

АНАЛІЗ ІНТЕРІКТАЛЬНОЇ СПАЙКОВОЇ АКТИВНОСТІ В ГІПОКАМПІ ТА НЕОКОРТЕКСІ ПРИ РОЗВИТКУ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОВОГО КІНДЛІНГУ У ЩУРІВ

Одеський державний медичний університет,
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова

Традиційно дослідниками завжди приділялося багато уваги питанням формування та розвитку епілептогенних систем мозку, пошуку та з'ясування ролі компенсаторних і протисудомних механізмів, які активуються під час розвитку судомної активності у мозку та відіграють важливу роль в її припиненні. Кіндлінг як одна із найбільш адекватних моделей епілепсії дає можливість досліджувати закономірності виникнення, розвитку, реорганізації епілептичних і протиепілептичних систем як на рівні окремих структур мозку, так і їх міжструктурних відношень. Незважаючи на інтенсивні дослідження, багато які механізми формування епілептиформної активності (ЕпА) в умовах кіндлінгу залишаються нез'ясованими. Так, відомо, що одним із електрографічних корелятивів, які спостерігаються у процесі розвитку кіндлінгу, є виникнення епілептиформних потенціалів, які являють собою типові позитивно-негативні спайкові розряди. Ці розряди можна зареєструвати у віддаленому періоді після кіндлінгового впливу, за що вони отримали назву інтеріктальних (міжнападних) потенціалів. Механізми генерації та розвитку інтеріктальної спайкової активності (ІСА) вивчені недостатньо.

Останнім часом опубліковані роботи, в яких показано,

що генерація інтеріктальних та іктальних розрядів здійснюється різними популяціями клітин, завдяки різним клітинним і сітьовим механізмам [1; 2]. Раніше при вивченні виникнення та розвитку інтеріктальної та іктальної активності у різних структурах мозку в разі коразолового кіндлінгу було встановлено, що в основі епілептиформних ефектів лежить формування первинного детермінантного осередку в гіпокампі, який визначає розвиток патологічної епілептичної системи, що спричинює синдром генералізації ЕпА [3]. Однак при попередньому використанні як звичайного, так і «швидкого» гіпокампального електростимуляційного кіндлінгу виявили його значний нейропротекторний ефект при каїнат-спричинених структурних ушкодженнях мозку у щурів [4; 5]. Крім того, деякі дослідження на експериментальних моделях як *in vitro* [6], так і *in vivo* [8] показали, що стимуляція гіпокампальної ділянки з генерацією ІСА знижує можливість розвитку іктальних розрядів. Одні з перших, хто запропонував гіпотезу про те, що розвиток ІСА є, скоріше за все, проявом активації не протисудомних механізмів, були експериментатори, які досліджували зміни амплітуди та кількості спайків, а також порогу виникнення нападів за

умов електростимуляційного кіндлінгу [7]. Але характер модуляційного впливу інтеріктальних спайкових розрядів на розвиток судомних нападів залишається і сьогодні не до кінця зрозумілим.

Метою нашого дослідження було визначення функціональної ролі інтеріктальної спайкової активності в гіпокампі та неокортексі при хронічно зростаючій епілептизації мозку щурів із використанням моделі пентилентетразолового кіндлінгу.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальна частина роботи була виконана на 22 самцях білих щурів лінії Вістар масою 180–220 г в умовах хронічного експерименту. Тварин утримували на звичайному раціоні віварію у стандартних умовах із природною 12-годинною зміною світла та темряви. Підготовчі операції виконувалися під етаміналовим наркозом (30 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Усі поверхні рани обробляли розчином новокаїну (1%). Трепанційні отвори висвердлювали відповідно до координат, які були визначені за атласом G. Paxinos, C. Watson (1982). Для відведення ЕЕГ в структури лобної кори та вентрального гіпокампа стереотаксично імплантували ніхромові електроди у лаковій ізоляції з

діаметром кінчика 0,1–0,15 мм за координатами: лобна кора — AP=2,0; L=0,2; H=0,2; вентральний гіпокамп — AP=-4,8; L=5,0; H=7,5. Кріплення електродів на черепі здійснювали за допомогою стоматологічної пластмаси — протакрилу. Формування кіндлінгу здійснювали не раніше ніж через 10 днів після проведених підготовчих операцій. Протягом 21 доби, щодня одноразово внутрішньоочеревинно вводили пентилентетразол (ПТЗ, “Sigma”, США) дозою 25 мг/кг, яка спершу не спричинювала судомних проявів. Епілептоген вводили в об’ємі 0,2 мл в однакових умовах (в один і той самий час доби в лабораторії з однаковою освітленістю, вологістю, температурою та шумовим фоном).

Проводили ЕЕГ-реєстрацію в умовах вільної поведінки щурів протягом 30 хв до і 1 год після введення конвульсанту за допомогою комп’ютерного енцефалографа з АЦП (National Instruments) з частотою опитування 256 імпульсів за секунду. Дані записувалися на жорсткий диск для подальшої off-line обробки. Аналізували період одразу після введення ПТЗ із розвитком як іктального, так й інтеріктального типу активності та віддалений істинно-інтеріктальний період через добу після введення конвульсанту. За інтеріктальні спайки приймали високо-амплітудні (>300–400 мкВ), швидкі розряди, які склалися з істинних спайків (з тривалістю не більше 50 мс) і гострих хвиль (50–200 мс) (рис. 1, а) [1]. Оцінювали частоту й амплітуду інтеріктальних спайкових розрядів. Вважали, що розвиток інтеріктальної активності після введення ПТЗ відбувається з регулярним типом генерації ІСА, коли ці розряди повторювалися з періодом у 3–20 с. Одноразово відстежували поведінкові зміни з визначенням інтенсивності судомних проявів, візуально оцінюючи за спеціальною шкалою: 0 балів — відсутність судомної реакції; 1 бал

— міоклонічні здригання голови; 2 бали — міоклонічні судоми м’язів тулуба; 3 бали — клонічні судоми м’язів передніх і задніх кінцівок; 4 бали — генералізовані клоніко-тонічні судоми з падінням тварин на бік; 5 балів — повторні генералізовані клоніко-тонічні судоми.

Всі одержані результати обробляли статистично із розрахунком середнього значення та стандартного відхилення, а також довірчого інтервалу (Р), що використовувався для оцінки ступеня вірогідності відмінностей за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності вважалися статистично вірогідними при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Електрографічні та поведінкові зміни у наших дослідах при повторному багаторазовому введенні ПТЗ були аналогічні описаним раніше [3].

У 14 з 22 тварин наприкінці початкового періоду кіндлінгу (5-те–7-ме введення конвульсанту) відбувалося формування ІСА (рис. 1, б). Дослідження часу її появи у процесі розвитку епілептичних ефектів показало, що в першу чергу вона виникала у гіпокампі та була тут максимально виражена. Амплітуда (А) спайків у гіпокампі дорівнювала ($1189,1 \pm 122,7$) мкВ, а

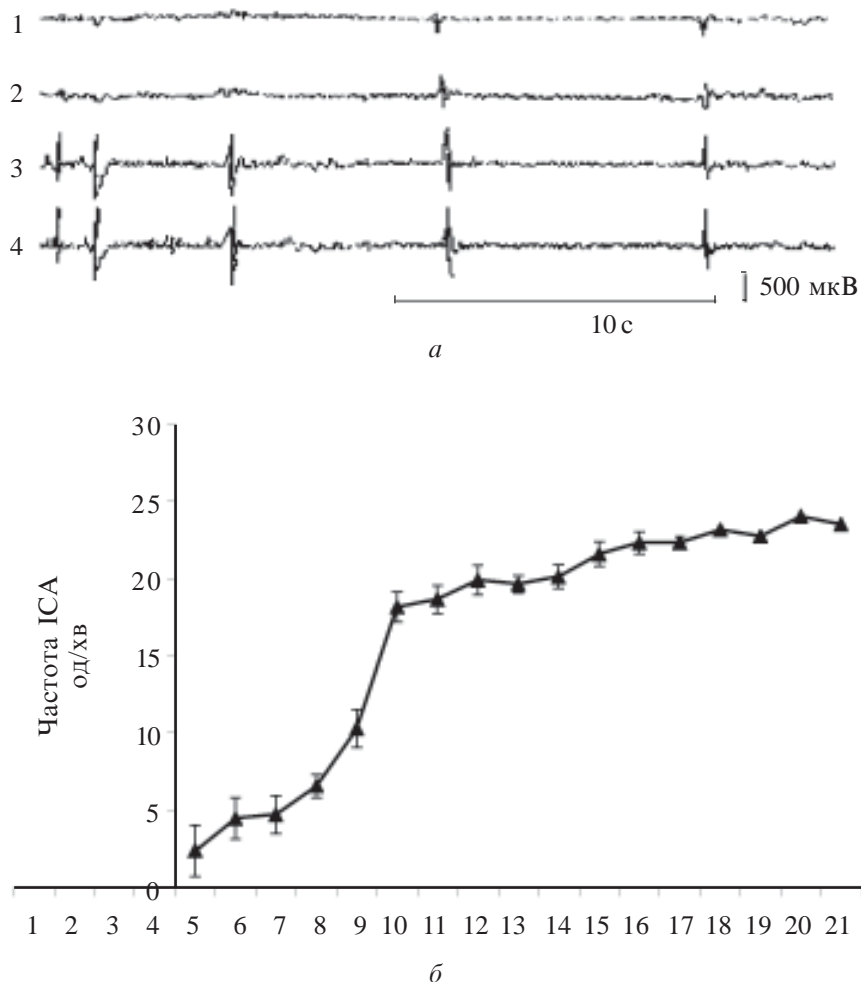


Рис. 1. Інтеріктальні спайки в гіпокампі та корі мозку при розвитку пентилентетразолового кіндлінгу в щурів: а — типові інтеріктальні спайки на ЕЕГ у щурів після 10-го введення епілептогену, 1–4 — відповідно права та ліва лобова кора, правий і лівий гіпокамп; б — зміни частоти інтеріктальних спайків гіпокампа та кори, за всією абсцис — тривалість спостережень із щоденним уведенням конвульсанту (в днях)

в корі мозку — $(387,5 \pm 152,4)$ мкВ. Після різкого збільшення частоти ІСА у відповідь на 8-ме–10-те введення ПТЗ (див. рис. 1, б) інтенсивність судомних поведінкових проявів у середньому періоді кіндлінгу змінювалася незначно (рис. 2). При розвитку нападів клонічних судом кінцівок, у віддаленому істинно-інтеріктальному періоді після 10–13-ї ін'єкції ПТЗ, спостерігалось максимальне виявлення ІСА, що відмічалось одразу після цих нападів. Цікаво, що при цьому відзначено припинення генерації ІСА у середньому за 40–60 с до початку генералізованого нападу. Але у більшій частині таких щурів (у 10 з 14 тварин з регулярною ІСА), незважаючи на збереження високої частоти ІСА на 19-те–21-ше введення коразолу, спостерігали розвиток тяжких генералізованих клоніко-тонічних судом (див. рис. 2).

У 8 із 22 тварин після 6–7-го введення ПТЗ як у гіпокампі, так і у корі реєстрували лише поодинокі спалахи ІСА, переважали часті спайк-хвильові комплекси. У цьому випадку вже на 14–17-те введення кон-

вульсанту навіть група з кількох інтеріктальних спайкових розрядів призводила до генерації іктального розряду (див. рис. 2), який супроводжувався судомним нападом із падінням тварин на бік (6 із 8 щурів). У двох тварин після перших введення конвульсанту зареєстровані спалахи спайк-хвильової активності в корі були більш виражені ($A=125,5 \pm 31,3$ мкВ), ніж у гіпокампі ($A=71,4 \pm 22,1$ мкВ). Треба відмітити, що у цих тварин уже на 10–11-те введення ПТЗ спостерігали розвиток тяжких генералізованих судом. Можливо, такі випадки перебігу подій і лежать в основі висновків деяких авторів, які не зараховують коразоловий кіндлінг до моделей фокальної епілепсії [9].

На початковому етапі формування кіндлінгу (починаючи з 6–7-го введення) при реєстраціях, що відбувалися через добу після ін'єкції конвульсанту, на ЕЕГ спостерігали часті спайк-хвильові комплекси (у 20 з 22 тварин). У всіх цих випадках виявлялися нерегулярні поодинокі прояви ІСА в гіпокампі та корі мозку. Подальші дослідження

істинно-інтеріктального періоду показали, що нерегулярний характер ІСА не змінювався. Але у випадку з тваринами (у 12 з 14), в яких відразу після введення ПТЗ відбувалося генерування регулярних проявів ІСА, через добу реєстрували (12–17-те введення) 10–20-секундні періоди високої частоти генерації ІСА (від 36 до 60 за хвилину). Водночас ця високочастотна генерація ІСА завжди відповідала періоду закінчення міоклонічних скорочень м'язів передніх кінцівок. У щурів із нерегулярним типом ІСА (6 із 22), який реєстрували одразу після ін'єкції конвульсанту, при розвитку через добу (10–16-те введення) міоклонічних скорочень м'язів тулуба і кінцівок не спостерігали особливостей генерації ІСА.

Таким чином, на визначених (певних) етапах наших експериментів, у тварин з вираженою ІСА не реєстрували розвитку іктальних проявів, тимчасом як у інших щурів, на ЕЕГ яких були відсутні прояви регулярної ІСА, навіть невелика група з кількох спайків у відповідь на введення тестуючої дози епілептогену призводила до генерації тяжкого судомного нападу. У цілому, особливо в початковому і середньому періодах формування кіндлінгу, спонтанна ІСА супроводжувалася значно меншими за інтенсивністю судомними проявами і, можливо, запобігала розвитку великих нападів. Механізм такого протисудомного впливу регулярної ІСА передусім обумовлений особливостями структури гіпокампальної нейрональної сітки, в якій виявляються, наприклад, особливі типи інтернейронів [10]. Активація цих клітин має важливе значення в зниженні збудливості пірамідних нейронів і зменшенні епілептогенного збудження в цілому мозку. З одного боку, виникаючий при тривалому введенні субконвульсивних доз ПТЗ дисбаланс між функціональним станом гальмових і збудливих систем,

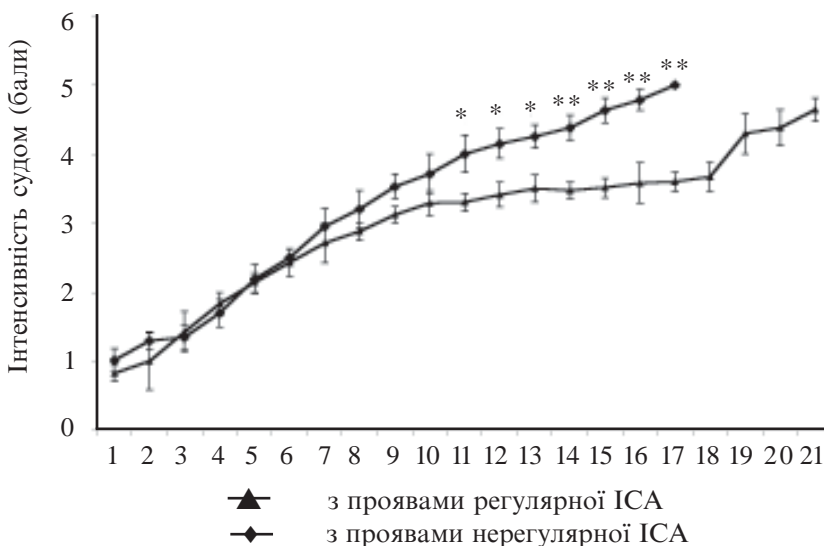


Рис. 2. Зміни інтенсивності судом у щурів під час розвитку пентилентетразолового кіндлінгу залежно від типу генерації інтеріктальної спайкової активності

Примітка. За віссю абсцис — тривалість спостережень із щоденним введенням конвульсанту (в днях), * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$ — вірогідні відмінності досліджуваного показника у щурів із нерегулярним типом інтеріктальної спайкової активності порівняно з таким у щурів із регулярним типом активності.

як відомо, пов'язаний із прямою дією ПТЗ, що блокує хлорний іонофор ГАМК_A-бензодіазепінового рецепторного комплексу, а також активацією рецепторів збудливих амінокислот [11]. З другого боку, при дослідженні ПТЗ-спричиненої активності було доведено посилення ГАМК_B-опосередкованої медіаторної передачі [12], а важлива роль гальмових механізмів у формуванні синхронізованих високоамплітудних розрядів, до яких належить ІСА, добре відома [11]. Припускаємо, що активація ГАМК_B-медіаторної системи в умовах особливої морфофункціональної структурної організації гіпокампа здатна знижувати збудливість навіть за відсутності ГАМК_A-опосередкованого гальмування.

Дослідження інших авторів також підтверджують можливу роль ГАМК_B-рецепторів у запуску механізмів контролю та термінації кіндлінг-спричиненої активності (Francis J. et al., 2001). Крім того, вивчення особливостей локалізації ГАМК_B-рецепторів у корі [14] та гіпокампі [13] показало, що основна їхня частина розташована позасинаптично. А при патологічних порушеннях, що супроводжуються потужною активацією клітин, у тому числі й інтернейронів, коли відбувається збільшення кількості ГАМК, що вивільнюється, може відбуватися залучення цієї великої групи рецепторів до функціонування нейрональних сіток. Більше того, на пре- і постсинаптичному рівнях основна частина ГАМК_B-рецепторів асоційована з глутаматними рецепторами, що вказує на їх особливу роль у модуляції збудливої нейротрансмісії [13]. Цікаво, що на фоні блокування бікукуліном ГАМК_A-рецепторів, використання блокувальних ГАМК_B-рецепторів приводило до трансформації поодиноких проявів ІСА у пролонговані багатокomпонентні розряди. При цьому часто спостерігали формування іктального типу

активності [15]. Можливо, активація ГАМК_B-медіаторної системи, яка у свою чергу приводить до розвитку регулярної ІСА, і лежить в основі показаного модуляційного ефекту, що відвертає розвиток тяжких судомних нападів у початковому та середньому періоді формування кіндлінгу.

Висновки

1. Встановлено, що формування регулярної ІСА в гіпокампі та корі мозку щурів відбувалось у початковому періоді пентилентетразол-індукованого кіндлінгу в 67 % тварин. У середньому періоді кіндлінгу ця активність значно зменшувала інтенсивність судомних проявів і запобігала розвитку великих нападів.

2. На завершальних етапах формування пентилентетразолового кіндлінгу, незважаючи на збільшення частоти проявів ІСА, у 71 % тварин із регулярною ІСА розвивалися тяжкі генералізовані клоніко-тонічні судоми.

3. У групі тварин із нерегулярним типом генерації ІСА поява на ЕЕГ гіпокампа групи з кількох інтеріктальних спайкових розрядів призводила до більш раннього (14–17-те введення пентилентетразолу) формування генералізованого іктального розряду з тяжкими поведінковими проявами судомного характеру.

ЛІТЕРАТУРА

1. De Curtis M., Avanzini G. Interictal spikes in focal epileptogenesis // *Prog. Neurobiol.* — 2001. — N 63. — P. 541-567.
2. Morimoto K., Fahnestock M., Racine R. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain // *Prog. Neurobiol.* — 2004. — N 73. — P. 1-60.
3. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Брусенцов А. И. Киндлинг и эпилептическая активность. — Одесса: Астропринт, 1999. — 275 с.
4. Kelly L., McIntyre D. Hippocampal kindling protects several structures from the neuronal damage resulting from kainic acid-induced status epilepticus // *Brain Res.* — 1994. — N 634. — P. 245-256.

5. Penner M., Pinaud R., Robertson H. Rapid kindling of the hippocampus protects against neuronal damage resulting from status epilepticus // *Neuroreport.* — 2001. — N 12. — P. 453-457.

6. Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices / M. Bickson, J. Lian, P. Hahn et al. // *J. Physiol.* — 2001. — N 531. — P. 181-191.

7. Engel J., Ackermann R. Interictal EEG spikes correlate with decreased, rather than increased, epileptogenicity in amygdaloid kindling // *Brain Res.* — 1981. — N 241. — P. 75-86.

8. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation / S. R. B. Weiss, X. L. Li, J. Rosen et al. // *Neuroreport.* — 1995. — N 4. — P. 2171-2176.

9. Differential effects of pentylentetrazol-kindling on long-term potentiation of population excitatory postsynaptic potentials and population spikes in the CA1 region of rat hippocampus / M. Palizvan, Y. Fathollahi, S. Semnani et al. // *Brain Res.* — 2001. — N 898. — P. 82-90.

10. Functional activation of somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in experimental models of limbic seizures / A. Vezzani, C. Bendotti, M. Rizzi et al. // *Epilepsy Res.* — 1996. — Suppl. 12. — P. 187-195.

11. Годухин О. В. Клеточно-молекулярные механизмы киндлинга // *Успехи физиол. наук.* — 2005. — Т. 36, № 2. — С. 41-54.

12. Snead O. C. Evidence for GABA_B-mediated mechanisms in experimental generalized absence seizures // *Eur. J. Pharmacology.* — 1991. — N 213. — P. 343-349.

13. Subcellular localization of metabotropic GABA_B receptor subunits GABA_{B1a/b} and GABA_{B2} in the rat hippocampus / A. Kulik, I. Vida, R. Lujan et al. // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23, N 23. — P. 11026-11035.

14. Expression and distribution of metabotropic GABA subunits GABA_BR1 and GABA_BR2 during rat neocortical development / G. Lopez-Benedito, R. Shigemoto, A. Kulik et al. // *Eur. J. Neurosci.* — 2002. — N 15. — P. 1766-1778.

15. De Curtis M., Radici C., Forti M. Cellular mechanisms underlying spontaneous interictal spikes in acute model of focal cortical epileptogenesis // *Neurosci.* — 1999. — Vol. 88, N 1. — P. 107-109.

АНАЛИЗ ИНТЕРИКТАЛЬНОЙ СПАЙКОВОЙ АКТИВНОСТИ В ГИПОКАМПИ ТА НЕОКОРТЕКСИ ПРИ РОЗВИТКУ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОВОГО КІНДЛІНГУ У ЩУРІВ

У дослідженні вивчалася функціональна роль інтериктальної спайкової активності (ІСА) в гіпокампі та неокортексі при хронічно зростаючій епілептизації мозку щурів із використанням моделі пентилентетразолового (ПТЗ) кіндлінгу. Встановлено, що формування регулярної ІСА відбувалось у початковому періоді кіндлінгу у 67 % тварин. У середньому періоді кіндлінгу ця активність супроводжувалася значно меншими за інтенсивністю судомними проявами і, можливо, запобігала розвитку великих нападів. У групі тварин із нерегулярним типом генерації ІСА спостерігали більш раннє (14–17-те введення ПТЗ) формування генералізованого іктального розряду з тяжкими поведінковими проявами судомного характеру.

Ключові слова: інтериктальна спайкова активність, гіпокамп, неокортекс, кіндлінг, пентилентетразол.

THE ANALYSIS OF THE INTERICTAL ACTIVITY IN RAT'S HIPPOCAMPUS AND FRONTAL CORTEX DURING PENTYLENETETRAZOL-INDUCED KINDLING

The involvement of development the regular interictal spikes (IS) in the rat's hippocampus and frontal cortex on the generation ictal discharges with severe behavioral seizures in a chronic kindling model were investigated.

The most commonly observed pattern (67% of rats) was characterized by the appearance of regular IS. In the case when we observed single IS, non-regular IS progressed into generalized clonic-tonic seizures after 14th–17th injection of PTZ. During this time of kindling procedure the development of severe generalized clonic-tonic seizures hasn't been found in rats with regular IS.

Key words: interictal spikes, hippocampus, frontal cortex, kindling, pentylenetetrazole.

УДК 614.253.5:37

С. В. Калинин, канд. мед. наук, доц.

ВНЕДРЕНИЕ ТЕЛЕМЕДИЦИНСКОГО СЕРВИСА В ОДЕССКОМ РЕГИОНЕ

*Одесский государственный медицинский университет,
Одесская областная клиническая больница*

Введение

Телемедицинская помощь рассматривается в качестве метода наиболее быстрого оказания специализированной медицинской помощи пациентам [2; 3; 5; 14]. Следует отметить, что срочные лечебные мероприятия нередко играют критическую роль в случае острых нарушений деятельности сердца, при инсультах, травмах и т. п. [3; 5; 8; 10]. Поэтому подобное преимущество телемедицины может иметь важное значение для внедрения в систему здравоохранения стран бывшего СССР, и в особенности в систему здравоохранения таких регионов, как Одесский, в котором острая патология сердца и сосудов занимает первое место (61,2 %) среди прочих факторов смертности в молодом

возрасте [6; 9]. При этом второе и третье места занимают соответственно опухолевые заболевания и травмы (12,5 и 11,2 %) [9].

Несмотря на очевидное положение дел, когда телемедицинский сервис обещает быть эффективным инструментом спасения жизни пациента, процесс внедрения данной технологии происходит очень медленно, и телемедицинские консультации не стали рутинной медицинской технологией. Можно назвать несколько причин подобного положения, среди которых первая — отсутствие закона об обязательном медицинском страховании. Также весьма важная причина — это неудовлетворительное состояние инфраструктуры (коммуникационных линий) лечебно-профилактических учреждений, слабая обес-

печенность компьютерной техникой и отсутствие рынка телемедицинских устройств.

Тем не менее, Одесский регион стал первым среди регионов Украины, где принята государственная программа развития телемедицины собранием Областного совета народных депутатов (ноябрь 2006).

Такое решение можно представить как логическое развитие телемедицинских инициатив в регионе, которые ранее были предприняты в рамках проведения пилотных телемедицинских консультаций между Одесской областной клинической больницей и Измаильской районной больницей — наиболее удаленной точкой Одесского региона [1; 4].

Целью настоящей работы стал экспертный анализ результатов телемедицинских кон-