

УДК 616.1/9:612.8

## ЦИТОХИМИЯ АПОПТОЗА В ОЧАГЕ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Сайко Ю.В., Маркина Л.Д.

ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Владивосток, e-mail: juliad77@mail.ru

В работе изучена динамика активности окислительных ферментов в очаге гипервозбудимости при каинатном киндлинге у крыс. Каинат оказывает проконвульсантное действие и одновременно при экзогенном подведении выступает как нейродеструктивный фактор, который потенцирует возникновение феномена цитотоксичности. Поражение мембраны митохондрий и, как следствие, нарушение процессов окислительно-фосфорилирования являются ключевыми моментами клеточной гибели при запуске каспазного каскада. Наши исследования показали, что апоптотический демонтаж нейронов в очаге эпилептиформной активности сочетается с изменением активности окислительных ферментов. Каинатный киндлинг ведет к неуклонному снижению активности окислительных ферментов дыхательной цепи – сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, которое максимально выражено на 7-е сутки эксперимента и по времени совпадает с появлением наибольшего количества TUNEL-положительных элементов II-III слоев височной коры. Активность данных ферментов является отражением состояния энергетической функции нейронов при эпилептическом статусе.

**Ключевые слова:** апоптоз, окислительные ферменты, киндлинг

## CYTOCHEMISTRY OF THE APOPTOSIS IN THE HYPEREXCITABILITY CENTER AT THE EXPERIMENTAL EPILEPSY

Sayko Y.V., Markina L.D.

Vladivostok state medical university, Vladivostok, e-mail: juliad77@mail.ru

In this paper we studied the dynamics of the activity of oxidative enzymes in the focus of hyperexcitability in the kainic kindling in rats. Kainate has proconvulsant action and simultaneously with exogenous summarizing acts as a neurodestructive factor that potentiates the emergence of the phenomenon of cytotoxicity. The defeat of the mitochondrial membrane and, consequently, impaired oxidative phosphorylation are key cell death when starting caspase cascade. Our studies have shown that removal of apoptotic neurons in the focus of epileptiform activity is combined with a change in activity of oxidative enzymes. Kainate kindling leads to a steady decrease in the activity of the oxidative respiratory chain enzymes – succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase, which is most pronounced on the 7th day of the experiment and the time coincides with the appearance of the greatest number of TUNEL-positive elements of the II-III layers of the temporal cortex. The activity of these enzymes is a reflection of the energy function of neurons in status epilepticus.

**Keywords:** apoptosis, oxidising enzymes, kindling

Сигнальные пути апоптоза, так или иначе, ведут к поражению митохондриальной мембраны и нарушению процессов окислительно-восстановительных реакций в дыхательной цепи, которую составляют более 70 энзимов, коферментов и активных факторов [1, 3, 5, 10].

Важнейшими звеньями окислительной системы являются сукцинатдегидрогеназа и цитохромоксидаза, расположенные соответственно в начале и в конце дыхательной цепи [7, 8, 14]. Эти два фермента, как показывают спектрометрические исследования, находятся в эквимолекулярных взаимоотношениях и организованы в кристах митохондрии комплексными ансамблями с правильными промежутками. По активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы можно судить об уровне энергетических функций клетки, состоянии цикла Кребса и редокс-процессах в нейроне. Падение активности окислительных ферментов при феномене гипервозбудимости коррелирует с состоянием митохондрий в апоптотических клетках [9, 12, 13, 15]. Стадия конден-

сации и маргинации ядерного хроматина характеризуется наличием в клетке митохондрий округлой и/или овальной формы с хорошо выраженными кристами, однако по мере углубления процесса умирания и вакуолизации цитоплазмы (блеббинг) количество крист в митохондриях резко уменьшается [2, 4, 6, 11].

### Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы состояла в комплексном исследовании состояния нейронов височной коры крыс в условиях эпилептической гипервозбудимости и окислительного стресса. Для этого нейроны идентифицировали в соответствии с их морфологическим типом, медиаторной и нейрохимической специализацией. Определяли изменения активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, а затем исследовали апоптотический индекс корковых нейронов в фокусах эпилептического повреждения. Основной раздел работы составили исследования, выполненные на материале 35 нелинейных крыс-самцов массой 250–300 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

Формирование локальных очагов перевозбуждения корковых нейронов вызывали путем введения раствора каиновой кислоты – селективного агониста

одноименных глутаматных рецепторов. Каинат оказывает проконвульсантное действие и одновременно при экзогенном подведении выступает как нейродеструктивный фактор, который потенцирует возникновение феномена цитотоксичности. Избирательное действие каината на глутаматные рецепторы реализуется в формировании стойких очагов эпилептиформной активности, которые на поведенческом уровне проявляются в виде судорог, агрессии, адипсии и афагии.

Каиновую кислоту (Sigma) вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг каждый час до наступления эпилептического статуса. Через 1,5 часа судорожного синдрома, соответствующего статусу, крысам вводили диазепам в дозе 4 мг/кг. Животных умерщвляли через 2,5 часа, на 1, 3, 5, 7 и 21 сутки посредством передозировки эфирного наркоза.

Височная (слуховая) область новой коры у крыс соответствует координатам в положении брега от -5,3 до -6,3 мм. Срезы изготавливали в поперечной и сагиттальной плоскостях, принимая во внимание различную ориентацию исследуемых клеток в трехмерном пространстве коры. Морфологические изменения нейронов в очагах эпилептического повреждения изучали с помощью метода Гольджи и Кахала. Для уточнения топологии и соматодендритной морфологии клеток часть срезов височной коры докрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля, гематоксилином-эозином, железным гематоксилином и по методу Романовского-Гимза. Активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы определялась по методу Нахласа. Присутствие ферментов в нейронах при использовании в качестве акцепторов водорода нитро-СТ устанавливается по наличию гранул диформаза интенсивно синего цвета, которые обнаруживаются в цитоплазме и отсутствуют в ядре.

### Результаты исследования и их обсуждение

Сукцинатдегидрогеназа представляет собой флавопротеид и катализирует дегидрирование янтарной кислоты в fumarовую [15]. Сукцинатдегидрогеназа локализована на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, где она передает восстановительные эквиваленты дыхательной цепи на уровне убихинона. Заметные изменения активности фермента наблюдаются спустя трое суток от начала эксперимента.

К этому времени отмечается уменьшение величины цитоплазматических гранул и снижение интенсивности их окраски, что особенно заметно в клетках с эктопированным ядром. В таких элементах интенсивно синие гранулы лежат кольцом вокруг прозрачного ядра. Максимальное угнетение активности фермента нами отмечены на 7-е сутки от начала каинат-индуцированного эпилептического статуса (табл. 1). В этот период цитоплазма нейронов выглядит в значительной степени обесцвеченной, так как содержит минимальное количество мелких гранул голубого или лилового цвета.

**Таблица 1**

Активность сукцинатдегидрогеназы в эпилептическом очаге головного мозга крысы при каинатном киндлинге (в ЕОП)

Этапы эксперимента	Контроль	Каинат
1-е сутки	3,9 ± 0,30	3,8 ± 0,2
3-и сутки	---	3,0 ± 0,3
5-е сутки	---	1,1 ± 0,02*
7-е сутки	---	0,4 ± 0,08*

Примечание: здесь и далее \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Цитохромоксидаза – гемопроtein, который служит конечным компонентом цепи дыхательных переносчиков, локализованных в митохондриях, и катализирует реакцию, в результате которой электроны, высвобождающиеся из молекул субстрата при окислении их дегидрогеназами, переходят на конечный акцептор – кислород [6, 11].

Иногда цитохромоксидазу называют цитохромом  $a_3$ . Первоначально полагали, что цитохром  $a$  и цитохром  $a_3$  – это автономные гемопроteины. В дальнейшем было показано, что эти два цитохрома входят в состав комплекса, который получил название цитохром  $aa_3$ . Он содержит две молекулы гема, в каждой из которых атом железа может переходить из состояния  $Fe^{2+}$  в состояние  $Fe^{3+}$  и обратно в ходе окисления и восстановления, а также два атома Cu, каждый из которых взаимодействует с одним из гемов.

Изменение активности цитохромоксидазы во многом сходны с изменениями сукцинатдегидрогеназы. На третьи сутки от начала каинатного киндлинга активность цитохромоксидазы снижалась как в мелких, так и крупных нейронах. В цитоплазме уменьшалось количество гранул. В части нейронов ядро занимало краевое положение. На 5-е сутки от начала эксперимента угнетение функций фермента становится более заметным. Цитоплазма поврежденных нейронов содержит мелкие бледно-голубые и фиолетовые гранулы диформаза (табл. 2).

**Таблица 2**

Активность цитохромоксидазы в эпилептическом очаге головного мозга крысы при каинатном киндлинге (в ЕОП)

Этапы эксперимента	Контроль	Каинат
1-е сутки	3,55 ± 0,50	3,44 ± 0,2
3-и сутки	---	2,9 ± 0,5
5-е сутки	---	1,6 ± 0,32*
7-е сутки	---	0,5 ± 0,12*

Наши исследования показали, что апоптотический демонтаж нейронов в очаге эпилептиформной активности сочетается с изменением активности окислительных ферментов. Гиперфункция нейроцитов эпилептического очага, направленная на восстановление утраченных связей и реактивный коллатеральный рост, ведет к неспецифическим клеточным реакциям. По мере прогрессирования эпилептогенеза при продолжающемся статусе судорожных припадков активность оксиредуктаз постоянно снижается, что указывает на альтерацию жизненно важных функций нейрона и по времени совпадает с появлением наибольшего количества TUNEL-позитивных элементов II–III слоев височной коры [6, 8, 9]. Снижение активности окислительных ферментов дыхательной цепи при синдроме гипервозбудимости максимально выражено на 7-е сутки эксперимента.

### Заключение

Терминальный цитохром  $aa_3$  (цитохромоксидаза) осуществляет конечную стадию процесса – перенос восстановительных эквивалентов на молекулярный кислород. Цитохромоксидаза имеет очень высокое сродство к кислороду, что позволяет дыхательной цепи функционировать с максимальной скоростью до тех пор, пока в ткани практически не будет исчерпан весь  $O_2$ . При эпилептическом статусе эффективность работы митохондрий может регулироваться несколькими лимитирующими факторами: доступностью АДФ и субстратов, возможностями самой дыхательной цепи при насыщающих количествах всех субстратов и компонентов и доступностью кислорода. В условиях гипоксии и окислительного стресса при эпилептической эксайтотоксичности неизбежно страдает каждое из этих звеньев, что отражается на активности митохондриальных оксидаз. Кроме того, избыточная наработка свободных радикалов ведет к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Образование и накопление диеновых конъюгатов увеличивает полярность гидрофобных углеводородных хвостов жирных кислот, которые образуют липидный бислой мембраны, и ведет к повышению проницаемости мембран, нарушению активности мембрано-связанных ферментов и ионного транспорта. Интенсификация ПОЛ способствует полному разрушению ненасыщенных липидов мембран, нарушениям структуры и функции белков, нуклеиновых кислот и в конечном итоге – гибели клетки.

### Список литературы

1. Дудина Ю.В. Клеточные и нейрохимические механизмы коркового эпилептогенеза // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2005. – № 4. – С. 11–17.
2. Дудина Ю.В. Иммунологические проблемы эпилептического мозга // Дальневосточный медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 116–118.
3. Дудина Ю.В., Калинин С.Г., Мотавкин П.А. Состояние ГАМК-ергических интернейронов височной коры при экспериментальной эпилепсии // Журнал Неврологии и психиатрии им. Корсакова, Эпилепсия, приложение к журналу. – 2006. – № 1. – С. 83–88.
4. Дудина Ю.В., Калинин С.Г., Охотин В.Е. Локализация NO-синтазы в височной коре крыс линии Крушинского-Молодкиной и участие NO в механизмах эпилептогенеза // Сознание и наука: взгляд в будущее: сб.: Международный симпозиум. – Владивосток. – 2000. – С. 346–354.
5. Мотавкин П.А., Дудина Ю.В. Морфологические и биохимические аспекты апоптоза при височной эпилепсии у человека и животных // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 1. – С. 8–12.
6. Сайко Ю.В. Типология корковых нейронов и их значение в организации процессов торможения и возбуждения при височной эпилепсии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №2. – С. 45–53.
7. Dudina Yu.V. Effect of Kainate-Induced Experimental Epilepsy on NADPH-Diaphorase and Calcium-Binding Proteins in Rat Hippocampal Neurons // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2005. – Vol. 139, № 3. – P. 309–312.
8. Dudina Yu.V. Histoensymology of cytotoxic and neuroprotective mechanisms in the human temporal cortex at status epilepticus // Neuroscience for medicine and psychology. Second International Interdisciplinary Congress. Sudak, Crimea, Ukraine, June 10–21. – 2006. – P. 85–86.
9. Dudina Yu.V. Immune status of the brain with epilepsy // Neuroscience for medicine and psychology. Second International Interdisciplinary Congress. Sudak, Crimea, Ukraine, June. – 2010. – P. 116–117.
10. Henshall D.C. Apoptosis signaling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy // Biochem. Soc. Trans. – 2007. – Vol. 35. – P. 421–423.
11. Kalinichenko S.G., Dudina Y.V., Dyuzen, I.V., Motavkin P.A. Induction of NO synthase and glial acidic fibrillary protein in astrocytes in the temporal cortex of the rat with audiogenic epileptiform reactions // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2005. – Vol. 35, №. 6. – P. 629–634.
12. Morris E.B 3rd, Parisi J.E, Buchhalter J.R. Histopathologic findings of malformations of cortical development in an epilepsy surgery cohort // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2006. – Vol. 130. – P. 1163–1168.
13. Sadleir L.G., Farrell K., Smith S., et al. Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy // Neurology. – 2006. – Vol. 67. – P. 413–418.
14. Tejada S., Sureda A., Roca C., Gamundi A., Esteban S. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine // Brain Res. – 2007. – Vol. 71. – P. 372–375.
15. Vulliemoz S., Dahoun S., Seeck M. Bilateral temporal lobe epilepsy in a patient with Turner syndrome mosaicism // Seizure. – 2007. – Vol. 16. – P. 261–265.

### References

1. Dudina Ju.V. Kletochnye i nejrohimeskie mehanizmy korskovoego jepileptogeneza // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. 2005. no. 4. pp. 11–17.

2. Dudina Ju.V. Immunologicheskie problemy jepilepticheskogo mozga // Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal. 2007. no. 4. pp. 116–118.
3. Dudina Ju.V., Kalinichenko S.G., Motavkin P.A. Sosrotozanie GAMK-ergicheskikh internejronov visochnoj kory pri jeksperimental'noj jepilepsii // Zhurnal Nevrologii i psihiatrii im. Korsakova, Jepilepsija, prilozhenie k zhurnalu. 2006. no. 1. pp. 83–88.
4. Dudina Ju.V., Kalinichenko S.G., Ohotin V.E. Lokalizacija NO-sintazy v visochnoj kore kryz linii Krushinskogo-Molodkinoy i uchastie NO v mehanizmah jepileptogeneza // V Sb.: Mezhdunarodnyj simpozium «Soznanie i nauka: vzgljad v buduwee». Vladivostok. 2000. pp. 346–354.
5. Motavkin P.A., Dudina Ju.V. Morfologicheskie i biohimicheskie aspekty apoptoza pri visochnoj jepilepsii u cheloveka i zhivotnyh // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. 2010. no. 1. pp. 8–12.
6. Sajko Ju.V. Tipologija korkovyh nejronov i ih znachenie v organizacii processov tormozhenija i vzbuzhdenija pri visochnoj jepilepsii // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. 2012. no. 2. pp. 45–53.
7. Dudina Yu.V. Effect of Kainate-Induced Experimental Epilepsy on NADPH-Diaphorase and Calcium-Binding Proteins in Rat Hippocampal Neurons // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005. Vol. 139. no. 3. pp. 309–312.
8. Dudina Yu.V. Histoensymology of cytotoxic and neuroprotective mechanisms in the human temporal cortex at status epilepticus // Neuroscience for medicine and psychology. Second International Interdisciplinary Congress. Sudak, Crimea, Ukraine, June 10–21. 2006. pp. 85–86.
9. Dudina Yu.V. Immune status of the brain with epilepsy // Neuroscience for medicine and psychology. Second International Interdisciplinary Congress. Sudak, Crimea, Ukraine, June. 2010. pp. 116–117.
10. Henshall D.C. Apoptosis signaling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy // Biochem. Soc. Trans. 2007. V. 35. pp. 421–423.
11. Kalinichenko S. G., Dudina Yu.V., Dyuzen, I.V., Motavkin P.A. Induction of NO synthase and glial acidic fibrillary protein in astrocytes in the temporal cortex of the rat with audiogenic epileptiform reactions // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2005. Vol. 35. no. 6. pp. 629–634.
12. Morris E.B 3rd, Parisi J.E, Buchhalter J.R. Histopathologic findings of malformations of cortical development in an epilepsy surgery cohort // Arch. Pathol. Lab. Med. 2006. Vol. 130. pp. 1163–1168.
13. Sadleir L.G., Farrell K., Smith S., et al. Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy // Neurology. 2006. Vol. 67. pp. 413–418.
14. Tejada S., Sureda A., Roca C., Gamundi A., Esteban S. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine // Brain Res. 2007. Vol. 71. pp. 372–375.
15. Vulliemoz S., Dahoun S., Seeck M. Bilateral temporal lobe epilepsy in a patient with Turner syndrome mosaicism // Seizure. 2007. Vol. 16. pp. 261–265.

**Рецензенты:**

Черток В.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной анатомии ГБОУ ГВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития Российской Федерации, г. Владивосток;

Матвеева Н.Ю., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой гистологии ГБОУ ГВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития Российской Федерации, г. Владивосток.  
Работа поступила в редакцию 23.04.2012.