

Т. Л. Карасева¹, д-р биол. наук, проф.,
 Я. Р. Кривенко¹,
 Л. С. Годлевский², д-р мед. наук, проф.,
 О. В. Онуфриенко²,
 А. А. Шандра², д-р мед. наук, проф.

НЕЙРОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕПТИНА

¹ Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса,

² Одесский национальный медицинский университет

С помощью современных методов исследования в молекулярной биологии в 1994 г. был открыт новый гормон — лептин [1]. Производимый адипоцитами жировой ткани гормон лептин подавляет аппетит, тормозит нарастание костной массы и снижает расход энергии у позвоночных и человека [1; 2]. Секретируемый пептид состоит из 145 аминокислотных остатков и представляет собой белок с молекулярной массой 16058 Да, кодируемый геном *ob* (*obese gene* — ген ожирения). Было показано, что ген *ob* экспрессируется в основном в адипоцитах белой жировой ткани, которые секретируют синтезируемый ими гормон лептин в кровь. Основной орган-мишень — центральная нервная система, воздействуя на которую, он снижает аппетит, стимулирует использование липидов в энергетическом обмене и уменьшает запасы жира в жировых депо.

Уникальное свойство лептина усиливать чувство насыщения длительное время считалось главной, если не единственной, особенностью этого гормона.

В литературе в последнее время появились данные о роли лептина в развитии эпилептиформной активности на моделях пентилентетразоловых и фокальных неокортикальных

судорог, вызванных введением 4-амидопиридина в опытах на крысах [3]. Лептин, введенный непосредственно в мозг или внутриназально, подавлял судороги и снижал выделение глутамата, воздействуя на глутаматные рецепторы AMPA в гиппокампе. Авторы полагают, что эти данные свидетельствуют о возможности применения гормона в терапии эпилепсии и его важной роли в регуляции высших мозговых функций [3]. В последующих электрофизиологических исследованиях была показана противосудорожная роль лептина в условиях экспериментальных моделей эпилепсии [3; 4]. Однако, по данным других авторов, лептин в электрофизиологических исследованиях на экспериментальной модели пенициллин-индуцированной эпилептической активности у крыс проявляет проконвульсивное действие, и этот эффект, по крайней мере частично, авторы связывают с ингибированием синтеза каннабиноидов [5].

Сегодня болезнь Альцгеймера признана одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Среди десяти основных причин смертности болезнь Альцгеймера занимает шестое место и остается единственным заболеванием, которое до сих пор не поддается эффективной терапии и про-

филактике. В связи с этим поиск терапевтических подходов в лечении данного заболевания приобретает все большее научное и социальное значение. Используя набор простых поведенческих тестов (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, Т-лабиринт, лабиринт Морриса) на крысах и мышах, было показано, что грелин, нейропептид Y и лептин способствуют улучшению обучения путем моделирования специфических молекулярных механизмов памяти (накопления и консолидации информации) [6; 7].

В связи с вышеизложенным представлялось целесообразным дальнейшее исследование эффектов лептина.

Цель работы — исследовать нейротропные (противосудорожные, седативные и ноотропные) свойства гормона лептина в опытах на мышах и крысах.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на белых беспородных мышах-самцах массой 18–22 г и крысах-самцах массой 180–380 г. Животных содержали на стандартной лабораторной диете при естественном освещении. Животным контрольных групп в соответствующих опытной группе объемах вводили физиологи-

ческий раствор. Лептин фирмы "Sigma-Aldrich" вводили внутривенно (в/вр) в дозах 10 и 20 нМ в соответствии с рекомендациями [6].

Общую двигательную активность определяли с помощью теста «открытое поле» [7]. В течение 2,5 мин пребывания мышей в «открытом поле» регистрировали количество вставаний на задние лапки (вертикальная двигательная активность), переходов с квадрата на квадрат (горизонтальная двигательная активность) и заглядывания в отверстия (исследовательское поведение). Седативную активность оценивали по снижению спонтанной двигательной активности животных в «открытом поле».

Изучение противосудорожной активности лептина проводили на мышах по методу «антагонизма с коразолом», учитывая способность лептина предупреждать тонико-клонический компонент судорожного припадка и смерть животных. Коразол в дозе 116 мг/кг (ED₉₅ — доза, которая способна вызывать клонико-тонические генерализованные судороги и смерть 95 % животных) вводили подкожно за 10 мин до проявления максимального эффекта исследуемого вещества. Наличие судорог и количество погибших животных регистрировали на протяжении 40–240 мин после введения коразола. Численность животных в группе составляла не менее 6 особей [8].

Изучение влияния лептина на память проводилось по методу Морриса [9] на крысах линии Вистар массой 180–200 г. Исследуемое вещество опытной группе животных вводили в/вр в суспензии с Tween-80 в дозе 10 мг/кг за 15 мин до наблюдений

в 1-й день опыта. Контрольной группе животных вводился эквивалентный объем суспензии Tween-80 в изотоническом растворе NaCl.

Изучение влияния гормона лептина на выраженность миорелаксантного действия проводили по тесту «вращающегося стержня». По методике мышей размещали через 30, 60, 90 и 120 мин после введения препарата на гладкий деревянный стержень диаметром 2 см, вращающийся со скоростью 5 об/мин. Для эксперимента отбирали животных, которые оставались на стержне 2 мин в двух повторных испытаниях. После этого мышам вводили лептин в дозе 20 нМ. Если животному не удалось удержаться на стержне более 2 мин как минимум 2 раза, тест расценивали как положительный, то есть указывающий на проявление миорелаксации. Эффект выражали в процентах по отношению к контролю [10].

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Microsoft Excel путем вычисления среднего арифметического и его уровня значимости по критерию достоверности Стьюдента при $p < 0,05$ [11].

Результаты исследования и их обсуждение

Показан, что введение лептина не вызывает седативного

действия и не изменяет общую двигательную активность мышей по сравнению с контролем (табл. 1).

Изучение влияния лептина в дозе 20 нМ в сравнении с контролем в опытах на мышах показало, что гормон не обладает миорелаксантным эффектом и не вызывает нарушения координации движений по тесту «вращающегося стержня» у экспериментальных мышей через 30, 60 и 120 мин (рис. 1).

Изучение влияния лептина на кратковременную и долговременную память крыс в тесте водного лабиринта Морриса показало, что введение гормона за 15 мин до начала эксперимента приводит к уменьшению латентного времени нахождения спасательной платформы. Так, время нахождения платформы животными контрольной группы составило ($17,8 \pm 4,1$) и ($14,7 \pm 2,9$) с в 1-й и 10-й день эксперимента. Крысы с введенным лептином 10 и 20 нМ находили платформу за ($9,4 \pm 1,3$) и ($10,8 \pm 2,0$) с соответственно. Анализ полученных результатов свидетельствует о наличии ноотропной активности у лептина и улучшении кратковременной памяти у животных на 47 %, а долговременной на 26 % по сравнению с контролем (табл. 2).

При изучении противосудорожной активности гормона лептина было отмечено, что в

Таблица 1

Влияние лептина в дозах 10 и 20 нМ на общую двигательную активность мышей в тесте «открытое поле», $n=10$

Седативная активность	Контроль	Лептин	
		10 нМ	20 нМ
Горизонтальная	$36,10 \pm 1,05$	$35,50 \pm 1,41$	$44,00 \pm 1,45$
Вертикальная	$9,50 \pm 0,56$	$8,80 \pm 0,92$	$9,30 \pm 1,20$
Исследовательская	$27,20 \pm 1,32$	$26,50 \pm 1,31$	$25,30 \pm 1,35$
Общая двигательная	$72,80 \pm 1,21$	$71,00 \pm 1,50$	$74,20 \pm 1,42$

дозах 10 и 20 нМ лептин защищает 33 % животных от тонико-клонических судорог и смерти, вызванных коразолом, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Вместе с тем выявлено, что после в/бр введения лептина в дозе 20 нМ, а через 40 мин введения подкожно коразола подопытным животным у всех экспериментальных мышей в течение 30 мин наблюдался тремор и стереотипное поведение (грызут хвост и замирают), а затем восстанавливается нормальная двигательная и исследовательская активность.

Наблюдение за развитием противосудорожного эффекта гормона лептина в дозе 20 нМ через 40 мин, 2, 4 и 12 ч показало, что в течение четырех часов после введения лептин оказывал пролонгированное противосудорожное действие, а в последующем активность снижалась (рис. 2).

Таким образом, проведенные исследования показали, что лептин увеличивал латентный период развития, уменьшал тяжесть судорог и снижал смертность животных в условиях модели коразоловых судорог. Известно, что данная модель судорог — одна из наиболее чувствительных к моделирующим влияниям и обязательна при исследовании новых противосудорожных средств [12]. Учитывая нейрохимические механизмы действия пентилтетразола, можно предположить, что лептин усиливает механизмы ГАМК-ергического торможения [12]. Необходимо дальнейшее исследование для выяснения механизмов противосудорожного действия лептина.

Обращает на себя внимание выявление нами выраженной продолжительности противосудорожного действия лептина

Миорелаксантное действие, %

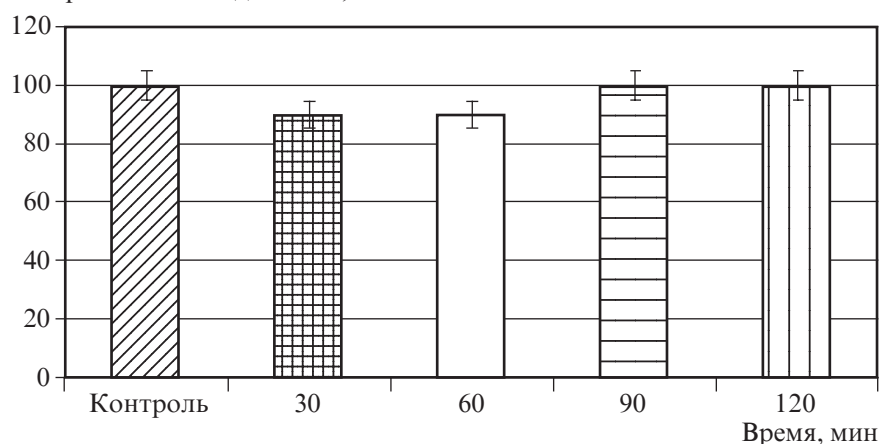


Рис. 1. Влияние гормона лептина в дозе 20 нМ на выраженность миорелаксантного действия по тесту «вращающегося стержня» в опытах на мышах в течение 2 ч

Таблица 2

Противосудорожная и ноотропная активность гормона лептина в дозах 10 и 20 нМ в опытах на мышах и крысах

Показатель	Конт-роль	Лептин	
		10 нМ	20 нМ
Латентный период развития судорог, с	60	52	80*
Эффект защиты от судорог, %	16,7	33*	33*
Влияние на память			
Латентный период, с			
1-й день	17,8±4,1	9,4±1,3	—
10-й день	14,7±2,9	10,83±2,00	—
Ноотропный эффект, %			
1-й день	100	147,2*	—
10-й день	100	126,3*	—

Примечание. * — $p < 0,05$ — достоверные изменения исследуемых показателей по сравнению с таковыми в контрольных исследованиях.

Противосудорожный эффект, %

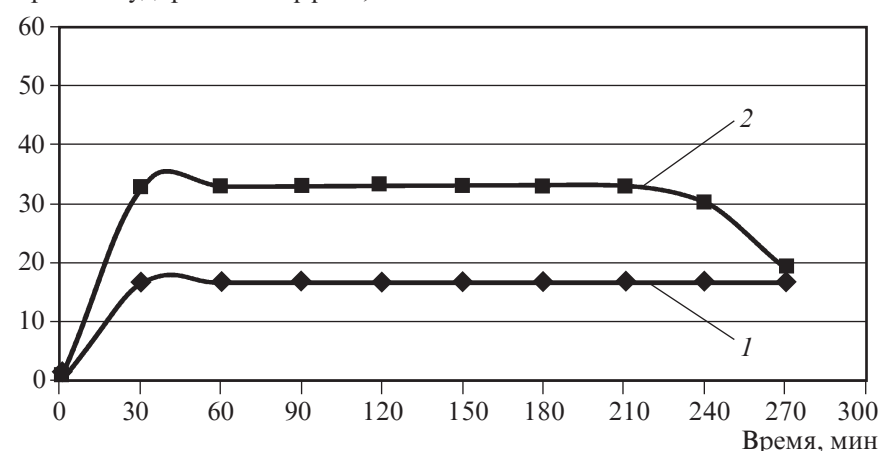


Рис. 2. Кривая зависимости противосудорожного эффекта гормона лептина от времени по тесту «антагонизма с коразолом» в опытах на мышах: 1 — контроль; 2 — лептин 20 нМ

в течение четырех часов после его введения. Важно также отсутствие влияния лептина на координацию движения и общую двигательную активность, что, возможно, свидетельствует об отсутствии нейротоксического действия гормона. Наряду с этим лептин оказывал весьма важные ноотропные эффекты, проявляющиеся в улучшении памяти у животных. Известно, что один из наиболее частых побочных эффектов существующих противоэпилептических препаратов — долговременное нарушение когнитивных процессов как у животных, так и у пациентов [13; 14].

Следует признать тот факт, что на сегодняшний день терапия эпилепсии в большей степени симптоматическая и не существует надежной стратегии профилактики ее развития. Известно, что у более трети пациентов монотерапия эпилепсии не эффективна. Поэтому полученные нами данные позволяют предположить возможность применения лептина в качестве дополнительного препарата в комплексной фармакотерапии эпилепсии.

Таким образом, можно предположить, что нейротропные эффекты лептина (ноотропные, противосудорожные, седативные) опосредованы участием ГАМК-ергической системы.

Выводы

1. Введение гормона лептина в дозе 10 нМ приводит к улучшению как кратковременной, так и долговременной памяти крыс в водном лабиринте Морриса по сравнению с контролем.

2. Лептин в дозе 20 нМ защищает 33 % животных от тонико-клонических судорог, вызванных коразолом, по сравне-

нию с контролем, не изменяет общую двигательную активность и не проявляет седативного эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. *A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure* / K. Vijay, G. Franck, N. Suda [et al.] // *Cell*. – 2009. – Vol. 138. – P. 976–938.

2. *Панкрушина А. Н.* Лептин: новые перспективы и подходы к коррекции ожирения / А. Н. Панкрушина, К. Ю. Толстых // *Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология»*. – 2008. – Т. 10. – С. 27–34.

3. *Sabrina D.* Anticonvulsant effects of leptin in epilepsy / Diano Sabrina, Horvath Tamas L. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2008. – Vol. 118., Iss. 1. – P. 26.

4. *Leptin inhibits 4-aminopyridine — and pentylene-tetrazole-induced seizures and AMPAR-mediated synaptic transmission in rodents* / Lin Xu, Nicholas Rensing, Xiao-Feng Yang [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118 (1). – P. 272–280.

5. *The Role of CB₁-Receptors in the Proconvulsant Effect of Leptin on Penicillin-Induced Epileptiform Activity in Rats* / G. Arslan, S. K. Alici, M. Ayildiz, E. Agar // *Journal of Clinical Investigation*. – 2008. – Vol. 118, Iss. 16. – P. 373–382.

6. *Лильп И. Г.* Межлинейные различия в способности к обучению мышей линий 101/НУ и СВА в водном лабиринте (модифицированный тест Морриса) / И. Г. Лильп, Ф. З. Бизикова, И. И. Полетаева, В. И. Иванов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* – 1997. – Т. 124. – С. 666–668.

7. *Пат. RU 221249 С2 А61К38/17* Применение антагонистов лептина для лечения резистентности к инсулину при диабете II типа / Эртль Йохан, Прайтиш Геральд, Мюллер Гюнкор. – 1997. – Публикация РСТ WO 98/12224 26.03.1998 г.

8. *Dewar K. M.* Pharmacological effects of leptin / K. M. Dewar // *J. Pharmacol. Experiment. Therap.* – 1989. – Vol. 250, N 2. – P. 696–706.

9. *Morris R.* Developments of a water-maze procedure for studying spatial

learning in the rat / R. Morris // *Journal Neurosci Methods*. – 1984. – Vol. 11 (1). – P. 47–60.

10. *Гацура В. В.* Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура. – М. : Медицина, 1974. – 130 с.

11. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – 2-е изд., перераб. и доп. – К. : Морион, 2001. – 408 с.

12. *Loscher H. W.* The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs III. Pentylene-tetrazole seizure models. 1991 / H. W. Loscher, D. N. Fassbender, C. P. Nolting // *Epilepsy Res.* – 1991. – Vol. 8. – P. 171–189.

13. *Effects of neonatal antiepileptic drugs exposure on cognitive, motor function in adult rats* / P. A. Forcelli, M. J. Janssen, S. Vicini, K. Gale // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2012. – Vol. 340. – P. 558–566.

14. *Late cognitive effects of early treatment with Phenobarbital* / S. Sulzbacher, J. R. Farwell, N. Temkin [et al.] // *Clin. Pediatr.* – 1999. – Vol. 38. – P. 387–394.

Поступила 21.04.2016

Рецензент д-р мед. наук,
проф. П. С. Вастьянов

УДК 615.828:612.825.1

Т. Л. Карасева, Я. Р. Кривенко, Л. С. Годлевский,
О. В. Онуфриенко, А. А. Шандра

НЕЙРОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕПТИНА

Исследования проводили на белых беспородных мышцах-самцах массой 18–24 г и крысах-самцах линии Вистар массой 180–350 г. Лептин вводили в дозах 10 и 20 нМ в буферном растворе экспериментальным животным. Изучение противосудорожной активности в опытах на мышцах показало, что гормон лептин защищает 33 % животных от тонико-клонических судорог, вызванных коразолом (116 мг/кг). В тесте «открытое поле» гормон лептин не проявлял седативного действия и не изменял общую двигательную активность животных. При введении лептина в дозе 10 нМ крысам при изучении влияния на кратковременную и долговременную память в тесте водного лабиринта Морриса обнаружено, что гормон приводит к улучшению как кратковременной, так и долговременной памяти у крыс.

Ключевые слова: гормон лептин, клонико-тонические судороги, обучение, память.

UDC 615.828:612.825.1

T. L. Karasyova, Ya. R. Krivenko, L. S. Godlevsky, O. V. Onufrienko, A. A. Shandra

NEUROTROPIC EFFECTS OF LEPTIN

Investigations have been performed on male mice weighing 18–24 g and rats weighing 180–350 g. Leptin was injected at a dose of 10 and 20 nM in a buffer solution to experimental animals. Study of the anticonvulsant activity in mice revealed that the hormone leptin protects 33% of animals against tonic-clonic seizures induced Corazol (116 mg/kg). In the open field the hormone leptin did not show sedative effects and did not change the locomotor activity of animals. When leptin administration at a dose of 10 nM when studying the influence on the short and long term memory in the Morris water maze test it was found that leptin lead to an improvement in both short and long-term memory in rats.

Key words: hormone leptin, seizures, learning, memory.

УДК 615.917.015

Л. В. Аніщенко

ОСОБЛИВОСТІ МЕХАНІЗМІВ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ПОЛІОЛІВ

Одеський національний медичний університет

Вступ

Питання охорони природи і раціонального використання ресурсів багато в чому визначаються охороною водойм від забруднення стічними водами промислових підприємств, які, потрапляючи до водойми, можуть викликати серйозні утруднення в постачанні населенню доброякісної води. Вищесказане стосується і виробництва поліоксипропіленополіолів (ПОПП). До недостатньо вивчених у гігієнічному плані ПОПП, які можуть забруднювати водойми, належать: поліоксипропілен-оксиетиленглікольуретан (ПОПП-100), поліоксипропіленамін (ПОПП-294), поліоксипропільована сахароза з поліоксипропілентріолом (ПОПП-504) [1; 2; 7; 9; 10].

Вивчення ступеня небезпеки хімічних факторів базується на

великому діапазоні досліджень, серед яких обов'язковим є встановлення особливостей їх біологічної дії. Особливого значення набуває визначення токсикокінетичних і метаболічних критеріїв оцінки токсичності ксенобіотиків, їх впливу на антиоксидантну систему організму, що й було метою даного дослідження.

Матеріали та методи дослідження

Санітарно-токсикологічні дослідження зі встановлення параметрів токсичності виконані на статевозрілих щурах популяції Вистар і білих мишах з урахуванням методичних показань О. Н. Елизаровой [3].

Розрахунок середньолетальних доз (DL_{50}) проводили відповідно до методичних рекомендацій Г. Н. Крассовского [6].

Кумулятивні властивості речовин вивчали за методом R. K. Lim et al. [11]. Коефіцієнти кумуляції (Кк) визначали відповідно до методичних розробок [4].

Вивчення кумулятивних властивостей поліолів проводили в умовах довготривалого впливу протягом 30 діб. Коефіцієнти кумуляції речовин розраховували за формулою:

$$K_k = (D_k \cdot 50) / (DL_{50} \cdot a \cdot n),$$

де D_k — сумарна доза, отримана всіма тваринами протягом експерименту (загиблими та вижившими); a — відсоток загиблих тварин; n — кількість тварин.

Вміст ДК у сироватці крові визначали спектрографічним методом А. Б. Каухина, Б. С. Ахметовой [5] і розраховували за допомогою коефіцієнта молярної екстинкції, який дорівнював $2,2 \cdot 10^5 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$. Вміст малоново-