

УДК 612.821.6+612.822.3

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ МЕТАБОЛИЗМА ЭНДОКАННАБИНОИДОВ НА ЭПИЛЕПТИЧЕСКИЙ СТАТУС У МОРСКИХ СВИНОК

<sup>1</sup>Шубина Л.В., <sup>1,2</sup>Кичигина В.Ф.

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук»,  
Пушино, e-mail: kateha007@bk.ru;

<sup>2</sup>Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пушино

У бодрствующих морских свинок исследовали влияние интрацеребровентрикулярного введения ингибитора обратного захвата эндоканнабиноидов AM404 и фермента деградации эндоканнабиноида анандамида URB597 на эпилептический статус (ЭС), вызванный конвульсантом каиновой кислотой. Параллельно регистрировали внутримозговую ЭЭГ в медиальной септальной области, гиппокампе, энторинальной коре и амигдале до (в течение 3–4 дней) и во время (4–6 ч) эпилептического статуса. Введение каиновой кислоты приводило к развитию судорожной активности и ЭС. При введении перед каиновой кислотой AM404, либо URB597 данный конвульсант не вызывал ЭС. Электрографические судороги в некоторых случаях регистрировались, однако заканчивались быстрее. Результаты показывают, что блокирование основных путей метаболизма эндоканнабиноидов может стать мишенью для фармакологической модуляции судорог.

**Ключевые слова:** эндоканнабиноиды, AM404, URB597, септум, гиппокамп, энторинальная кора, фмигдала, эпилептический статус, каиновая кислота, ЭЭГ, морские свинки

## INFLUENCE OF THE EDOCANNABINOID METABOLISM INHIBITORS ON THE STATUS EPILEPTICUS IN GUINEA PIGS

<sup>1</sup>Shubina L.V., <sup>1,2</sup>Kitchigina V.F.

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino, e-mail: kateha007@bk.ru;

<sup>2</sup>Puschino State Life Science Institute, Puschino

Influence of intraventricular injections of the endocannabinoid transport inhibitor AM404 and inhibitor of the enzymatic degradation of the endocannabinoid anandamide URB597 on kainic acid-induced status epilepticus (SE) was investigated in waking guinea pigs. Intrabrain EEGs in medial septal region, hippocampus, entorhinal cortex and amygdala were recorded simultaneously before (3–4 days) and during SE (4–6 hours). KA administration induced sustained limbic seizures (status epilepticus) lasted for several hours. When AM404 or URB597 was injected immediately before KA, the seizure scores were markedly reduced. Electrographic seizures were sometimes registered but terminated more quickly. In this animal group, there were neither spontaneous seizure activities nor mossy fiber sprouting. These results suggest that the blocking of the endocannabinoid metabolism can be targeted to pharmacologically modulation of seizure severity.

**Keywords:** endocannabinoids, AM404, URB597, septum, hippocampus, entorhinal cortex, amygdala, status epilepticus, kainic acid, EEG, guinea pigs

К настоящему времени в литературе накоплены данные, показывающие, что каннабиноиды могут проявлять как антиэпилептические [13, 14], так и нейропротекторные свойства [11]. Эндогенная каннабиноидная система (ЭКС), являясь важным регулятором синаптической активности, вовлечена во множество физиологических функций. ЭКС состоит из двух типов каннабиноидных G протеин-связанных рецепторов (CB1 и CB2), их эндогенных липидных лигандов (эндоканнабиноидов, ЭК) анандамида и 2-арахидонилглицерола (2-АГ), а также ферментов их синтеза, транспорта и деградации [см. обзор 5]. CB1 рецепторы широко экспрессируются в мозге на терминалях аксонов как тормозных [10], так и возбуждающих нейронов [11]. ЭК синтезируются «по мере надобности» из мембранных предшественников в постсинаптической клетке и, ретроградно активируя пресинаптические CB1 рецепторы, регулируют активность каналов и выделение нейротрансмиттеров [5]. Анандамид и 2-АГ удаляются из внекле-

точного пространства с помощью специфического механизма обратного захвата в нейронах и астроцитах и гидролизуются в клетках посредством гидролазы амидов жирных кислот и моноацилглицерол-липазы соответственно.

**Целью** настоящей работы было исследование роли ЭКС в регуляции активности различных областей мозга при эпилептическом статусе (вызванном каиновой кислотой, КК), являющемся хорошо изученной моделью височной эпилепсии [1]. Для активации ЭКС применяли ингибитор обратного захвата эндоканнабиноидов, AM404, и ингибитор фермента деградации анандамида (FAAH), URB597.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены в соответствии с международными нормами этического обращения с животными (Experientia. 1995. 51: 1–5). Опыты были поставлены на трех группах бодрствующих морских свинок. За неделю до начала опытов животным вживляли монополярные электроды в поле СА1 гиппокампа (AP = 6.6; L = 3; H = 5), медиальную септальную

область (МСО, AP = 12,2; L = 2; H = 7,5, 15°), энторинальную кору (ЭНК, AP = 4,6; L = 5,5; H = 10,5) и базальное ядро амигдалы (БАМ, AP = 10,2; L = 5; H = 12,2) для одновременной регистрации полевых потенциалов (ЭЭГ). Все микроинъекции фармакологических препаратов производили в левый боковой желудочек через вживленную канюлю (AP = 8,6; L = 2,5; H = 4,7). У всех животных в течение 3-х дней регистрировали спонтанную ЭЭГ в исследуемых структурах. Затем животным экспериментальных групп («AM404»,  $n = 6$ ; «URB597»,  $n = 5$ ) однократно вводили ингибитор обратного захвата эндоканнабиноидов AM404 (3 мкл,  $120 \cdot 10^{-9}$  моль) или ингибитор фермента деградации анандамида URB597 (2 мкл,  $4,8 \cdot 10^{-9}$  моль), а животным контрольной группы – такой же объем ДМСО («контроль») и регистрировали ЭЭГ после окончания инъекции. Через 3–4 дня животным всех групп вводился конвульсант каиновая кислота (0,4 мкг), за 5 мин до которой животным группы «AM404» вводили AM404 (3 мкл,  $120 \cdot 10^{-9}$  моль), животным группы «URB597» вводили URB597 (2 мкл,  $4,8 \cdot 10^{-9}$  моль), а животным группы «контроль» – такой же объем ДМСО. Через 1,5 часа инъекции AM404 (2 мкл,  $80 \cdot 10^{-9}$  моль), URB597 (1 мкл,  $2,4 \cdot 10^{-9}$  моль) и ДМСО (соответствующего объема) повторяли. ЭЭГ регистрировали в течение четырех часов после введения каиновой кислоты. Тяжесть поведенческих судорог оценивали в баллах по модифицированной шкале Racine (от 0 до 6, где 0 соответствовал нормальному поведению, а 6 – крайней стадии судорог, смерти животного) [12]. Запись ЭЭГ и ее анализ производили с помощью программы Datarac2K2, США, 2005 (диапазон регистрируемых частот 0–300 Гц, частота оцифровки 1кГц). Для статистического анализа применяли линейную модель одновариантного анализа (one-way ANOVA) с последующим применением критерия Тьюки. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD; различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

*Спонтанная активность исследуемых структур мозга.* Анализ ЭЭГ бодрствующих морских свинок выявил более широкий диапазон частот в гиппокампе (0–250 Гц), по сравнению с другими структурами (0–100 Гц в МСО, 0–150 Гц в ЭНК, 0–100 Гц в БАМ). В МСО была также выражена дельта-активность; тета-активность в наибольшей степени была свойственна гиппокампу. В амигдале иногда появлялся альфа-ритм, не характерный для остальных структур (рис. 1А). Разовое введение AM404, URB597 и ДМСО не приводило к существенным изменениям спонтанной активности изучаемых структур. Поведение животных после разового введения данных соединений в используемых концентрациях и объемах также не менялось.

*Модуляция эпилептического статуса.* При введении каиновой кислоты у всех контрольных животных примерно через 5–10 минут развивался эпилептический статус. Во время ЭС у морских свинок на-

блюдалось замирание, непроизвольное жевание, сильная дрожь (на начальных этапах), кружение с падением (на поздних этапах). Все это сопровождалось сильными электрографическими судорогами в ЭЭГ, представляющими собой периодические высокочастотные высокоамплитудные осцилляции. ЭС длился четыре часа и более. У всех животных группы «контроль» судорожная активность достигала 4–5 баллов по шкале Racine, при этом электрографические судороги регистрировались во всех исследуемых структурах.

При совместном введении каиновой кислоты с ингибитором обратного захвата эндоканнабиноидов AM404 (группа «AM404») либо с ингибитором фермента деградации анандамида URB597 (группа «URB597») данный конвульсант не вызывал эпилептического статуса; при этом в поведении животных отмечалось лишь легкое беспокойство. Судорожная активность была на уровне 1–2 баллов по шкале Racine. Необходимо отметить, что в группе «URB597» у 40% животных не регистрировались также электрографические судороги. В данном случае в ЭЭГ наблюдались острые волны (6–10 Гц), а также высокочастотная активность в диапазоне 100–200 Гц. В гиппокампе острые волны следовали с частотой 6 Гц; при этом обнаруживалось наложение на них высокочастотной активности на частоте 36 Гц (см. рис. 1).

*Модуляция судорожных паттернов.* Анализ паттернов судорожных эпизодов в ЭЭГ во время ЭС в контрольной и экспериментальных (в том случае, если электрографические судороги имели место) группах животных показал их сходство. Как длительность, так и частота судорожных эпизодов не различалась в контрольной и экспериментальных группах. Однако в том случае, когда каиновой кислоте предшествовало введение ингибиторов метаболизма ЭК (группы «AM404» и «URB597»), судороги спонтанно заканчивались через 3 часа после введения КА, в то время как у животных контрольной группы их приходилось останавливать введением диазепама (10 мг/кг) (рис. 2).

Проведенное исследование впервые показало, что внутримозговое системное введение ингибитора обратного захвата эндоканнабиноидов AM404, а также ингибитора фермента деградации анандамида URB597 ослабляло экспериментально вызванный эпилептический статус в различных структурах мозга.

Генерация эпилептиформной активности, представляющей собой синхронные залповые разряды большой популяции нейронов, обеспечивает повышенный вход  $Ca^{2+}$  в клетку и активацию фосфолипазы C, создавая тем самым условия для синтеза ЭК.

Так, обнаружено, что уровень ЭК сильно повышается в гиппокампе при экспериментальной эпилепсии [11, 13]. Уровень анандамида (но не 2-АГ) резко возрастал в гиппокампе мышей через 20 мин после введения проконвульсанта каиновой кислоты и возвращался к норме через час [11]. В другой работе в аналогичных условиях показано возрастание синтеза как ананда-

мида, так и 2-АГ [15]. На пилокарпиновой модели эпилепсии также показано увеличение 2-АГ в гиппокампе уже через 15 минут после развития эпилептического статуса [13]. Эти результаты наводят на мысль об адаптивной роли ЭК: известно, что за счет регуляции нейротрансмиссии они контролируют эффективность синаптических нейронных входов [6].

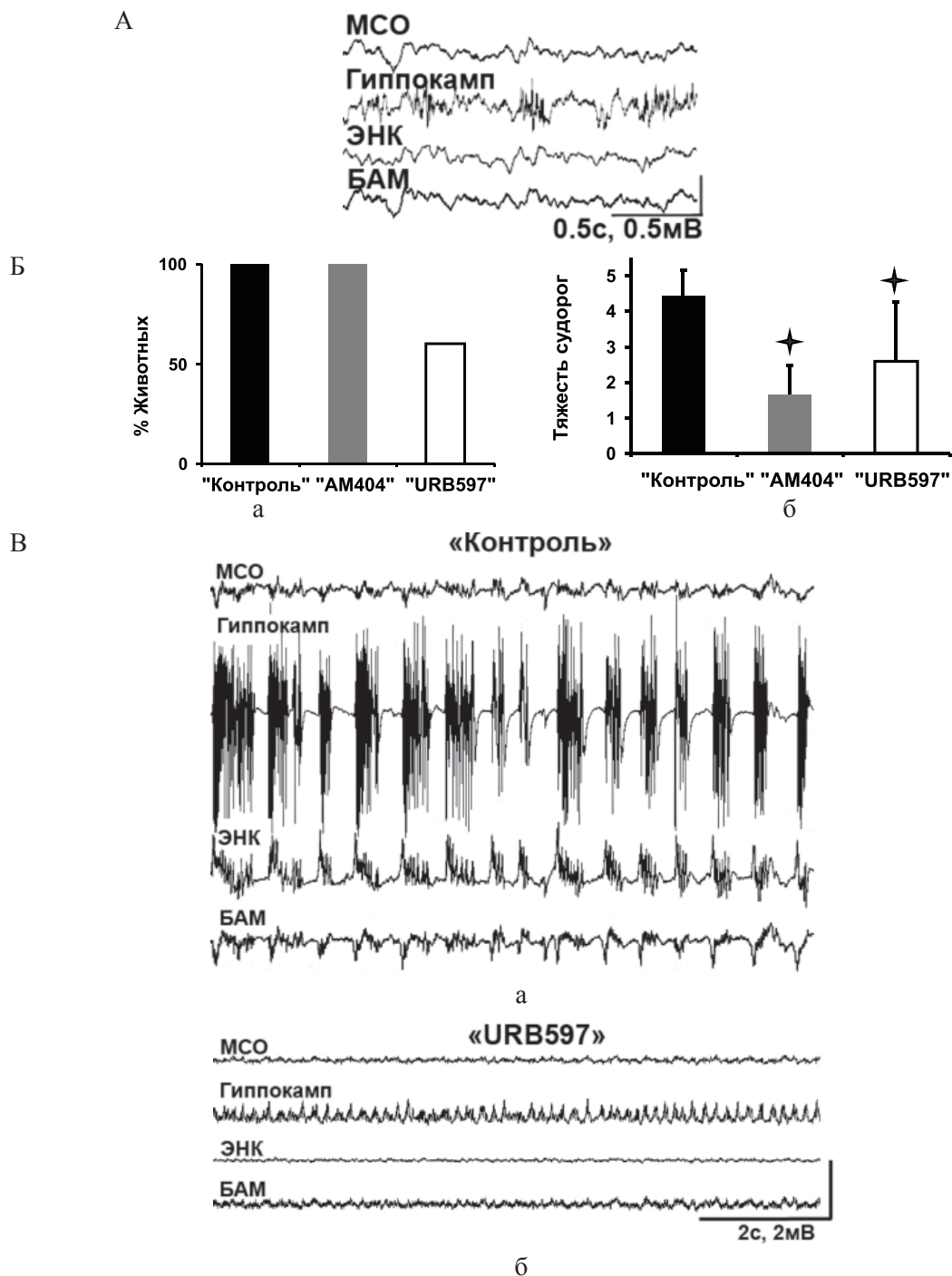


Рис. 1. Полевые потенциалы, одновременно зарегистрированные в МСО, гиппокампе, ЭНК и ЦАМ. (А) Фоновая активность. (Б) Процент животных с электрографическими судорогами (а) и тяжесть поведенческих судорог (б) после введения каиновой кислоты. (В) Электрографические судороги во время ЭС в контрольной группе животных (а) и их отсутствие в группе «URB597»

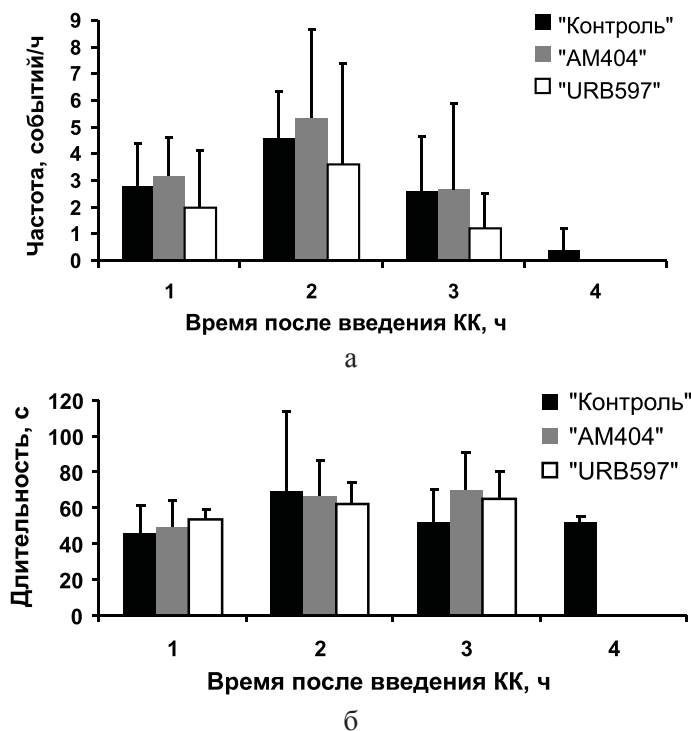


Рис. 2. Динамика частоты (а) и длительности (б) судорожных эпизодов в ЭЭГ в течение четырех часов (ч) после введения каиновой кислоты в контрольной и экспериментальных группах животных

Ранее было показано, что ингибитор мембранного транспорта AM404 усиливает действие анандамида *in vivo* [4] и на срезах гиппокампа [6]. С другой стороны, показана селективность фермента деградации анандамида (FAAH) к гидролизу анандамида [3], широкая экспрессия данного фермента в мозге [5], почти полное отсутствие ингибирования моноацилглицероллипазы ингибитором FAAH, URB597 [9]. Все это может говорить о том, что ослабление эпилептического статуса посредством как AM404, так и URB597, является следствием повышения уровня анандамида, по меньшей мере, на уровне гиппокампа. В предыдущих работах *in vivo* было также показано, что повышение уровня ЭК в мозге (опосредованное ингибиторами обратного захвата ЭК, либо ферментами их деградации) имело противосудорожное действие после инъекции проконвульсанта каиновой кислоты [2, 8, 9, 11, 15]. На другой модели, при AMPA-вызванной эксайтотоксичности, повышение уровня ЭК (посредством совместного введения ингибитора обратного захвата и фермента гидролиза анандамида) значительно снижало судорожную активность, а также защищало от повреждений

нейронов и нарушений поведения и аверсивной памяти [7].

Вещества, блокирующие инактивацию анандамида и 2-АГ, в экспериментах могут способствовать установлению их физиологической роли. В перспективе они также могут оказаться полезными при лечении ряда заболеваний.

### Выводы

1. Ингибиторы обратного захвата эндоканнабиноидов и фермента деградации анандамида, AM404 и URB597 (соответственно), повышающие уровень эндоканнабиноидов в мозге, существенно не изменяют ЭЭГ, а также не влияют на поведение животных.

2. Эпилептический статус, вызванный каиновой кислотой, существенно ослабляется ингибированием метаболизма эндоканнабиноидов AM404 и URB597 посредством их внутримозгового введения.

3. Подавление метаболизма эндоканнабиноидов не изменяет частоту и длительность судорожных эпизодов в ЭЭГ во время эпилептического статуса, однако способствует более быстрому их прекращению.

**Список литературы/ References**

1. Buckmaster P.S., Dudek F.E. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats // *J. Neurophysiol.* – 1999. – Vol. 8. – P. 712–721.
2. Coomber B., O'Donoghue F.M., Mason R. Inhibition of endocannabinoid metabolism attenuates enhanced hippocampal neuronal activity induced by kainic acid // *Synapse.* – 2008. – Vol. 62. – P. 746–755.
3. Cravatt B.F., Giang D.K., Mayfield S.P., Boger D.L., Lerner R.A., Gilula N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amide // *Nature.* – 1996. – Vol. 384. – P. 83–87.
4. Fegley D., Kathuria S., Mercier R., Li C., Goutopoulos A., Makriyannis A., Piomelli D. Anandamide transport is independent of fatty acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM117 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 8756–8761.
5. Freund T.F., Katona I., Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83. – P. 1017–1066.
6. Hájos N., Kathuria S., Dinh T., Piomelli D., Freund T.F. Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: effects of low temperature and the transport inhibitor AM404 // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 19. – P. 2991–2996.
7. Karanian D., Brown Q.B., Makriyannis A. et al. Dual modulation of endocannabinoid transport and fattyacidamide hydrolase protects against excitotoxicity // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 7813–7820.
8. Karanian D., Karim S., Wood J. et al. Endocannabinoid enhancement protects against kainic acid-induced seizures and associated brain damage // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 322. – P. 1059–1066.
9. Kathuria S., Gaetani S., Fegley D., Valino F., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G., La Rana G., Calignano A., Giustino A., Tattoli M., Palmery M., Cuomo V., Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 76–81.
10. Katona I., Sperlagh B., Sik A., Kafalvi A., Vizi E.S., Mackie K., Freund T.F. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19. – P. 4544–4558.
11. Marsicano G., Goodenough S., Monory K. et al. CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity // *Science.* – 2003. – Vol. 302. – P. 84–88.
12. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr // Clin. Neurophysiol.* – 1972. – Vol. 32. – P. 269–279.
13. Wallace M.J., Blair R.E., Falenski K.W. et al. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. – Vol. 307. – P. 129–137.
14. Wallace M.J., Wiley J.L., Martin B.R., DeLorenzo R.J. Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid anti-convulsant effects // *Eur. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 428. – P. 51–57.
15. Wettschureck N., van der S.M., Tsubokawa H. et al. Forebrain-specific inactivation of Gq/G11 family G proteins results in age-dependent epilepsy and impaired endocannabinoid formation // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 5888–5894.

**Рецензенты:**

Куликов А.В., д.б.н., зав. сектором экспериментальной трансплантологии ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», г. Пущино;

Павлик Л.Л., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктуры нейрона ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 19.09.2012.