

**В. В. Ткач**

## **Вплив інтрацеребрального введення лікворину на генералізовану судомну активність у щурів**

*Исследовали влияние интрацеребрального (в желудочки головного мозга крыс) введения нового инъекционного препарата ликворина на генерализованную судорожную активность, вызываемую внутрибрюшинным введением коразола и определение выраженности противосудорожного действия препарата в различные сроки с момента его введения. Биопрепарат ликворин получен из прижизненно взятой цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) крупного рогатого скота, криоконсервированный и γ-стерилизованный. Установлено, что данный биопрепарат снижает судорожную активность у крыс, проявляющуюся в увеличении латентного периода первых судорог, предотвращении развития генерализованных судорожных припадков, а также летальности животных. Действие препарата проявлялось через 2 ч и было максимально выражено через 24 ч. Антиконвульсивное действие ликворина, по-видимому, реализуется за счет влияния его активных факторов: вещества P, кининов, эндорфинов, пептида Δ-сна, гормонов гипофиза и других нейропептидов, находящиеся в ЦСЖ крупного рогатого скота, на ГАМКергические структуры ЦНС.*

### **Вступ**

Актуальною проблемою є пошук ефективних лікувальних препаратів для боротьби з епілепсією. Це пов'язано з широким розповсюдженням захворювання і потенційно важкими його наслідками [3]. Нині доведено, що більшість синтетичних лікарських препаратів, які застосовують для лікування хворих на епілепсію, мають побічні токсичні та алергійні впливи [2].

Перспективним сьогодні є пошук препаратів, особливо біологічного походження, з низькою токсичністю. Виникає питання щодо можливості використання для цієї мети цереброспинальної рідини (ЦСР) великої рогатої худоби. Як біологічний субстрат тваринного походження вона може служити основою для розробки якісно нових лікарських засобів.

Різноманітні властивості ЦСР визначаються наявністю в ній біологічно активних речовин, гіпоталамічних релізинг-факторів, гормонів гіпофіза й епіфіза, гормонів периферичних ендокринних залоз, нейромедіаторів і нейропептидів, простагландинів, ендорфінів, лізоциму, вітамінів груп В і С. Епілепсія у людини і викликані експериментальні генералізовані напади у тварин однотипні стосовно клінічної картини і за даними лабораторних досліджень [5]. Тому доцільним є вивчення протисудомної ефективності нового біопрепарату лікворину на моделях епілептичної активності у щурів.

Метою нашої роботи було дослідження впливу інтрацеребрального (в шлуночки головного мозку) введення біопрепарату на судоми, викликані у щурів внутрішньоочеревинним введенням коразолу, а також встановлення

характеру судомних проявів у різні строки з моменту ін'єкції препарату (через 30 хв, 2, 6, 10, 24, 48 год).

### **Методика**

Досліди виконані за умов гострого експерименту на 120 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–250 г. Всіх тварин розділили на шість дослідних (по 16 щурів) і шість контрольних (по 10 щурів) груп.

Біопрепарат лікворин розроблений співробітниками Кримського медуніверситету (КДМУ) і Кримською республіканською станцією переливання крові (КРСПК). Новий ін'єкційний біопрепарат одержували з життєво взятої ЦСР корів і являв собою депротейнізований фільтрат з кріоконсервованої і  $\gamma$ -стерилізованої ЦСР. Це прозора, безбарвна, термостабільна рідина, (рН 8,5–8,7). Препарат не має акумулюючих, токсичних, тератогенних, канцерогенних, ембріотоксичних, імунодепресантних властивостей, що вказує на його нешкідливість для організму реципієнта.

ЦСР одержували від здорових тварин на донорських пунктах у Криму. Флакони з ліквором транспортували в контейнерах у КРСПК, де сировина підлягала екологічній експертизі та подальшій технологічній обробці: багаторазовому заморожуванню й розморожуванню,  $\gamma$ -стерилізуванню, центрифугуванню, фільтрації (фільтри «Міліпор») і ампулюванню.

Експериментальні випробування протисудомних властивостей нового біопрепарату лікворину вперше проводили в КДМУ і вони були фрагментом комплексного дослідження з програми «Розробка нового імунобіологічного препарату з ЦСР великої рогатої худоби (корів)» (№ держреєстрації 01.93V041176).

Біопрепарат (10 мкл) тваринам дослідної групи вводили під ефірним рауш-наркозом у порожнину шлуночків головного мозку за координатами атласу  $AP = 0$ ,  $L = 1,0$  і  $H = 3,5$  [8]. Тваринам контрольної групи аналогічно вводили відповідні об'єми 0,9%-го розчину хлористого натрію. Гострі генералізовані судоми у щурів викликали внутрішньоочеревинним введенням коразолу (50 мг/кг).

Після введення конвульсанта тварин розміщали в прямокутну камеру (40×60×90 см), де за ними спостерігали протягом 60 хв, визначаючи тривалість латентного періоду перших судомних реакцій, латентний період і число тварин з генералізованими тоніко-клонічними судомними нападами, а також число щурів, які загинули. Інтенсивність судом оцінювали у балах за такою шкалою: 0 балів – відсутність судомної реакції; 1 бал – судомні здригання; 2 бали – клонічні судоми всього тулуба; 3 бали – клонічні судоми передніх кінцівок, підйом щурів на задні лапи; 4 бали – виражені тоніко-клонічні напади з падінням тварин на бік і фазою тонічної екстензії задніх кінцівок, депресією і вегетативними розладами; 5 балів – повторні тоніко-клонічні напади з падінням тварини на бік, що закінчувалися для частини тварин загибеллю [6]. Після завершення нападу у тварин розвивалася депресія, що супроводжувалася різким пригніченням активності.

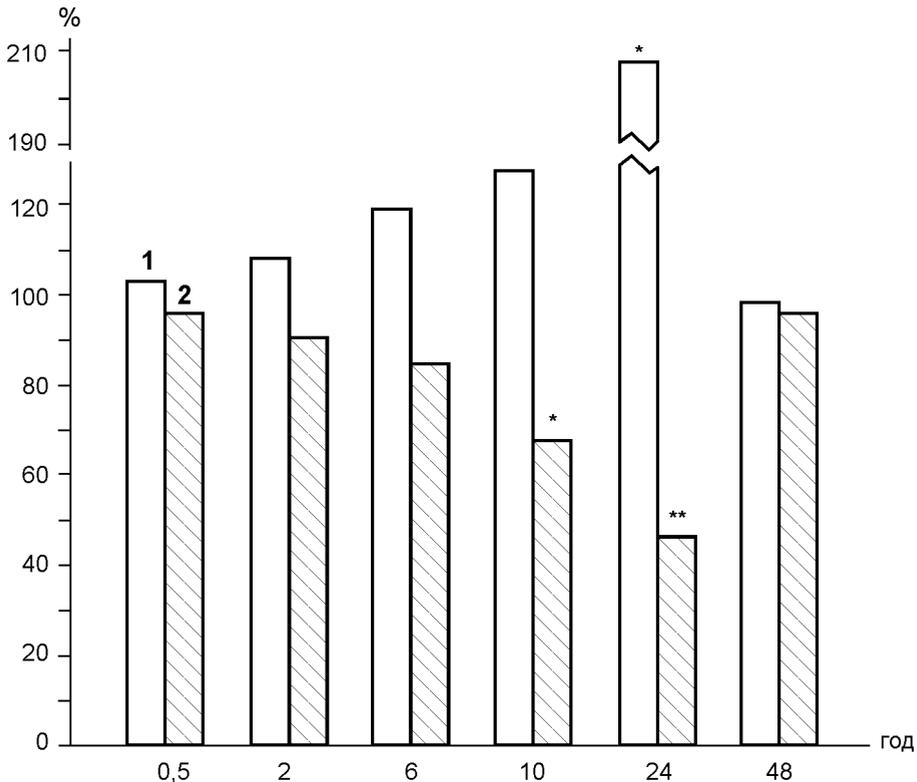
Результати експериментів опрацьовували методом варіаційної статистики з використанням критерію  $t$  Стьюдента.

## Результати та їх обговорення

У контрольних дослідах виникнення перших судомних здригань з моменту застосування коразолу спостерігалось у середньому через 102,0 с  $\pm$  3,2 с, протягом наступних 1–3 хв інтенсивність судомних проявів підвищувалося, у 6 з 8 щурів відмічалися генералізовані тоніко-клонічні напади, латентний період яких становив 154,2 с  $\pm$  2,9 с. Середня тяжкість судом була 3,4 бала  $\pm$  0,4 бала.

Генералізовані судомні реакції, індуковані введенням коразолу у тварин контрольних груп у різні строки (від 2 до 48 год) з моменту інтрацеребрального введення 0,9 %-го розчину хлористого натрію не мали певних відмінностей порівняно з наведеними показниками.

Введення коразолу тваринам дослідної групи, здійснене через 30 хв після інтрацеребральної ін'єкції лікворину, викликало перші судомні прояви у середньому через 105,5 с  $\pm$  5 с з моменту введення конвульсанта. Протягом наступних 1–4 хв у тварин судомні прояви ставали більше виражені, латентний період яких був 157 с  $\pm$  1,2 с. У щурів розвивалися клонічні судоми всього тіла та передніх кінцівок, у 3 з 10 тварин реєструвалися тоніко-клонічні судомні напади. Середня тяжкість останніх становила 3,3 бала  $\pm$  0,5 бала, що не відрізнялося від тяжкості судом у тварин відповідної контрольної групи (рисунок).



Вплив інтрацеребрального введення біопрепарату лікворину на генералізовану судомну активність, індуковану в щурів внутрішньоочеревним введенням коразолу (50 мг/кг). По осі абсцис: години після ін'єкції лікворину (10 мкл). По осі ординат: латентний період (1) і тяжкість судом (2). За 100% прийнято результати контрольних дослідів (горизонтальна лінія). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

Ін'єкція коразолу через 2 год після інтрацеребрального введення лікворину супроводжувалася розвитком перших судомних проявів у середньому через  $110 \text{ с} \pm 7,8 \text{ с}$ . Протягом наступних 1–2 хв у тварин збільшувалася вираженість судомних проявів – відзначалися клонуси всього тіла та м'язів передніх кінцівок; у 5 з 10 тварин реєструвалися тоніко-клонічні судомні напади з втратою рівноваги, вегетативними порушеннями і депресією. Середня тривалість латентного періоду виникнення генералізованих судом становила  $175 \text{ с} \pm 2,7 \text{ с}$ , а тяжкість судомних реакцій –  $3,1 \text{ бала} \pm 0,3 \text{ бала}$ , що незначною мірою відрізнялося від значень відповідного показника у тварин контрольної групи.

У тварин, котрим коразол вводили через 6 год після інтрацеребральної ін'єкції лікворину, перші судомні здригання виникали через  $121 \text{ с} \pm 9,2 \text{ с}$ . Протягом наступних 1–3 хв у тварин підвищувалась інтенсивність судомних проявів, латентний період яких був  $178,1 \text{ с} \pm 2,1 \text{ с}$  – розвивалися клонічні судоми всього тулуба та передніх кінцівок, у 4 з 9 щурів на 2–5-й хвилині з моменту введення коразолу розвивалися генералізовані тоніко-клонічні судомні напади з втратою рівноваги. Середня тяжкість становила  $2,9 \text{ бала} \pm 0,3 \text{ бала}$  порівняно з контрольними спостереженнями.

При застосуванні коразолу через 10 год після інтрацеребрального введення лікворину перші судомні реакції у тварин реєструвалися через  $133 \text{ с} \pm 10 \text{ с}$ . У всіх тварин розвивалися клонічні судомні реакції і були відсутні генералізовані тоніко-клонічні напади; відношення числа тварин з генералізованими нападами до загальної кількості тварин у групі було достовірно менше порівняно з такою ж у тварин контрольної групи ( $P < 0,025$ ). Середня тяжкість у групі становила  $2,2 \text{ бала} \pm 0,1 \text{ бала}$ , що теж було достовірно менше щодо такої у тварин контрольної групи ( $P < 0,05$ ).

Введення коразолу тваринам через 24 год після інтрацеребральної ін'єкції лікворину викликало виникнення судомних здригань у середньому через  $210,6 \text{ с} \pm 18,6 \text{ с}$ , що було достовірно більше порівняно з відповідними спостереженнями у контролі ( $P < 0,05$ ; див. рисунок). При цьому в усіх тварин реєструвалися судомні здригання чи поодинокі клонуси м'язів тулуба. Відношення числа тварин з генералізованими судомними нападами до загального числа тварин у групі було достовірно меншим, ніж у контрольних спостереженнях ( $P < 0,025$ ). Середня тяжкість судомних реакцій становила  $1,5 \text{ бала} \pm 0,3 \text{ бала}$ , що також було менше порівняно з контрольними спостереженнями ( $P < 0,01$ ).

Дослідження характеру судомних проявів, викликаних коразолом у щурів через 48 год після введення лікворину засвідчило, що перші судоми за цих умов виникають через  $98 \text{ с} \pm 11 \text{ с}$ . У 6 з 10 тварин реєструвалися генералізовані тоніко-клонічні судомні напади, латентний період яких становив  $155 \text{ с} \pm 3,1 \text{ с}$ . Середня тяжкість судомних реакцій у групі була  $3,3 \text{ бала} \pm 0,3 \text{ бала}$ , що не відрізнялося від значень аналогічних показників у тварин відповідної контрольної групи.

Таким чином, проведені дослідження засвідчили, що за умов інтрацеребрального застосування лікворину у щурів виявлено зниження виразності судомних реакцій, викликаних введенням коразолу. Це проявляється у збільшенні латентного періоду перших судом, призупенні розвитку гене-

ралізованих судомних нападів, а також у зменшенні летальності тварин. Виразність антисудомної дії препарату залежала від часу, який пройшов після інтрацеребральної ін'єкції: зниження тяжкості судомних проявів реєструвалося через 2 год і було максимально вираженим через 24 год після інтрацеребральної ін'єкції біопрепарату.

В експериментальній фармакології судоми, викликані коразолом, використовують як тест при пошуку і вивченні антисудомних засобів. Виникнення судом у щурів зумовлені впливом коразолу на збудливість супраспінальних структур ЦНС, оскільки коразол блокує постсинаптичні ГАМК-рецептори, порушуючи провідність СІ-каналів, послаблюючи ГАМК-індуковане гальмування, викликаючи епілептиформну активність і судомні ефекти.

Протисудомна дія лікворину виявлялася при введенні в лікворну систему мозку щурів. Наші результати свідчать про те, що протиепілептична дія даного препарату, очевидно, реалізується внаслідок впливу його активних факторів (речовини Р, кінінів, ендорфінів, пептиду  $\Delta$ -сну, гормонів гіпофіза та інших нейропептидів, що знаходяться в ЦСР великої рогатої худоби) на ГАМКергічні структури ЦНС. Підтвердженням цього припущення є результати нашого дослідження, які свідчать, що застосування лікворину значно знижує чи повністю виключає генералізовані судоми, спровоковані введенням коразолу (антагоніст ГАМК-рецепторів).

Проведені дослідження доводять, що біопрепарат лікворин здійснює протиепілептичний вплив. Мають науковий інтерес деякі з виявлених особливостей протисудомної дії. Так, за умов експериментального дослідження на щурах на моделі гострих генералізованих судом, викликаних введенням коразолу, засвідчено, що протиепілептична дія лікворину відзначалася після відносно тривалого періоду з моменту його застосування, що становить не менш як 2 год. При цьому антиконвульсивна ефективність лікворину спостерігалася також протягом значного проміжку часу, до доби, протягом якої вираженість ефекту підвищувалася. Подібні за динамікою протиепілептичні ефекти були описані при застосуванні біологічно активних сполук пептидної природи [4], які мають властивість модулювати активність моноамінергічних систем мозку, змінювати потенціал дії клітинних мембран, впливати на збільшення, рецепцію та метаболізм медіаторів.

Оскільки механізмом дії епілептогенного ефекту коразолу є блокування ГАМК-рецепторів [9], слід гадати, що антиепілептична дія біопрепарату лікворину реалізується за допомогою його впливу на ГАМК-рецепторні ділянки мембрани нейрона.

**V. V. Tkach**

### **INFLUENCE OF THE BIOPREPARATION LIKVORIN BY THE INTRAVENTRICULAR INFUSING ON GENERAL CONVULSIVE ACTIVITY OF RATS**

It was studied anticonvulsive action of the biopreparation licvorin had been made from a cerebrospinal fluid (CSF) of a cattle on the epileptic activity provoking by korasol. The preparation was infused intraventricularly.

Research showed preparation had the antiepileptic effect. It was manifested by decreasing expressiveness of convulsions, averting of general epileptic fit and mortality. Anticonvulsive action of the biopreparation licvorin was registered in 2 hours and was achieved maximum effect 24 hours after injection.

Anticonvulsive properties of the biopreparation licvorin realized by influence his active factors on structures of a brain, specifically on the GABAdependent systems.

*Crimea State University, Simferopol*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Ашмарин И. П., Доведова Е. Л.* Влияние пептида дельта-сна на активность ацетилхолинэстеразы и моноаминоксидазы в синапсосомах и митохондриях мозга кролика in vitro // Докл. АН СССР. — 1980. — **255**, № 6. — С. 1501-1503.
2. *Вайнтруб М. Я.* Эпилепсия: многолетнее медикаментозное лечение и его осложнения. — М.: Аслан, 1995. — 192 с.
3. *Карлов В. А.* Эпилепсия. — М.: Медицина, 1990. — 336 с.
4. *Крыжановский Г.Н.* Общая патофизиология нервной системы: Руководство. — М.: Медицина, 1997. — 352 с.
5. *Погодаев К. И.* Эпилептология и патохимия мозга (к теории этиологии, патогенеза и лечения эпилепсии). — М.: Медицина, 1986. — 288 с.
6. *Шандра А.А., Годлевский Л.С., Крыжановский Г.Н. и др.* Влияние пептида дельта-сна на судорожную активность при коразоловом киндлинге // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1988. — **106**, № 9. — С. 269 — 271.
7. *Graf M. V., Kastin A. J.* Delta-sleep-inducing peptid (DSIP), a review // Neuroscience and Biobehavioural Reviews. — 1984. — **8**. — P. 83-93.
8. *Paxinos C., Watson D.* The rat brain in stereotaxic coordinates. — Sydney: Acad. press, 1982. — 255 p.
9. *Woodbury D. M.* Convulsant drugs: Mechanisms of action. — In: Antiepileptic drugs: Mechanism of Action. N. Y.: Raven press, 1980. — P. 249-303.

*Кримський мед. ун-т  
ім. С. І. Георгієвського, Симферополь*

*Матеріал надійшов  
до редакції 10.12.98*