

## ДВА ТИПИ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ АКТИВНОСТІ, ІНДУКОВАНОЇ У ЩУРІВ ПОВТОРНИМИ ВВЕДЕННЯМИ ПІКРОТОКСИНУ В СУБКОНВУЛЬСИВНИХ ДОЗАХ

Надійшла 09.01.2014

Судомну активність у щурів індукували за допомогою пікротоксину, який протягом 4 год вводили внутрішньоочередово кожні 30 хв у субконвульсивних дозах (0.9 мг/кг при першій ін'єкції та 0.7 мг/кг – при наступних). Викликану такими впливами епілептиформну активність (ЕфА) можна було поділити на два типи – з розвитком тільки пік-хвильових (П-Х-) комплексів (68.4 %) та регулярну кортикальну пікову активність, до якої додавалася генерація лише окремих нетривалих П-Х-розрядів (31.6 %). У тварин з ЕфА першого типу спостерігався поетапний розвиток клонічних судом різної інтенсивності. У частини щурів цієї групи після останньої (дев'ятої) ін'єкції пікротоксину відзначалися важкі клоніко-тонічні судоми. У тварин з ЕфА другого типу П-Х-розряди після останніх ін'єкцій пікротоксину мали меншу тривалість, ніж у щурів без генерації коркових піків, і супроводжувалися клонічними судомами меншої інтенсивності.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** епілептиформна активність, пікротоксин, судоми, пік-хвильові ЕЕГ-розряди, регулярні кортикальні пікові розряди.

### ВСТУП

Дослідники механізмів розвитку епілепсії приділяли та приділяють багато уваги питанням виникнення і розповсюдження надмірного збудження в нейронних системах мозку, а також пошуку і з'ясуванню ролі компенсаторних механізмів, які активуються під час епілептизації [1–3]. На сьогодні одним із актуальних питань експериментальної епілептіології є створення нових моделей, котрі дозволяють відслідковувати зміни під час швидко наростаючої синхронізації та генералізації епілептиформної ЕЕГ-активності (ЕфА). Першими, хто показали можливість формування ефектів „швидкого” або прискореного кіндлінгу, були дослідники, які вивчали залежність формування електростимуляційного кіндлінгу від режиму та параметрів електричної стимуляції гіпокампа [4]. Відомо, що класичний кіндлінг можливо сформувавши не тільки за допомогою електростимуляції лімбічних та неокортикальних ділянок мозку, але й із використанням низки фармакологічних впливів. Враховуючи феномени перехресної чутливості та синергізму при

дії кіндлінгових стимулів різної природи, частина дослідників вважають, що патогенетичні механізми формування ЕфА в умовах різних моделей кіндлінгу є значною мірою спільними [5]. Нещодавно була запропонована модель індукування гострих судом за допомогою повторних уведень пентилентетразолу в субконвульсивних дозах протягом усього 70 хв [6]. В умовах таких експериментів формувалася стан особливого типу, який дослідники називали генералізованим безсудомним епілептичним статусом. Відтворення в експерименті нейронної гіперактивності подібного типу дає можливість дослідити закономірності утворення, розвитку та реорганізації епілептогенних та антиепілептогенних систем протягом короткого часового інтервалу.

Метою нашого дослідження було з'ясування особливостей прискореного формування прогресуючої ЕфА в щурів за допомогою повторних системних уведень пікротоксину в субконвульсивних дозах протягом декількох годин.

### МЕТОДИКА

Експерименти були виконані на 19 самцях білих нелінійних щурів масою 180–250 г в умовах хронічного експерименту. Підготовчі

<sup>1</sup>Одеський національний медичний університет МОЗ України (Україна).

<sup>2</sup>Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова (Україна).

Ел. пошта: shandra@odessa.net (О. А. Шандра);

ksenia\_den@mail.ru (О. В. Денисенко).

операції виконували під комплексним наркозом (тіопентал натрію, 70 мг/кг + каліпсол, 7 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Здійснювали трепанацію черепа та вживляли монополярні ніхромові електроди в лаковій ізоляції з діаметром кінчика 0.10–0.15 мм. Стереотаксичну імплантацію електродів у лобну кору великих півкуль, вентральний гіпокамп та медіодорсальний таламус проводили згідно зі стереотаксичним атласом [7] за наступними координатами: фронтальна кора – AP = 2.4; L = 0.8; H = 1.2; гіпокамп – AP = –4.8; L = 5.0; H = 7.0; таламус – AP = –2.8; L = 0.5; H = 5.5. Електроди фіксували до черепа за допомогою стоматологічної пластмаси (протакрилу). Відведення електричної активності, введення конвульсанта та дослідження поведінкових реакцій здійснювали не раніше ніж через сім діб після підготовчих операцій. Реєстрацію ЕЕГ у щурів проводили в умовах, наближених до вільної поведінки, протягом 30 хв до введення конвульсанта і 5–6 год після цього. Використовували диференційний підсилювач DL304 («НейроБиоЛаб», РФ), підключений до АЦП (L-154, «Л-КАРД», РФ). Запис і аналіз ЕЕГ-активності здійснювали в середовищі програми багатоканального осцилографа «PowerGraph» (ООО «ДИСофт», РФ).

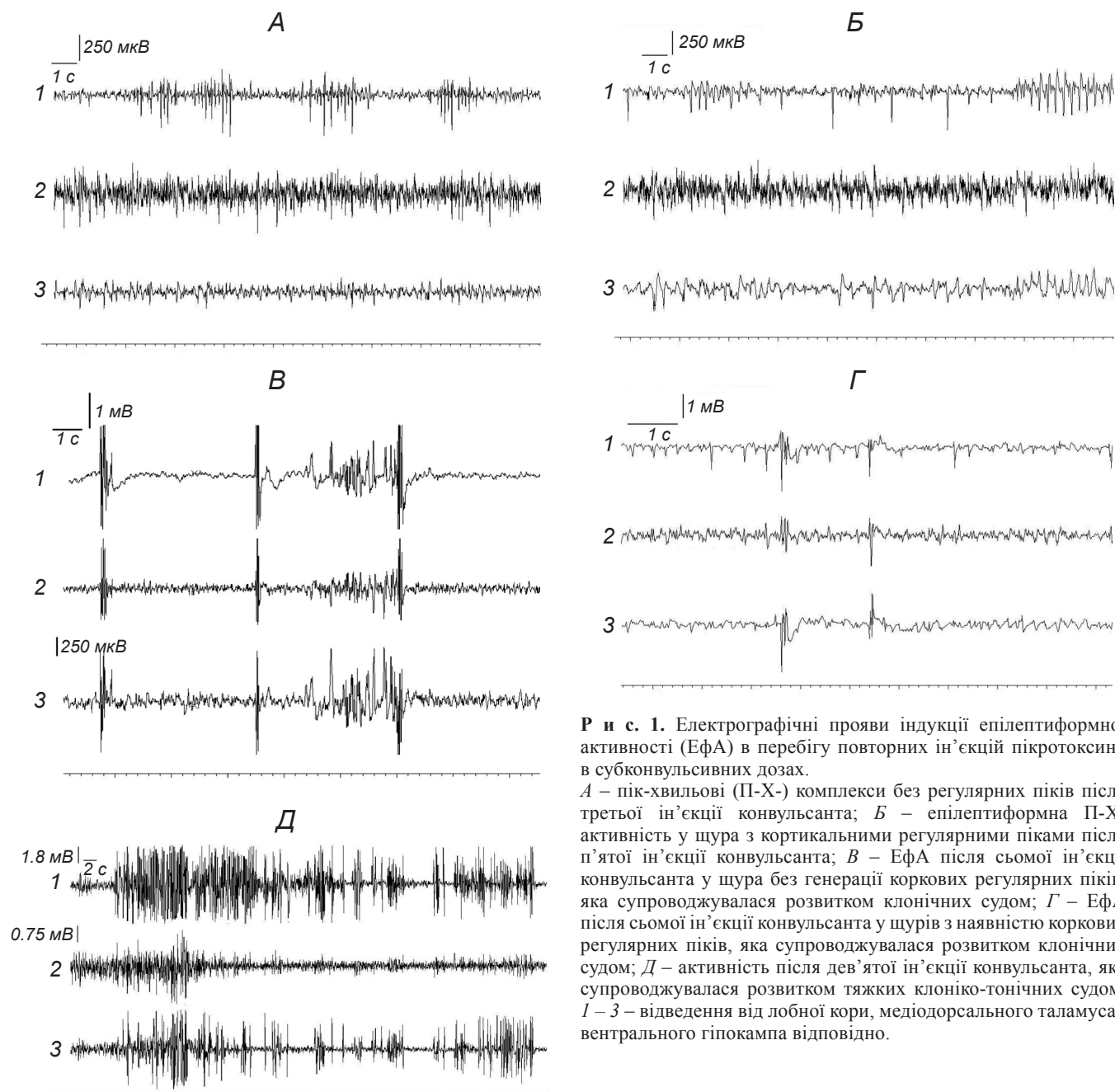
ЕфА індукували за допомогою введення пікротоксину («Sigma», США). Конвульсивний ефект цього агента пов'язаний із порушенням ГАМК-ергічного гальмування. Препарат вводили внутрішньоочеревинно кожні 30 хв у дозах 0.9 мг/кг при першій ін'єкції та 0.7 мг/кг – при наступних. Сумарна доза конвульсанта, яку одержували щури в експерименті, не перевищувала 6.5 мг/кг.

Аналізували частотно-амплітудні характеристики пік-хвильових (П-Х-) ЕЕГ-комплексів, окремих пікових ЕЕГ-потенціалів, генерація яких не супроводжувалася поведінковими судомними проявами, а також генералізованих потенціалів, зареєстрованих під час розвитку клонічних та клоніко-тонічних судом. Частоту генерації епілептиформних потенціалів вимірювали в межах трихвилинних періодів і підраховували її середні значення. Крім того, досліджували динаміку тривалості генерації генералізованих П-Х-потенціалів, пов'язаних із розвитком судомних проявів. При цьому підраховували сумарну тривалість трихвилинних ЕЕГ-відрізків, у межах яких генерувалися судомні потенціали, та визначали середнє значення тривалості епілептиформних ЕЕГ-потенціалів протягом 1 хв. За ЕЕГ-піки вважа-

ли високоамплітудні (> 300–400 мкВ) швидкі коливання з тривалістю не більше 50 мс, не супроводжувані хвилиєю. Якщо ці розряди повторювалися з періодом від 3 до 20 с, ЕфА після введення пікротоксину розцінювалася як така з регулярною генерацією піків. Одночасно відслідковували поведінкові зміни з визначенням інтенсивності судомних проявів, візуально оцінюючи їх за п'ятибальною шкалою. При цьому відсутність судомних проявів відповідала нулю балів, міофасціальні здригання – одному балу, клонічні судоми м'язів голови та тулуба – двом балам, клонічні судоми м'язів передніх кінцівок та підймання на задні кінцівки («поза кенгуру») – трьом балам, генералізовані клоніко-тонічні судоми з падінням тварин на бік – чотирьом балам, а повторні генералізовані клоніко-тонічні судоми – п'яти балам [8]. Числові результати обробляли статистично із розрахунком середнього значення та стандартного відхилення, а також довірчого інтервалу (*P*); оцінку ступеня вірогідності міжгрупових відмінностей виконували за допомогою критерію ANOVA. Відмінності вважалися статистично вірогідними при *P* < 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Для формування ЕфА щурам кожні 30 хв вводили пікротоксин у дозі, яка спочатку у більшості тварин не забезпечувала появу якихось судомних змін у поведінці. У 21 % щурів через 3–6 хв після першої ін'єкції конвульсанта спостерігали нетривале (до 1 хв) зниження рухової активності – «завмирання». Повторне введення пікротоксину викликало збільшення тривалості таких періодів до 5–7 хв і поступовий розвиток клонічних судом. Характер поведінкових проявів корелював із типом ЕЕГ-активності, яку реєстрували в цей час. Розвиток ЕфА в наших дослідах супроводжувався формуванням кортикальної активності двох типів. ЕЕГ-активність першого типу була характерна для 13 із 19 (68.4 %) щурів. У таких тварин після однієї–трьох ін'єкцій пікротоксину в неокортексі відбувалася генерація значної кількості комплексів П-Х-активності (рис. 1, А). Амплітуда цих розрядів не перевищувала 400 мкВ, а частота складала 6–8 с<sup>-1</sup>. Після введення четвертої дози пікротоксину в усіх тварин, ЕфА котрих характеризувалася наявністю виключно П-Х-розрядів, спостерігалися клонічні скорочення м'язів морди, голови та передньої частини тулуба. Середня інтенсивність таких судом

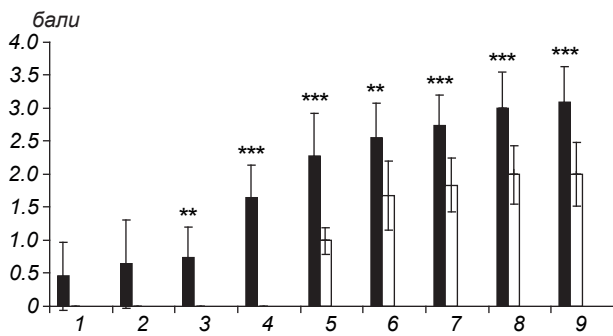


**Р и с. 1.** Електрографічні прояви індукції епілептиформної активності (ЕФА) в перебігу повторних ін'єкцій пікротоксину в субконвульсивних дозах.

*А* – пік-хвильові (П-Х-) комплекси без регулярних піків після третьої ін'єкції конвульсанта; *Б* – епілептиформна П-Х-активність у щура з кортикальними регулярними піками після п'ятої ін'єкції конвульсанта; *В* – ЕФА після сьомої ін'єкції конвульсанта у щура без генерації коркових регулярних піків, яка супроводжувалася розвитком клонічних судом; *Г* – ЕФА після сьомої ін'єкції конвульсанта у щурів з наявністю коркових регулярних піків, яка супроводжувалася розвитком клонічних судом; *Д* – активність після дев'ятої ін'єкції конвульсанта, яка супроводжувалася розвитком тяжких клоніко-тонічних судом. 1 – 3 – відведення від лобної кори, медіодорсального таламуса і вентрального гіпокампа відповідно.

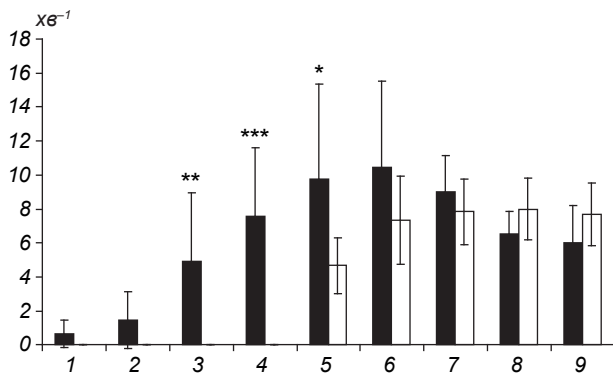
складала  $1.67 \pm 0.5$  бала (рис. 2). Зареєстровані поведінкові зміни відбувалися на тлі поступового збільшення частоти і тривалості синхронізованих П-Х-розрядів (рис. 3; 4). Після шостої–восьмої ін'єкції конвульсанта інтенсивність судом у даних щурів підвищувалася (максимально до трьох балів; рис. 2). В цей час у складі ЕЕГ-активності кори, таламуса і гіпокампа реєстрували генералізовані швидкі та повільні хвилі, які склались у ритмічний рисунок П-Х-розрядів, чергованих з

періодами низькоамплітудної активності (рис. 1, *В*). Найбільше зростання частоти П-Х-комплексів спостерігали після шостої ін'єкції конвульсанта, коли згаданий показник досягав  $10.45 \pm 5.05$  хв<sup>-1</sup>. Тривалість судом підвищувалася поступово, протягом усього періоду формування таких рухів – до  $26.9 \pm 6.57$  хв<sup>-1</sup> (рис. 3; 4). Після останньої, дев'ятої, ін'єкції пікротоксину у двох тварин із 13 з генерацією П-Х-активності реєструвався розвиток генералізованих клоніко-тонічних судом. Таке значне зростання інтенсивності судом супровод-



**Р и с. 2.** Інтенсивність поведінкових судом у щурів в умовах прискореної індукції епілептиформної активності за допомогою повторних ін'єкцій пікротоксину (1–9) в субконвульсивних дозах.

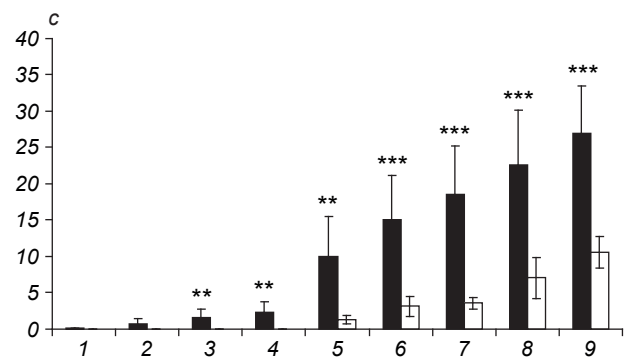
Чорні та білі стовпчики – середня інтенсивність судом (бали) у тварин з епілептиформною ЕЕГ-активністю першого і другого типів відповідно; наведені також значення стандартних відхилень. Двома і трьома зірочками позначені випадки вірогідних міжгрупових різниць із  $P < 0.01$  та  $P < 0.001$  відповідно.



**Р и с. 3.** Частота генерації пік-хвильових розрядів ( $\text{хв}^{-1}$ ) в умовах прискореної індукції епілептиформної судомної активності. Однією зірочкою позначено наявність міжгрупової різниці з  $P < 0.05$ . Решта позначень аналогічні таким на рис. 1.

жувалося збільшенням як частоти, так і тривалості П-Х-розрядів високої амплітуди (в корі – в середньому  $3.51 \pm 0.46$ , у таламусі –  $1.42 \pm 0.41$  і в гіпокампі –  $2.23 \pm 0.51$  мВ) тривалістю до 40–50 с (рис. 1, Д).

Інший тип ЕЕГ-активності спостерігався в решти щурів (шести тварин, 31.6 %) (рис. 1, Б). У таких щурів після першого–третього введення пікротоксину відбувалося формування регулярної пікової ЕЕГ-активності в корі. Результати дослідження процесів розвитку цих епілептиформних потенціалів показали, що така активність у початковий період формування ЕфА виникала в різних структурах асинхронно; лише в одному випадку відбувалася синхронна генерація подібних потенціалів у корі та гіпокампі. Генерація кортикальних ЕЕГ-піків поступово набувала регулярного характеру; такі потенціали



**Р и с. 4.** Тривалість пік-хвильових розрядів (с) у межах однохвилинних інтервалів часу в умовах прискореної індукції епілептиформної судомної активності.

Позначення аналогічні таким на рис. 2 і 3.

виникали з інтервалами 3–8 с. Середня частота подібних потенціалів складала  $14.8 \pm 3.27$   $\text{хв}^{-1}$ , амплітуда –  $468.5 \pm 43.2$  мкВ. Активність такого типу на перших етапах формування не супроводжувалася розвитком судомних поведінкових проявів. При подальшому формуванні ЕфА у таких щурів окрім регулярних коркових пікових потенціалів реєстрували генерацію синхронних П-Х-розрядів. Після п'ятого введення конвульсанта на тлі генерації перших П-Х-розрядів та зменшення частоти кортикальних піків до  $9.6 \pm 1.67$   $\text{хв}^{-1}$  у щурів спостерігалися періоди імобілізації та міофасціальні здригання (рис. 2). У тварин з ЕфА другого типу П-Х-комплекси були менш тривалими, ніж у щурів з відсутністю генерації кортикальних піків, і ці розряди супроводжувалися клонічними судомами, інтенсивність яких не перевищувала двох балів (рис. 1, Г; 2; 4).

## ОБГОВОРЕННЯ

Таким чином, згідно з результатами наших досліджень, повторні введення пікротоксину в субконвульсивних дозах протягом декількох годин призводять до індукції ЕфА, котру за низкою особливостей можна поділити на дві групи: активність з розвитком виключно П-Х-комплексів та регулярну коркову пікову активність із генерацією лише спорадичних нетривалих П-Х-розрядів.

У тварин першої групи формування ЕфА супроводжувалося поетапним розвитком клонічних судом різної інтенсивності. У двох щурів цієї групи (10.5 %) після останньої, дев'ятої, ін'єкції пікротоксину відбувалася генерація тяжких клоніко-тонічних судом. Наростаюча інтенсивність судом під

впливом повторних уведень пікротоксину нагадує таку при розвитку швидкого кіндлінгу, індукованого електричною стимуляцією структур лімбічної системи [4].

У другій групі розвиток регулярної пікової ЕЕГ-активності супроводжувався розвитком лише помірних поведінкових судом (середня інтенсивність два бали). Механізми генерації та патогенетичне значення пікової ЕФА вивчені недостатньо [9–12]. Протягом декількох десятиків років епілептологи вважали, що збільшення частоти та амплітуди пікових розрядів залежить від посилення проепілептичних впливів у нейронних структурах, і це якось пов'язано з активацією просудомних механізмів [10, 12]. З урахуванням зазначених даних клініцисти призначають протиепілептичні засоби та обирають їх дози з метою не тільки запобігти розвитку тривалих іктальних ЕЕГ-розрядів, але й цілком пригнітити генерацію інтеріктальних пікових розрядів.

Гіпотеза про те, що розвиток інтеріктальних пікових розрядів є, скоріше за все, проявом активації не про-, а протисудомних механізмів, була вперше висунута при дослідженні змін амплітуди та кількості ЕЕГ-піків, а також порога виникнення судомних нападів у перебігу електростимуляційного кіндлінгу [11]. У нашому дослідженні у 31.6 % тварин спостерігалася генерація регулярної пікової активності в корі, і така ситуація якраз може бути проявом активації протисудомних механізмів. Підтвердження даного припущення є той факт, що судоми, сформовані в разі генерації саме подібної пікової кортикальної активності, були вірогідно менш інтенсивними, ніж відповідні показники у тварин з генерацією виключно П-Х-комплексів.

Раніше нами в умовах формування „класичного” фармакологічного кіндлінгу також було показано, що при цьому електрографічні та поведінкові прояви судомних реакцій мають бути віднесені до двох типів [13]. В інбредних щурів лінії WAG/Rij з генетично детермінованою схильністю до судомних реакцій абсансного типу електрокортикографічні прояви з різною вираженістю пароксизмальних П-Х-комплексів знову-таки розділялися на два типи [14].

Узагальнюючи вищенаведене, можна зазначити, що формування ЕФА двох типів в умовах індукції такої активності за допомогою повторного введення пікротоксину в субконвульсивних дозах протягом декількох годин дозволяє запропонувати додаткову модель епілептогенезу; це може виявитися корисним у дослідженнях механізмів даного явища.

Робота з експериментальними тваринами проводилася відповідно до вимог вітчизняних та міжнародних стандартів стосовно використання лабораторних тварин в експериментальних дослідженнях (Конвенція Ради Європи, 1986; Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.06, № 3447-IV), а також комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 28 Д від 09.11.12).

Під час проведення роботи не виникало жодних конфліктів, котрі стосувалися комерційних або фінансових відношень, відношень з організаціями або особами, будь-яким чином пов'язаними з дослідженням, та взаємовідносин співавторів статті – О. В. Денисенко та О. А. Шандри.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. S. Galanopoulou and S. L. Moshé, “The epileptic hypothesis: developmentally related arguments based on animal models,” *Epilepsia*, **50**, Suppl. 7, 37-42 (2009).
2. E. J. Frances, “Epilepsy as a spectrum disorder: Implications from novel clinical and basic neuroscience,” *Epilepsia*, **52**, Suppl. 1, 1-6 (2011).
3. J. O. McNamara, “Cellular and molecular basis of epilepsy,” *J. Neurosci.*, **14**, No. 6, 3413-3425 (1994).
4. E. W. Lothman, J. M. Hatelid, C. F. Zorumski, et al., “Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures,” *Brain Res.*, **360**, Nos. 1/2, 83-91 (1985).
5. А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов, *Киндлинг и эпилептическая активность*, Астропринт, Одесса (1999).
6. M. Wong, D. F. Wozniak, and K. A. Yamada, “An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects,” *Exp. Neurol.*, **183**, No. 1, 87-99 (2003).
7. L. Kruger, S. Saporta, and W. Larry, *Photographic Atlas of the Rat Brain: The Cell and Fiber Architecture Illustrated in Three Planes with Stereotaxic Coordinates*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (1995).
8. А. А. Шандра, *Принципы и методы патогенетической терапии эпилепсии*, Автореф. дис. ... докт. мед. наук, Москва (1985).
9. M. Barbarosie, J. Louve, M. D'Antuono, et al., “Masking of synchronous GABA-mediated potentials controls limbic seizures,” *Epilepsia*, **43**, No. 12, 1469-1479 (2002).
10. M. de Curtis and G. Avanzini, “Interictal spikes in focal epileptogenesis,” *Prog. Neurobiol.*, **63**, No. 5, 541-567 (2001).
11. J. Engel and R. Ackermann, “Interictal EEG spikes correlate with decreased, rather than increased, epileptogenicity in amygdaloid kindling,” *Brain Res.*, **190**, No. 2, 543-548 (1980).
12. K. Morimoto, M. Fahnestock, and R. Racine, “Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain,” *Prog. Neurobiol.*, **73**, No. 1, 1-60 (2004).
13. О. В. Денисенко, Т. В. Бузика, О. А. Кашенко, О. А. Шандра, “Аналіз інтеріктальної спайкової активності в гіпокампі та неокортексі при розвитку пентилентетразолового кіндлінгу у щурів”, *Досягнення біології та медицини*, № 3, 32-36 (2007).
14. E. L. van Luijtelaaar and A. M. Coenen, “Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats,” *Neurosci. Lett.*, **70**, No. 3, 393-397 (1986).