

**ВЛИЯНИЕ НА МЕЖРЕЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ
МОДУЛЯЦИИ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩИМ ПЕПТИДОМ
ГАМК_A-РЕЦЕПТОРНЫХ СТРУКТУР**

М.Б. Иванов, В.А. Башарин, Б.О. Войтенков, Е.Ю. Бонитенко, С.П. Сидоров,
Ю.В. Шилов, И.М. Иванов

СПб МАПО, Исследовательский центр «КОМКОН»

г. Санкт-Петербург

РЕФЕРАТ

Методом фармакологического «зондирования» на мышах изучено влияние на межрецепторные взаимодействия модификации дельта-сон индуцирующим пептидом ГАМК_A-рецепторного комплекса. В экспериментах *in vivo* показано, что системное применение дельта-сон индуцирующего пептида приводит к модуляции участков связывания лигандов ГАМК-бензодиазепин-ионофор-рецепторного комплекса, модифицирует внутрирецепторные и оказывает значимое влияние на межрецепторные взаимодействия как внутри ГАМК-ергической системы, так и на ее регулирующее влияние других нейромедиаторных систем.

Ключевые слова: ДСИП, «Дельтаран», ГАМК_A-рецептор, ГАМК_B-рецептор, нейромедиаторы, судороги.

ВВЕДЕНИЕ

По существующим на сегодняшний день представлениям ГАМК-ергическая медиаторная система является основной системой отвечающей за процессы торможения в ЦНС. Выделяют две основные функции ГАМК - метаболическую и медиаторную, с последней связывают ее влияние на регуляцию локомоторной активности, пищевого поведения, поддержания судорожного порога, реакций на стрессорные воздействия и формирование эмоционального поведения, осуществление высших интегративных функций

головного мозга, таких как условные рефлексy, процессы обучения и памяти, взаимодействие с другими нейромедиаторными системами мозга. ГАМК играет важную регуляторную роль во многих периферических процессах, обеспечивающих жизнедеятельность организма (Раевский К.С., 1986; Matsumoto R.R., 1989).

Особая роль принадлежит ГАМК-ергической системе в развитии судорожного синдрома при различных патологических состояниях и заболеваниях ЦНС (Софронов Г.А., 1992; Charman A.G., 1983).

В предыдущих исследованиях методом фармакологического «зондирования» нами было показано влияние дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) на компоненты ГАМК-рецепторно-ионофорного комплекса. В свою очередь изменение функционального состояния ГАМК-ергической нейромедиаторной системы под влиянием ДСИП может приводить к изменениям регуляции деятельности ЦНС на медиаторном и межмедиаторном уровнях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты были выполнены на белых беспородных мышах-самцах массой 22-25 г. разводки питомника РАМН п. Рапполово. До начала эксперимента животные не менее двух недель содержались на стандартном пищевом рационе вивария. За 24 часа до опытов кормление животных, находившихся на свободном водном режиме, прекращали.

Эксперименты выполнены с использованием модели норборнан-пикротоксинового киндлинга (Головко А.И. и др., 1998), и интоксикации бикикуллином. При изучении влияния ДСИП на компоненты ГАМК_A-рецепторного комплекса в качестве фармакологических «зондов» использовали препараты, лигандные к различным нейромедиаторным системам ЦНС.

Препараты и методики их введения

Бикикуллин (БКК) (Sigma, США) - классический антагонист ГАМК_A-рецепторов - алкалоид, выделенный в 1932 г. из листьев растений,

принадлежащих к семейству дымяноквых (Fumariaceae). БКК блокирует низкоаффинные ГАМК_A рецепторы (Sharif N.A., 1985). Вводили в объеме 0,2 мл на 10 г массы тела. (ЛД₅₀ для мышей - $5,4 \pm 0,5$ мг/кг).

Пикротоксин (ПТ) (Sigma, США) выделен из ягод Menispermaceae – ядовитого растения. Пикротоксин – эквимольная смесь пикротоксина и пикротина. Вводили животным в объеме 0,2 мл на 10 г массы тела. В экспериментах по изучению процесса формирования норборнанового киндлинга использовалась доза 4 мг/кг, не вызывающая в контроле тяжелых клонико-тонических судорог 3 - 4 степени (ЛД₅₀ для мышей - $7,39 \pm 1,21$ мг/кг).

Норборнан (2,2-ди(трифторметил)-3,3-дициано-5,6-дихлорнорборнан) является неконкурентным ГАМК-антагонистом, блокирующим хлорную проводимость нейрональных мембран за счет прочного ковалентного связывания внутри канала с последующим его закупориванием (Головко А.И. и соавторы, 1996). Для формирования киндлинга использовался в дозах 0,5-0,8 ЛД₅₀. ЛД₅₀ для первых, вторых и третьих суток составила $0,120 \pm 0,017$; $0,078 \pm 0,012$; $0,078 \pm 0,012$ мг/кг соответственно

Дельтаран (ДСИП) (СПбНИИВС, Россия) – смесь синтетического эндогенного нонапептида, называемого дельта-сон индуцирующим пептидом, 10 весовых частей и аминокислоты глицина (91 весовая часть). Вводился мышам однократно внутрибрюшинно за 30 мин до пикротоксина или биккукулина в дозе 300 мкг/кг (по ДСИП) в зависимости от условий эксперимента.

Характеристики использованных в работе фармакологических зондов приведены в таблице 1

Все препараты животные получали интраперитонеально в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела животного, контрольной группе вводилось эквивалентное количество растворителя.

Характеристики фармакологических «зондов», использованных в работе

№№	Группы препаратов	Название препарата	Дозы и способ применения
1.	Агонисты ГАМК _B -рецепторов	Баклофен	в дозе 5 мг/кг однократно внутривенно за 10 минут до пикротоксин
		Фенибут	в дозе 100 мг/кг однократно внутривенно за 10 минут до пикротоксина
2.	Агонисты М-холинорецепторов	Ареколин	в дозе 15 мг/кг однократно внутривенно через 5 минут после пикротоксина
		Оксотреморин	в дозе 1,0 мг/кг однократно внутривенно через 5 минут после пикротоксина
3.	Антагонист М-холинорецепторов	Атропина сульфат	в дозе 0,1 мг/кг однократно внутривенно за 10 минут до пикротоксина
4.	Антагонист NMDA рецепторов	МК-801	вводился в дозе 1,0 мг/кг за 10 мин до бикикуллина

Судорожную активность оценивали по методу Г.Н.Крыжановского и соавторов (1985) и J. Ono et al. (1990) в нашей модификации (Иванов М.Б., 1998). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГАМК-ергическая нейромедиаторная система функционирует в тесном взаимодействии с другими системами нейротрансмиттеров. Представлялось обоснованным начать изучение влияния модификации дельта-сон индуцирующим пептидом ГАМК_A-рецепторного комплекса на характер его взаимодействия с другими нейромедиаторными системами с оценки степени заинтересованности ГАМК_B-нейромедиаторных систем. В качестве средств фармакологического тестирования использовали "классические" агонисты ГАМК_B-рецепторов, баклофен и фенибут.

Имеются сведения о противосудорожных свойствах ГАМК_B-агонистов, кроме того, баклофен обладает анальгетической активностью, обнаружено и транквилизирующее действие агонистов ГАМК (Сергеев П.В., 1987).

В экспериментах на модели норборнан-пикротоксинового киндлинга показано, что введение баклофена и фенибута оказывает значимое влияние на сроки развития и выраженность судорог у мышей, инициируемых пикротоксином, в то время как предварительное введение ДСИП приводит к полному нивелированию эффектов агонистов ГАМК_B-рецепторов (Табл.2).

Таблица 2

Влияние дельтарана на фармакологическую активность агонистов ГАМК_B-рецепторов в условиях норборнан-пикротоксинового киндлинга

Группы животных	Показатели		
	Время развития судорог (мин)		Время гибели, (мин)
	1 – 2 ст.	3-4 ст.	
Контрольная	9,48±0,47	11,11 ±0,5	25,58±3,18
Получавшие:			
Дельтаран	9,09±4,14	10,13±5,15	22,46±7,01
Баклофен	15,22±2,18	16,06±2,16	34,40±4,25
	* t-Стьюдента p=0,04 Манна-Уитни p=0,02	* t-Стьюдента p=0,08 Манна-Уитни p=0,04	*t-Стьюдента p=0,16 Манна-Уитни p=0,18
Фенибут	13,59±1,55	14,59±1,48	40,17±4,17
	* t-Стьюдента p=0,05 Манна-Уитни p=0,02	* t-Стьюдента p=0,09 Манна-Уитни p=0,01	* t-Стьюдента p=0,03 Манна-Уитни p=0,03
Баклофен + Дельтаран	11,47±1,42	12,56±1,51	35,22±4,44
	* t-Стьюдента p=0,29 Манна-Уитни p=0,52	* t-Стьюдента p=0,41 Манна-Уитни p=0,87	* t-Стьюдента p=0,14 Манна-Уитни p=0,22
Фенибут + Дельтаран	11,12±1	13,20±1,11	26,55±3,45
	* t-Стьюдента p=0,29 Манна-Уитни p=0,25	* t-Стьюдента p=0,17 Манна-Уитни p=0,2	* t-Стьюдента p=0,85 Манна-Уитни p=1

* - в сравнении с контрольной группой.

Учитывая тесную функциональную связь между ГАМК-ергической и NMDA системами, нами было изучено влияние совместного и отдельного действия дельтарана и антагониста NMDA (МК-801) на судорожные проявления вызванные бикикулином (Табл.3).

Таблица 3

Эффекты дельтарана и МК-801 на фоне введения бикикуллина (6 мг/кг)

Группы животных	Показатели		
	Время наступления судорог		Время гибели, (мин)
	1-2 ст.	3-4 ст.	
Контрольная	1,6±0,4	1,8±0,5	3,2±1,0
Получавшие:			
«Дельтаран»	1,8±0,2	2,1±0,2	5,7±0,8
Антагонист NMDA	1,6±0,3	1,6±0,2	3,6±0,3
«Дельтаран» антагонист NMDA	1,9±0,3	1,9±0,3	3,8±0,3

Установлено, что как антагонист NMDA – рецепторов, так и его сочетание с дельтараном не оказывают значимого влияния на течение интоксикации бикикулином.

В следующей серии экспериментов оценивалось влияние модификации дельтараном ГАМК_A-рецептора на характер биологического ответа при действии М-холинотропных препаратов в условиях норборнан-пикротоксинового киндлинга. В качестве модельных препаратов использовались агонисты (ареколин и оксотреморин) и антагонисты (атропина сульфат). Выбор в качестве фармакологических «зондов» этих препаратов был обусловлен тем, что по некоторым данным они ослабляют токсические эффекты пикротоксина у мышей и усиливают противосудорожное действие ГАМК (Georgiev V.P., 1981). Механизм противосудорожного действия холиноагониста по всей вероятности связан с холинергической активацией системы ГАМК. Результатом подобного взаимодействия является повышение судорожного порога для ГАМК-литиков (Georgiev V.P., 1981). Однако, как показано в наших экспериментах, оксотреморин не оказывал влияния, а ареколин потенцировал судорожные эффекты пикротоксина в условиях

предварительного введения норборнана (Табл.4). Полученные результаты могут быть связаны со снижением чувствительности ГАМК-рецептора к стимулирующим влияниям оксотреморина, но не ареколина, вследствие особого характера взаимодействия норборнана с хлор-ионофором ГАМК_A-рецепторов изменяются свойства всего рецептора и способность отвечать на стимулирующее влияние других нейромедиаторных систем.

Таблица 4

Эффекты дельтарана и агонистов М-холинорецепторов в условиях норборнан-пикротоксинового киндлинга

Группы животных	Показатели		
	Время развития судорог (мин)		Время гибели, (мин)
	1 - 2 ст.	3-4 ст.	
Контрольная	12,02±1,45	12,24±1,45	30,46±4,44
Получавшие:			
Дельтаран	11,49±3,12	12,11±4,19	26,46±6,24
Ареколин		9,47±0,46	26,11±2,08
		* t-Стьюдента p=0,18 Манна-Уитни p=0,32	* t-Стьюдента p=0,35 Манна-Уитни p=0,37
Оксотреморин		12,38±0,23	27,3±1,2
		* t-Стьюдента p=0,89 Манна-Уитни p=0,67	* t-Стьюдента p=0,46 Манна-Уитни p=0,46
Ареколин + дельтаран		8,13±0,38	23,21±1,38
		* t-Стьюдента p=0,049 Манна-Уитни p=0,055	* t-Стьюдента p=0,12 Манна-Уитни p=0,12
		** t-Стьюдента p=0,15 Манна-Уитни p=0,25	** t-Стьюдента p=0,31 Манна-Уитни p=0,28
Оксотреморин + дельтаран		9,41±1,28	22,28±3,13
		* t-Стьюдента p=0,26 Манна-Уитни p=0,38	* t-Стьюдента p=0,17 Манна-Уитни p=0,1
		** t-Стьюдента p=0,059 Манна-Уитни p=0,13	** t-Стьюдента p=0,16 Манна-Уитни p=0,17

*- в сравнении с контрольной группой, **- в сравнении с группой получавшей ареколин и оксотреморин соответственно.

Следует отметить, что дельтаран не оказывал влияния на повышение судорожной активности при использовании антагониста М-холинорецепторов - атропина сульфата в условиях норборнан-пикротоксинового киндлинга (Табл.5).

Таблица 5

Эффекты дельтарана и атропина сульфата (антагонист М-холинорецепторов) в условиях норборнан-пикротоксинового киндлинга

Группы животных	Показатели			Летальность
	Время развития судорог (мин)		Время гибели (мин)	
	1-2 ст.	3-4 ст.		
Контрольная	12,17±2,08	13,02±2,10	30,50±7,59	6/7
Получавшие:				
Дельтаран	11,99±3,28	12,93±4,21	28,43±7,01	6/7
Атропина сульфат	6,53±0,26	7,31±0,50	29,07	2/6
	* t-Стьюдента p=0,043 Манна-Уитни p=0,03	* t-Стьюдента p=0,047 Манна-Уитни p=0,054	* t-Стьюдента p=0,91 Манна-Уитни p=1,00	
Атропина сульфат + дельтаран	6,35±0,52	7,47±1,05	32,41±6,53	5/7
	* t-Стьюдента p=0,036 Манна-Уитни p=0,01	* t-Стьюдента p=0,051 Манна-Уитни p=0,064	* t-Стьюдента p=0,87 Манна-Уитни p=0,85	
	** t-Стьюдента p=0,97 Манна-Уитни p=0,94	** t-Стьюдента p=0,85 Манна-Уитни p=0,67	** t-Стьюдента p=0,77 Манна-Уитни p=0,7	

*- в сравнении с контрольной группой, **- в сравнении с группой получавшей атропин сульфат.

ВЫВОДЫ: Модификация ДСИП ГАМК_А-рецепторов с одной стороны нивелирует эффекты, вызываемые агонистами ГАМК_В-рецепторов, при этом практически не влияет на действие NMDA-антагонистов, а с другой модифицирует (усиливает) фармакологическую активность агонистов М-холинорецепторов, не влияя на действие антагонистов этих структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. - М.: "Медицина", 1987. - 399 с.
2. Софронов Г.А., Головки А.И. Влияние судорог, вызванных ГАМК-литиками, на связывание 3Н-мусцимола и 3Н-диазепама в стриатуме крыс // Бюл.экспер.биол.-1992.-Т.113,№1.-С.52-53.
3. Головки А.И., Головки С.И., Зефиоров С.Ю., Софронов Г.А. Токсикология ГАМК-литиков. - СПб.: "Нива", 1996. - 141 с.
4. Головки А.И., Иванов М.Б., Свицерский О.А. и др. Механизмы формирования повышенной судорожной готовности при интоксикации норборнаном//Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1998. - Т.125, № 6. - С. 653-556.
5. Иванов М.Б. Механизмы формирования повышенной судорожной готовности при интоксикации норборнаном // Дисс. ... канд. мед. наук. – СПб, 1998. – 158 с.
6. Крыжановский Г.Н., Шандра А.А., Макулькин Р.Ф., Годлевский Л.С. Гиппокамп как детерминантная структура, генерирующая эпилептическую активность при киндлинге. //Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1985. - Т.ХСІХ, № 5. - С. 527-532.
7. Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. - М.: "Медицина", 1986, София.: "Медицина и физкультура", 1986-239 с.
8. Chapman A.G., Meldrum B.S. Effects of anticonvulsant drugs on brain amino acid metabolism // Epilepsy: an update on research and therapy.-New York:A.R.Liss,Inc.-1983.-P.63-76.
9. Georgiev V.P., Lambadjieva N.D. Interaction between cholinergic drugs, gamma- aminobutyric acid and cyclic guanosine monophosphate on picrotoxin-induced convulsive-seizure threshold//Neuropharmacology.-1981.-Vol.20,№ 9.- P.813-817.

10. Matsumoto R.R. GABA receptors: are cellular differences reflected in function? // Brain Res. Rev. - 1989. - Vol. 14, № 3. - P. 203-225.
11. Ono J., Vieth R.F., Walson P.D. Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection in rats // Funct. Neurol. - 1990. - V. 5, N4. - P. 345-352.