

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ РАН

На правах рукописи

ВИНОГРАДОВА Людмила Владиславовна

**НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
РЕФЛЕКТОРНОЙ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

03.03.01 Физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва 2014

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Исследование нейрофизиологических механизмов эпилепсии является одним из важных направлений нейробиологии, которое не только позволяет понять патогенез данного заболевания, но и вносит существенный вклад в изучение фундаментальных механизмов работы головного мозга. Эпилепсия - хроническое неврологическое заболевание, для которого характерно повторное возникновение спонтанных судорог (Shneker , Fountain, 2003; Engel, 2006). Считается, что в основе развития эпилепсии лежит нарушение баланса тормозных и возбуждающих процессов в ЦНС, ведущее к патологическому гиперсинхронному возбуждению больших нейронных популяций. Согласно современным представлениям, судороги являются сетевым феноменом, отражающим реверберацию патологического гипервозбуждения в нейронных сетях (Spenser, 2002; Engel, 2006; Faingold, 2004). Формирование и постепенное расширение эпилептической сети за счет рекрутирования в нее все новых структур лежит в основе эпилептогенеза - хронического процесса, ведущего к развитию и интенсификации судорог (Avanzini et al., 2012; Goldberg, Coulter, 2013).

В зависимости от степени вовлечения структур головного мозга в эпилептическую сеть, выделяют фокальную и генерализованную формы эпилепсии. При фокальной эпилепсии (например, височной) происходит формирование локальной эпилептической сети в одном из полушарий головного мозга, чаще всего в результате очаговой патологии. При генерализованной эпилепсии аномально возбужденные сети широко распределены в мозге, и такие судороги связаны с одновременной эпилептической

активацией многих областей обоих полушарий (Spenser, 2002; Wolf, 2006; Engel, 2006). У большинства пациентов с первично генерализованной эпилепсией отсутствует выраженная структурная аномалия головного мозга, которая могла бы отвечать за инициацию судорог, и конкретные патогенетические механизмы этой формы заболевания остаются неясными. Считается, что в большинстве случаев генерализованная эпилепсия является результатом генетически детерминированных изменений нейронной возбудимости (Engel, 2006; Steriade, 2003).

Однако все более актуальной становится точка зрения об отсутствии четкой границы между фокальной и генерализованной формами эпилепсии (Berg et al., 2010). Фокально возникшая эпилептическая активность часто распространяется в экстрафокальные отделы (вторичная генерализация), что ведет к вторичной билатеральной синхронизации судорожных разрядов (Avoli et al., 2005; Bertram, 2003; Pitkanen, Lukasiuk, 2008). С другой стороны, электрографические и клинические проявления первично генерализованной эпилепсии у пациентов в ряде случаев характеризуются фокальными чертами.

Данные электрофизиологических исследований и нейровизуализации показывают, что развитие первично генерализованных судорог связано с аномальной активацией корково-подкорковых сетей – таламокортикальных при абсансной эпилепсии (*petit mal*) (Карлов, Гнездицкий, 2005; Steriade, 2003; Depaulis, van Luijtelaaar, 2005) и корково-стволовых при генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами (*grand mal*) (Lado, Moshe, 2002; Norton, Blumenfeld, 2002). Если дисфункция таламокортикальных сетей, определяющая развитие неконвульсивных генерализованных судорог абсансного типа,

изучена достаточно подробно, то крайне мало известно о механизмах генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами - одной из наиболее тяжелых форм заболевания, для которой характерно развитие повторных эпизодов сильной ригидности мышц (тонические судороги) и/или ритмических мышечных сокращений (клонические судороги).

Аудиогенные судороги (АС), развивающиеся у грызунов в ответ на звуковую стимуляцию, являются одной из наиболее популярных и адекватных экспериментальных моделей первично генерализованной конвульсивной эпилепсии (Крушинский, 1949; Семиохина и др., 2006; Faingold, 1999; Jobe, Browning, 2006). Они всегда начинаются с двигательного возбуждения (аудиогенного бега), за которым могут следовать клонические, тонические или клонико-тонические судороги, имеющие симметричный паттерн и отражающие билатеральную эпилептическую активацию ствола. Судорожное возбуждение при аудиогенной эпилепсии начинается в слуховом отделе ствола (нижнем двухолмии) и затем охватывает другие ствольные структуры - глубокие слои верхнего двухолмия, центральное серое вещество, ретикулярную формацию. Начальная фаза аудиогенных судорог - двигательное возбуждение - отражает раннюю активацию нижнего двухолмия, которое обеспечивает не только анализ слуховой информации, но и сенсомоторную интеграцию у грызунов. Переход от двигательного возбуждения к клонико-тоническим судорогам отражает вовлечение в эпилептическую сеть других отделов ствола (Faingold, 2004; Jobe, Browning, 2006).

Передний мозг не участвует в экспрессии однократных аудиогенных судорог, но рекрутируется в эпилептическую сеть при их повторном возникновении (Marescaux et al., 1987; Simler et al.,

1999). Поведенческим выражением такой вторичной эпилептической активации переднего мозга служит появление в составе приступа нового типа судорог – посттонического клонуса (после максимальных стволовых судорог) или клонуса лимбического типа (после субмаксимальных стволовых судорог). Процесс удлинения и усложнения повторных аудиогенных приступов в результате вторичной генерализации эпилептической активности из стволовых отделов в структуры переднего мозга, получил название аудиогенного киндлинга (АК) (Крушинский, 1960; Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Garcia-Cairasco et al., 1996).

Киндлинг (kindling, раскачка), то есть прогрессивное усиление судорожного ответа на повторную эпилептогенную стимуляцию, является адекватной экспериментальной моделью эпилептогенеза и вторичной генерализации судорог (Goddard et al., 1969; Racine, 1972). При формировании киндлинга эпилептическая активность распространяется в структуры, удаленные от первичного очага возбуждения, что ведет к постепенной интенсификации электрографических и моторных проявлений судорог (Racine, 1972; McIntyre et al., 2002).

При аудиогенном киндлинге активируется та же лимбическая эпилептическая сеть, что и в классической парадигме киндлинга, вызванного электрической стимуляцией миндалины (Wasterlain et al., 1982; Hirsch et al., 1997), что позволяет использовать модель аудиогенного киндлинга для исследования механизмов, как генерализованных конвульсивных судорог, так и лимбического эпилептогенеза. Подробно исследованный нейроанатомический субстрат и четкие поведенческие корреляты аудиогенного киндлинга делают данную модель крайне удобной для экспериментального исследования эпилептогенеза. А то, что для

инициации судорог используется только сенсорная стимуляция, и эпилептогенез протекает в условиях ненарушенной нейрохимической и структурной целостности головного мозга, делает эту модель наиболее приближенной к патологии человека. Однако использование аудиогенного киндлинга в качестве экспериментальной модели эпилептогенеза остается крайне ограниченным, и эта модель обычно не применяется при доклиническом скрининге новых антиэпилептических препаратов.

Одним из главных ограничений существующей модели аудиогенного киндлинга является используемая для его выработки парадигма стимуляции. Если в классической парадигме электрического киндлинга применяется слабая околопороговая стимуляция лимбических структур, исходно инициирующая минимальный судорожный ответ (Goddard et al., 1969; Racine, 1972), то при аудиогенном киндлинге традиционно используют интенсивное звуковое раздражение, вызывающее максимальные АС с тонико-клоническими судорогами. Первоочередной задачей нашего исследования была проверка применимости классической парадигмы к модели аудиогенного киндлинга, то есть изучение возможности формирования киндлинга при повторении звуковой стимуляции, вызывающей минимальный судорожный ответ.

Несмотря на длительную историю изучения эпилепсии и большое количество накопленных к настоящему времени данных о клеточно-молекулярных изменениях в эпилептическом мозге, остаются неясными причины развития данного заболевания, индивидуальных различий в течении эпилепсии, а также условия, ведущие к патологической реорганизации нейронных сетей в ходе эпилептогенеза. Одной из самых актуальных прикладных задач при изучении эпилепсии является поиск эффективных методов лечения

заболевания. Существующие антиэпилептические препараты тормозят возникновение судорог, но не предотвращают длительные изменения нейронной возбудимости, лежащие в основе эпилептогенеза и интенсификации повторных судорог. Поэтому в настоящее время идет активный поиск *антиэпилептогенных* препаратов, задерживающих или предотвращающих развитие и прогрессирующее течение эпилепсии. В ходе данного исследования оценивалась возможность использования модели аудиогенного киндлинга для поиска и тестирования антиэпилептических и антиэпилептогенных препаратов.

Важной особенностью настоящего исследования было изучение участия феномена распространяющейся депрессии (РД) в механизмах рефлекторной аудиогенной эпилепсии. Вопрос о роли РД в патогенезе эпилепсии у пациентов остается практически неисследованным, хотя известно, что волна РД регулярно возникает в коре больших полушарий у больных с мигренью, ишемией, субарахноидальной геморрагией (Hadjikhani et al., 2001; Fabricius et al., 2008; Dreier, 2011). У экспериментальных животных РД может сопровождать судорожную активность, вызванную электрической и фармакологической стимуляцией (Bures et al., 1974; Королева и др., 1993). В настоящей работе исследовали возможность возникновения РД в ответ на синаптическую активацию коры при рефлекторно вызванных аудиогенных судорогах.

Цель и задачи работы

Целью работы было изучение нейрофизиологических механизмов иктогенеза (развития судорог) и эпилептогенеза (усиления повторных судорог) на экспериментальной модели аудиогенного киндлинга с применением методов

электрофизиологического, нейрофармакологического и фенотипического анализа судорожной активности.

В соответствии с данной целью исследования были поставлены следующие задачи.

(1) Сравнить динамику аудиогенного киндлинга, вызванного повторением минимальной звуковой стимуляции, у крыс разных генетических линий.

(2) Исследовать роль эндоканнабиноидной, гистаминергической и ГАМКергической систем головного мозга в механизмах иктогенеза и эпилептогенеза, вызванного звуковой стимуляцией.

(3) Оценить антиэпилептогенную активность противосудорожного препарата второго поколения леветирацетама (Кеппры) на модели аудиогенного киндлинга.

(4) Провести электрографический анализ эпилептической активации коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij.

(5) Изучить взаимодействие разных типов судорожной активности (конвульсивной и неконвульсивной) у крыс WAG/Rij с двумя формами генерализованной эпилепсии (абсансной и аудиогенной).

(6) Исследовать асимметрию моторных и электрографических проявлений минимальных аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij.

Научная новизна

Впервые показано, что киндлинг может формироваться при повторении минимальных аудиогенных судорог (короткого эпизода двигательного возбуждения). Среди крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией описаны субпопуляции животных с разной чувствительностью к киндлинг-эпилептогенезу.

Обнаружено, что волна распространяющейся депрессии является самым ранним и самым регулярным ответом новой коры на повторные стволовые аудиогенные судороги, что свидетельствует о крайне низком пороге инициации РД при активации кортикопетальных связей. Впервые продемонстрировано, что возникновение корковой РД при аудиогенных судорогах определяет паттерн послесудорожной депрессии эпилептических разрядов абсансного типа у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии.

Впервые получены экспериментальные данные об асимметричном начале стволовых аудиогенных судорог и асимметричном паттерне вторичной генерализации эпилептической активности из ствола в кору при аудиогенном киндлинге. Описана стойкая индивидуальная моторная асимметрия самого раннего компонента повторных аудиогенных судорог (начального двигательного возбуждения) и первых электрографических признаков эпилептической активации коры (волны РД и эпилептиформной активности) при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij. Впервые получены данные о повышенной уязвимости левого полушария к хроническому эпилептогенезу у экспериментальных животных.

Впервые описаны длительные антиэпилептогенные эффекты кратковременной фармакологической стимуляции эндоканнабиноидной системы и однократного введения леветирацетама (Кеппры).

Теоретическое и научно-практическое значение работы

В результате проведенного исследования предложена модифицированная модель аудиогенного киндлинга, которая может

быть использована при изучении фундаментальных механизмов эпилептогенеза и возможностей его фармакологической модуляции.

Проведенные эксперименты показали, что эндоканнабиноидная система является перспективной мишенью для фармакологического лечения прогрессирующих форм эпилепсии. Данные о длительном антиэпилептогенном эффекте леветирацетама, полученные на модели аудиогенного киндлинга, могут быть использованы для формирования наиболее продуктивной стратегии лечения некоторых форм эпилепсии.

Обнаруженное в данном исследовании регулярное возникновение при повторных аудиогенных судорогах корковой волны распространяющейся депрессии и ее мощное влияние на активность коры указывает на возможное участие феномена РД в постприступных нарушениях у больных эпилепсией. Поскольку корковая РД считается электрографическим коррелятом мигренозной ауры, полученные данные вносят вклад в понимание механизмов постиктальной головной боли и тесной связи между эпилепсией и мигренью.

Поскольку аудиогенные судороги являются экспериментальной моделью генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами, полученные в наших экспериментах данные о моторной асимметрии начальной фазы аудиогенных судорог могут быть важны для понимания природы ранних асимметричных проявлений первично генерализованных судорог у пациентов (Gastaut et al., 1986; Casaubon et al., 2003). Повышенная чувствительность левого полушария к эпилептогенезу, описанная нами у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией, согласуется с клиническими данными о более высокой эпилептогенности этого полушария у пациентов (Брагина, Доброхотова, 1988; Карлов и др.,

1992; Болдырева и др., 2000) и предполагает различный характер включения в патологический процесс структур левого и правого полушарий, что может быть использовано для экспериментального изучения функциональной межполушарной асимметрии в условиях патологии головного мозга и эндогенных механизмов регуляции чувствительности мозга к эпилептическому возбуждению.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Повторная провокация стволовых аудиогенных судорог минимальной интенсивности может вызывать формирование киндлинга с развитием судорог лимбического типа и эпилептической активацией коры больших полушарий.

2. Волна распространяющейся депрессии является регулярной реакцией коры на повторные стволовые аудиогенные судороги и может развиваться в отсутствие выраженной эпилептической активации новой коры.

3. Стойкая индивидуальная асимметрия является характерной чертой самых ранних проявлений первичных стволовых и вторичных корковых судорог, вызванных повторной звуковой стимуляцией у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией. Эти данные указывают на фокальное начало аудиогенных судорог и латерализованный характер их вторичной генерализации в кору.

4. Формирование вторичных эпилептических очагов при аудиогенном киндлинге находится под тормозным контролем эндоканнабиноидной системы.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на международных симпозиумах и конференциях: Европейских Конгрессах по

эпилепсии (6th, 7th и 9th European Congresses on Epilepsy; Vienna, 2004; Helsinki, 2006; Rhodos, 2010), международном Конгрессе по эпилепсии (26th International Congress on Epilepsy, Paris, 2005), европейских конгрессах по нейронаукам (FENS) (Vienna 2006; Amsterdam, 2010), конференции «IACM, Cannabinoids in Medicine» (Kohln, 2013).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 статей, в том числе 13 статей в международных журналах, 2 статьи в отечественных журналах, рекомендованных ВАК, и одна монография (в соавторстве с В.И.Королевой и Н.А.Гореловой).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, четырех глав с изложением результатов и их обсуждением, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 17 таблиц и 34 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Инициация аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга

В экспериментах использовали половозрелых крыс линий Крушинского-Молодкиной (КМ) (n=133), WAG/Rij (n=95) и Wistar (n=176). Крысы линии КМ были получены из вивария биологического факультета МГУ, крысы Wistar – из питомника «Столбовая», крысы WAG/Rij - из вивария Института ВНД и НФ РАН. Все крысы инбредной линии КМ демонстрировали высокую и стабильную чувствительность к аудиогенным судорогам (АС). Крысы инбредной линии WAG/Rij являются экспериментальной

моделью абсансной эпилепсии, и для них характерно спонтанное возникновение неконвульсивных судорог абсансного типа. Среди крыс линий Wistar и WAG/Rij от 10 до 50 % особей чувствительны к АС, то есть демонстрируют судорожную реакцию на звуковой стимул. Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по медицинской этике в соответствии с положением Института ВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Для вызова аудиогенных судорог применялся широкополосный акустический сигнал (13-85 кГц, 50-60 дБ). Звуковой раздражитель длился 60 сек или прекращался с началом двигательного возбуждения (первой фазы АС). Для формирования киндлинга крыс подвергали повторной звуковой стимуляции с интервалом 1-2 дня (крысы КМ) или 2-3 дня (крысы Wistar и WAG/Rij). Поведенческим критерием формирования киндлинга было появление после окончания основной части аудиогенного приступа (двигательного возбуждения или тонических судорог) дополнительных клонических судорог – лимбического клонуса (миоклонуса головы и клонуса передних лап) у крыс Wistar и WAG/Rij или посттонического клонуса (генерализованного клонуса всех конечностей) у крыс КМ.

Поведенческие реакции на звуковую стимуляцию регистрировали с помощью видеокамеры и анализировали off-line. Измеряли латентный период, общую длительность и интенсивность АС, а также длительность отдельных фаз припадка. Интенсивность АС оценивали по 9-балльной шкале Джоба (Jobe et al., 1973). Интенсивность клонических судорог лимбического типа определяли по 5-балльной шкале Racine (1972).

Электрофизиологические методы

Регистрацию электрической активности структур головного мозга в широком диапазоне частот (включая сверхмедленные сдвиги потенциала) проводили в условиях хронического эксперимента на бодрствующих свободно подвижных крысах Wistar и WAG/Rij. Предварительно крысам под наркозом (chloral hydrate, 300 мг/кг) имплантировали регистрирующие электроды: стальные винты и/или нихромовые электроды в лаковой изоляции для записи электрической активности в стандартном диапазоне частот (выше 1 Гц) и карбоновые электроды в стеклянной изоляции (Королева и др., 1993) для регистрации сдвигов постоянного потенциала, связанных с волной РД. Электроды вживляли билатерально во фронтальную, париетальную и/или затылочную области коры больших полушарий, а также центральное ядро нижнего двухолмия по координатам атласа Paxinos & Watson (1986). Стальной винт над мозжечком использовали в качестве индифферентного электрода. Опыты начинали через две недели после операции.

Регистрацию электрической активности осуществляли с помощью 6-канального широкополосного (от 0 до 1000 Гц) усилителя с входным усилением 1 ГОм и АЦП (E14-440, L-Card, Россия). Полученные данные анализировали off-line. Визуализацию и обработку электрографических данных осуществляли с помощью программного обеспечения PowerGraph (ООО «Интероптика-С», Россия). В некоторых опытах сверхмедленные сдвиги потенциала, связанные с волной РД, регистрировали на быстродействующем самописце.

Нейрофармакологические методы

Фармакологический анализ эпилептогенеза проводили с использованием следующих препаратов: антагониста эндоканнабиноидных рецепторов CB1 SR 141716 (Solvay Pharmaceuticals Weesp, the Nehterland), неселективного агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212-2 (Tocris Cookson Ltd., Bristol, United Kindom), блокатора ГАМК-трансаминазы вигабатрина (Sabril; Yamanuchi Pharma BV, Leiderdorp, The Netherland), блокатора гистамин-N-метилтрансферазы метоприна (GlaxoSmithKline, Stevenage, UK) и антиэпилептического препарата второго поколения леветирацетама (USB Pharma, Braine-l'Alleud, Belgium). SR 141716 вводили интрагастрально, WIN55212 подкожно, остальные препараты внутривентриально.

Антагонист эндоканнабиноидных рецепторов SR 141716 вводили в течение 5 дней (ежедневно), остальные препараты - однократно. SR 141716 (30 мг/кг) инъектировали за 3 часа до звуковой стимуляции, WIN55212 (4 мг/кг) и леветирацетам (3, 6 или 50 мг/кг) - за 1 час, вигабатрин (100 или 200 мг/кг) - за 2, 4 или 24 часа, метоприн (10 мг/кг) - за 4 или 24 часа до инициации аудиогенных судорог. Контрольным животным по той же схеме вводили физиологический раствор или соответствующий растворитель.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием параметрических и непараметрических методов (t-критерия Стьюдента, тестов Фишера, Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis). Влияние систематически действующих факторов на

параметры аудиогенных судорог и киндлинга оценивали методом дисперсионного анализа (ANOVA). Данные выражали как среднее \pm S.E.M.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фенотипический анализ эпилептогенеза на модели аудиогенного киндлинга

Короткая звуковая стимуляция, прекращавшаяся сразу после начала первой локомоторной фазы приступа, вызывала развернутые аудиогенные судороги (АС) максимальной интенсивности (8.5 ± 0.4 баллов по 9-балльной шкале, Jobe et al., 1973) у крыс КМ с высокой врожденной чувствительностью к АС и минимальный судорожный ответ (1.0 ± 0.1 балл) у крыс Wistar и WAG/Rij с низкой чувствительностью к АС. У крыс КМ реакция на короткий звук состояла из начального бега (4.3 ± 0.3 сек) и интенсивных тонических судорог (19.4 ± 0.5 сек), у крыс Wistar и WAG/Rij этот же звук вызывал один короткий эпизод бега (5.3 ± 0.4 и 6.3 ± 0.3 сек, соответственно). Однократное звуковое раздражение вызывало только судороги стволового типа (бег, тонические судороги).

У крыс КМ при повторной звуковой стимуляции латентность и длительность стволовых компонентов аудиогенного приступа (бега и тонических судорог) не менялись, но сразу после окончания тонических судорог появлялся и постепенно нарастал по длительности новый тип моторных судорог – посттонический клонус. Такое изменение паттерна АС, являющееся надежным поведенческим маркером аудиогенного киндлинга и вовлечения переднего мозга в эпилептическую сеть у крыс с высокой

чувствительностью к АС (Faingold, 1999), наблюдали у всех крыс линии КМ (n=21).

У крыс Wistar и WAG/Rij с низкой чувствительностью к АС формирование аудиогенного киндлинга при повторном вызове минимальных АС (эпизода аудиогенного бега) было связано с появлением сразу после окончания бега клонических судорог лимбического типа и их прогрессивной интенсификацией. Этот лимбический клонус был идентичен по своему фенотипу судорогам, развивающимся при электрическом киндлинге миндалина (Racine, 1992), и отражал эпилептическую активацию структур переднего мозга. У крыс Wistar (n=35) и WAG/Rij (n=35) с аудиогенной эпилепсией наблюдали три основных типа реагирования на повторное акустическое воздействие: (1) быстрое и полное формирование киндлинга (*киндлинг-чувствительные* крысы, 37% крыс Wistar и 34 % крыс WAG/Rij); (2) регулярное развитие аудиогенного бега без формирования киндлинга (*киндлинг-резистентные* крысы, 43 % крыс Wistar и 40 % крыс WAG/Rij) и (3) полное исчезновение судорожной реакции на звук в повторных тестах (крысы с *приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам*, 20 % крыс Wistar и 26 % крыс WAG/Rij). Соотношение особей с разными типами реагирования на повторную звуковую стимуляцию было одинаковым среди крыс Wistar и WAG/Rij, чувствительных к АС. У крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии (аудиогенной и абсансной) длительность спонтанных абсансных судорог была достоверно выше у киндлинг-резистентных (83.4 ± 12.6 сек/20 мин), чем у киндлинг-чувствительных (20.4 ± 2.7 сек/20 мин) особей ($p < 0.05$).

Таким образом, короткая звуковая стимуляция вызывает развернутые судороги максимальной интенсивности у крыс КМ с

высокой чувствительностью к АС и минимальные аудиогенные судороги у крыс Wistar и WAG/Rij с низкой чувствительностью к АС. При повторении такой стимуляции формирование киндлинга наблюдается у всех крыс КМ и у части «аудиогенных» крыс Wistar и WAG/Rij. Для крыс последних двух линий характерны значительные внутрилинейные различия в чувствительности к киндлинг-эпилептогенезу.

Нейрофармакологический анализ механизмов иктогенеза и эпилептогенеза на модели аудиогенного киндлинга

Чтобы исследовать роль различных медиаторных систем в механизмах иктогенеза и эпилептогенеза, а также оценить перспективность использования модели аудиогенного киндлинга для тестирования антиэпилептических и анитэпилептогенных свойств фармакологических препаратов, изучали влияние препаратов, модулирующих активность эндоканнабиноидной, гистаминергической и ГАМКергической систем, а также антиэпилептического препарата второго поколения леветирацетама (Кеппры), на разные компоненты аудиогенных судорог и формирование аудиогенного киндлинга.

Участие эндоканнабиноидной системы в иктогенезе и эпилептогенезе при аудиогенной эпилепсии

Эндоканнабиноидная система - одна из важнейших модуляторных систем головного мозга, играющая активную роль в регуляции синаптической передачи и пластичности, контроле нейронной возбудимости и баланса торможения/возбуждения в ЦНС (Alger, 2004; Katona, Freund, 2012). На модели аудиогенного киндлинга были исследованы острые (иктогенные) и длительные

(эпилептогенные) эффекты антагониста CB1 рецепторов SR 141716 (SR) и мощного неселективного агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212(2) (WIN). В первой серии экспериментов с антагонистом CB1 рецепторов проверялось участие этих рецепторов в различных формах резистентности к аудиогенным судорогам и аудиогенному киндлингу у крыс Wistar. Предполагалось, что, если эти рецепторы вовлечены в поддержание врожденной или приобретенной форм устойчивости к судорогам и киндлингу, то их фармакологическая блокада будет снимать данные формы резистентности. Во второй серии экспериментов оценивали влияние агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212(2) на аудиогенные судороги и аудиогенный киндлинг у крыс КМ. Предполагалось, что стимуляция эндоканнабиноидной системы должна оказывать антиэпилептогенное и антииктогенное действие на судороги и эпилептогенез.

Прозепилептические эффекты антагониста CB1 рецепторов SR141716

Антагонист CB1 рецепторов SR (30 мг/кг) или растворитель вводили ежедневно в течение 5 дней крысам Wistar с разной чувствительностью к АС и аудиогенному киндлингу, которые были предварительно подвергнуты 25 звуковым стимуляциям. Острые эффекты оценивались через 3 часа после введения первой дозы препарата, длительные эффекты – в течение двух недель после окончания 5-дневного введения SR.

(1) У неэпилептических крыс Wistar (n=8) звук никогда не вызывал судорожного ответа, и введение SR не влияло на врожденную устойчивость этих крыс к аудиогенным судорогам. (2) У исходно «аудиогенных» крыс Wistar, которые демонстрировали приобретенную устойчивость к АС при повторной стимуляции

(n=14), к 20-му тесту судорожная реакция на звук полностью исчезала. После хронического введения SR чувствительность к АС восстанавливалась у половины крыс, и общее число судорожных реакций на звук достоверно повышалось (по сравнению с контрольными животными) в течение двух недель после окончания введения SR ($p < 0.005$). (3) У крыс Wistar с регулярной судорожной реакцией на повторную звуковую стимуляцию SR оказывал мощное проконвульсивное действие на лимбический компонент аудиогенных судорог. После введения антагониста CB1 рецепторов лимбический клонус резко удлинялся у киндлинг-чувствительных крыс и появлялся de novo у киндлинг-резистентных крыс, которые никогда не демонстрировали лимбические судороги в предыдущих 25 тестах до введения препарата. Таким образом, фармакологическая блокада эндоканнабиноидных CB1 рецепторов повышает чувствительность головного мозга к лимбическому эпилептогенезу и/или облегчает вторичную генерализацию эпилептической активности из ствола в передний мозг.

Антиэпилептогенный эффект агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212(2)

Во второй серии экспериментов оценивали влияние неселективного агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212(2) (WIN) на аудиогенные судороги и аудиогенный киндлинг у крыс КМ. В дозе 4 мг/кг WIN не влиял на параметры аудиогенных судорог, вызванных через один час после введения ($p > 0.3$). Несмотря на отсутствие «острого» эффекта, эта доза WIN оказывала длительное антиэпилептогенное влияние: после однократного введения WIN на ранней стадии аудиогенного киндлинга его формирование значительно замедлялось ($F = 3.56$, $p < 0.0001$). У контрольных крыс, которым вводился растворитель,

посттонический клонус (поведенческий маркер аудиогенного киндлинга у крыс КМ) развивался после 8.1 ± 0.5 повторных стимуляций, а у крыс, которым был введен WIN, - после 13.9 ± 0.6 ($p < 0.0001$).

Данные, полученные в обеих сериях экспериментов, свидетельствуют об активной роли эндоканнабиноидной системы в механизмах, регулирующих чувствительность мозга к эпилептогенезу. Прозепилептогенное влияние фармакологической блокады CB1 рецепторов у крыс Wistar предполагает важную роль тонической активности эндоканнабиноидной системы в эндогенных компенсаторных процессах, направленных на ослабление судорожной реакции на повторное эпилептогенное воздействие. Данные о длительном тормозном влиянии кратковременной фармакологической стимуляции эндоканнабиноидных рецепторов (однократное введение агониста) на вторичную генерализацию судорог в ходе аудиогенного киндлинга подтверждают участие этой системы в адаптивном процессе, направленном на купирование или смягчение повторных судорог.

Участие гистаминергической системы в иктогенезе и эпилептогенезе при аудиогенной эпилепсии

Гистаминергическая система – одна из нейромодуляторных систем, обеспечивающих глобальную регуляцию активности ЦНС. Описано тормозное влияние этой системы на лимбические судороги, вызванные электрическим киндлингом, (Kamei, 2001) и тонические судороги, вызванные звуком (Feng, Faingold, 2000; Tuomisto et al., 1987). В настоящей работе исследовалось влияние фармакологической активации гистаминергической системы на паттерн аудиогенных судорог и формирование аудиогенного

киндлинга у крыс КМ и Wistar. Для стимуляции гистаминергической системы использовали системное введение метоприна, блокирующего фермент деградации гистамина (гистамин-N-метилтрансферазу) и вызывающего длительное повышение уровня гистамина в мозге (Duch et al., 1978; Hough et al., 1986; Itoh et al., 1991). Однократное введение метоприна (10 мг/кг) на ранней стадии эпилептогенеза не влияло на скорость формирования аудиогенного киндлинга у крыс КМ. Однако эта доза метоприна оказывала выраженное «острое» действие на стволовые компоненты аудиогенного приступа: снижала длительность ($p < 0.005$) и интенсивность ($p < 0.05$) тонических судорог у крыс КМ, но удлиняла двигательное возбуждение у крыс КМ ($p < 0.05$) и Wistar ($p < 0.05$). При этом метоприн не влиял на посттонический клонус, отражающий эпилептическую активацию переднего мозга, у крыс КМ со сформированным киндлингом. Таким образом, фармакологическая стимуляция гистаминергической системы оказывает селективное влияние на судороги *стволового* происхождения: потенцирующее действие - на начальную локомоторную фазу аудиогенного приступа и тормозное влияние - на тонические судороги.

Участие ГАМКергических механизмов в экспрессии аудиогенных судорог

Ослабление ГАМКергического торможения считается одним из важнейших механизмов развития эпилепсии (Pirreda, Gale, 1985; Turski et al., 1985; Ebert et al., 2000). В нашей работе было исследовано влияние фармакологической стимуляции ГАМКергической передачи на разные компоненты аудиогенного приступа у крыс КМ, Wistar и WAG/Rij со сформированным

аудиогенным киндлингом. Использовали системное введение антиэпилептического препарата вигабатрина (ВГБ), вызывающего необратимую блокаду деградации ГАМК и длительно (до 48 часов) повышающего концентрацию ГАМК в мозге (Jung et al., 1977; Valdizan et al., 1999).

У крыс КМ со сформированным аудиогенным киндлингом ВГБ (100 и 200 мг/кг) дозо-зависимо уменьшал общую длительность приступа ($F=16.0$; $p<0.001$) за счет селективного торможения его переднемозгового компонента – посттонического клонуса (ПТК) ($F=18.0$; $p<0.0001$). Длительность и частота возникновения ПТК достоверно снижались при увеличении дозы препарата и времени после его введения. При этом вигабатрин не влиял на латентность развития аудиогенного приступа и длительность стволовых компонентов АС (бега и тонических судорог) у крыс КМ.

У крыс Wistar и WAG/Rij со сформированным аудиогенным киндлингом ВГБ также дозо-зависимо снижал общую длительность аудиогенного приступа ($F=24.9$; $p<0.0001$ для крыс Wistar и $F=26.1$; $p<0.0001$ для крыс WAG/Rij) за счет избирательного подавления лимбических судорог, появившихся в составе припадков в ходе киндлинга ($F=25.1$; $p<0.0001$ для крыс Wistar и $F=29.6$; $p<0.0001$ для крыс WAG/Rij). Через 24 часа после введения 200 мг/кг ВГБ наблюдали полный блок лимбической фазы припадков у всех крыс. При этом ВГБ не влиял на латентность и длительность стволового компонента АС (бега).

Таким образом, фармакологическая стимуляция ГАМКергической передачи избирательно тормозит развитие *переднемозговых* судорог в составе аудиогенного припадков, не оказывая существенного влияния на его стволовые компоненты. Этот эффект наблюдается у крыс разных генетических линий, при

разной интенсивности судорожного ответа на звук, у крыс с абсансными судорогами (крысы WAG/Rij) и без них (крысы KM и Wistar).

Антииктогенный и антиэпилептогенный эффекты леветирацетама при аудиогенной эпилепсии

Новый антиэпилептический препарат второго поколения леветирацетам (Кеппра) обладает уникальным механизмом действия на судорожную активность, взаимодействуя с белком синаптических везикул SV2A (Lynch et al., 2004), контролирующим везикулярный эндо/экзоцитоз и выброс медиаторов (Boido et al., 2010).

У крыс KM леветирацетам демонстрировал мощное и быстрое противосудорожное действие: через час после его введения наблюдали увеличение латентности ($F=19.8$, $p<0.001$) и снижение общей длительности ($F=29.8$, $p<0.001$) аудиогенных судорог. Уже после введения низкой дозы леветирацетама (6 мг/кг) длительность тонических судорог снижалась ($p<0.05$), а после максимальной дозы препарата (50 мг/кг) они не развивались ни у одной крысы ($n=7$). Леветирацетам в дозе 50 мг/кг вызывал полное подавление посттонического клонуса (переднемозгового компонента АС) у крыс со сформированным аудиогенным киндлингом. Однократная инъекция этой дозы препарата перед началом аудиогенного киндлинга значительно замедляла его формирование ($F=2.14$; $p<0.01$; Рис. 1).

Длительность посттонического клонуса

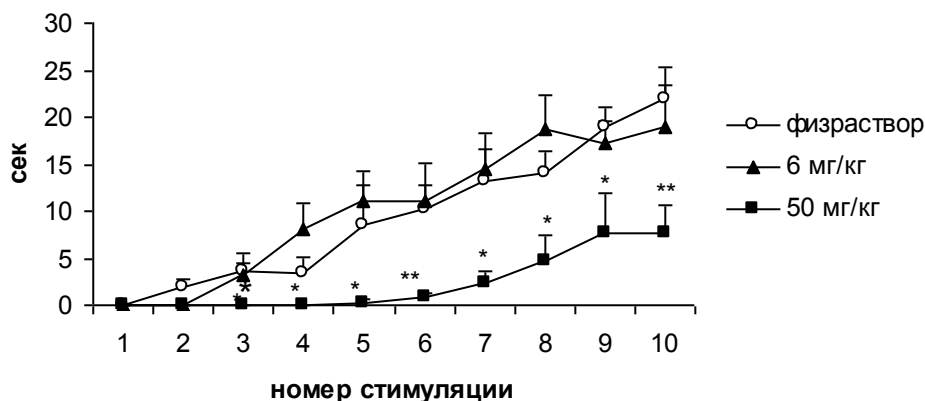


Рис. 1. Влияние однократного введения леветирацетама на развитие аудиогенного киндлинга у крыс КМ. Физиологический раствор или леветирацетам в дозе 6 или 50 мг/кг вводили перед началом формирования киндлинга. Ордината – длительность посттонического клонуса (поведенческого маркера аудиогенного киндлинга). Данные выражены как среднее \pm S.E.M. для каждой группы. * и ** - достоверные различия между группами ($p < 0.05$ и $p < 0.005$, соответственно).

Таким образом, леветирацетам оказывает мощное антииктогенное действие на все фазы АС и длительное антиэпилептогенное влияние на развитие аудиогенного киндлинга.

Электрографический анализ аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij

Так как электрографические методы, позволяющие оценить изменения активности больших нейронных популяций с высоким временным разрешением, остаются главным инструментом при диагностике эпилепсии и изучении ее нейрофизиологических механизмов, проводился электрографический анализ иктогенеза и эпилептогенеза при рефлексорной аудиогенной эпилепсии.

Электрическая активность коры и нижнего двухолмия при минимальных аудиогенных судорогах и их повторном вызове у крыс Wistar

Исследовали изменения электрической активности нижнего двухолмия (первичного фокуса эпилептической активности при аудиогенной эпилепсии) и новой коры (области вторичной генерализации судорожной активности при аудиогенном киндлинге) во время минимальных судорог, вызванных коротким звуком у крыс Wistar. В первых тестах во время аудиогенного бега в нижнем двухолмии регистрировали высокоамплитудные спайки и острые волны, а в коре – гиперсинхронную активность частотой 8.8 ± 0.2 Гц. Эпилептиформная активность в новой коре развивалась только при повторных аудиогенных судорогах и отражала ее вторичную эпилептическую активацию при аудиогенном киндлинге. Кортикальная эпилептическая активность представляла собой пик- или пик-волновой разряд (afterdischarge, AD) частотой 1-4 Гц, который развивался сразу после окончания аудиогенного бега (стволовой части приступа) и сопровождался клоническими судорогами лимбического типа. В ходе повторных тестов амплитуда коркового AD увеличивалась с 0.24 ± 0.01 мВ до 1.27 ± 0.11 мВ, а длительность вырастала - от 9.6 ± 1.4 сек до 31.4 ± 4.2 сек (Рис. 2). Параллельно с усилением электрографических признаков эпилептической активации новой коры происходила интенсификация сопровождающих ее поведенческих лимбических судорог.

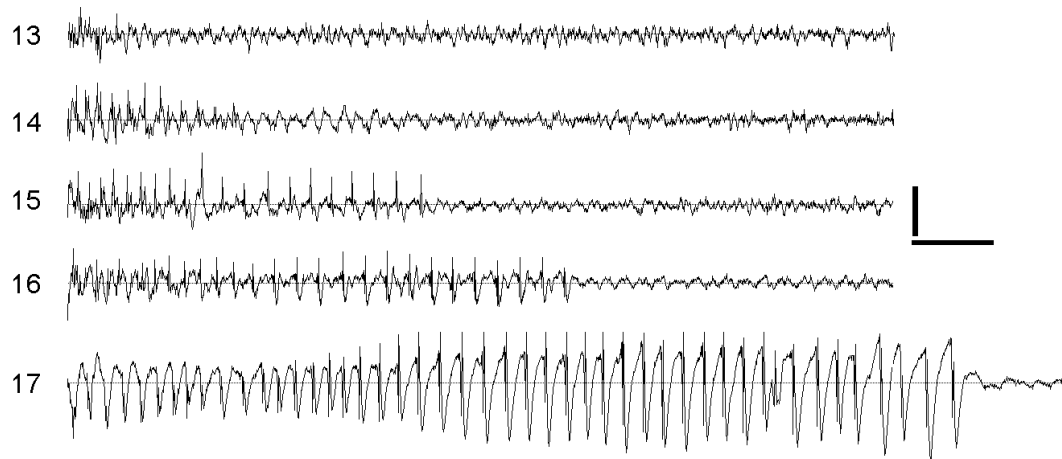


Рис. 2. Развитие эпилептической активности в новой коре после повторных эпизодов аудиогенного бега у крыс Wistar. Приведены фрагменты ЭЭГ, записанные в париетальной коре левого полушария у одной крысы, после 13, 14, 15, 16 и 17-го эпизодов бега (номер эпизода указан в начале соответствующего фрагмента записи). Начало фрагментов совпадает с окончанием аудиогенного бега. Калибровка: 0.5 мВ, 2 сек.

Развитие эпилептиформного разряда было единственным проявлением судорожной активации коры во время аудиогенного киндлинга при стандартной записи ЭЭГ в полосе выше 0.5-1 Гц. При регистрации сверхмедленной активности коры (сдвигов постоянного потенциала) во время повторных аудиогенных судорог, было обнаружено, что задолго до появления эпилептиформной активности в новой коре здесь начинает возникать волна распространяющейся депрессии (РД) (Рис. 3).

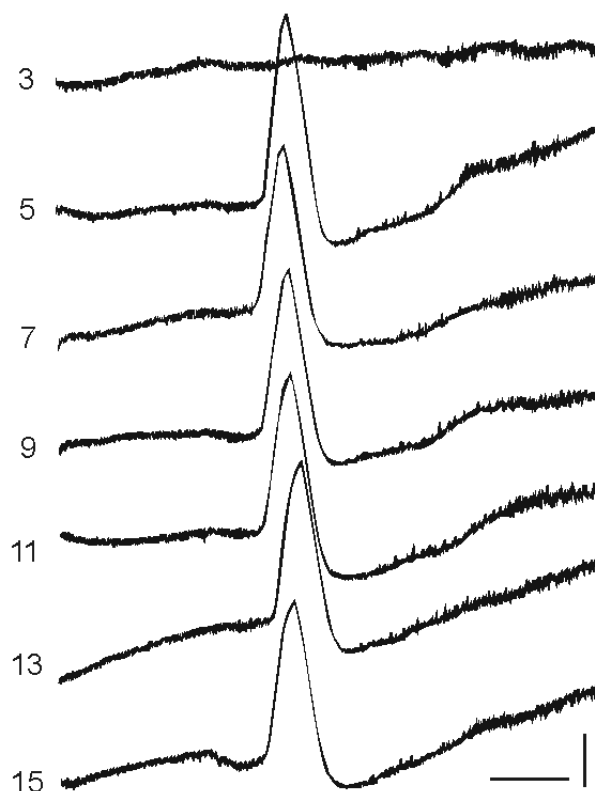


Рис. 3. Регулярное возникновение в коре волны РД после повторных эпизодов аудиогенного бега. Приведены записи сверхмедленных сдвигов потенциала париетальной коры левого полушария, полученные у одной и той же крысы Wistar после 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15-го эпизодов аудиогенного бега (номер эпизода указан в начале соответствующего фрагмента записи). Начало фрагментов совпадает с окончанием аудиогенного бега. Калибровка: 30 сек и 10 мВ.

Волна РД регулярно возникала в коре при повторных аудиогенных судорогах у всех крыс Wistar со стабильным судорожным ответом на звук ($n=36$), как киндлинг-чувствительных, так и киндлинг-резистентных. У киндлинг-чувствительных крыс РД начинала возникать с самых ранних стадий киндлинга, когда в коре еще отсутствовала эпилептическая активность, и продолжала возникать после появления в новой коре эпилептиформных разрядов (Рис. 4). У киндлинг-резистентных крыс волна РД была единственным ответом коры на повторные стволовые аудиогенные судороги.

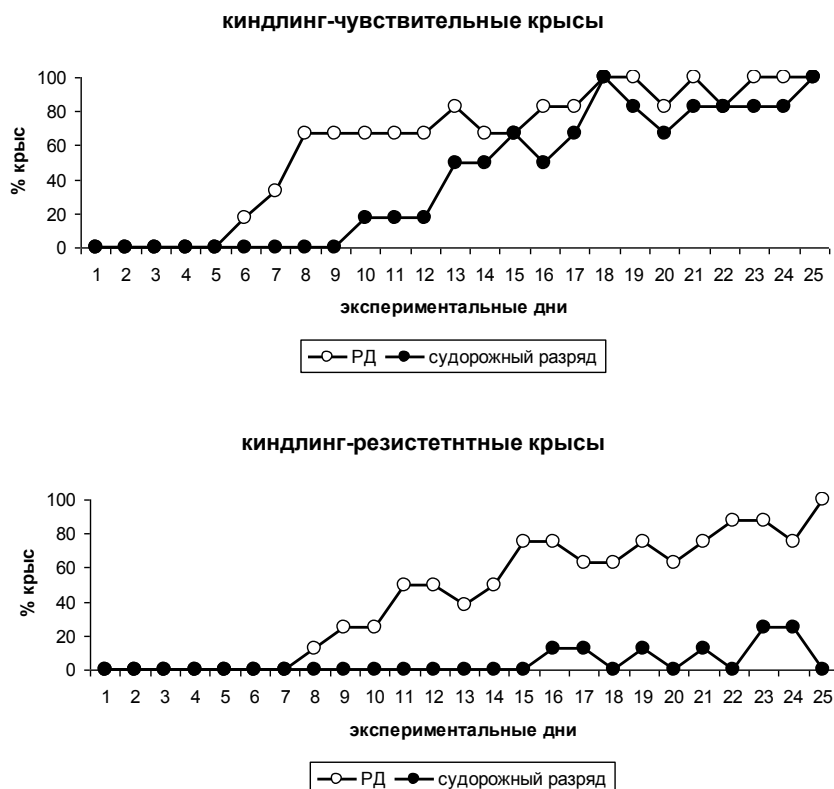


Рис. 4. Возникновение в новой коре волны распространяющейся депрессии (РД) и эпилептиформного судорожного разряда при повторных аудиогенных судорогах у крыс Wistar, чувствительных и резистентных к аудиогенному киндлингу.

Когда в новой коре отсутствовала интенсивная судорожная активность, РД возникала только в одном полушарии и появлялась во фронто-париетальной коре с большой временной задержкой (1.5-2 мин) после окончания аудиогенного бега. При развитии в коре высокоамплитудных эпилептиформных разрядов на поздних стадиях киндлинга волна РД начинала возникать в обоих полушариях сразу после окончания аудиогенных судорог.

Таким образом, волна распространяющейся депрессии является самой ранней и регулярной реакцией коры на повторные стволовые аудиогенные судороги у крыс Wistar. Формирование аудиогенного киндлинга при повторении минимальных АС связано

с появлением в новой коре низкочастотного эпилептиформного разряда.

Электрическая активность коры при повторном вызове минимальных аудиогенных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами (абсансной и аудиогенной) эпилепсии

Крысы WAG/Rij с двумя формами генерализованной эпилепсии демонстрируют как спонтанные неконвульсивные абсансные судороги (ЭЭГ пик-волновые разряды частотой 5-7 Гц, spike-wave discharges, SWD), так и акустически вызванные конвульсивные аудиогенные судороги (Кузнецова, 1998). Как известно, абсансные судороги отражают реверберацию патологического возбуждения в таламокортикальных сетях (Карлов, Гнездицкий, 2005; Depaulis, van Luijtelaar, 2005), аудиогенные судороги связаны с эпилептической активацией стволовых сетей (Faingold, 2004; Jobe, Browning, 2006). Идентичность фенотипов аудиогенных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии и у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией предполагает, что патологическая активность таламокортикальных сетей, связанная с генетической абсансной эпилепсией, оказывает минимальное влияние на аномальное возбуждение стволовых субстратов аудиогенных судорог.

Изменения электрической активности коры в ходе аудиогенного киндлинга у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии были идентичны таковым у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией. Развитие киндлинга сопровождалось появлением в коре низкочастотного (1-4 Гц) эпилептиформного разряда (afterdischarge, AD), амплитуда которого увеличивалась в ходе киндлинга с 0.5 ± 0.1 мВ до 1.8 ± 0.4 мВ ($p < 0.005$). Как и у крыс Wistar, односторонняя волна РД была самым ранним проявлением растущей возбудимости

коры при повторных аудиогенных судорогах. На поздних стадиях киндлинга, когда звук вызывал припадок с интенсивной эпилептической активацией коры, РД становилась билатеральной. То есть предрасположенность к абсансным судорогам практически не влияла на электрографические проявления гипервозбудимости коры, развивающиеся при аудиогенном киндлинге.

В экспериментах на крысах WAG/Rij с двумя формами эпилепсии было обнаружено мощное влияние РД на постприступные изменения корковой активности: возникновение в коре волны РД при аудиогенных судорогах определяло постиктальную депрессию спонтанных абсансных судорог.

Асимметрия ранних проявлений аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij

Одностороннее возникновение корковой волны РД при повторных минимальных аудиогенных судорогах у крыс Wistar и WAG/Rij указывает на существование межполушарной асимметрии в динамике вторичной патологической активации коры при аудиогенном киндлинге. Это побудило нас подробно исследовать асимметрию моторных и электрографических проявлений повторных минимальных аудиогенных судорог у этих крыс.

Индивидуальная асимметрия аудиогенного бега и электрографических ответов коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij

Двигательное возбуждение, вызванное коротким бинауральным звуком у аудиогенных крыс Wistar и WAG/Rij, имело асимметричный паттерн и представляло собой однонаправленный бег по периметру камеры или вращение в одном доминирующем

направлении – влево (против часовой стрелки) или вправо (по часовой стрелке). При повторном тестировании направление бега обычно оставалось неизменным, демонстрируя стойкую индивидуальную асимметрию.

Как описано выше, односторонняя волна РД была самой ранней реакцией коры на повторный вызов аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij, и корковая РД оставалась унилатеральным событием вплоть до поздних стадий аудиогенного киндлинга. Латерализация односторонней волны РД была тесно связана с направлением инициировавшего ее аудиогенного бега: РД всегда возникала в коре, ипсилатеральной направлению движения, вызванного звуковой стимуляцией (Рис. 5).

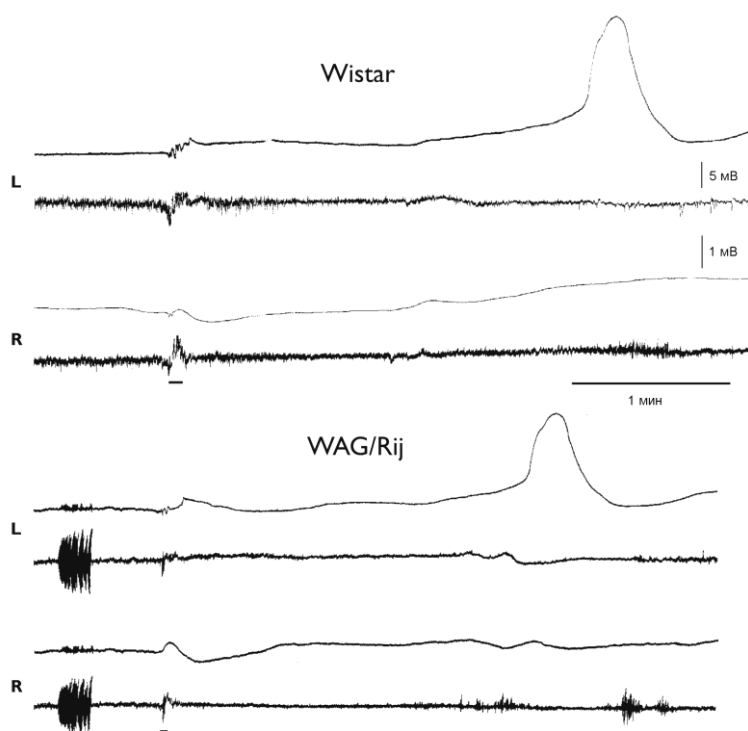


Рис. 5. Возникновение РД в коре левого полушария после аудиогенного бега влево у крыс Wistar и WAG/Rij. Сдвиги постоянного потенциала (верхние кривые) и ЭЭГ (нижние кривые) записаны в симметричных точках коры левого (L) и правого (R) полушарий. Черточками внизу отмечены периоды аудиогенного бега. Высокоамплитудный разряд перед началом аудиогенного бега у крысы WAG/Rij – спонтанный разряд абсансного типа (SWD).

Первые корковые эпилептиформные разряды (afterdischarge, AD) также имели асимметричный паттерн с доминированием коры полушария, ипсилатерального направлению аудиогенного бега. Первые разряды (AD) появлялись в этом полушарии раньше и имели

здесь более высокую амплитуду, чем в коре противоположного полушария ($p < 0.05$). Однако корковые эпилептические разряды быстро (после 1-3 повторных тестов) становились билатерально симметричными.

Популяционная асимметрия минимальных аудиогенных судорог и чувствительности к аудиогенному киндлингу у крыс Wistar и WAG/Rij

При оценке моторной асимметрии аудиогенного бега на уровне популяции не было найдено достоверных различий. Частота возникновения левостороннего и правостороннего аудиогенного бега была одинаковой, как у крыс Wistar (48 и 52 %, соответственно, $n=100$), так и у крыс WAG/Rij (47 и 53 %, соответственно, $n=50$). Длительности лево- и правостороннего аудиогенного бега также не отличались (5.3 ± 0.6 и 5.3 ± 0.7 сек, соответственно, у крыс Wistar и 5.6 ± 0.6 и 5.3 ± 0.8 сек, соответственно, среди крыс WAG/Rij).

Корковая волна РД возникала у всех крыс Wistar и WAG/Rij, как после левостороннего, так и после правостороннего аудиогенного бега. Однако развитие корковой эпилептиформной активности (AD) и лимбических судорог при аудиогенном киндлинге отличалось у крыс этих линий и при разном направлении аудиогенного бега. У крыс Wistar, демонстрирующих левосторонний бег при звуковой стимуляции, формирование аудиогенного киндлинга с вторичной эпилептической активацией коры наблюдали вдвое чаще, чем у крыс Wistar с правосторонним аудиогенным бегом ($p < 0.005$). Такой закономерности не было найдено у крыс WAG/Rij, у которых эпилептическая активность в коре развивалась с одинаковой вероятностью после аудиогенного бега в левую и в правую сторону.

Таким образом, проведенное исследование показало, что самые ранние проявления аудиогенных судорог (как на стволовом, так и на корковом уровне) имеют асимметричный паттерн. Стойкая индивидуальная асимметрия является характерной чертой первой фазы стволовых аудиогенных судорог и первых электрографических признаков активации коры при аудиогенном киндлинге (первых волн РД и эпилептиформных разрядов) у крыс Wistar и WAG/Rij. У крыс Wistar также обнаружена популяционная асимметрия, связанная с межполушарными различиями в динамике вторичной генерализации стволовых судорог в передний мозг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рефлекторные аудиогенные судороги у грызунов, отражающие патологическое функционирование стволовых нейронных сетей, являются уникальным инструментом исследования сетевой судорожной чувствительности. Проведенное нами исследование выявило ряд новых закономерностей иктогенеза и эпилептогенеза при рефлекторной аудиогенной эпилепсии, которые вносят существенный вклад в понимание нейрофизиологических механизмов эпилепсии и патологической реорганизации корково-подкорковых сетей в эпилептическом мозге. Выявление этих закономерностей определялось использованием в данной работе новых экспериментальных подходов к исследованию аудиогенной эпилепсии: применения *минимальной* звуковой стимуляции для вызова судорог, подробного изучения *самых ранних* этапов развития аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга, использования крыс с *разной судорожной чувствительностью*, регистрации *сверхмедленных сдвигов потенциала* и электрографических реакций коры *обоих полушарий* при повторных аудиогенных судорогах.

Исследование показало, что слабое локомоторное возбуждение, которое является самой ранней фазой аудиогенных судорог у крыс с низкой чувствительностью к АС, сопровождается эпилептической активацией нижнего двухолмия. С помощью короткой звуковой стимуляции нам удалось инициировать у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией только эту самую раннюю фазу судорог, представляющую собой минимальный судорожный ответ на звук и связанную с начальным фокальным возбуждением ствола. Оказалось, что при повторном вызове таких минимальных стволовых судорог может формироваться киндлинг, причем развитие киндлинга определяется индивидуальной чувствительностью крыс к эпилептогенезу. Значительные межлинейные и внутрелинейные различия в чувствительности к эпилептогенезу, описанные нами на модели аудиогенного киндлинга, хорошо моделируют клиническую ситуацию, где наблюдается высокая вариабельность в течении заболевания - от быстрой ремиссии у одних пациентов до прогрессивного учащения и утяжеления повторных приступов у других (Blume, 2006). Полученные в работе данные об особенностях нейрофизиологических и нейрохимических процессов, лежащих в основе различной чувствительности к аудиогенному киндлингу, могут способствовать пониманию природы индивидуальных различий в течении эпилепсии и поиску методов замедления или предотвращения эпилептогенеза у пациентов.

Нейрофармакологическое исследование рефлекторной аудиогенной эпилепсии показало, что аудиогенные судороги и аудиогенный киндлинг являются удобными экспериментальными моделями для изучения роли разных медиаторных и модуляторных систем в патогенезе судорог разного типа и тестирования

активности новых антиэпилептических препаратов. Продемонстрирована активная защитная роль эндоканнабиноидной системы в эпилептическом мозге и ее участие в механизмах резистентности к лимбическому эпилептогенезу. Специфическое влияние ГАМКергической и гистаминергической систем на различные компоненты аудиогенных судорог, указывает на разную роль этих систем в эпилептическом возбуждении стволовых и переднемозговых сетей. Полученные экспериментальные данные важны для понимания эндогенных механизмов эпилептогенеза и разработки методов антиэпилептической терапии.

При исследовании сверхмедленной активности коры больших полушарий крыс Wistar и WAG/Rij с рефлекторной аудиогенной эпилепсией было впервые обнаружено, что аудиогенные судороги регулярно вызывают возникновение в коре волны распространяющейся депрессии. Показано, что корковая РД возникает при *минимальных стволовых* судорогах только в ответ на синаптическую активацию кортикопетальных связей у бодрствующих свободно подвижных крыс в отсутствии каких-либо фармакологических воздействий. Односторонняя волна РД является самым ранним проявлением аудиогенного киндлинга и появляется задолго до развития в коре эпилептической активности. Поскольку корковая волна РД рассматривается как один из патогенетических механизмов мигрени (Leao, Morrison, 1945; Lauritzen, 1987, Moskowitz et al., 1993), полученные нами данные о регулярном одностороннем возникновении корковой РД в ответ на сенсорную стимуляцию, специфически активирующую стволовые сети, могут быть важны для понимания патогенеза мигрени, в том числе постиктальной мигрени у пациентов с эпилепсией.

Описана моторная асимметрия самой ранней фазы аудиогенного приступа у крыс Wistar и WAG/Rij, что предполагает асимметричное начало стволовых судорог, вызванных бинауральной звуковой стимуляцией. Асимметричный паттерн вторичной эпилептической активации коры при аудиогенном киндлинге, и его тесная связь с латерализацией первичных стволовых судорог указывает на возможность латерализованного распространения судорожной активности из ствола в кору больших полушарий. Полученные данные представляют собой первое экспериментальное свидетельство асимметричного характера корково-подкорковых взаимодействий при аудиогенном киндлинге.

У крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией обнаружены значительные различия в уязвимости левого и правого полушарий к генерализации судорожной активности из ствола в кору. В клинических исследованиях была показана более высокая эпилептогенность левого полушария у пациентов (Брагина, Доброхотова, 1988; Болдырева и др., 2000; Карлов и др., 1992; Dean et al., 1997; Labar et al., 2001), что позволило высказать предположение о большей реактивности этого полушария на патологические изменения, развивающиеся в головном мозге (Брагина, Доброхотова, 1988; Карлов и др., 1992; Болдырева и др., 2000). Результаты нашего исследования на модели аудиогенного киндлинга являются первым свидетельством существования различий в чувствительности к эпилептогенезу левого и правого полушарий у экспериментальных животных. Хотя понятна недопустимость прямой экстраполяции данных, полученных на крысах, на клинические особенности эпилепсии у людей, результаты нашей работы могут быть полезны для экспериментального изучения механизмов межполушарных различий в реактивности

головного мозга на патологические воздействия, а также поиска эндогенных механизмов контроля чувствительности мозга к эпилептическому возбуждению.

ВЫВОДЫ

1. Короткая звуковая стимуляция инициирует у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией эпизод двигательного возбуждения - минимальные моторные судороги стволового типа, не вызывающие эпилептической активации коры больших полушарий. Эти минимальные судороги представляют собой однонаправленный бег и являются самой ранней фазой аудиогенного приступа, отражающей начальное эпилептическое возбуждение стволовых отделов мозга.

2. Повторение минимальных аудиогенных судорог может приводить к формированию киндлинга, то есть появлению вторичных эпилептических очагов в структурах переднего мозга, синаптически связанных с первичным стволовым фокусом. При этом наблюдается усложнение судорожного ответа на звук за счет появления после окончания стволовых судорог (аудиогенного бега) признаков эпилептической активации лимбической системы (лимбических клонических судорог).

3. Среди крыс Wistar и WAG/Rij выделены субпопуляции животных, чувствительных и резистентных к развитию лимбического клонуса при повторении минимальных аудиогенных судорог, что указывает на существование значительных внутрилинейных различий в предрасположенности к киндлингу.

4. Эндоканнабиноидная система вовлечена в механизмы резистентности к киндлингу: блокирование эндоканнабиноидных рецепторов (CB1) ведет к стремительному формированию

аудиогенного киндлинга у резистентных крыс Wistar, а фармакологическая стимуляция этой системы замедляет киндлинг у крыс Крушинского-Молодкиной с высокой чувствительностью к аудиогенным судорогам.

5. Нейрофармакологический анализ аудиогенных судорог у крыс разных генетических линий показал, что гистаминергическая система активно участвует в регуляции стволовых компонентов аудиогенного припадка, тогда как ГАМКергические механизмы избирательно модулируют переднемозговые компоненты аудиогенного приступа, развивающиеся в ходе киндлинга.

6. Антиэпилептический препарат леветирацетам (Кеппра) оказывает длительное тормозное (антиэпилептогенное) влияние на формирование аудиогенного киндлинга и вторичную генерализацию судорожной активности в головном мозге.

7. Анализ электрической активности коры при повторных минимальных аудиогенных судорогах у крыс Wistar и WAG/Rij показал, что развитие лимбических клонических судорог в ходе киндлинга сопровождается появлением в коре низкочастотного (1-4 Гц) эпилептиформного разряда.

8. Анализ сверхмедленных сдвигов потенциала коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij показал, что волна распространяющейся депрессии (РД) является регулярной реакцией коры на повторные минимальные аудиогенные судороги. При этом корковая РД возникает, как у чувствительных, так и у резистентных к аудиогенному киндлингу животных, то есть независимо от развития в новой коре эпилептиформной активности.

9. У крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии (абсансной и аудиогенной) возникновение волны РД при аудиогенных судорогах

определяет развитие постиктальной депрессии абсансной судорожной активности.

10. Стойкая индивидуальная моторная асимметрия является характерной чертой минимальных стволовых аудиогенных судорог (двигательного возбуждения) при их повторном вызове у крыс Wistar и WAG/Rij. На популяционном уровне не обнаружено асимметрии этих аудиогенных судорог.

11. Вторичная патологическая активация коры больших полушарий, развивающаяся при повторении асимметричного судорожного бега, также сначала имеет асимметричный характер: эпилептиформный разряд и волна РД раньше появляются в коре одного полушария (всегда ипсилатерального направлению аудиогенного бега).

12. Тесная взаимосвязь ранних асимметричных проявлений первичных стволовых судорог (направленности аудиогенного бега) и вторичной активации коры (латерализации первых односторонних волн РД и эпилептических разрядов) при аудиогенном киндлинге свидетельствует о существовании межполушарной асимметрии в скорости вторичной генерализации судорожной активности из ствола и передний мозг.

13. У крыс Wistar левое полушарие более уязвимо к эпилептогенезу: в этом полушарии легче протекает вторичная генерализация судорог из ствола в новую кору при аудиогенном киндлинге.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ СТАТЕЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Королева В.И., Горелова Н.А., **Виноградова Л.В.** Депрессия Лео в структурах головного мозга. Москва, «Наука», 1993, 144 стр.
2. Королева В.И., **Виноградова Л.В.**, Королев О.С. Устойчивый негативный потенциал, вызываемый в структурах головного

мозга одиночной волной короковой распространяющейся депрессии. *Журн.высш.нерв.деят.* 1998 (48) 654-663.

3. **Vinogradova L.V.**, Kuznetsova G.D., Coenen A.M.L. Audiogenic seizures associated with a corticco-striatal spreading depression wave are accompanied by a long-term suppression of spike-wave discharges. In: *The WAG/Rij Model of Absence Epilepsy: The Nijmegen-Russian Federation Papers* (Eds. G. Van Luijtellar, G.D. Kuznetsova, A. Coenen, S.A. Cherpurnov), NICI, The Netherland, 2004, pp. 239-247.
4. **Виноградова Л.В.** Аудиогенный киндлинг у крыс WAG/Rij: изменение поведенческих и электрофизиологических реакций на повторное предъявление короткой звуковой стимуляции. *Журн.высш.нервн.деят.* 2004 (54) 619-628.
5. Midzyanovskaya I.S., Kuznetsova G.D., **Vinogradova L.V.**, Shatskova A.B., Coenen A.M.L., van Luijtelaar G. Mixed forms of epilepsy in a subpopulation of WAG/Rij rats. *Epilepsy & Behavior* 2004 (5) 655-661.
6. **Vinogradova L.V.**, Kuznetsova G.D., Shatskova A.B., van Rijn C.M. Vigabatrin in low doses selectively suppresses the clonic component of audiogenically kindled seizures in rats. *Epilepsia* 2005 (46) 800-810.
7. **Vinogradova L.V.**, Kuznetsova G.D., Coenen A.M.L. Audiogenic seizures associated with a cortical spreading depression wave suppress spike-wave discharges in rats. *Physiology & Behavior* 2005 (86) 298-303.
8. **Vinogradova L.V.**, Vinogradov V.Yu., Kuznetsova G.D. Unilateral cortical spreading depression is an early marker of audiogenic kindling in awake rats. *Epilepsy Research* 2006 (71) 64-75.

9. **Vinogradova L.V.**, Shatskova A.B., Tuomisto L. Histaminergic modulation of acoustically induced running behavior in rats. *Brain Research* 2007 (1148) 198-204.
10. **Vinogradova L.V.**, van Rijn C.M. Anticonvulsive and antiepileptogenic effects of levetiracetam in the audiogenic kindling models. *Epilepsia* 2008 (49) 1160-1168.
11. **Vinogradova L.V.** Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *Epilepsia* 2008 (49) 1665-1674.
12. **Vinogradova L.V.**, Kuznetsova G.D., Coenen A.M.L. Unilateral cortical spreading depression induced by sound in rats. *Brain Research* 2009 (1286) 201-207.
13. **Vinogradova L.V.** Interhemispheric difference in susceptibility to epileptogenesis: evidence from the audiogenic kindling model in Wistar rats. *Brain Research* 2010 (1329) 175-181.
14. van Rijn C.M., Perescis M.F.J., **Vinogradova L.**, van Luijtelaar G. The endocannabinoid system protects against cryptogenic seizures. *Pharmacological Reports* 2011 (63) 165-168.
15. **Vinogradova L.V.**, Shatskova A.B., van Rijn C.M. Pro-epileptic effects of the cannabinoid receptor antagonist SR141716 in a model of audiogenic epilepsy. *Epilepsy Research* 2011, vol. 96, N 3 pp. 250-256.
16. **Vinogradova L.V.**, Shatskova A.B. Lateral asymmetry of early seizure manifestations in experimental generalized epilepsy. *Neuroscience* 2012 (213) 133-143
17. Samotaeva I.S., Tillman N., van Luijtelaar G., **Vinogradova L.V.** Intracortical microinjections may cause spreading depression and suppress absence seizures. *Neuroscience* 2013 (230) 50-55.