

РЕДКОЗУБОВА Ольга Михайловна

**ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА И
СПОСОБОВ ЕГО КУПИРОВАНИЯ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА
ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ**

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (заведующий кафедрой – профессор А.А. Каменский).

Научные руководители

доктор биологических наук, профессор

Чепурнов Сергей Александрович

кандидат биологических наук, доцент

Чепурнова Нина Евгеньевна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор

института психологии им. Л.С. Выготского

Российского Государственного Гуманитарного Университета,

Титов Сергей Алексеевич

кандидат биологических наук, доцент

психологического факультета

Государственного университета –Высшей школы экономики,

Лихачев Юрий Валентинович

Ведущая организация

Институт высшей нервной деятельности

и нейрофизиологии РАН

Защита состоится _____ в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного ученого совета _____ биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, д.1, корп. 12, МГУ, биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По имеющимся данным, 2-4% всего населения страдают эпилепсией. Наиболее драматичным состоянием в эпилептологии является эпилептический статус.

Эпилептический статус – состояние, при котором эпилептические припадки столь часты и продолжительны, что формируется стабильно и качественно иное эпилептическое состояние. При эпистатусе каждый последующий припадок возникает раньше, чем больной полностью вышел из предыдущего приступа, т.е. у него остаются выраженные нарушения сознания, гемодинамики, дыхания, гомеостаза [Карлов, 1990]. Эпилептический статус - это состояние, требующее немедленной рациональной терапии, направленной на восстановление и стабилизацию функций организма [Vining, Freeman, 1985]. Несмотря на современный арсенал антиэпилептических препаратов (АЭП), 10–15% больных эпилепсией являются медикаментозно резистентными; судорожный эпилептический статус нередко возникает при острых поражениях (черепно–мозговая травма) и заболеваниях головного мозга (инсульт, нейроинфекции, опухоли и др.), сильно отягощая прогноз; наконец, как указывают S. Knake и соавт. [1999], существующие препараты первой линии контролируют эпилептический статус только у 20–80% больных. Несмотря на современные достижения в лечении эпилептического статуса, имеют место рефрактерные случаи, не поддающиеся адекватной терапии. Кроме того, современные препараты, применяющиеся для купирования эпилептического статуса, обладают побочными эффектами, такими как седативный, угнетение кардиоваскулярной и респираторной деятельности [Карлов, 2001]. Поэтому целесообразно продолжение активного поиска новых способов лечения, новых антиэпилептических препаратов.

Одной из таких попыток является разработка препарата сакрицин на основе алициклических карбоновых кислот [Саакян, 1996; Асанова с соавт., 1995; Cherpurnov et al., 1998]. Препарат обладает малой токсичностью и эффективен против аудиогенных судорог у крыс линии КМ, увеличивает порог ПТЗ-индуцированных судорог [Могими, 1997] и, как недавно показано, подавляет пик-волновую активность на Co^{2+} модели эпилепсии [Гончаров с соавт., 2000]. Он оказывает свое действие через холинергическую систему мозга, участие которой в эпилептогенезе человека исследовано недостаточно [Сергиенко с соавт., 1979; Laird et al., 1986]. Потенциальные возможности препарата до конца не раскрыты.

Актуальной представляется и оценка центральных функций регуляторных нейропептидов как агентов, потенциально участвующих в контроле судорожной активности мозга. Тиролиберин [Чепурнов, 2002] нашел применение в неврологии, в терапии эписиндромов, клинике детской эпилепсии. Лабораторные и клинические исследования показали особое нейроанатомическое распределение и нейрохимическую роль для тиролиберина в модуляции судорожных приступов [Kubek, Garg, 2002; Crespi et al., 1986; Kerwin, Pycoc, 1979; Yarbrough, 1976].

В настоящее время паральдегид используется в значительной степени для немедленного вмешательства при лечении эпилепсии. Паральдегид подавляет судороги и у взрослых, и у детей [Shorvon, 1994]. Введение паральдегида не предотвращает функционального ухудшения и развития эпилепсии в более позднем возрасте [Kubova, 2000; Kubova, 2004].

В настоящее время активно развивается поиск митопротекторов как потенциальных нейропротекторов, поиск препаратов и веществ, направленных на уменьшение последствий окислительного стресса, нарушений на биохимическом уровне и гибели нейронов вследствие эпилептического статуса. Появляется все больше данных, свидетельствующих о необратимых изменениях в структуре митохондриальных ферментов вследствие продолжительного эпилептического статуса [Gibbs , 2006], что, в свою очередь, ведет к гибели нейронов.

Цели и задачи исследования. Целью работы было исследование формирования эпилептического статуса развивающегося и взрослого мозга беспородных белых крыс и крыс линии Вистар на экспериментальной литий-пилокарпиновой модели и способов его торможения.

В связи с поставленной целью решались следующие конкретные задачи:

1. Определить ЭЭГ-характеристики и поведенческие особенности развития и протекания эпилептического статуса у крысят в возрасте 12 и 25 дней и взрослых крыс в возрасте 90 дней.

2. Оценить эффективность и дозо-зависимость действия нового отечественного противосудорожного препарата - сакрицина на литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса у белых беспородных крыс.

3. Определить особенности поведения (по тесту «приподнятый крестообразный лабиринт») белых беспородных крыс, перенесших эпистатус и возможность его изменения с помощью противосудорожной терапии сакрицином.

4. Определить дозо-зависимость эффектов нейропептида - тиролиберина на литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса у крыс линии Вистар.

5. Сравнить эффекты паральдегида на моторные судороги, смертность, краткосрочные и долгосрочные последствия эпилептического статуса в двух возрастных группах крыс – 12-ти и 25-ти дней.

6. Оценить функциональное состояние (активность дыхательной цепи, мембранный потенциал и кальциевую емкость) митохондрий, выделенных из головного мозга крыс, перенесших литий-пилокарпиновый эпилептический статус.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов. В работе впервые выявлены возрастные особенности развития и протекания эпистатуса. В связи с разной подготовленностью, зрелостью медиаторных систем у крыс разного возраста, ответные реакции эпилептизированного тем или иным методом мозга могут быть неодинаковыми при применении противоэпилептических препаратов, поэтому важно иметь представление о развитии судорожного припадка.

Последствия эпилептического статуса выражаются в значительных нарушениях работы всех систем организма. Длительный некупирующийся эпистатус приводит к утяжелению прогноза для больного. Однако даже относительно позднее купирование может модулировать отставленные эффекты эпилептического статуса. Удалось показать, что паральдегид, введенный в целях купирования судорог, дозозависимо модулирует отставленные эффекты и последствия эпилептического статуса.

Эпистатус вызывает тяжелые моторные судороги, которые с помощью ультрамалых доз нейропептида тиролиберин купировать не удалось. Но кратковременное торможение, вызываемое тиролиберинном, может помочь в лечении эпистатуса при сочетании с другими противосудорожными препаратами.

Известно, что все противоэпилептические препараты участвуют в нейромедиаторных процессах и модулируют таким образом работу мозга. Одной из целей данной работы было - изучить возможное действие нового противоэпилептического средства – сакрицина на литий-пилокарпиновой модели. Было выявлено купирующее действие сакрицина, выражающееся в увеличении длительности периодов интериктального торможения. Сакрицин в больших дозах вызывал не только противосудорожное, но и миорелаксантное действие. Объединение миорелаксантных и противосудорожных свойств сакрицина может оказаться важным показателем при терапии судорожных состояний.

Впервые была показана возможность купировать эписпастический статус при помощи гиперкапнии.

Изменение энергетических процессов в митохондриях нейронов является одной из причин инициации и самоподдержания эпилептического статуса. В настоящее время активно исследуется роль митохондрий в развитии нейродегенерации в результате эпилептического статуса. Были показаны процессы активации Са-зависимой деполяризации митохондрий, увеличение митохондриальной проницаемости после длительных судорог.

Понимание механизмов торможения эпилептического статуса, полученных на модели, может быть применено в клинике височной эпилепсии, особенно в отношении нейрхимических механизмов купирования эпилептических приступов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Особенности развития и протекания судорожного припадка, его последствия у крыс зависят от возраста и уровня развития медиаторных и адаптивных систем головного мозга.

2. Сакрицин (соль полициклической поликарбонической кислоты) оказывает противосудорожное и миорелаксантное действие на крыс в состоянии эписпастического. Паральдегид оказывает модулирующее воздействие на развивающийся мозг.

3. Тиролиберин в ультрамалых дозах значительно снижает тяжесть моторного судорожного припадка.

4. Во время эпилептического статуса может происходить активация Са-зависимой деполяризации, увеличение митохондриальной проницаемости.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на Международной Студенческой Конференции по фундаментальным наукам «Ломоносов-2000» в Москве, XVIII Съезде физиологического Общества им. И.П.Павлова (2001) в Казани, Международном Конгрессе по нейрогипофизарным гормонам в Бордо, Франция (2001), XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» в Москве (2004), VI Европейском Конгрессе по эпилептологии в Вене, Австрия (2004), XVIII Конференции Польской Эпилептической Ассоциации по эпилепсии в Варшаве, Польша (2004), 9 Междисциплинарная Конференция «Стресс и поведение» в Санкт-Петербурге (2005), 15-ом Съезде Европейского Нейропептидного Клуба в Риге, Латвия (2005), 26-ом Международном Конгрессе по эпилепсии в Париже, Франция (2005), X Научной Конференции молодых ученых в Москве (2006), 9-ом Международном Симпозиуме по гинзенозидам в Теджоне, Корея (2006), XX Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова в Москве (2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (296 ссылок, в том числе 253 – зарубежные работы). Диссертация содержит 200 страниц машинописного текста, в том числе – 39 рисунков и 6 таблиц.

Работа поддержана грантом РФФИ 320-612 (2006-2008), грантом NF 6474-3 Министерства здравоохранения Чешской Республики, исследовательским проектом AVOZ 501 1922, грантом РФФИ 00-04-48809а (2000-2001), грантом РФФИ 02-04-48449а (2002-2003).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Работа выполнена на 53 крысах-самцах линии Вистар возраста 3-4 месяцев, 78 крысятах линии Вистар возраста 12 дней, 77 крысятах линии Вистар возраста 25 дней и 115 беспородных белых крысах-самцах возраста 3-4 месяца. Крысы содержались в виварии в стандартных условиях. Все эксперименты проводили согласно «Правилам с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.84 г. №724).

Используемые препараты. Лития хлорид (LiCl; фирмы Acgus) вводили в концентрации 1,5 мМ в объеме 2 мл стерильного физиологического раствора на кг веса за сутки до введения пилокарпина.

Пилокарпина гидрохлорид (Pilocarpinum hydrochloride, фирмы Acgus) вводили в дозе 40 мг/кг в объеме 2 мл стерильного физиологического раствора.

Сакрицин (Na⁺ соль поликарбоневой кислоты, ООО “Сакримед”) вводили в дозах 35, 70, 140, 400 мг/кг в объеме 3 мл стерильного физиологического раствора. Крысам контрольных групп вводили стерильный физиологический раствор в объеме из расчета на массу крысы.

Тириoliberин вводили в концентрациях 10⁻³, 10⁻⁹ и 10⁻¹² М в растворе стерильной дистиллированной воды в объеме 20 мкл.

Для купирования судорог использовали паральдегид (параацетальдегид, тример ацетальдегида, Paraldehyde, фирмы Acgus) в концентрации 0,6 мл/кг 10%-го раствора.

Для изучения действия краткосрочных и отставленных эффектов паральдегида использовали 2 различные дозы 10%-го раствора: 0,07 и 0,3 мл/кг у 12-тидневных крысят и 0,3 и 0,6 мл/кг у 25-дневных крысят.

Для изучения влияния CO₂ на моторные судороги, инициированные литий-пилокарпином, применяли ингаляционный способ с использованием эксикатора.

В качестве наркоза использовали: кетамин (Pharmaceuticals, Cambridge) в дозе 100 мг/кг, ксилазин (Pharmaceuticals, Cambridge) – в дозе 20 мг/кг, эфир.

Литий-пилокарпиновая модель эпилептического статуса. Взрослых животных оперировали за 7 дней до введения хемоконвульсанта пилокарпина (использовали крыс линии Вистар, n=9) для регистрации ЭЭГ. Вживляли электроды в лобную кору головного мозга и гиппокамп по общепринятой методике в стандартном стереотаксическом приборе [Буреш и др., 1991] с использованием кетамина с ксилазином или эфира в качестве наркоза. Использовали монополярные электроды из серебряных проволочек с лаковой изоляцией диаметром около 250 мкм и с расстоянием между кончиками 0.5 мм. Их фиксировали к кости черепа цемент-фосфатом «Dugastyl». Через 7 дней после операции у взрослых крыс регистрировали ЭЭГ с помощью многоканальной усилительной системы с

компьютерным анализом ЭЭГ и видеомониторингом (Каминский, 2000). Все опыты проводили в одно и то же время суток.

Спустя 1 неделю взрослым крысам вводили 2мл LiCl в дозе 127 мг/кг внутрибрюшинно. Спустя 24 ч после инъекции LiCl, крыс подсоединяли к переходному устройству, записывали фоновую ЭЭГ в течение 10-15 мин, затем вводили пилокарпин, отмечали время начала эписпастуса. Эписпастус наблюдали в течение 2 ч, после чего купировали судорожную активность паральдегидом в дозе 0,6 мл/кг (схема 1). После проделанного эксперимента крыс наблюдали в течение 3 дней.

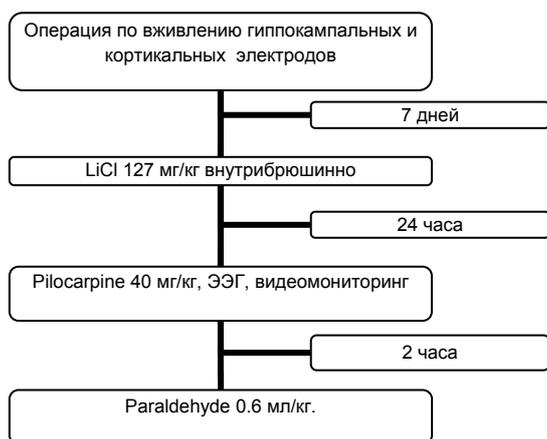


Схема 1.

Протокол эксперимента с регистрацией ЭЭГ взрослых крыс и использованием литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса.

Для оценки тяжести судорог пользовались шкалой Мареша.

Для регистрации ЭЭГ крысам (линии Вистар) в возрасте 12 и 25 дней за сутки до операции вводили LiCl в дозе 127 мг/кг в объеме 2мл внутрибрюшинно. На следующий день под эфирным наркозом электроды вживляли в лобную кору и гиппокамп. Через 3 ч записывали фоновую ЭЭГ в течение 10-15 мин, затем вводили пилокарпин в дозе 40 мг/кг в объеме 2 мл. Отмечали время начала эписпастуса и регистрировали судорожную активность в течение 2 ч, после чего судороги купировали паральдегидом в дозе 0,3 мл/кг.

Эксперименты с исследованием возможности купирования эписпастуса сакрицином проводили в двух вариантах. В первом спустя 1 неделю после операции инициировали эписпастус по стандартной методике. Регистрировали фоновую ЭЭГ в течение 10-15 мин до введения пилокарпина, отмечали время начала эписпастуса. После 1 ч судорог крысам опытной группы вводили тестируемый препарат в дозе 400 мг/кг, через 60 мин после этого еще раз вводили сакрицин в дозе 400 мг/кг и через 60 мин делали третью инъекцию сакрицина в дозе 400 мг/кг. После завершения эксперимента крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили паральдегид для купирования судорог в дозе 0,6 мл/кг. После проделанного эксперимента крыс наблюдали в течение 3 дней.

Во втором варианте эписпастус провоцировали по стандартной методике. За 40 мин до введения хемоконвульсанта, препарат сакрицина вводили в дозах 35, 70, 140, 400 мг/кг в объеме 3 мл физраствора. В ряде опытов второе введение сакрицина в дозе 400 мг/кг проводили одновременно с введением пилокарпина (40 мг/кг в объеме 2 мл).

Для фармакоанализа нейропептида тиролиберина эписпастус инициировали стандартным методом у взрослых крыс линии Вистар. За 15 мин до введения хемоконвульсанта крысам вводили интраназально тиролиберин в концентрациях 10^{-3} , 10^{-9} и 10^{-12} М в растворе дистиллированной воды. После 1-го введения тиролиберина, его

вводили повторно одновременно с введением пилокарпина. Спустя 2 ч судороги купировали введением паральдегида в дозе 0,6 мл/кг.

Для изучения действия паральдегида на краткосрочные и отставленные эффекты эпилептического статуса, использовали 2 различные дозы: 0,07 и 0,3 мл/кг у 12-тидневных крысят и 0,3 и 0,6 мл/кг у 25-дневных крысят. Эпистатус был инициирован стандартным способом у самцов линии Вистар на 12-ый день постнатального развития или 25-ый день.

Исследование поведения. Крестообразный приподнятый лабиринт (КПЛ). За 5 мин тестирования оценивали: 1) латентный период; 2) число и продолжительность выходов (всеми четырьмя лапами) на открытые лучи; 3) число “выглядываний” (выход двумя лапами); 4) число выходов на закрытые лучи; 5) суммарное время пребывания крысы на открытых лучах; 6) число стоек с опорой на стенки закрытых лучей; 7) время замираний; 8) число умываний; 9) суммарное время умываний; 10) количество дефекаций.

Удерживание на бруске, рота-род, водный лабиринт Морриса. Исследовано поведение крысят 2-х возрастных групп, перенесших эпистатус на 12 и 25 дни постнатального развития. Тесты выполнялись на 3, 6, 13, 26, и на 56 дни после эпистатуса. Тестирование в водном лабиринте проводили спустя 3 месяца после эпистатуса. Каждая крыса получала одну учебную сессию (8 попыток) в день в течение 5 дней последовательно.

Анализ ЭЭГ. Для получения спектрального анализа ЭЭГ использовали пакет программ Mon-EEG-a и Mon-EEG-r (Каминский, 2000). Для отдельных участков зарегистрированной ЭЭГ вычисляли мощность разрядов.

Выделение митохондрий из головного мозга крыс проводили по стандартной методике дифференциального центрифугирования с использованием 0,02% дигитонина для высвобождения митохондрий из синантосом [Rosental et al., 1987].

Определение белка в препарате митохондрий с помощью микробиуретового метода. Количественное определение белка проводили по стандартной методике с помощью микробиуретового метода [Gornall, 1949].

Регистрация активности дыхания митохондрий проводилась полярографически по поглощению кислорода суспензией митохондрий (0,1 мг белка в ячейке) с использованием оксиграфа Oroboros (Австрия) при 30°C.

Измерение мембранного потенциала митохондрий проводилось спектрофотометрически с использованием потенциал-зависимого индикатора сафранина А в кювете спектрофотометра Beckman DU 640 при 25°C и постоянном перемешивании [Бачурин и др., 2007]. Анализ полученных данных проводили с помощью графика зависимости разности изменения светопоглощения при 524 и 554 нМ от времени.

Измерение кальциевой емкости митохондрий проводили в KCl буфере, содержащем глутамат и малат (5 мМ) как субстраты дыхания и 200 мкМ АДФ, с использованием металлохромного индикатора арсеназо III [Scarpa et al., 1978] и дробным добавлением к суспензии митохондрий аликвот кальция (6,25 мкМ в минимальном объёме) каждые две минуты в течении 20-30 минут.

Статистическая обработка результатов.

Статистический анализ полученных результатов во всех сериях проводили по U-критерию Манна-Уитни, а также по t-критерию Стьюдента. Данные при исследовании поведения в водном лабиринте оценивали с использованием точного метода Фишера, различия внутри группы оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Данные представлены в форме среднее \pm ст.ошибка (means \pm SEM). Уровень значимости во всех опытах принимали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Развитие моторных судорог у крыс разного возраста в условиях литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса.

В первой части работы исследовали особенности развития эписатуса у крыс разного возраста: у крысят линии Вистар в возрасте 12 дней ($n=45$) (что соответствует младенческому возрасту человека), у 25-дневных крысят, когда созревают почти все медиаторные системы и у крыс в возрасте 90 дней ($n=14$) (что соответствует взрослому состоянию). У взрослых крыс через 1-2 мин после введения пилокарпина наблюдалось сильное слюно- и слезотечение, «жевание», беспокойство: животное бегало по клетке, периодически становилось на задние лапки. Еще через 3-7 мин наблюдался постоянно повторяющийся «рефлекс» расчесывания задними лапками спины. Наблюдалась усиленная дефекация и уринации. Развитие эписатуса начинается с мелкой дрожи всего тела, «кивания» головой, что соответствует судорожной активности 2 балла по шкале Мареша. Затем наступает быстрый переход к третьей стадии, которая развивается в судорожную активность, оцениваемую по шкале Мареша 4 балла. Эта стадия может продолжаться от нескольких секунд до нескольких минут.

У 78,3% животных судороги четвертой стадии могут сменяться более слабыми судорожными пароксизмами третьей стадии. Позднее у крыс могут возобновляются сильные судороги. Такая периодичность судорожной активности может совершаться в виде несколько циклов. У 24% животных после четвертой стадии может развиваться пятая, которая характеризуется тяжелыми тонико-клоническими судорогами с потерей позы. Нередко наблюдались случаи так называемого «встряхивания мокрой собаки».

У 12-тидневных крысят судороги проявлялись, главным образом, в подергиваниях лицевых мышц, «жевательных» движениях, «кивании» головы, клонических судорогах передних конечностей, плавательных движениях и повышенном тоне хвостовых мышц. У крысят, по-видимому, в силу незавершённости формирования защитных стволовых тормозных механизмов часто за клонической стадией возникал тонический компонент припадка - выгибание спины. У 25-тидневных крысят судороги проявлялись в виде клонический судорог передних конечностей и мышц головы. Конвульсии характеризовались большей интенсивностью, нежели у 12-дневных крысят, наблюдалась 4 стадия.

По мере созревания противэпилептической защиты у крыс линии Вистар, латентный период наступления эпилептического статуса увеличивался, и были получены следующие результаты: у 12-дневных крысят ЛП составил 14.6 ± 6 мин, у 25-дневных – 24.8 ± 12.7 мин, у 90-дневных – 31.1 ± 10.0 мин (рис. 1). Достоверные различия выявлены для групп 12-ти и 25-дневных крыс ($p < 0,05$), а также для групп 12-ти и 90-дневных крыс ($p < 0,001$). Полученные результаты объясняются повышенной судорожной готовностью мозга вследствие незрелости медиаторных систем в 12-тидневном возрасте, а также недостаточной зрелостью противэпилептических защитных механизмов.

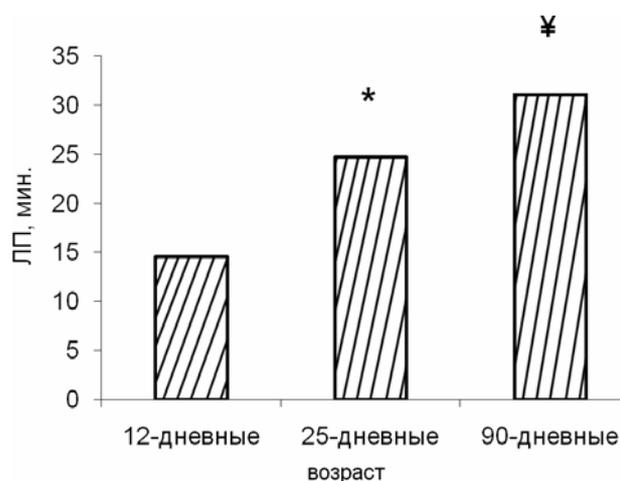


Рис. 1. Изменение ЛП эпилептического статуса, вызванного пилокарпином в дозе 40 мг/кг, по мере созревания структур головного мозга у крыс линии Вистар.

*- $p < 0,05$ - отличие 12-ти и 25-дневных
 ¥- $p < 0,001$ - отличие 12-ти и 90-дневных

Судорожную готовность головного мозга оценивали по количеству крыс с развившимся эпилептическим статусом. Оказалось, что у 12-дневных крысят линии Вистар судорожный порог ниже, чем у 25-дневных и 90-дневных, а у 25-дневных, в свою очередь, – ниже, чем у 90-дневных. В группе 12-дневных 95.4% крысят оказались восприимчивы к введению литий-пилокарпина, в группе 25-дневных – 80%, а в группе 90-дневных – 64.3% (рис.2). Для первых двух недель развития крысенка постсинаптическое действие ГАМК на ГАМК_A-рецептор проявляется в виде деполяризации, и только спустя 2 недели деполяризация сменяется гиперполяризацией в большинстве структур мозга, в том числе непосредственно вовлечённых в патогенез судорог - гиппокампе и миндалине. По литературным данным возможным клеточным механизмом гиперполяризации является начало экспрессии мембранного K⁺/Cl⁻ ко-транспортера, обеспечивающего трансмембранный градиент ионов Cl⁻ [Rivera, 99].

Способность адаптивных и защитных систем мозга противостоять эпилептическому статусу оценивали по проценту смертности крыс после двухчасового эпистатуса, купированного паральдегидом. У 25-дневных крысят высок процент смертности – 16.3%. У 12-дневных крысят процент летальных исходов невелик – 2.2% (рис. 2). Взрослые особи эпилептический статус переносят более тяжело, чем 12-ти и 25-дневные крысята – 21.4% случаев с летальным исходом после купирования эпистатуса паральдегидом.

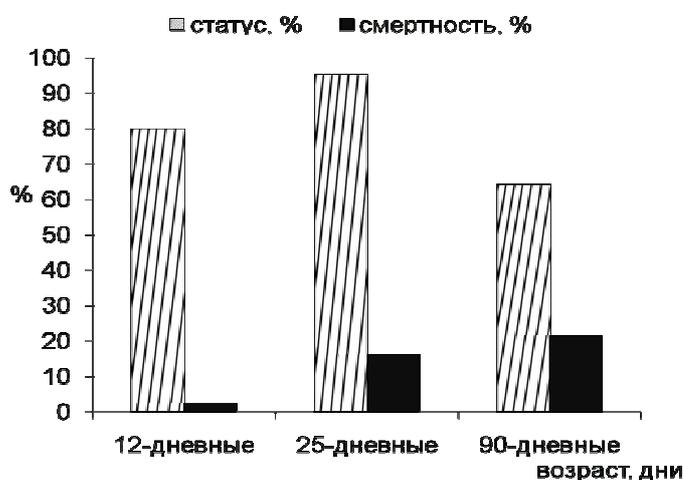


Рис. 2. Проявление ЭС после введения пилокарпина (число крыс в %) в зависимости от возраста и смертность в результате 2-х часового эпистатуса у крыс линии Вистар.

Эпилептический статус, перенесенный в раннем возрасте, часто ассоциируется со значительными повреждениями мозга [Sagar, Oxbury, 1987], а также увеличивающимся риском развития эпилепсии и повреждением когнитивных функций [Aicardi, Chevrie, 1970]. Есть данные, что области таламуса наиболее уязвимы во время эпилептического статуса, вызванного литий-пилокарпином, что показано на 12-дневных крысятах линии Вистар [Kubova et al, 2001]. Однако остается непонятным, почему, вызывая такие разрушения в созревающем мозге, смертность от ЭС остается низкой по сравнению со взрослыми животными, поскольку противоэпилептическая защита в раннем возрасте также остается несовершенной.

У крыс линии Вистар в различных возрастных группах (12 дней, n=4; 25 дней, n=4; 90 дней, n=4) исследовали характерные особенности ЭЭГ при развитии эпилептического статуса после введения литий-пилокарпина. У 12-ти и 25-дневных крысят в период 2 стадии в ЭЭГ происходило увеличение амплитуды разрядов в 2 раза в коре и в 4 раза - в гиппокампе. Гиппокампальный статус мог начаться в левом гиппокампе, или в правом, или в обоих синхронно (рис. 3 А,В).

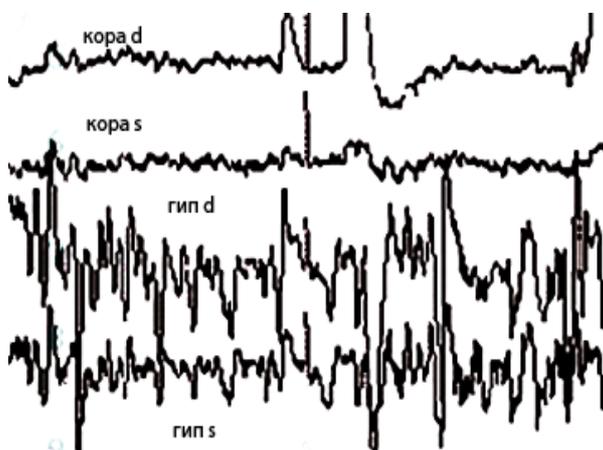


Рис. 3А
ЭЭГ у 12-дневных крысят. Начало эписатуса в обоих гиппокампах.

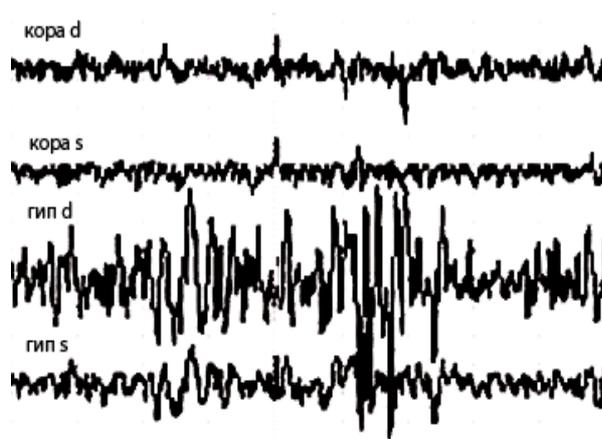


Рис. 3В
ЭЭГ у 25-дневных крысят. Начало эписатуса в правом гиппокампе.

В отличие от крысят, у взрослых животных вторая стадия характеризуется незначительным и непостоянным увеличением амплитуды разрядов во всех областях синхронно – и в коре, и в гиппокампе.

Третья стадия, характеризующаяся как стабильное самоподдерживающееся судорожное состояние, не переходящее в четвертую стадию, на ЭЭГ отражается как постоянный, непрерывный разряд следующих друг за другом с большой частотой спайков (15-20 имп/с), характеризующихся большой амплитудой (до 550 мкВ). Характерной особенностью разряда является правильный, четкий, однообразный рисунок совершенно упорядоченных спайков.

Однако у взрослых животных со зрелой системой противоэпилептической защиты нередко можно было наблюдать подавления электрографических коррелятов судорожных пароксизмов путем замещения высокоамплитудной активности низкоамплитудным ритмом, что наблюдалось в коре и гиппокампе синхронно. Низкоамплитудный ритм мог продолжаться 0,5-1,5сек с интервалами от 10-14 сек в течение 2 ч записи. Можно проследить динамику судорожных приступов, которые развиваются сначала в

гиппокампе, а затем в коре. У 12-ти дневных крысят первоначально судорожная активность развивается в гиппокампе и только через 10-20 сек она появляется в коре. У 25-ти дневных крысят эпилептическая активность в коре появляется позже на 5-6 мин.

У грызунов первые 2 недели жизни являются критическими для окончательного созревания многих нейромедиаторных систем: ГАМК-ергической, АВП-ергической, глутаматергической и др. Следовательно, в разные сроки после рождения по-разному складываются взаимоотношения между теми медиаторными системами, которые обеспечивают или повышение судорожной готовности мозга или, напротив, антиэпилептические защитные механизмы. В связи с разной подготовленностью, зрелостью медиаторных систем у крыс разного возраста, ответные реакции эпилептизированного тем или иным методом мозга могут быть неодинаковыми при применении противоэпилептических средств. Для описания полученных результатов, касающихся эффектов исследуемых препаратов на судорожную активность, важно иметь представление о развитии судорожного припадка.

2. Эффекты паральдегида на литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса у молодых крыс.

Последствия эпилептического статуса определяются большим количеством различных факторов. Среди них те факторы, которые лежат в этиологии заболевания, возраст, продолжительность эпилептического статуса, являются самыми важными. Не менее важны системные осложнения – гипоксия, нарушения в сердечно-сосудистой системе.

В настоящее время паральдегид используется в значительной степени для немедленного вмешательства при лечении эпилепсии. Паральдегид подавляет судороги и у взрослых, и у детей [Shorvon, 1994]. Даже относительно позднее купирование судорог может модулировать отставленные эффекты эпилептического статуса. Для изучения этой возможности были проведены следующие эксперименты: сравнили эффекты двух различных доз паральдегида на моторные судороги, смертность, краткосрочные и долгосрочные эффекты эпилептического статуса, на поведенческие реакции в двух возрастных группах крыс – 12-ти и 25-ти дней. Обе дозы паральдегида, используемые в данных экспериментах, ранее были тестированы на животных, и было выявлено, что обе они подавляют судорожные пароксизмы.

Эпилептический статус был инициирован у белых самцов линии Вистар на 12-ый день постнатального развития (n=29) или 25-ый день (n=30). Использовались 2 различные дозы: 0,07 и 0,3 мл/кг у 12-дневных крысят и 0,3 и 0,6 мл/кг у 25-дневных крысят. Дозы были выбраны согласно эффектам, оказываемым паральдегидом на моторную активность крыс. Паральдегид вводили однократно, спустя 2 часа после начала эпилептического статуса. Масса тела измерялась ежедневно в течение 1 недели после эпилептического статуса, и после того, на 13, 26, и спустя 56 дней после эпилептического статуса. Вычисляли относительную массу тела [вес тела во время измерения/масса тела на 12-ый или 25 день постнатального развития x 100 %].

Влияние введения паральдегида на развитие литий-пилокарпинового эпилептического статуса, смертность и массу тела у 12-ти и 25-тидневных крысят.

У 100% крысят развивался эпилептический статус, который длился до введения паральдегида 2 ч. Паральдегид в обеих тестируемых дозах - 0,07 и 0,3 мл/кг у 12-тидневных крысят заметно уменьшал тяжесть судорожных припадков. Не было обнаружено различий в подавлении судорог 2-мя различными дозами- 0,07 и 0,3 мл/кг.

Также не было выявлено отличий в смертности 12-тидневных животных. Относительная масса тела крысят, эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,3 мл/кг, была значительно ниже чем у крысят контрольной группы, на протяжении 7 дней после статуса ($p < 0,001$). Относительная масса тела у крысят, эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,07 мл/кг, была значительно ниже чем у крысят контрольной группы, на протяжении 13 дней после эпилептического статуса ($p < 0,05$) (рис. 4).

У 25-тидневных крысят после введения паральдегида, судороги быстро купировались. В течение последующих 24 часов после купирования эпистатуса наблюдались единичные клонические судороги (3-4 стадия) у крысят, эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,3 мл/кг. У крысят, эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,6 мл/кг, наблюдались двигательные автоматизмы – «жевание», «встряхивание мокрой собаки».

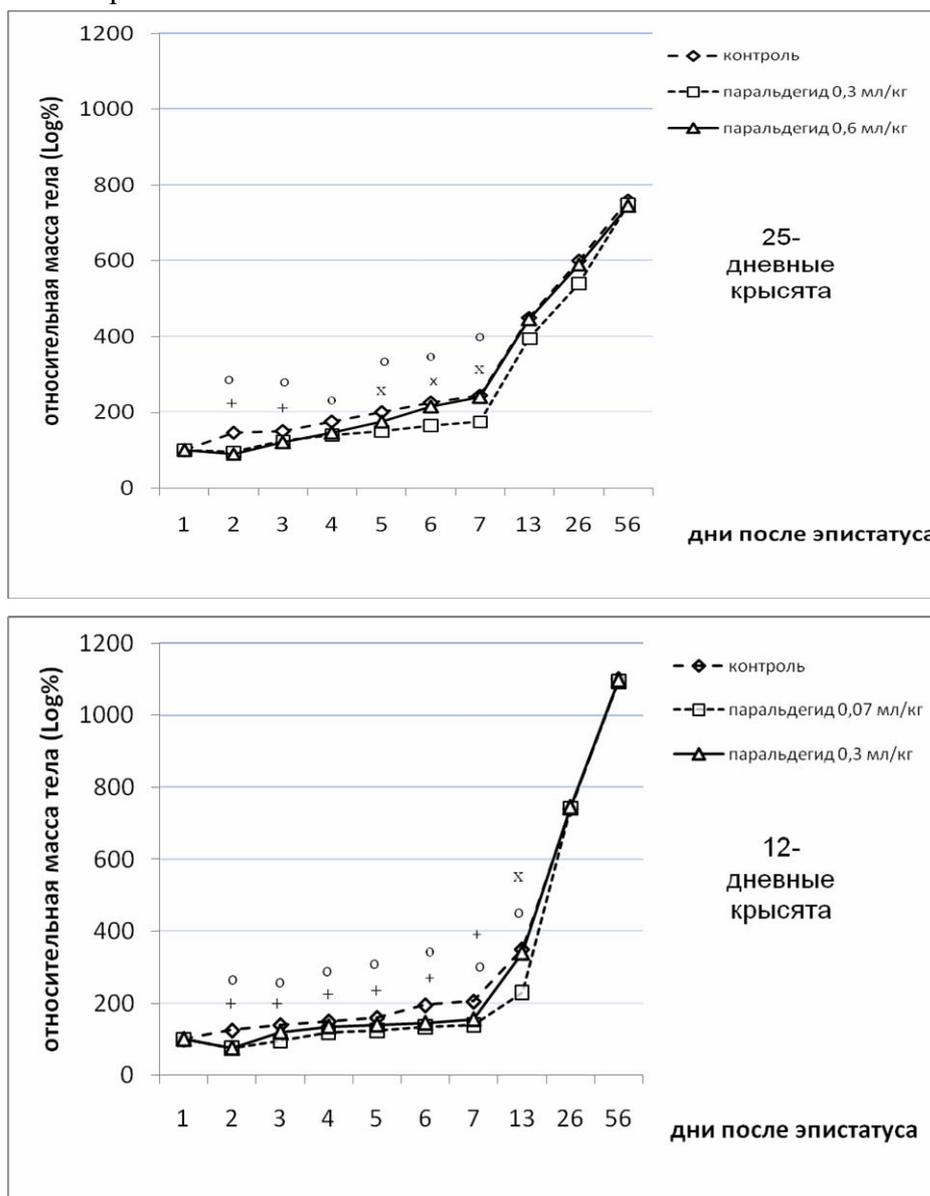


Рис. 4. Изменение массы тела 12-ти и 25-дневных крысят после купирования эпистатуса различными дозами паральдегида. Вес тела в 12 и 25 дней взят за 100%. $p < 0,05$:

- o – низкая доза по сравнению с контролем
- + – высокая доза по сравнению с контролем
- x – низкая доза по сравнению с высокой.

Смертность крысят была одинакова в обеих группах. Сравнение относительных масс тела (рис. 4) показало, что крысята, эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,6 мл/кг, достигли величин относительных масс тела контрольной группы уже спустя 3 дня после эпилептического статуса. В то же время у крысят, эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,3 мл/кг, относительная масса тела была значительно ниже, чем у крысят контрольной группы на протяжении недели после эпистатуса ($p < 0,05$).

Влияние паральдегида на отставленные эффекты литий-пилокарпинового эпилептического статуса у 12-тидневных и 25-тидневных крысят.

В нашу задачу входило исследование влияния паральдегида, который купирует эпистатус, на отставленные проявления нарушений когнитивных функций и моторной активности у крысят разного возраста. На крысятах в возрасте 12 дней провели тестирование на двигательную активность. Исследовали способность крысят ухватываться за брусок задними лапами и время, проведенное на бруске. Не было выявлено отличий по этим показателям у крыс опытной группы, которым вводили паральдегид в 2-х дозах – 0,07 мл/кг и 0,3 мл/кг во время эпистатуса, и крысами контрольной групп в любой из дней тестирования после эпилептического статуса. В тесте рота-род, спустя 56 дней после эпилептического статуса, крысята, перенесшие статус, находились на стержне более короткое время (90 ± 21 сек при введении паральдегида в дозе 0,07 мл/кг и 86 ± 13 сек при введении паральдегида в дозе 0,3 мл/кг) по сравнению с крысами контрольной группы (154 ± 11 сек, $p = 0,02$). Различий между крысятами, перенесшими эпистатус, купированный паральдегидом в дозах – 0,3 и 0,07 мл/кг, обнаружено не было.

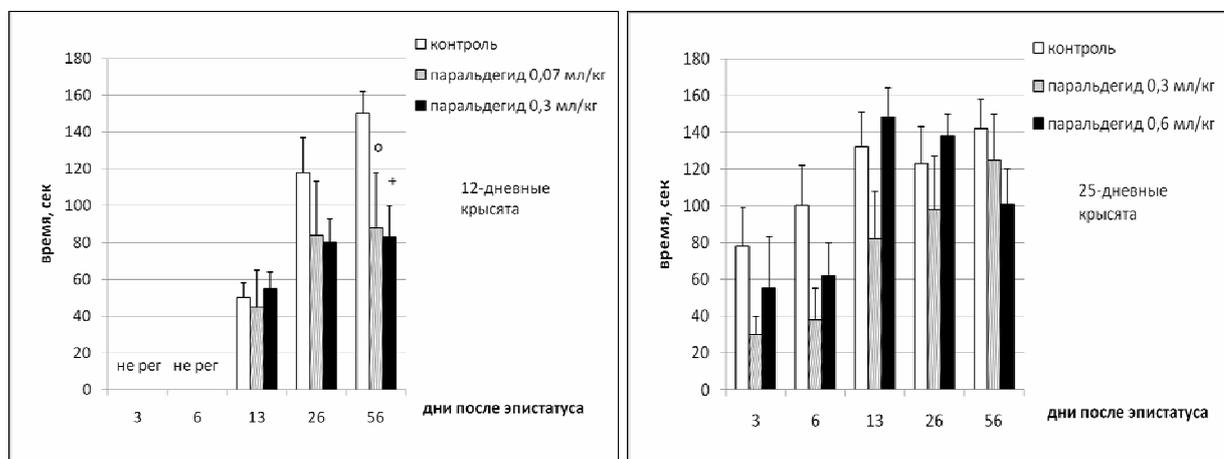


Рис. 5. Изменение времени нахождения на вращающемся стержне 12-ти и 25-дневных крысят после эпистатуса, купированного различными дозами паральдегида.

$p < 0,05$: o - низкая доза по сравнению с контролем
+ - высокая доза по сравнению с контролем

У 25-тидневных крысят спустя 3 дня после эпистатуса, 5 из 9 животных (56%, $p = 0,029$), эпистатус которых был купирован паральдегидом в дозе 0,3 мл/кг, не могли быть тестированы на двигательную активность в результате сохранившейся повышенной возбудимости. Все контрольные животные и крысы, получавшие паральдегид в дозе 0,6 мл/кг были способны к тестированию. За этим исключением, не было обнаружено никаких различий в латентных периодах нахождения на бруске или стержне в рота-род-

тесте между крысами контрольной группы и крысами, перенесших эпилептический статус (рис.5). В тесте рота-род время, проведенное на стержне, было меньше у крыс обеих групп, перенесших эпилептический статус в 12-дневном возрасте, на 26 и 56 дни тестирования после статуса, по сравнению с контролем. Это связано скорее с повышением тревожности, изменением эмоционального статуса [Kubova, 2004], чем с прямыми нарушениями в двигательной активности, поскольку не наблюдалось никаких отклонений в других тестах на двигательную активность.

Нарушения когнитивной функции выявили у крысят при исследовании поведения в водном лабиринте Морриса (рис 6).

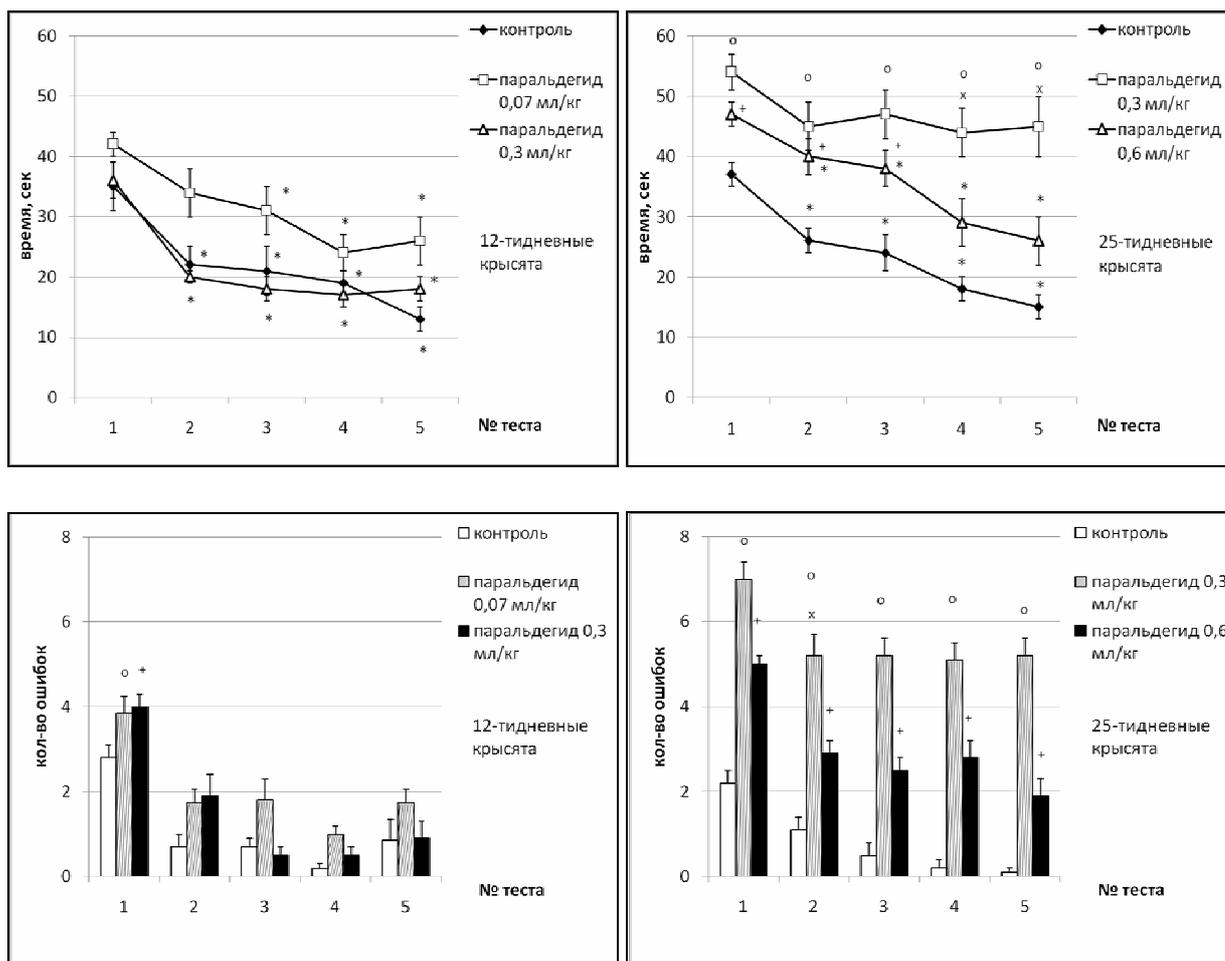


Рис. 6. Прохождение водного лабиринта Морриса 12-ти и 25-дневными крысятами, спустя 3 месяца после эпилептического статуса, купированного различными дозами пентиледегида.

$p < 0,05$:

o – низкая доза по сравнению с контролем

+ - высокая доза по сравнению с контролем

x – низкая доза по сравнению с высокой.

* - отличие между первым и последующими тестами в каждой группе.

Эксперимент проводили спустя 3 месяца после эпилептического статуса. У 12-дневных крысят, эпилептический статус которых был купирован более низкой дозой пентиледегида 0,07 мл /кг, время поиска платформы уменьшилось только на 3-ий день тестирования. Крысята, статус которых был купирован более высокой дозой пентиледегида, ориентировались в лабиринте так же хорошо, как и крысята контрольной группы и время пребывания в лабиринте снизилось на 2-ой день тестирования (по сравнению с первым) (р

<0,01). В первый день тестирования число неудачных попыток был выше у крыс, перенесших эпилепсию, купированной паральдегидом в обеих дозах ($4,0 \pm 0,6$ для крыс с введением паральдегида в дозе $0,07$ мл/кг и $3,8 \pm 0,5$ для крыс с введением паральдегида в дозе $0,3$ мл/кг), по сравнению с крысами контрольной группы ($2,1 \pm 0,1$, $p=0,003$). Животные, перенесшие эпилепсию в 25-тидневном возрасте, купированной любой дозой паральдегида, нуждались в более длительном времени нахождения платформы по сравнению с крысами контрольной группы ($p < 0,01$). Начиная с 4-го дня тестирования, крысы, перенесшие эпилепсию, купированной низкой дозой паральдегида, проводили в лабиринте более длительное время по сравнению с животными, статус которых был купирован более высокой дозой ($p < 0,05$).

По сравнению с первым днем тестирования время пребывания в лабиринте у контрольных животных и крыс, статус которых был купирован паральдегидом в дозе $0,6$ мл/кг, значительно сократилось на второй день тестирования. Уменьшения времени поиска платформы в лабиринте не происходило ни в один из дней тестирования у животных, эпилепсию которых был купирован паральдегидом в дозе $0,3$ мл/кг. В целом, животные обеих групп, перенесших эпилепсию, менее удачно проходили данный тест по сравнению с крысами контрольной группы ($p < 0,05$). У 25-дневных животных существенно ухудшается прохождение лабиринта Морриса по сравнению с 12-дневными крысятами. Различия в нарушениях когнитивных функций могут быть связаны с продолжением повреждающего действия эпилептического статуса на нейроны головного мозга вследствие того, что низкие дозы паральдегида не очень эффективно купируют эпилепсию, и его проявления могут наблюдаться на ЭЭГ впоследствии [Liu, 1994].

3. Противосудорожные эффекты нового препарата «сакрицина» на литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса.

В данной серии экспериментов были использованы взрослые беспородные крысы ($n=27$). В первой серии экспериментов сакрицин вводили дважды – за 40 мин до введения пилокарпина и одновременно с пилокарпином в дозе 400 мг/кг ($n=9$). Во второй серии сакрицин вводили однократно – за 40 мин до введения пилокарпина в дозе 400 мг/кг ($n=9$). Двукратное введение сакрицина в дозе 400 мг/кг практически полностью снимало развитие эпилепсии. Сакрицин в данной дозе оказывал сильное миорелаксантное действие. Однократное введение сакрицина в дозе 400 мг/кг частично купирует развитие эпилепсии, судороги развиваются лишь у 33% крыс. При этом миорелаксантные свойства сакрицина выражены слабее. У крыс с развившимся эпилепсией латентный период его наступления по сравнению с контролем увеличен, хотя в меньшей степени по сравнению с двукратным введением сакрицина (62 , 43 и 102 мин для опытных, 32 ± 2 мин для контрольной группы соответственно). По остальным показателям тяжесть судорог не отличалась от контрольной группы.

В третьей серии экспериментов были также использованы взрослые беспородные крысы ($n=42$). Сакрицин вводили дважды – за 40 мин до введения пилокарпина и одновременно с пилокарпином в дозах 35 мг/кг ($n=11$); 70 мг/кг ($n=11$); 140 мг/кг ($n=9$). Не наблюдалось снижения мышечного тонуса, вялость и меньшая подвижность, как после введения сакрицина в больших дозах. Развитие эпилепсии шло по той же схеме, что и у крыс контрольной группы, но судороги протекали легче. Существенно понижается суммарное время четвертой стадии по сравнению с контролем. Количество пятых стадий не отличается у крыс контрольной и опытной групп. Сакрицин в низких дозах не влияет

на латентный период развития эпилептического статуса, не влияет и на процент крыс, у которых развился эписатус. Однако сакрицин в малых дозах снижает смертность крыс, перенесших 2-х часовой эпилептический статус (0% опытных по сравнению с 27,3% контрольными).

Сакрицин обладает различными механизмами действия: общим противосудорожным эффектом, выражающимся в уменьшении времени реализации генерализованной активности в корково-таламических кругах [Ашмарин и др., 2003]; через холинергическую систему мозга [Сергиенко с соавт., 1979; Laird et al., 1986]; за счет вовлечения сакрицином бета-адренорецепторов; эффекты сакрицина объясняются также блокированием межполушарного переноса судорожной активности [Молодавкин и Воронина, 1997, 2002], что оказывает влияние на торможение эпилептических разрядов лобной коры на фоне развившегося ЭС. Возможные механизмы реализации действия сакрицина могут быть связаны с бензодиазепиновым сайтом ГАМК_A – рецептора, а также с гистаминергической системой [Ашмарин и др., 2003]. Объединение миорелаксантных и противосудорожных свойств сакрицина может оказаться важным показателем при терапии судорожных состояний.

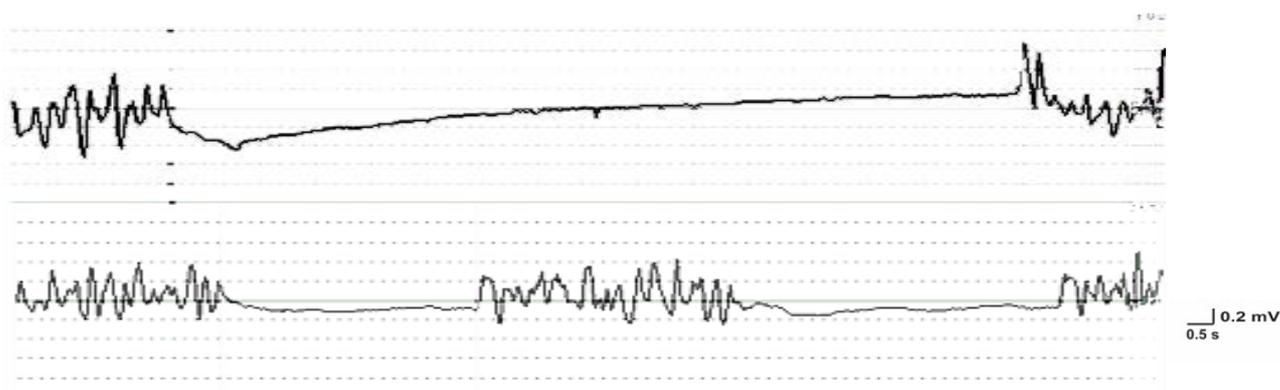
Влияние однократного введения сакрицина в дозе 400 мг/кг за 40 минут до эпилептического статуса на тревожность крыс в тесте "приподнятый крестообразный лабиринт"

Проведено сравнение поведения трех групп беспородных крыс в ПКЛ (n=32). В одной группе исследовали интактных крыс, в другой – крыс, перенесших эписатус и в третьей – исследовали поведение крыс, получавших при развитии эписатуса сакрицин в дозе 400 мг/кг (однократное введение за 40 мин до введения пилокарпина). Хотя не получено достоверных отличий, наблюдается тенденция к увеличению времени затаивания и латентного периода начала движения у крыс, перенесших ЭС. Это можно объяснить очень низкой активностью крыс после ЭС. У крыс контрольной группы время груминга увеличено, эти крысы предпочитают оставаться на закрытых лучах в отличие от постэписатусных крыс. Количество падений также преобладает у крыс, перенесших ЭС. Полученные данные свидетельствуют о нарушениях двигательной активности после 2-х часового ЭС. Крысы, получившие сакрицин в дозе 400 мг/кг за 40 мин до введения пилокарпина, легче восстанавливались после перенесенного ЭС. Это проявлялось в меньшем ЛП пребывания на ПКЛ (2 ± 2 сек для крыс опытной группы по сравнению с 10.7 ± 3 сек для крыс контрольной группы, $p < 0.05$, Манна-Уитни). Установлено также, что время затаивания для крыс, получавших сакрицин, гораздо меньше, чем для крыс контрольной группы (45 ± 18 сек и 78 ± 27 сек соответственно, $p < 0.05$, Манна-Уитни). По остальным параметрам достоверных отличий не наблюдалось, однако можно сделать вывод, что сакрицин может оказывать не только противосудорожное и миорелаксантное действие, но и в некотором качестве и нейропротективное действие, поскольку уровень активности у крыс опытной группы был немного выше по сравнению с контрольной группой.

Влияние введения сакрицина в дозе 400 мг/кг на фоне развившегося эпилептического статуса при ЭЭГ-регистрации на литий-пилокарпиновой модели ЭС.

В данной серии опытов исследовали влияние сакрицина на ЭЭГ, которую регистрировали у крыс во время развития литий-пилокарпинового эписатуса. Спустя 1 неделю после операции по вживлению электродов, инициировали эписатус и наблюдали

его развитие в течение 1 часа. После этого вводили сакрицин в дозе 400 мг/кг 3 раза с интервалом 40 мин. Вследствие миорелаксирующего действия сакрицина, после первого же его введения резко снижался мышечный тонус и крысы лежали почти неподвижно. Эпилептическая активность при этом в ЭЭГ сохранялась, а моторная судорога была выражена только в виде сокращения отдельных групп мышц. После последнего введения наблюдали практически полное прекращение электроэнцефалографического выражения эпилептического статуса, а также прекращение моторных судорог. После каждого следующего введения сакрицина наблюдали замещение высокоамплитудной и высокочастотной эпилептической активности интериктальным торможением. По мере введения препарата с каждым разом длительность этих замещений возрастала, а амплитуда разрядов уменьшалась (рис. 7). Получили достоверные отличия по величине амплитуд спайков в разрядах в норме и в разные периоды развития эпилептического статуса.

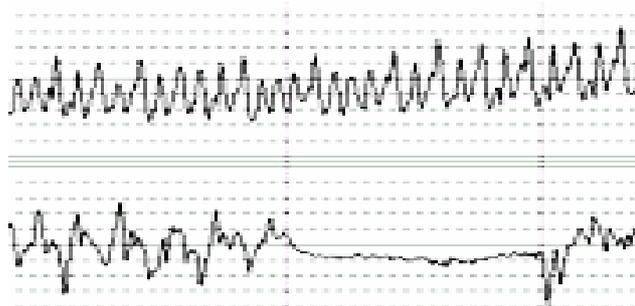


А

Рис. 7.

А - ЭЭГ крысы после 2-ой инъекции сакрицина в дозе 400 мг/кг: постепенное увеличение длительности и частоты интериктальных периодов.

В - ЭЭГ во время эпилептического статуса одной крысы (верхняя запись, кора) и ЭЭГ второй крысы после 1-ой инъекции сакрицина в дозе 400 мг/кг.



В

Сакрицин в дозе 400 мг/кг влияет на снижение амплитуды разрядов, инициированных ЭС, а в результате 3-х кратного введения в дозе 400 мг/кг с интервалом 40 минут полностью купирует развитие ЭС. Для того, чтобы показать, что амплитуда разрядов в ходе ЭС снижается не спонтанно, а в результате действия сакрицина, была проведена регистрация ЭЭГ у крыс контрольной группы (n=4). В течение 4 часов записи не наблюдалось снижение амплитуды и также не отмечалось длительное и частое замещение высокоамплитудной и высокочастотной ЭЭГ, характерной для ЭС, нормальной, низкоамплитудной.

На основании полученных данных можно утверждать, что эпилептический статус, индуцированный с помощью пилокарпина, затрагивает не только холинергическую, но и другие системы мозга, включая их в самоподдерживающийся ЭС.

4. Эффекты нейропептида тиролиберин на литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса.

В данной серии экспериментов были использованы взрослые крысы линии Вистар (n=30). Проводили 3 серии опытов. Тиролиберин (ТРГ) вводили дважды – за 15 мин до введения пилокарпина и одновременно с пилокарпином интраназально в концентрациях 10^{-3} М (n=10), 10^{-9} М (n=10), 10^{-12} М (n=5) в растворе стерильной дистиллированной воды. Отмечали время начала статуса. Спустя 2 часа судороги купировали введением паральдегида объемом 0,6 мл/кг. ТРГ во всех сериях экспериментов укорачивал латентный период развития ЭС (35,3 мин для крыс контрольной группы, 21 мин для 10^{-3} М; 15 мин - 10^{-9} М; 17 мин - 10^{-12} М (p<0.05, U-критерий Манна-Уитни).

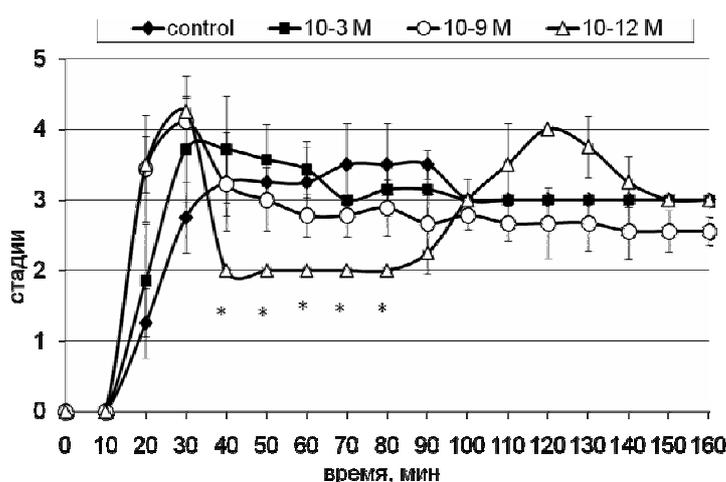


Рис.8 Динамика течения эпистатуса после двукратного интраназального введения крысам линии Вистар тиролиберина за 15 мин до введения пилокарпина и вместе с пилокарпином
* – p<0.05

Припадок под действием ТРГ начинается более резко и быстро (рис. 8). ТРГ в концентрации 10^{-3} М не снижает тяжесть судорог по сравнению с контролем. Например, длительность четвертых стадий после введения ТРГ была $3,6\pm 3,18$ мин, а у крыс контрольной группы - $2,3\pm 3,4$ мин, количество 4-х стадий увеличивается ($8,9\pm 2,2$ по сравнению с контролем $4,2\pm 2,9$, p<0.05), увеличивается кол-во 5-х стадий ($6,7\pm 2,3$ и $0,5\pm 0,6$ соответственно). ТРГ в концентрации 10^{-9} М не увеличивает суммарной длительности и количества приступов 4 и 5 стадий по сравнению с контролем. ТРГ в концентрации 10^{-12} М вызывает следующий эффект: через 40 мин после его аппликации развивается торможение, а еще через 40 мин статус возобновляется. По-видимому, развивающийся эпистатус оказался настолько тяжелым в отношении моторных и электрофизиологических проявлений судорог, что с помощью тиролиберина купировать его не удалось. Полученные данные указывают на то, что кратковременное торможение, вызываемое тиролиберинном, может помочь в лечении эпистатуса при сочетании с другими противосудорожными препаратами.

5. Эффекты продолжительного эпилептического статуса на митохондрии головного мозга крыс на литий-пилокарпиновой модели.

Изменение энергетических процессов в нейронах и их митохондриях является одной из причин инициации и самоподдержания эпилептического статуса [Gibbs et al., 2006]. Роль митохондрий в развитии нейродегенерации в результате эпилептического статуса, в настоящее время активно исследуется. Во время судорожных припадков стремительно

возрастает скорость окислительного метаболизма. Активация митохондриальных процессов имеет жизненно важное значение, так как внутриклеточных запасов и гликолитической продукции высокоэнергетичных фосфатов хватает только на 1-2 мин потребления [Siesjo et al., 1992]. В процессе эпилептического статуса также важное значение имеет активация дыхания митохондрий для поддержания энергетического баланса, однако это связано с выработкой большого количества свободных радикалов, к которым митохондрии мозга достаточно чувствительны. Таким образом, повреждаются другие важные для нервных клеток функции митохондрий, как, например, процесс активного накопления и связывания Ca^{2+} . Обладая способностью аккумулировать чрезвычайно высокие концентрации Ca^{2+} (до 30 мМ), митохондрии могут играть защитную или буферную роль при различных физиологических процессах, связанных с ростом внутриклеточного кальция. При определённых условиях повышение концентрации Ca^{2+} вызывает специфический процесс появления проницаемости внутренней мембраны митохондрий (mitochondrial permeability transition) в результате открытия особых белковых пор во внутренней мембране митохондрий, представляющих собой сложный многобелковый комплекс. Индукция открытия этих сложных образований приводит к запуску процесса гибели нейронов головного мозга в большинстве случаев.

Эпилептический статус был инициирован у белых беспородных самцов (n=16) стандартным способом. Статус длился 2 ч, после чего крысы декапитировали и выделяли митохондрии из головного мозга крыс. Определяли кальциевую ёмкость митохондрий путем дробного добавления к суспензии митохондрий аликвот кальция (6,25 мкМ в минимальном объёме) каждые две минуты в течении 20-30 мин. В результате у крыс с низкой тяжестью протекания эпилептического статуса (без 5 стадии и с малым количеством 4 стадий), никакой разницы с контролем не обнаружено. У крыс с тяжелым статусом обнаружена стимуляция процесса Ca^{2+} -зависимой деполяризации, а также снижена Ca^{2+} емкость митохондрий, что говорит об увеличении чувствительности митохондрий к индукторам запуска апоптоза, и это может объяснить повышенную гибель клеток во время судорог (рис 9).

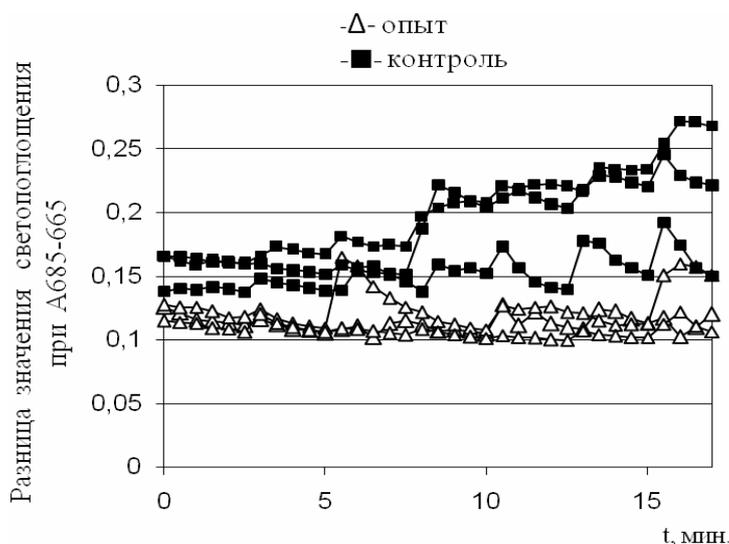


Рис. 9. Изменение кальциевой емкости митохондрий, выделенных из головного мозга крыс с большей тяжестью судорог.

Кроме того, Ca^{2+} -зависимая деполяризация может приводить к разобщению окислительного фосфорилирования, накоплению свободных радикалов [Schuchmann, 1999]. В присутствии АТФ и АДФ Ca^{2+} , поступая внутрь митохондрий, легко переходит в связанное с фосфатом соединение [Kristian, 2007], поэтому происходит активное накопление Ca^{2+} . Поскольку эпистатус сопряжен со значительными энергетическими затратами, количество АТФ и АДФ существенно уменьшается, соответственно снижается и Ca^{2+} емкость митохондрий.

Активность дыхания митохондрий регистрировали полярографически по поглощению кислорода суспензией митохондрий (0,1 мг белка в ячейке) с использованием оксиграфа. Известно, что митохондрии обеспечивают связь и координацию между функциональной необходимостью энергетических затрат клетки и возможностью их обеспечения, увеличением скорости окислительного фосфорилирования, показательным критерием которого является дыхательный контроль [Chance, Williams, 1956]. Поскольку при длительных судорогах энергетические затраты нервных клеток многократно возрастают, а с другой стороны имеют место гипоксические проявления и острая нехватка кислорода, можно было бы ожидать изменения в активности различных ферментативных систем митохондрий. Обзор литературных данных показал разнонаправленность влияния судорожных припадков на ферментативную активность митохондрий, выделенных из головного мозга после эпистатуса, в зависимости от модели (и соответственно, механизма инициации судорог) и тяжести судорог. Поэтому было решено исследовать активность дыхания митохондрий и на литий-пилокарпиновой модели.

В результате экспериментов на литий-пилокарпиновой модели получилось, что активность дыхания митохондрий мозга у контрольных крыс и крыс, перенесших 2-х часовой эпилептический статус, независимо от тяжести статуса, не изменяется ни в присутствии субстратов комплекса I, ни в присутствии субстратов комплекса II. Дыхательный контроль у контрольных и опытных крыс достоверно не различается.

Таким образом, можно предположить, что к необратимым последствиям нейродегенерации приводят только наиболее тяжелые продолжительные формы эпилептического статуса, инициированного литий-пилокарпином у крыс.

6. Исследование возможности позднего купирования судорог CO_2 на литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса.

В данной серии экспериментов исследовали влияние CO_2 с целью облегчения тяжести судорожного припадка, инициированного литий-пилокарпином. Были использованы взрослые беспородные крысы ($n=12$). Эпилептический статус провоцировался по обычной схеме. Спустя 2 ч после развития эпистатуса, крыс помещали в плотно закрытый эксикатор. Баллон с углекислым газом сообщался с эксикатором через иглу диаметром 3 мм. Газ подавался внутрь в течение 30 сек под постоянным давлением, тремя порциями. Скорость подачи газа была отрегулирована экспериментально и достигала значения 8 л/мин на максимуме. При этом концентрация газа в эксикаторе максимально была равна 60%. Через 30 сек после подачи газа, крысу извлекали из эксикатора и продолжали наблюдение в течение 2-х ч. В результате при такой постепенной подаче CO_2 у крыс не развивалось гипервозбуждения, напротив, они постепенно засыпали. Тяжесть судорог снижалась у 100% крыс, у 75% крыс статус купировался полностью, у 25% наблюдалось его подавление до 1-2 стадии. Выживаемость составила 100%. Однако не были проведены параллельные ЭЭГ-исследования, поэтому нельзя исключить наличие эпилептиформных

паттернов в отражении эпилептической активности на ЭЭГ. В течение последующих 2-х дней вели наблюдения за крысами. У 2-х крыс из 12-ти наблюдались периодические клонические спазмы мускулатуры конечностей, иногда развивающиеся до 3 стадии.

Противосудорожное действие гиперкапнии, по-видимому, состоит в усилении тонического влияния углекислоты на ретикулярные активирующие системы, которые, в свою очередь, подавляют активность синхронизирующих аппаратов подкорки. Углекислый газ легко проникает через гематоэнцефалический барьер [Gingrich, 2001], что оказывает немедленное действие при судорогах. Нередко при судорогах и после ЭС мозговое кровообращение нарушено, что оказывает неблагоприятное действие на нейроны головного мозга. CO_2 является мощным вазодилататором, увеличивая мозговой кровоток.

Выводы

1. На модели литий-пилокарпинового эпилептического статуса выявлены возрастные особенности в развитии судорожного припадка у крыс. По мере взросления, на 12, 25, 90 дни после рождения, достоверно увеличивается латентный период (более чем в два раза) наступления судорожного припадка. Тяжесть моторного припадка и характеристики судорожной активности в ЭЭГ в исследованные возрастные периоды не изменялись. Смертность от эписатуса была наименьшей (2%) у 12-ти дневных крысят.
2. Формирование эпилептического статуса у крысят в возрасте 12 и 25 дней всегда начинается в гиппокампе одного из полушарий мозга, только спустя 3-5 мин эпилептическая активность распространяется на неокортекс. У взрослых крыс развитие эпилептического статуса начинается генерализованно с непрерывных пик-волновых разрядов, регистрируемых одновременно в гиппокампе и коре.
3. Внутривентрикулярное введение препарата сакрицин (соль полициклической поликарбонной кислоты) оказывает противосудорожное действие на крыс в состоянии эписатуса. В ЭЭГ регистрируются короткие периоды интериктального торможения, при увеличении дозы сакрицина время интериктального торможения удлиняется, в результате чего достигается полное прекращение судорог.
4. Противосудорожный эффект сакрицина сопровождается ярко выраженным миорелаксантным действием, что снимает тяжесть моторного судорожного припадка вплоть до глубокой мышечной атонии. Тормозное действие малых доз сакрицина на эпилептический статус особенно четко проявляется в предотвращении летального исхода.
5. Интраназальное введение тиролиберина в концентрации 10^{-3} М оказывает провоцирующее действие на развитие эписатуса, но применение тиролиберина в ультрамалой концентрации 10^{-12} М вызывает значительное (с 5-ой до 2-ой стадии) снижение тяжести моторного судорожного припадка эписатуса.
6. Внутривентрикулярное введение паральдегида в дозах 0,3 мл/кг и 0,6 мл/кг купирует эпилептический статус у 12-тидневных и 25-дневных крысят соответственно, а также оказывает модулирующее воздействие на развивающийся мозг.
7. С помощью 30-секундной гиперкапнии, достигаемой помещением крысы в атмосферу со сверхвысоким содержанием CO_2 , эпилептический статус купировался у 75% крыс, у 25% наблюдалось его подавление до 1-2 стадии.
8. На литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса прежде всего может происходить активация Ca^{2+} -зависимой деполяризации, увеличение митохондриальной проницаемости мембран, и не наблюдается изменения в интенсивности дыхания митохондрий, выделенных из головного мозга крыс.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гончаров О. Б., Мелехов М.Г., Артюхова М.В., **Ретинская (Редкозубова) О.М.** Противосудорожная защитная система мозга и ее модификация нейропептидами и карбоновыми кислотами. // Тезисы Международной Студенческой Конференции по фундаментальным наукам «Ломоносов-2000», с. 405, 2000.
2. Чепурнова Н.Е., Ключева Ю.А., ван Луителаар Ж., Коэнен А, Пономаренко А.А., Артюхова М.В., **Ретинская (Редкозубова) О.М.**, Чепурнов С.А. Судорожная готовность мозга крыс линии WAG/Rij в раннем онтогенезе. // XVIII Съезд физиологического Общества им. И.П.Павлова. Тез докл. Казань 25-28 сентября 2001. С. 263.
3. Chepurnova N.E., Ponomarenko A.A., **Retinskaya (Redkozubova) O.M.**, Chepurnov S.A. Arginine vasopressin in cascade mechanisms of febrile convulsions modulation by PACAPb // World Congress on Neurohypophysial hormones Bordeaux 8-12 September 2001. P1-10.
4. Kubova H, **Retinskaya (Redkozubova) O**, Druga R, Mares P: Effects of lamotrigine on status epilepticus in immature rats. // Epilepsia 44: Suppl.9:220, 2003.
5. Чепурнов С.А., Чепурнова Н.Е., **Редкозубова О.М.**, Тарасова Н.В., Саакян С.А., Серков К.А., Аристов А.В., Гиневский Д.А. Экспериментальный эпилептический статус у крыс - блокада моторной и судорожной активности сакрицином // XI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Москва. 19-23 апреля 2004.
6. **O.M.Redkozubova**, A.A.Ponomarenko, S.A.Chepurnov, N.E.Chepurnova, S.A.Saakyan, E.L.J.M. van Luijtelaa. Pyrogenal and hyperthermia induced neonatal febrile convulsions of WAG/Rij rats pups. // VI European Congress on Epileptology/ Vienna, May 30- June 3, 2004.
7. **Redkozubova O.M.**, Goncharov O.B., Abbasova K.R., Chepurnova N.E., Chepurnov S.A. Thyroliberin intranasal application in rats with lithium-pilocarpine epileptical status. // European Neuropeptide Club 15th Annual Meeting, May 19-21,2005, Riga, Latvia.
8. S.A. Chepurnov, N.E. Chepurnova, **O.M. Redkozubova**, S.A. Saakyan. Neuropeptides in experimental status epilepticus – the thyroliberin efficacy. // XVIII th Conference on Epilepsy of the Polish Society of Epileptology Warsaw, May 20-22, 2004.
9. A.A.Ponomarenko, **O.M. Redkozubova**, N.E.Chepurnova, S.A.Chepurnov, E.L.J.M. van Luijtelaa. Neonatal febrile convulsions of WAG/Rij rats pups – the models of pyrogen and hyperthermia induced seizures. // XVIII th Conference on Epilepsy of the Polish Society of Epileptology Warsaw, May 20-22, 2004.
10. S.A. Chepurnov, N.E. Chepurnova, **O.M. Redkozubova**, Marco de Curtis, Laura Uva. Status epilepticus – the role of cholinergic mechanisms. // Психофармакология и биологическая наркология, т.5, №2, с 897-898, 2005.
11. Чепурнов С.А., Чепурнова Н.Е., **Редкозубова О.М.**, Саакян С.А. Status epilepticus – новые механизмы и пути торможения (литий-пилокарпиновая модель). // Успехи физиологических наук, 2005, том 36, №1, с.68-84.
12. С.А.Чепурнов, Н.Е.Чепурнова, **О.М.Редкозубова**, С.А.Саакян. Status epilepticus – новые механизмы и пути торможения (литий-пилокарпиновая модель). // 9 Междисциплинарная Конференция «Стресс и поведение», 2005.
13. N.E.Chepurnova, **O.M.Redkozubova**, N.V.Tarasova, K.R.Abbasova, S.A.Chepurnov. Neuropeptide in experimental status epilepticus: thyroliberin efficacy.// VI European Congress on Epileptology/ Vienna, May 30-June 3, 2004.
14. Chepurnova N.E., De Curtis M., Uva L., Chepurnov S.A., **Redkozubova O.M.**, Goncharov O.B. Status epilepticus in rat and Guinea pig (lithium-pilocarpine and PTZ models // 26th Intern. Epilepsy Congress. Paris. 28 August-1 September 2005. (abs. P1186)// Epilepsia. Vol. 46. Suppl. 6. P.364.
15. Kubova H, Rejchrtova J, **Redkozubova O**, Mares P. Outcome of status epilepticus in immature rats varies according to the paraldehyde treatment.// Epilepsia. 2005;46 Suppl 5:38-42.
16. **О.М. Редкозубова**, А.А. Мирина, Д.А. Чепурнова, А.А. Правдухина, А.А. Дубина. Структурные изменения мозга крысы, выявляемые с помощью магнитно-резонансной томографии, при пилокарпиновом эпилептическом статусе.// Москва, X Научная Конференция молодых ученых 11-12 октября 2006, с 43.
17. Chepurnov S.A., Chepurnova N.E., Jin-Kyn Park, **Redkozubova O.M.**, Pravdukhina A.A., Abbasova K.R., Buzinova E.V., Mirina A.A., Chepurnova D.A., Dubina A.A., Pirogov U.A., de Curtis M., and

Uva L. The inhibition of epileptogenesis during status epilepticus by ginsenosides of korean red ginseng and ginseng cell culture (dan 25). // Advances in ginseng research 2006 – proceedings of the 9th International Symposium on ginseng – the Korean Society of ginseng, September 25-28, 2006, geumsan, Korea.

18. **Редкозубова О.М.**, Мирина А.А., Чепурнова Д.А., Сулейманова Е.М., Дубина А.А. Магнитно-резонансная томография мозга молодых и старых крыс: последствия литий-пилокарпинового статуса. // XX Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, Москва, 7 июня 2007.
19. Cherpurnov S.A., Cherpurnova N.E., Jin-Kyn Park, **Redkozubova O.M.**, Pravdukhina A.A., Abbasova K.R., Buzinova E.V., Mirina A.A., Cherpurnova D.A., Dubina A.A., Pirogov U.A., de Curtis M., and Uva L. The inhibition of epileptogenesis during status epilepticus by ginsenosides of korean red ginseng and ginseng cell culture (dan 25). // J. Ginseng Res., vol. 31, №3, 159-174 (2007).