

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
(повне найменування вищого навчального закладу)

Біологічний факультет
(повне найменування інституту/факультету)

Кафедра фізіології людини та тварин
(повна назва кафедри)

Дипломна робота

бакалавра
(ступень вищої освіти)

на тему: «Особливості розвитку пентилентетразолового кіндлінгу у щурів різного віку»

«Features of pentylenetetrazol kindling development in rats of different ages»

Виконала: студентка заочної форми навчання
напряму підготовки 6.040102 Біологія

Котелевська Наталя Михайлівна

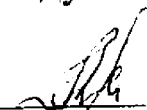
Керівник: ст. викладач Денисенко О. В. 

Рецензент: ст. викладач каф. Мікробіології, вірусології
та біотехнології Лісютін Геннадій Вікторович

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ 9 від 24.03 2016 р.

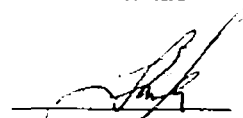
Захищено на засіданні ЕК №
протокол №9 від 24.04 2016 р.
Оцінка Відмінно 100/100
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри


(підпис)

проф. Карпов Л. М.

Голова ЕК


(підпис)


(прізвище та ініціали)

Одеса – 2016

779538

Анотація

Досліджено особливості генералізації епілептиформної активності під час формування класичного пентилентетразолового кіндлінгу у щурів віком п'ять та вісім тижнів, три та шість місяців за умов різних інтервалів введення конвульсанту. При розрахунку кіндлінгових доз зареєстрували їх зменшення із віком від 42 мг/кг до 22 мг/кг. Виявили, що зменшення інтервалу введення пентилентетразолу до 24 годин приводило до збільшення часу формування кіндлінгу. Найбільший час генералізації судомної активності зареєстрували у шестимісячних щурів, найменший – у тварин віком 5 тижнів.

Серед трьохмісячних щурів зареєстрували три варіанти генералізації судом: у 40 % тварин більш ранній, ніж у решти термін розвитку генералізованих клоніко-тонічних судом, у 40 % - повна генералізація після останньої ін'єкції конвульсанту та відсутність розвитку важких судом у 20 %. В групі шестимісячних тварин розвиток важких судом зареєстрували у 60 % щурів після останніх ін'єкцій конвульсанту, у треті – такі судоми не генерувалися.

Роботу викладено на 36 сторінках, вона містить 3 таблиці. Наведено посилання на 46 джерел літератури (8 кирилицею та 38 латиницею).

Ключові слова: *кіндлінг, пентилентетразол, генералізація, судоми, вік-залежність, щури.*

The dependence of age and conditions of pentylenetetrazol injections in the induction of generalization during classic pharmacological kindling in rats were investigated. The kindling protocol in 5- and 8-week-, 3- and 6-month-old rats was provided. The ED₁₆ for induction of clonic convulsions was used as the kindling doze. The pentylenetetrazol-kindling showed an age-dependent decrease in kindling doze from 42 mg/kg to 22 mg/kg.

Among the 3- month-old rats the variants of seizure generalization were recorded: in 40 % of animals earlier than at in other term of the occurrence of clonic-tonic seizures, 40 % - complete generalization of seizures after the last injection and the absence of severe seizures in 20 %. In the group of 6-month-old animals development of severe seizures were recorded in 60 % of rats after the last convulsant's injection, in others - such seizures were not generated.

Diploma thesis is presented on 36 pages, it contains 3 tables. It provides links to 46 references (8 cyrillic and 38 latinic).

Key words: *kindling, pentylenetetrazol, generalization, seizures, age-dependence, rats.*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Епілепсія та її патофізіологічні механізми розвитку.....	7
1.1.1. Механізми фокальної епілептиформної активності.....	7
1.1.2. Механізми генералізованої епілептиформної активності.....	11
1.2. Кіндлінг – модель хронічної епілептиформної активності.....	14
1.3. Особливості епілептиформної активності у молодих тварин.....	16
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	20
2.1. Методика розрахунку ефективних доз пентилентетразолу для формування кіндлінгу.....	20
2.2. Моделювання класичного пентилентетразолового кіндлінгу у щурів.....	20
2.3. Методика оцінки поведінкових змін в ході формування кіндлінгу у щурів.....	21
2.4. Статистична обробка результатів досліджень.....	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	23
ВИСНОВКИ.....	31
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	32

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГАМК – гамма-аміномасляна кислота;

ГПСП – гальмуючий постсинаптичний потенціал;

ЕпА – епілептиформна активність;

ЗПСП – збуджуючий постсинаптичний потенціал;

ЦНС - центральна нервова система;

NMDA – N-метил-D-аспартат.

ВСТУП

Традиційно дослідниками приділялось та приділяється багато уваги питанням виникнення й розповсюдження надмірного збудження в нейрональних системах мозку, а також пошуку і з'ясовуванню ролі компенсаторних механізмів, які активуються під час його епілептизації [1-3, 8, 14, 24, 25, 28, 30, 35]. Проблема виникнення і розвитку епілептичної активності (ЕпА) є сьогодні однією з таких, в рішенні якої збігаються інтереси фахівців різних галузей нейробиології та теоретичної медицини. Останніми роками значно розширилися уявлення про роль, яку відіграє ендогенна гальмівна система, а також система збуджуючих амінокислот в механізмах розвитку, розповсюдження і пригнічення ЕпА [18, 19]. Слід зазначити, що важливим, в базисних дослідженнях з вивчення патогенетичних механізмів хронічної ЕпА, в цілому, є застосування моделі кіндлінгу, яка є найадекватнішою до характерних проявів епілептогенезу, тривалий характер яких є наростанням епілептиформної активності, вираженням порушення активності рухових систем організму, збереженням високого ступеня збудливості утворень мозку в умовах відсутності епілептогенних дій [8, 32].

На сьогоднішній день залишаються не з'ясованими механізми запобігання розповсюдження надмірного збудження та активного пригнічення патологічної активності у структурах мозку. Аналіз експериментальних даних показав, що розвиток важких генералізованих судом у певної частини тварин при формуванні класичного кіндлінгу не відбувається [8]. Чимало дослідників вказують на те, що поведінкові маніфестації кіндлінгових електростимуляційно-індукованих судом залежать не тільки від сили судомного впливу, але й від умов його приложення та від віку тварин [32, 33, 44]. Але, що стосується класичного фармакологічного кіндлінгу, коли епілептиформні впливи отримують одразу усі структури центральної нервової системи, то дослідження параметрів його розвитку у тварин різного віку проводилися не в до-

статньому обсягу для розуміння механізмів генералізації ЕпА на різних етапах онтогенезу.

Метою наших досліджень було з'ясування особливостей розвитку судомної активності у щурів різного віку за умов різних інтервалів введення конвульсанту під час формування класичного пентилентетразолового кіндлінгу.

У зв'язку з чим, були поставлені наступні завдання:

1) дослідити та розрахувати ефективні дози пентилентетразолу, які б викликали розвиток клонічних судом у 16 % щурів віком п'ять та вісім тижнів, три та шість місяців;

2) дослідити та порівняти час формування пентилентетразоліндукованого кіндлінга у щурів віком п'ять та вісім тижнів, три та шість місяців із 24-годинним та 48-годинним інтервалом введення конвульсанту;

3) дослідити та порівняти особливості генералізації судомної активності при формуванні пентилентетразолового кіндлінгу у щурів віком п'ять та вісім тижнів, три та шість місяців із 24-годинним та 48-годинним інтервалом введення конвульсанту;

4) дослідити та порівняти особливості генералізації судом після останніх щоденних ін'єкцій пентилентетразолу у трьох- та шестимісячних щурів;

Об'єкт дослідження: особливості генералізації епілептиформної активності під час формування фармакологічного кіндлінгу.

Предмет досліджень: особливості генералізації епілептиформної активності під час формування класичного пентилентетразолового кіндлінгу у щурів різного віку за умов різних інтервалів введення конвульсанту.

ВИСНОВКИ

1. При дослідженні ефективних доз пентилентетразолу, які викликали розвиток клонічних судом у 16 % щурів, виявили зменшення цих доз із віком від 42 мг/кг у п'ятитижневих тварин до 22 мг/кг у шестимісячних.

2. При аналізі періоду розвитку пентилентетразолового кіндлінгу у тварин різного віку виявили, що зменшення інтервалу введення епілептогену до 24 годин приводило до збільшення часу формування кіндлінгу: у щурів віком 5 тижнів – з 12 до 14 кіндлінгових ін'єкцій для повного розгойдування судомної активності; у щурів віком 8 тижнів - з 12 до 15 ін'єкцій; у щурів віком 3 місяця - з 15 до 21 ін'єкції; у щурів віком 6 місяців – від 17 до 21 ін'єкції.

3. При аналізі особливостей генералізації судомної активності при формуванні пентилентетразолового кіндлінгу у тварин різного віку виявили, що зменшення інтервалу введення епілептогену до 24 годин приводило до зменшення кількості щурів з генералізованими клоніко-тонічними судомами від 100 % до 70 %. У групах молодих тварин кількість щурів з такими важкими судомами було більшим та досягало 100 %.

4. При формуванні пентилентетразолового кіндлінгу серед трьохмісячних щурів зареєстрували три варіанти генералізації судом: більш ранній - після 15 - 17 кіндлінгової ін'єкції - розвиток генералізованих клоніко-тонічних судом у 40 % випадків, повна генералізація після останньої ін'єкції конвульсанту у 40 % та відсутність розвитку важких судом у 20 %.

5. При формуванні пентилентетразолового кіндлінгу в групі шестимісячних тварин розвиток генералізованих клоніко-тонічних судом відбувався у 60 % щурів після останніх ін'єкцій конвульсанту, у 30 % - розвиток важких судоми не зареєстрували зовсім.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Биниашвили Р. Г., Вейн А. М., Гафуров Б. Г., Рахимджанов А. Р.* Эпилепсия и функциональные состояния мозга. – Ташкент: Медицина, 1985. – 292 с.
2. *Годухин О. В.* Клеточно-молекулярные механизмы киндлинга // Успехи физиол. наук. – 2005. – Т. 36, № 2. – С. 41 - 54.
3. *Карлов В. А.* Эпилепсия. – М.: Медицина, 1990. – 336 с.
4. *Крыжановский Г. Н., Шандра А. А.* Влияние электрической стимуляции верхних бугорков четверохолмия на очаговую эпилептическую активность в коре головного мозга // Бюллетень эксперим. биологии и мед. – 1993. – Т. 116, № 8. – С. 119 – 122.
5. *Медицинская статистика понятным языком: вводный курс: пер. с англ. / Банержи А.* – Под ред. В. П. Леонова. – М.: Практическая медицина, 2007. – 287 с.
6. *Семьянов А. В., Годухин О. В.* Клеточно–молекулярные механизмы фокального эпилептогенеза // Успехи физиологических наук. – 2001. – Т. 32, № 1. – С. 60 – 78.
7. *Шандра А. А.* Принципы и методы патогенетической терапии эпилепсии: Автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.16 - Москва, 1985. - 45 с.
8. *Шандра А. А., Годлевский Л. С., Брусенцов А. И.* Киндлинг и эпилептическая активность. – Одесса: АстроПринт, 1999. – 275 с.
9. *Barborosie M., Avoli M.* CA3-Driver hippocampale-entorinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures // J. Neurosci. - 1997. – № 17. – С. 9308 – 9314.
10. *Bickson M., Lian J., Hahn P.* Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices // J. Physiol. – 2001. – № 531. – P. 181 – 191.

11. *Bliss T. V. P., Lynch M. A.* Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus: properties and mechanisms // *Neurology and Neurobiol.* – 1988. – V. 35, № 4. – P. 3 – 72.
12. *Buzsaki G.* The thalamic clock: emergent network properties // *Neurosci.* – 1991. – V. 41, № 2/3. – P. 351 – 364.
13. *Charpier S., Leresche N., Deniau J.-M.* On the putative contribution of GABA_B receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges // *Neuropharmacol.* – 1999. – V. 38, № 2. – P. 1699 – 1706.
14. *de Curtis M., Avanzini G.* Interictal spikes in focal epileptogenesis // *Prog. Neurobiol.* – 2001. - № 63. – P. 541 – 567.
15. *David M. S., Edward H. B.* Changes in midline thalamic recruiting responses in the prefrontal cortex of the rat during the development of chronic limbic seizures // *Epilepsia.* – 2009. – Vol. 50, № 6 - P. 556 – 565.
16. *Eghbali M., Gage P. W., Birnir B.* Pentobarbital modulates gamma-aminobutyric acid-activated single-channel conductance in rat cultured hippocampal neurons // *Mol. Pharmacol.* – 2000. – V. 58, № 3. – P. 463 – 469.
17. *Fanelli R., McNamarar J. O.* Effects of age on kindling and kindled seizure-induced increase of benzodiazepine receptor binding // *Brain Res.* – 1986. - Vol. 362. – P. 17 – 22.
18. *Frances E. J.* Epilepsy as a spectrum disorder: Implications from novel clinical and basic neuroscience // *Epilepsia.* – 2011. - Vol. 52, Suppl. 1. - P. 1 – 6.
19. *Galanopoulou A. S., Moshé S. L.* The epileptic hypothesis: developmentally related arguments based on animal models // *Epilepsia.* – 2009. - Vol. 50, Suppl. 7. - P. 37 - 42.
20. *Gloor P.* Generalized cortico-reticular epilepsies. Some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge // *Epilepsia.* – 1968. – №. 9 – P. 249 – 263.

21. *Goddard G. V., McInture D. C., Leech C. K.* A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation // *Exp. Neurol.* – 1969. – Vol. 25, № 2. – P. 305 – 330.
22. *Grecksch G., Becker A., Rauca C.* Effect of age pentylenetetrazol- kindling and kindling-induced impairments of learning performance // *Pharm. Biochem. and Behav.* – 1997. - Vol. 56, № 4. – P. 595 - 601.
23. *Holmes G. L., Sarkisian M., Ben-Ari Y., Chevassus-Au-Louis N.* Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats // *J. Comp. Neurol.* – 1999. – Vol. 404, № 4. – P. 537 - 553.
24. *Holmes M. D., Brown M., Tucker D. M.* Are "generalized" seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence // *Epilepsia.* – 2004. - Vol. 45, № 6. - P. 1568 – 1579.
25. *Kelly L., McIntyre D.* Hippocampal kindling protects several structures from the neuronal damage resulting from kainic acid-induced status epilepticus // *Brain Res.* – 1994. - Vol. 634. – P. 245 - 256.
26. *Kulik A., Vida I., Lujan R., Haas C., Lopez-Benidito G., Shigemoto R., Frotcher M.* Subcellular localization of metabotropic GABA_B receptor subunits GABA_{B1a/b} and GABA_{B2} in the rat hippocampus // *J. Neurosci.* – 2003. - V. 35, № 23. - P. 11026 - 11035.
27. *Liiders H., Lesser R. P., Dinner D. S., Morris H. H.* Generalized epilepsies: a review // *Cleveland Clinic Quarterly.* – 1984. – V. 51. – P. 205 – 226.
28. *Lopes da Silva F. H., Kamphuis W., Titulaer M.* An experimental model of progressive epilepsy: the development of kindling of the hippocampus of the rat // *Ital. J. Neurol. Sci.* – 1995. – Vol. 16. – № 1-2. – P. 45 - 57.
29. *Lopez-Benidito G., Shigemoto R., Kulik A., Paulsen O., Fairen A., Lujan R.* Expression and distribution of metabotropic GABA subunits GABA_BR1 and GABA_BR2 during rat neocortical development // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. - № 15. - P. 1766 - 1778.

30. *McNamara J. O.* Cellular and molecular basis of epilepsy // *J. Neurosci.* – 1994. - Vol. 14, №. 6. - P. 3413 – 3425.
31. *Meeren H. K. M., Pijn J. P. M., Van Luijtelaar E. J. M., Coenen A. M. L., Lopes da Silva F. H.* Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats // *J. Neurosci.* – 2002. – №4. – P. 1480 – 1495.
32. *Morimoto K., Fahnestock M., Racine R.* Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain // *Prog. Neurobiol.* – 2004. - № 73. – P. 1 – 60.
33. *Moshe S. L., Albala B. J.* Maturation changes in postictal refractoriness and seizure susceptibility in developing rats // *Ann. Neurol.* – 1983. – Vol. 13, № 5. – P. 552 - 557.
34. *Moshe S. L., Albala B. J., Ackermann R. F., Engel J. Jr.* Increased seizure susceptibility of the immature brain // *Dev. Brain Res.* – 1983. – Vol. 7, № 1. – P. 81 - 85
35. *Penfield W. G., Jasper H. H.* Epilepsy and the functional anatomy of the human brain. - Boston: Little, Brown and Co, 1954. – 896 p.
36. *Pinault D., Leresche N., Charpier S., Deniau J. M.* Intracellular recordings in thalamic neurons during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy // *J. Physiol.* – 1998. – V. 509. – P. 449 – 456.
37. *Pugliese A. M., Ballerini L., Passani M. B., Corradetti R.* EPSP-spike potentiation during primed burst-induced long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices // *Neurosci.* – 1994. – Vol. 62, № 4. – P. 58 – 62.
38. *Rivera C., Voipio J., Payne J. A.* The K7CF co-transporter — KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation // *Nature.* – 1999. – V. 397, № 6716. – P. 251 – 255.
39. *Schroeder H., Becker A., Loessner B.* Glutamate binding to brain membranes is increased in pentylenetetrazol kindled rats // *J. Neurochem.* – 1993. - Vol. 60. – P. 1007 – 1011.

40. *Scott R. C., Neville B. G.* Pharmacological management of convulsive status epilepticus in children // *Dev. Med. Child Neurol.* – 1999. – Vol. 41, № 3. – P. 207 - 210.
41. *Semyanov A., Godukhin O.* Kindling-like state in rat hippocampal CA1 slices induced by the repeated short-term extracellular K^+ increases: the role of L-type Ca^{2+} -channels // *Neurosci. Lett.* – 1997. – V. 223, № 6. – P. 177 – 180.
42. *Snead O. C.* Evidence for $GABA_B$ -mediated mechanisms in experimental generalized absence seizures // *Europ. J. Pharmacology.* – 1991. - № 213. - P. 343 - 349.
43. *Sohal V. S., Huntsman M. M., Huguenard J. R.* Reciprocal inhibitory connections regulate the spatiotemporal properties of intrathalamic oscillations // *J. Neurosci.* – 2000. – V. 20. – P. 1735 – 1745.
44. *Welsh K. A., Gold P. E.* Age-related changes in kindling seizure development // *Soc. Neurosci. Abstract.* – 1983. - Vol. 9. – P. 764.
45. *Wenk G. L., Walker L. C., Price D. L., Corc L. C.* Loss of NMDA but not GABA-A2 binding in the brains of aged rats and monkeys // *Neurobiol. Aging.* – 1991. - № 12. – P. 93 – 98.
46. *Wong M., Wozniak D. F., Yamada K. A.* An animal model of generalized non-convulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects // *Experimental Neurology.* – 2003. – Vol. 183. – P. 87 – 99.

Figure