с формированием новой сложной архитектуры нейрхимического (в том числе МА-ергического) обеспечения нейродинамики основных нервных процес-

## REFERENCES

1. Булахова Л.А., Ушеренко П.С. // В кн.: - 7 Всесоюзный съезд невропатологов и психиатров. - Тез. докладов, - 26 - 30 мая 1981, - М.осква, 1981. - Т. 3. - С. 80-82.
2. Елкин В.Н. Генетика эпилепсии. - Л.: Медицина, - 1971. - 191 с.
3. Жарииков А.Д. // В кн.: - Катехоламинергические нейроны. - М.: Наука. - 1989, - С. 184 - 201.
4. Захария Е.А. Предрасположенность организма к эпилептическим припадкам. - К.: Здоров'я, - 1974. - 200 с.
5. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. - М.: Изд-во МГУ. - 1960. - 263 с.
6. Кузнецова Л.М. // В кн.: - Эпилепсия ( клиника, патогенез, лечение ). - Материалы конф. - Ред. Семенов С.Ф. - Тр. Московского НИИ психиатрии. - МЗ РСФСР, - 1972 - Т. 64, - С. 231 - 232.
7. Осинская В.О. // Биохимия, 1957, - Т. 22, № 3, - С. 537 - 545.
8. Carlson A., Waldes K.V.. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине / Цитировано по Юденфренд С. - М.:Мир. - 1965. - С. 481.
9. Davison L.N., Sandler M. // Nature, - 1958, - Vol. 181. - P. 186 - 187.
10. Fois A., Rosenberg C., Gibbs F.A. // EEG and Clin. Neurophysic. - 1995. - Vol. 7. - P. 567-572.
11. Parvim J., Hsia Y. - Y.D. // Proc. Soc. Exptl. - Biol. Med., - Vol. 118. - P.1046.

## ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ СУДОМНОЮ ГОТОВНІСТЮ І ВМІСТОМ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТВАРИН

Савченко В.М., Максименко О. Г.  
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

---

### РЕЗЮМЕ

Внаслідок проведених експериментів встановлено, що у щурів з високою генетично детермінованою судомною готовністю, в порівнянні з щурами інших груп, відмічено зниження рівня норадреналіну (НА) у гіпоталамусі і стволі мозку, а у півкулях, стволі мозку і мозочкові суттєво підвищений вміст дофаміну (ДА). Статистично вірогідно також знижався рівень тирозину у стволі і мозочкові. Це дає підстави припустити, що підвищення судомної готовності кореляційно пов'язане з процесами, що впливають як на систему катехоламінів, так і серотоніну.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** серотонін, триптофан, норадреналін, дофамін, фенілкетонурія, судомна готовність/

## INTERRELATION BETWEEN CONVULSIVE READINESS AND THE CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE CEREBRUM OF ANIMALS

Savchenko V.N., Maksimenko E.G.  
Kharkov National V.N. Karazin University

---

### SUMMARY

As a result of the conducted experiments it was determined that the noradrenaline (NA) level in the hypothalamus and brain stem decreased in rats with high genetically determined spasmodic readiness as compared to the rats of other groups, and in hemispheres, brain stem

and cerebellum the dopamine (DA) content rose significantly. The decrease of tyrosine level in the brain stem and cerebellum was statistically proved. It gives grounds to suppose that increase in spasmodic readiness is correlated with processes influencing both catecholamine complexes and serotonin.

**KEY WORDS:** serotonin, triptophane, noradrenoline, dopamine, phenylketonury, spasmodic readiness