

Д/р
12242

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

Факультет біологічний

Кафедра фізіології людини і тварин

Д и п л о м н а р о б о т а

спеціаліста

на тему: «**Особливості прискореного формування фармакологічного кіндлінгу у мишей**»

«Features of rapid pharmacological kindling development in the mice»

Виконав: студент денної форми навчання
напряму підготовки 7.04010201 Біологія

Оленко Павло Юрійович

Керівник: д.б.н., проф. Карпов Л. М. _____

Рецензент: ст. викл. Лісютін Г. В.

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ 12 від «12» 05.2016р.

Захищено на засіданні ЕК № 1
Протокол № 73 від «23» 06.16р.
Оцінка Вісн. 1 A 1 90
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Завідувач кафедри

[підпис]
(підпис) Карпов Л. М.
(прізвище та ініціали)

Голова ЕК

[підпис]
(підпис) Лісютін Г. В.
(прізвище та ініціали)

Одеса – 2016

779419

АНОТАЦІЯ

При прискореному моделюванні гострого періоду як пікротоксин-, так і коразол-індукованого кіндлінгу у мишей зареєстрували поетапний розвиток клонічних судом. У коразоловій моделі клонічні судоми були більш вираженими та тривалими, у 15,4 % тварин після останньої ін'єкції коразолу спостерігали розвиток генералізованих клоніко-тонічних судом. Протягом хронічного періоду у 50 - 60 % мишей зареєстрували розвиток клонічних судом. Моделювання посткіндлінгу показало збільшення судомної готовності. У хронічний та у посткіндлінговий періоди спостерігали зниження параметрів нековульсивної поведінки тварин.

Роботу викладено на 49 сторінках, вона містить 4 таблиці та 6 рисунків. Наведено посилання на 46 джерел літератури (8 кирилицею та 38 латиницею).

Ключові слова: швидкий кіндлінг, судоми, пікротоксин, коразол, поведінкова активність.

The formation of rapid picrotoxin and pentylenetetrazol kindling were investigated. The development of different types of clonic seizures during the kindling procedure were observed. Seizures in pentylenetetrazol kindling model were more severe and prolonged. The development of generalized clonic tonic seizures in 15,4 % mice during the pentylenetetrazol kindling were observed. Formation of clonic seizures in 50 - 60 % animals during the chronic period at both models were recorded. Formation of postkindling activity was connected with increasing of seizer's threshold. The decreases of nonconvulsive behavioral activity indexes during the chronic and postkindling periods were observed.

Diploma thesis is expounded on 49 pages, it contains 4 tables and 6 figures. It provides links to 46 references (8 cyrillic and 38 latinic).

Key words: rapid kindling, seizures, picrotoxin, pentylenetetrazol, behavioral activity.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Основні підходи до формування епілептиформної активності в експерименті	7
1.2. Кіндлінг – модель хронічної епілептиформної активності.....	10
1.2.1. Особливості розвитку епілептиформної активності під час звичайного кіндлінгу	11
1.2.2. Патофізіологічні механізми прискореного формування кіндлінгу.....	14
1.3. Механізми генералізації епілептиформної активності.....	16
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	21
2.1. Схема експерименту.....	21
2.2. Моделювання швидкого фармакологічного кіндлінгу.....	22
2.3. Методика оцінювання інтенсивності судомних проявів поведінки	23
2.4. Особливості формування хронічного періоду швидкого кіндлінгу..	23
2.5. Моделювання посткіндлінгу	24
2.6. Методика оцінювання несудомної поведінки мишей у тесті «Відкрите поле».....	24
2.7. Статистична обробка результатів досліджу.....	26
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	27
3.1. Особливості формування гострого періоду швидкого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу	27
3.2. Особливості формування хронічного періоду швидкого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу.....	31
3.3. Особливості формування посткіндлінгу у тварин із швидким пікротоксиновим та коразоловим кіндлінгом.....	37
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	42
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	45

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВП – відкрите поле

ВРА – вертикальна рухова активність

ГАМК – гамма-аміномасляна кислота

ГЕБ - гемато-енцефалічний бар'єр

ГРА – горизонтальна рухова активність

ГМ – головний мозок.

Гп – гіпокамп

ГПСП – гальмуючий постсинаптичний потенціал

ЕЕГ – електроенцефалограма

ЕпА – епілептиформна активність

ЕС - електростимули

ЗПСП – збуджуючий постсинаптичний потенціал

NMDA – N-метил D-аспаратат

ВСТУП

Традиційно дослідниками приділялось та приділяється багато уваги питанням виникнення й розповсюдження надмірного збудження в нейрональних системах мозку, а також пошуку і з'ясуванню ролі компенсаторних механізмів, які активуються під час його епілептизації [1-3]. На сьогоднішній день одним із актуальних питань експериментальної епілептології є створення нових моделей, які дозволяють відслідковувати зміни під час швидко наростаючої синхронізації та генералізації епілептиформної активності (ЕпА). Першими, хто показали можливість формування швидкого чи прискореного кіндлінгу, були дослідники, які вивчали залежність формування електростимуляційного кіндлінгу від режиму та параметрів електростимуляції гіпокампу [4]. Відомо, що класичний кіндлінг можливо сформувати не тільки шляхом електростимуляції лімбічних та неокортикальних ділянок мозку, але і за допомогою різних фармакологічних впливів. На підставі явища перехресної чутливості та синергізму в дії кіндлінгових стимулів різної природи частина дослідників вважають, що патогенетичні механізми ЕпА в умовах різних моделей кіндлінгу мають багато спільних рис [5]. Нещодавно була запропонована модель гострих судом шляхом повторного введення субконвульсивних доз коразолу протягом усього 70 хвилин [6]. Під час цих експериментів відбувалося формування особливого типу активності, який дослідники назвали «генералізований безсудомний епілептичний статус». Відтворення в експерименті такого типу нейрональної гіперактивності дає можливість дослідити закономірності виникнення, розвитку, реорганізації епілептогенних та антиепілептогенних систем протягом короткого періоду часу.

Метою наших досліджень було з'ясування особливостей прискореного формування гострого та хронічного періодів пікротоксинового та коразолового кіндлінгу у мишей.

У зв'язку з чим були поставлені наступні задачі:

1) дослідити та порівняти зміни інтенсивності судом під час формування гострого періоду швидкого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу;

2) дослідити та порівняти зміни латентного періоду перших судомних проявів під час формування гострого періоду швидкого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу;

3) дослідити та порівняти особливості поведінки мишей протягом хронічних періодів формування швидкого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу;

4) дослідити та порівняти особливості судомних реакцій мишей при формуванні посткіндлінгу через 15 діб після розвитку гострого періоду швидкого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу;

5) дослідити та порівняти особливості несудомної активності мишей до формування пікротоксинового та коразолового кіндлінгу, через два тижня після формування та через добу після моделювання посткіндлінгової активності.

Об'єкт дослідження: особливості поведінкової активності під час прискореного формування епілептичної системи.

Предмет дослідження: особливості поведінки мишей при формуванні різних видів швидкого фармакологічного кіндлінгу.

ВИСНОВКИ

1. При прискореному моделюванні гострого періоду як пікротоксин-, так і коразол-індукованого кіндлінгу у мишей зареєстрували поетапний розвиток клонічних судом. Коразол-викликані клонічні судоми були більш вираженими та тривалими, у 15,4 % тварин після останньої ін'єкції коразолу спостерігали розвиток генералізованих клоніко-тонічних судом.
2. При прискореному моделюванні гострого періоду пікротоксинового та коразолового кіндлінгу у мишей не зареєстрували значних змін латентного періоду перших судомних проявів.
3. Протягом хронічного періоду швидко сформованого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу у 46,2 % та 53,8 % мишей, відповідно, зареєстрували розвиток клонічних судом голови та тулуба.
4. При моделюванні посткіндлінгу як у мишей з швидким пікротоксиновим кіндлінгом, так і у мишей з швидким коразоловим кіндлінгом виявили зростання рівня судомної готовності із генерацією тяжких генералізованих клоніко-тонічних судом у 7,7 % та 38,5 % тварин, відповідно.
5. У хронічний період швидко сформованого пікротоксинового та коразолового кіндлінгу, після формування посткіндлінгу на фоні розвитку судомних проявів спостерігали виражене зниження показників орієнтаційно-дослідної та емоційної поведінкової активності у мишей.
6. Розвиток судом під час прискореного формування пікротоксинового та коразолового кіндлінгу у мишей дозволяє охарактеризувати запропоновані моделі, як моделі поетапного розгойдування епілептиформної активності.

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. *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.
15. *de Curtis M., Avanzini G.* Interictal spikes in focal epileptogenesis // *Prog. Neurobiol.* – 2001. - № 63. – P. 541 – 567.
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., Fahnstock 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 $GABA-A_2$ 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 nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects // *Experimental Neurology.* – 2003. – Vol. 183. – P. 87 – 99.