

На правах рукописи



Халилов Илгам Адегамович

**ВТОРИЧНЫЙ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗ В ГИППОКАМПЕ
НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС**

Специальность 03.03.01 – «Физиология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань 2019

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань, Россия) и в лаборатории ранней активности развивающегося мозга Средиземноморского института нейробиологии (Institut de Neurobiologie de la Mediterranée (Inmed) Inserm/AMU UMR1249 (г. Марсель, Франция).

Научный консультант:

Хазипов Рустем Нариманович, доктор медицинских наук, профессор Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Официальные оппоненты:

Мухина Ирина Васильевна, доктор биологических наук, профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биотехнологий ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Семьянов Алексей Васильевич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом молекулярной нейробиологии и лаборатории внесинаптической передачи Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Зайцев Алексей Васильевич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

Защита состоится 11 марта 2020 года в _____ на заседании диссертационного совета **КФУ.03.06** при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, зал заседания ученого совета (аудитория № 208).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Т.А. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Эпилепсия – одно из наиболее распространённых неврологических заболеваний (по разным данным, от 0,5 до 1 % популяции), характеризующееся повторными судорожными или бессудорожными приступами (эпилептиформные пароксизмы (ЭП)), возникающими в результате спонтанного массивного гиперсинхронного электрического разряда («эпилептического разряда») большой группы нейронов коры головного мозга. Для эпилепсии характерны спонтанные и повторяющиеся ЭП. Еще более часто встречаются неэпилептические пароксизмы, которые наблюдаются почти у 10 % жителей планеты. Наиболее часто ЭП наблюдаются у новорожденных и детей. Действительно, около 6 % детей переносят в течение жизни по крайней мере один ЭП (Borusiak et al., 2010). В клинической практике принято считать, что одиночный ЭП, сопровождающийся электроклиническим эпилептическим приступом, ещё не позволяет диагностировать эпилепсию, равно как и серия приступов, если они вызваны провоцирующими факторами, например, интоксикацией или высокой температурой организма (фебрильные судороги).

Несмотря на значительные успехи эпилептологии в последние десятилетия и большое количество данных о клеточно-молекулярных и структурных изменениях в эпилептическом мозге, причины, основные условия и механизмы возникновения эпилепсии (эпилептогенеза) остаются всё ещё мало малоизученными. Вследствие этого способы замедления или предотвращения эпилептогенеза и лечения эпилепсии также мало изучены. Так, например, у 30–40 % больных височной эпилепсией эпилептические приступы являются резистентными к лечению (некурабельными) (Dalic, Cook, 2016; Engel, Jr., 2016). Более того, участники Международного конгресса по эпилепсии (Барселона, Испания, 2017 г.) пришли к выводу, что, несмотря на внедрение в клиническую практику в последние годы более десяти новых современных противоэпилептических препаратов, общее количество больных эпилепсией и количество больных с формой заболевания, резистентной к лечению,

не снижаются. Все больше ученых и клиницистов приходят к выводу, что в борьбе с эпилепсией на первом плане должна быть разработка способов предотвращения эпилептогенного процесса, а не разработка новых противоэпилептических препаратов.

В связи с наибольшей распространенностью эпилепсии среди детей раннего возраста, а также с возрастными особенностями свойств нейронов и нейрональных сетей, важным направлением научных исследований является поиск терапевтических способов предотвращения возникновения эпилептического очага у детей в раннем возрасте. Данные когортных исследований свидетельствуют (Nunes et al., 2008; Pisani et al., 2012), что до 50 % детей старшего возраста с диагнозом эпилепсия перенесли ЭП в первые месяцы после рождения, по сравнению с 0,5 % для популяции детей в целом (Scher, 2006). Показано, что у новорожденных, резистентных к противоэпилептическим препаратам, риск возникновения эпилепсии в дальнейшем в 4 раза выше, чем у детей с нормальным развитием (Toet et al., 2005; Garfinkle et al., 2016). Популяционные и клинические исследования также подтверждают, что основную часть взрослых, страдающих эпилепсией, составляют выросшие дети с невылеченной эпилепсией. Поэтому в нашем исследовании мы обратились к неонатальному периоду, так как известно, что именно в этом возрасте наиболее часто наблюдаются эпилептиформные пароксизмы, которые в дальнейшем могут стать причиной возникновения эпилепсии (Holmes et al., 2002). В большинстве случаев источником эпилептиформной активности у новорожденных является поврежденный участок мозга, так называемый «эпилептогенный очаг», который может быть результатом родовой травмы, асфиксии, опухоли, сосудистой мальформации, инфекции мозга и др. (Charman et al., 2012). Эпилептиформные разряды из поврежденных участков незрелого мозга легко распространяются на соседние неповрежденные участки мозга, в том числе и на контралатеральную (противоположную) гемисферу, поскольку в развивающемся мозге детей – на фоне дефицита ГАМКергического торможения – преобладают процессы возбуждения (Ben-Ari et al., 2007).

Гипотеза о том, что эпилептиформные разряды при многократном повторении могут способствовать появлению нового очага эпилепсии, была сформулирована почти 140 лет назад английским ученым Уильямом Говером – «seizures beget seizures» (Gower, 1881), что означает «судорожные разряды порождают судорожные разряды» или «припадки порождают припадки». Позднее, в шестидесятые годы прошлого века, на основе собственных экспериментальных данных на различных видах взрослых животных и на основе клинических данных доктор Фрэнк Моррелл разработал концепцию «вторичного эпилептогенеза» (Morrell, 1960). Концепция подразумевает, что многократно повторяющиеся эпилептиформные разряды, возникающие в эпилептогенном очаге, распространяясь на соседние неповрежденные участки мозга и/или на контралатеральную гемисферу, могут образовывать новый эпилептический очаг – «вторичный (зеркальный) эпилептический фокус», который, несмотря на гистологическую целостность ткани в этом участке мозга, способен самостоятельно генерировать спонтанные эпилептиформные разряды. Однако данная концепция на незрелом мозге экспериментально не доказана, главным образом из-за отсутствия адекватной модели, позволяющей отделить фоновую патологию от собственно эпилептогенного эффекта эпилептиформных разрядов в неповрежденных участках мозга.

Для решения данной задачи нами была разработана модель вторичного эпилептогенеза *in vitro*, которая позволяет генерировать локальные эпилептиформные разряды и наблюдать их эпилептогенный эффект в интактной ткани незрелого мозга. В процессе создания модели был разработан препарат, состоящий из двух взаимосвязанных (комиссуральными волокнами) интактных гиппокампов новорожденных крыс или мышей (7–9-дневных, что, по литературным данным (Nehlig, 1997; Avishai-Eliner et al., 2002; Herlenius, Lagercrantz, 2004), приблизительно соответствует первому году жизни ребенка). Камера, специально разработанная для вышеописанного препарата, позволяет помещать левый и правый гиппокампы и соединяющие их комиссуральные волокна в три отдельные отсека и перфузировать их отдельно разными

растворами, которые в этой камере не смешиваются. Разработанная нами модель вторичного эпилептогенеза *in vitro* позволяет инициировать эпилептиформные разряды в одном из гиппокампов (имитирующем «эпилептогенный очаг») аппликацией на него конвульсивного агента и изучать проведение и эпилептогенный эффект этих разрядов на контралатеральный гиппокамп.

Наиболее актуальным в настоящее время является поиск специфических маркеров эпилептогенности эпилептиформных разрядов в незрелом мозге, поскольку известно, что не во всех случаях эпилептиформные пароксизмы приводят к возникновению хронической эпилепсии, а интенсивное лечение противоэпилептическими препаратами детей раннего возраста часто вызывает серьезные и необратимые патологические изменения в развивающемся мозге. Поэтому для современной неврологии одной из актуальных прикладных задач является поиск эффективных методов предотвращения эпилептогенеза и эффективной терапии эпилепсии у детей раннего возраста. Важно отметить, что существующие противоэпилептические препараты, которые были разработаны главным образом для лечения зрелого мозга, в незрелом мозге могут купировать судороги, но во многих случаях не предотвращают длительные патологические изменения нейронной возбудимости, лежащие в основе эпилептогенеза и эпилептических разрядов. Более того, у новорожденных некоторые противоэпилептические препараты, в частности препараты ГАМКергического действия, такие как барбитураты и бензодиазепины (препараты первого выбора для новорожденных и детей раннего возраста), в ряде случаев могут даже агgravировать эпилептиформную активность мозга. Именно поэтому в настоящее время идет активный поиск *антиэпилептогенных* препаратов, задерживающих или предотвращающих возникновение эпилепсии, что также было одной из задач диссертационного исследования. В частности, оценивалась возможность использования модели вторичного эпилептогенеза для поиска и тестирования новых и классических антиэпилептических и антиэпилептогенных препаратов.

Цель и задачи диссертационного исследования

Главная **цель** диссертационного исследования заключалась в выявлении основных условий и синаптических механизмов, лежащих в основе индукции и экспрессии эпилептической активности в развивающемся гиппокампе, включая исследование роли ГАМКергической нейротрансмиссии и хлорных котранспортеров в формировании вторичного эпилептического очага. Второй целью исследования было определение потенциальных терапевтических мишеней для предотвращения вторичного эпилептогенеза и подавления эпилептической активности в сформировавшемся вторичном очаге.

В соответствии с целями исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать экспериментальную модель вторичного эпилептогенеза в гиппокампе новорожденных крыс *in vitro*.

2. Исследовать электрографические свойства эпилептиформных разрядов и особенности их распространения в лимбической системе крыс в постнатальном периоде и определить электрофизиологические паттерны активности, ассоциированные с вторичным эпилептогенезом.

3. Исследовать роль ГАМК(A)-, NMDA- и AMPA-рецепторов в иктогенезе и во вторичном эпилептогенезе.

4. Исследовать изменение хлорного гомеостаза и роль хлорных котранспортеров в генерации эпилептиформных разрядов и в формировании вторичного эпилептического очага.

5. Исследовать антиэпилептогенную и антиэпилептическую активность противосудорожных препаратов первого выбора (фенобарбитала и диазепамы) и блокатора котранспортера NKCC1 (буметанида).

Научная новизна, теоретическое и научно-практическое значение диссертационного исследования

В процессе исследования разработаны новые экспериментальные модели и препараты интактных и связанных между собой структур лимбической системы новорожденных крыс *in vitro*, в частности: 1) препарат целого

гиппокампа, 2) препарат двойного гиппокампа, представляющий собой комплекс двух (правого и левого) гиппокампов, связанных комиссуральными волокнами и 3) препарат энторинально-гиппокампаально-септального комплекса. Разработаны методики микрохирургической диссекции вышеуказанных препаратов с сохранением целостности как самих структур, так и связей между ними, определены условия их содержания и перфузии для обеспечения жизнеспособности. Также разработаны экспериментальные камеры с несколькими отсеками для обеспечения отдельной перфузии структур лимбической системы, что является необходимым условием для исследования вторичного эпилептогенеза. Показано, что нейроны и нейрональные сети в разработанных нами препаратах сохраняют жизнеспособность и способность к генерации сетевых разрядов и осцилляций, в том числе эпилептиформной активности, в лимбической системе новорожденных крыс *in vitro* вплоть до окончания критического постнатального периода (10-й день после рождения, P10). Диссертационное исследование продемонстрировало, что применение разработанных нами препаратов может быть чрезвычайно широким – от нейрофизиологических экспериментов до детального изучения морфологии нейронов в норме и при патологии. Интактные препараты, в отличие от препаратов тонких срезов, позволяют выполнить трехмерную реконструкцию дендритных и аксонных разветвлений пирамидальных клеток и интернейронов, а также исследовать нейрональные связи между структурами лимбической системы. Наиболее значительным преимуществом интактных препаратов, по сравнению с препаратами тонких срезов, является сохранность как нейрональной сети внутри структур, так и синаптических связей между ними.

Электрофизиологические эксперименты с применением препарата целого гиппокампа продемонстрировали, что: 1) усиление эпилептиформной активности, вызванной аппликацией агониста глутаматных AMPA/каинатных рецепторов каината (КА), в пирамидальных клетках СА3 поля гиппокампа в течение первой постнатальной недели происходит параллельно с усилением КА-вызванных постсинаптических токов; 2) гиппокамп является первичной

структурой, генерирующей пароксизмальную активность в незрелой лимбической системе в ответ на действие КА; 3) распространение пароксизмальной активности в другие структуры лимбической системы является возрастзависимым; 4) в препарате целого гиппокампа иктальные разряды могут быть вызваны в более раннем возрасте, чем в тонких срезах данной структуры, что коррелирует с данными, полученными в экспериментах *in vivo*, в которых показано, что иктальные эпилептиформные разряды могут быть вызваны уже у трёхдневных (P3) крысят.

На основе препарата двойного гиппокампа нами разработана модель вторичного эпилептогенеза, использование которой позволило впервые продемонстрировать, что повторные иктальные разряды в одном гиппокампе могут проводиться в контралатеральный гиппокамп и приводить к формированию в нём вторичного эпилептического очага (зеркального эпилептического фокуса (ЗЭФ)), и подтвердить гипотезу «seizures beget seizures» в незрелом мозге *in vitro*. Впервые экспериментально продемонстрировано, что формирование вторичного очага эпилепсии напрямую зависит от активации как глутаматных, так и ГАМК(А)-рецепторов. Кроме того, нами установлено, что данный процесс обусловлен наличием в иктальных разрядах высокочастотных осцилляций (ВЧО). Выявлено, что в пирамидальных клетках эпилептического очага повышается внутриклеточная концентрация ионов хлора, что приводит к положительному сдвигу потенциала реверсии токов через ионные каналы ГАМК(А)-рецепторов и усилению возбуждающего действия ГАМК. Впервые показано, что буметанид, антагонист катионно-хлорного котранспортера NKCC1, не предотвращает формирование вторичного эпилептического очага, но блокирует спонтанную эпилептиформную активность во вторичном очаге. Более того, нами показано, что генетическое устранение котранспортера NKCC1 также не препятствует формированию эпилептического очага.

Разработанный нами электрофизиологический метод оценки эффективности работы хлорных котранспортеров позволил выявить замедленное выведение ионов хлора из нейронов ЗЭФ, повышенную внутриклеточную

концентрацию ионов хлора и установить, что возбуждающее действие ГАМК в «эпилептических» нейронах обусловлено главным образом даун-регуляцией калий-хлорного котранспортера KCC2.

Выявлено, что повышение внутриклеточной концентрации ионов хлора и усиление возбуждающего действия ГАМК на нейроны вторичного очага является основной причиной парадоксальной аггравации эпилептических разрядов в незрелом мозге, которая часто наблюдается при применении антиэпилептических препаратов первого выбора (фенобарбитала и диазепама), являющихся позитивными аллостерическими модуляторами ГАМК(A)-рецепторов, для предотвращения судорог у новорожденных и детей раннего возраста. Также показано, что фенобарбитал, в отличие от диазепама, ингибирует AMPA/каинат-рецептор-опосредованные постсинаптические токи и на начальных этапах эпилептогенеза оказывает противосудорожное и антиэпилептогенное действие. Однако в уже сформированном очаге оба препарата агgravировали эпилептическую активность. Основываясь на вышеприведенных результатах, нами была предложена стратегия профилактики фармакоиндуцированной аггравации эпилептиформных разрядов противоэпилептическими препаратами ГАМКергического действия путем применения этих препаратов в комбинации с блокатором котранспортера NKCC1 буметанидом.

Таким образом, разработанная нами модель вторичного эпилептогенеза открывает новые возможности для изучения патогенеза эпилепсии в развивающемся мозге и механизма действия существующих и новых противоэпилептических препаратов как с целью лечения эпилепсии, включая их противосудорожное действие, так и с целью предотвращения вторичного эпилептогенеза в незрелом мозге.

Диссертационная работа относится к числу фундаментальных научных исследований и имеет практическое значение. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научных исследованиях, в процессе обучения студентов биологических, медицинских и фармацевтических вузов, при

разработке новых противоэпилептических и противоэпилептогенных препаратов для лечения эпилепсии у новорожденных и детей раннего возраста.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Препараты целого и двойного гиппокампа, а также энторинально-гиппокампулярно-септального комплекса новорожденных крыс *in vitro* обеспечивают сохранность нейронов и синаптических связей внутри структур лимбической системы и между ними, характеризуются высокой жизнеспособностью и обладают рядом преимуществ, по сравнению с препаратами тонких срезов, для изучения морфологии нейронов и функций нейрональных сетей в развивающейся лимбической системе. В частности, интактные препараты позволяют исследовать генерацию и распространение эпилептиформной активности, а также процессы эпилептогенеза в структурах лимбической системы в течение нескольких дней в условиях *in vitro*.

2. Многократные фармакоиндуцированные иктальные разряды в препарате целого гиппокампа вызывают долговременные эпилептиформные изменения, которые проявляются спонтанными иктальными и интериктальными разрядами. Иктальные разряды проводятся через комиссуральные волокна в контралатеральный гиппокамп и способны вызывать в нем формирование ЗЭФ. Активация ГАМК (A)- и NMDA-рецепторов и наличие в иктальных разрядах высокочастотных (80–140 Гц) осцилляций (ВЧО) в контралатеральном гиппокампе являются необходимыми условиями формирования ЗЭФ.

3. Ключевым механизмом вторичного эпилептогенеза является нарушение хлорного гомеостаза, обусловленное дисфункцией калий-хлорного котранспортера KCC2, что приводит к замедлению выведения ионов хлора и повышению их внутриклеточной концентрации, а также к усилению возбуждающего действия ГАМК в нейронах эпилептического очага. Нарушение хлорного гомеостаза в эпилептическом очаге может быть скорректировано блокированием катионно-хлорного котранспортера NKCC1 с помощью селективного антагониста буметанида, что уменьшает внутриклеточную

концентрацию ионов хлора и возбуждающее действие ГАМК и приводит к подавлению пароксизмальной активности в эпилептическом очаге.

4. Противосудорожные препараты первого выбора для новорожденных позитивные аллостерические модуляторы ГАМК(A)-рецепторов фенобарбитал и диазепам оказывают разнонаправленное действие на вторичный эпилептогенез. Диазепам не предотвращает ни генерацию, ни проведение КА-вызванных иктальных разрядов, ни формирование вторичного очага. Фенобарбитал же подавляет проведение иктальных разрядов и предотвращает вторичный эпилептогенез, что обусловлено дополнительным ингибирующим действием фенобарбитала на AMPA/каинат-рецептор-опосредованные постсинаптические токи. В уже сформированном очаге оба препарата, и фенобарбитал и диазепам, усиливают возбуждающее действие ГАМК и аггавируют эпилептическую активность.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно сформулированы цели и задачи диссертационного исследования. Приведенные в диссертационной работе научные результаты получены при личном участии автора на всех этапах работы, включая дизайн, организацию и проведение экспериментов. Автор является ведущим разработчиком инновативных препаратов «целый гиппокамп» и «двойной гиппокамп», на основе которых разработана ключевая модель диссертационного исследования – модель вторичного эпилептогенеза *in vitro*. Анализ и обработка экспериментального материала и подготовка результатов исследования к публикации также проведены автором самостоятельно.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на международных симпозиумах и конференциях, таких как: Международный конгресс по эпилепсии (26th International Congress on Epilepsy, Paris, France, 2005), Европейский конгресс по нейронаукам (FENS, Geneva, Switzerland, 2009), Международный конгресс по эпилепсии (29th International Epilepsy Congress,

Rome, Italy, 2011), Ежегодные форумы по нейронаукам США (Society for Neurosciences): 27th Annual Meeting, New Orleans, USA, 1997; 28th Annual Meeting, Los Angeles, USA, 1998; 35th Annual Meeting, Washington, USA, 2005); 1-я Средиземноморская конференция по неврологии (1st Mediterranean Neuroscience Conference, Montpellier, France, 1997); 3-й Симпозиум Общества неврологии (3ème Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, France, 1997); Европейский Конгресс по эпилептологии (7th European Congress on Epileptology, Helsinki, Finland, 2006), Европейский конгресс по эпилептологии (8th European Congress on Epileptology, Berlin, Germany, 2008), 2-й Восточно-Средиземноморский конгресс по эпилепсии (2nd Eastern Mediterranean Epilepsy Congress, Dubai, UAE, 2010), III Международный конгресс «Фундаментальная и клиническая электрофизиология. Актуальные вопросы аритмологии» (Казань, Россия, 2019).

Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями автора в рецензируемых научных журналах, а также показателем их цитируемости (> 4500) и индексом Хирша – 24 (по WoS).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 257 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 411 наименований. Работа иллюстрирована 64 рисунками и таблицей.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и экспериментальные препараты

Все опыты на животных были проведены с соблюдением принципов гуманности и требований, предъявляемых к работе с экспериментальными животными в России, и в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных и Директивами 86/609/ЕЕС. Эксперименты проводили на препаратах срезов гиппокампа и препаратах интактного гиппокампа (*in toto*) новорожденных животных и на препаратах срезов гиппокампа взрослых животных. Для приготовления препаратов использовали лабораторных крыс линии Wistar и мышей линии C57BL. Процедуры приготовления срезов гиппокампа и интактного гиппокампа подробно описаны нами в ряде опубликованных работ (Ben-Ari et al., 1989 и Khalilov et al., 1997; Khalilov et al., 1999, соответственно).

Электрофизиологические методы регистрации и анализ данных

Пэтч-кламп регистрацию в разных конфигурациях – в конфигурации «целая клетка» (*whole-cell*) с фиксацией тока (*current-clamp*) и потенциала (*voltage-clamp*) или в конфигурации «на клетке» (*cell-attached*) – проводили с использованием усилителей Axopatch 200A и Multi Clamp 700B.

Внеклеточную регистрацию полевых потенциалов и популяционной активности нейронов проводили с помощью электродов, изготовленных из вольфрамовой проволоки (диаметр 50 мкм, California Fine Wire, Grover Beach, CA). Усиление и оцифровку регистрируемых сигналов осуществляли с помощью усилителя DAM 80A. Электрическая стимуляция осуществлялась с помощью биполярного вольфрамового электрода (диаметр проволоки 50 мкм). Анализ спектральной мощности иктовых разрядов проводили с использованием программного обеспечения AutoSignal v1.7 (SeaSolve Software Inc.).

Измерение динамики внеклеточного калия и кальция

Динамику внеклеточного калия и кальция измеряли с помощью ионоселективного микроэлектрода, изготовленного из двухствольной боросиликатной стеклянной трубочки (2GC150FS, Clark Electromedical, Pangbourne, Reading, UK), в котором одну пипетку с филаментом использовали

для внеклеточной регистрации полевых электрических потенциалов, а другую пипетку (без филамента) подвергали воздействию диметил-триметил-силиламинового пара. После просушки при температуре 200 °С пипетку без филамента заполняли раствором, содержащим соответствующий ионный сенсор. В качестве сенсора для ионов калия (K^+) использовали Fluka 60398, а для ионов кальция (Ca^{2+}) – Fluka 21196.

Фокальная аппликация ГАМК и глутамата

Для локальной аппликации ГАМК и глутамата использовали стеклянные пипетки (1–2 МОм), заполненные раствором ACSF с добавлением либо ГАМК (100–200 мкмоль), либо глутамата (100 мкмоль). Давление, длительность аппликации и расстояние от кончика пипетки до тела регистрируемого нейрона подбирали таким образом, чтобы амплитуда сигнала в ответ на аппликацию вещества не превышала 300 пА.

Полученные данные обрабатывали и анализировали с использованием следующих пакетов прикладных программ: pClamp 10.0 (Molecular Devices), miniAnalysis (Synaptosoft), Origin 7.0 (Microcal Software) и AutoSignal (SeaSolve Software Inc.). Групповые показатели представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Статистическую оценку достоверных различий в сравниваемых выборках оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA). Уровень достоверности $p < 0,05$ принимали за достоверно значимый.

2. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Новый препарат для исследования генерации и распространения сетевой активности в лимбической системе новорожденных крыс

Исследования с использованием препарата тонких срезов разных структур и отделов мозга животных и людей, подвергшихся хирургическому вмешательству, имеют огромное значение для понимания механизмов работы мозга в норме и при патологиях. Однако препарат тонких срезов имеет существенные недостатки. Поскольку в процессе приготовления тонких срезов

теряется большинство межнейрональных связей структур мозга, то исследование таких процессов, как генерация и распространение синхронизованной сетевой активности, становится проблематичным и часто малоэффективным. Для преодоления вышеуказанных недостатков нами разработаны препараты целого (интактного) гиппокампа и связанных между собой структур лимбической системы новорожденных грызунов *in vitro*.

Морфологические аспекты препарата целого гиппокампа

Световая микроскопия показала, что в препарате целого гиппокампа, приготовленного из мозга новорожденных (от P0 до P10) крыс, находившегося в *in vitro* условиях до 10 ч, и даже из мозга более старших крысят (P15, 4 часа *in vitro*), основные гистологические характеристики гиппокампа и морфология подавляющего большинства нейронов, включая интернейроны, хорошо сохранены. Электронно-микроскопическое исследование препарата интактного гиппокампа, выдержанного в *in vitro* условиях, также подтвердило хорошую морфологическую сохранность нейронов.

Электрофизиологические свойства препарата целого гиппокампа

Для исследования электрофизиологических свойств целого гиппокампа *in vitro* были использованы два метода регистрации: 1) внеклеточная регистрация полевых потенциалов и популяционной активности группы нейронов; 2) пэтч-кламп регистрация активности одиночных нейронов в разных конфигурациях.

Среднее значение мембранного потенциала исследуемых нейронов составляло -62 ± 4 мВ ($n = 74$), и эти клетки в ответ на деполяризующую ступеньку тока генерировали потенциалы действия с овершутом. Кроме того, характерные гигантские деполяризующие потенциалы (ГДП) (Ben-Ari et al., 1989), которые являются результатом синхронного разряда нейронов гиппокампа (Khazipov et al., 1997; Leinekugel et al., 1997), регистрировались как в интернейронах, так и в пирамидальных клетках.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что основные морфологические и физиологические свойства пирамидальных клеток

и интернейронов в интактном гиппокампе *in vitro* не нарушены, следовательно, новый препарат может быть использован в фармакологических экспериментах.

Уникальные свойства и возможности препарата интактного гиппокампа

Препарат интактного гиппокампа, в отличие от препарата тонких срезов, позволяет полностью реконструировать все дендритные и аксонные разветвления пирамидальных клеток (Рис. 1А) и интернейронов (Рис. 1В) и получить трехмерное (3D) изображение этих нейронов (Рис. 1С).

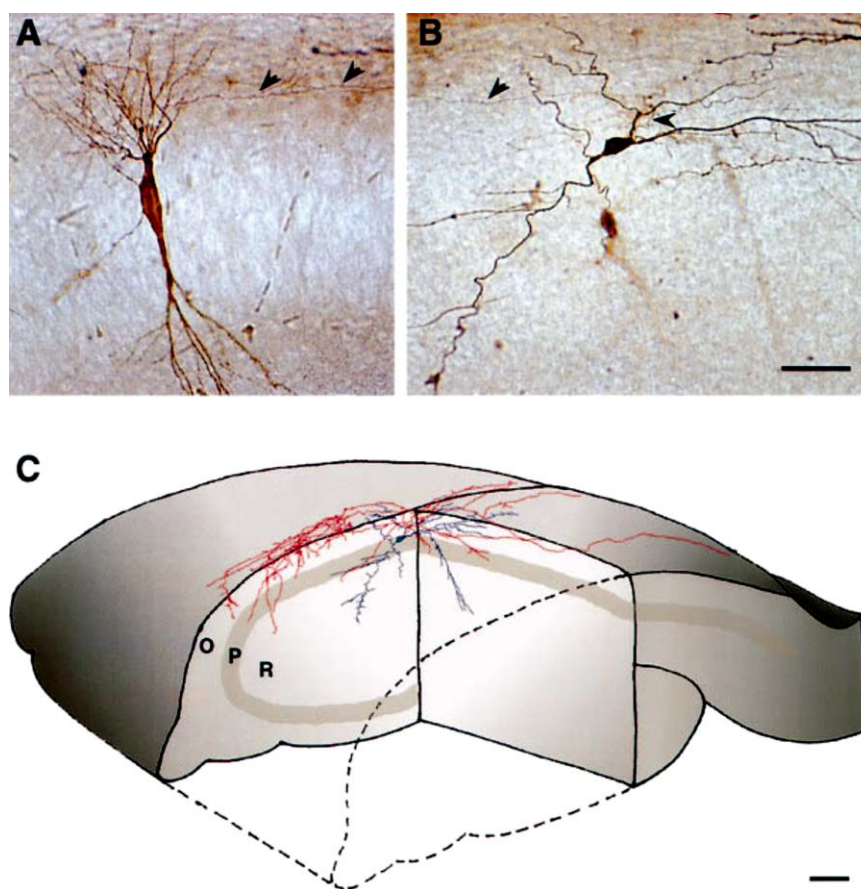


Рис. 1. Морфологические характеристики и 3D-реконструкция нейронов в препарате целого гиппокампа *in vitro*

Для экспериментов использовали интактный P7 гиппокамп, находившийся в *in vitro* условиях в течение 8 ч. (А–В) Окрашенные биоцитином пирамидальная клетка (А) и интернейрон (В) в тонких (100 мкм) срезах гиппокампа в СА1 поле после *in vitro* экспериментов. В обоих случаях хорошо видны тела клеток, их дендритные разветвления и аксоны (показаны стрелками). (С) 3D-реконструкция окрашенного биоцитином интернейрона в целом гиппокампе, показанного на (В). Хорошо видна веретенообразная сома интернейрона, расположенная на границе *stratum oriens* и *stratum pyramidale* и дающая три первичных дендрита (синий цвет), которые далее проходят в *stratum oriens*, *stratum pyramidale* и *stratum radiatum* СА1 поле гиппокампа. Дендритное дерево интернейрона ориентировано главным образом в поперечном направлении. Интернейрон также имеет мощное аксональное разветвление (красный цвет). Длина аксона в rostro–каудальном направлении – более 1 мм. Масштаб линейки: 100 мкм.

Использование интактного препарата гиппокампа позволяет реконструировать дендритные и аксонные разветвления нейронов и в комплексных препаратах: септум – гиппокамп, гиппокамп – гиппокамп, гиппокамп – энторинальный кортекс.

Регистрация сетевой электрической активности препарата целого гиппокампа

Использование препарата целого гиппокампа позволяет регистрировать и исследовать генерацию и распространение сетевых разрядов, таких как ГДП и эпилептиформная активность. Так, используя интактный препарат, нам удалось впервые зарегистрировать длительные (30–250 с) иктальные разряды в незрелом гиппокампе, которые вызывались бикукуллином, каинатом, повышенной внеклеточной концентрацией ионов калия и высокочастотной стимуляцией (*kindling*). В тонких срезах гиппокампа в таких экспериментах генерируются только короткие (< 1 с) интериктальные разряды.

2.2. Генерация и распространение эпилептиформных разрядов в лимбической системе новорожденных крыс в процессе развития

Профиль возрастных изменений каинат-вызванных эпилептиформных разрядов

Для определения профиля возрастных изменений эпилептиформных разрядов, вызванных аппликацией КА в омывающий раствор, проводили одновременную внеклеточную регистрацию электрических ответов в пирамидальном слое СА3 поля и пэтч-кламп регистрацию СА3 пирамидальных клеток. В гиппокампах новорожденных крысят (P0–P1), в контрольных условиях, паттерн электрической активности характеризовался наличием спонтанных ГДП, которые одновременно регистрировались обоими электродами и возникали с частотой $4,6 \pm 1,3$ мин⁻¹ ($n = 5$).

Типичный ответ на аппликацию КА (250 нмоль) был двухфазным. Во время первой фазы возникало кратковременное увеличение частоты ГДП до $1,0 \pm 0,2$ с⁻¹. Затем следовала фаза десинхронизации, сопровождающаяся подавлением ГДП. Во второй фазе частота ГАМКергических постсинаптических

токов, а также частота спайков на внеклеточном электроде резко увеличивались. Однако в ответ на аппликацию КА, даже при больших концентрациях (1 мкмоль), мы не наблюдали ни популяционных спайков на внеклеточном электроде, ни полисинаптических ответов. Таким образом, у новорожденных крысят (P0–P1) КА не способен вызывать эпилептиформную активность.

В гиппокампах крысят возраста P2–P3 ответ на аппликацию КА в 10 экспериментах из 21 был аналогичным ответу, наблюдавшемуся в более раннем возрасте. В 11 экспериментах из 21 во время увеличения частоты ГДП возникали короткие интериктальные эпилептиформные разряды. Только в одном случае аппликация КА вызвала ответы, похожие на иктальные разряды с характерными тоническими и клоническими фазами. Пэтч-кламп регистрация позволила обнаружить, что интериктальные разряды ассоциированы с глутамат-опосредованными токами в СА3 пирамидальных клетках.

В гиппокампах крысят возраста P4–P7 аппликация КА в 23 экспериментах из 41 сопровождалась генерацией классических иктальных разрядов. КА-вызванный иктальный разряд состоит из 4 фаз. Эпилептиформная активность начинается несколькими высокоамплитудными (0,5–2 мВ) интериктальными разрядами (фаза 1). Вторая фаза, так называемая тоническая фаза, характеризуется ритмическими (6–20 Гц) осцилляциями, которые имеют тенденцию к уменьшению к концу тонической фазы и к началу третьей – клонической – фазы. После серии клонических разрядов наступает фаза постиктальной депрессии (фаза 4), во время которой спонтанная и вызванная сетевая нейрональная активность полностью отсутствует. Таким образом, эпилептиформная активность, вызванная КА в гиппокампе новорожденных (P4) крысят, имеет характерную последовательность фаз иктальных разрядов, зарегистрированных ранее в экспериментах *in vivo* (Bragin et al., 1997).

Корреляция между усилением предрасположенности гиппокампа к генерации эпилептиформных разрядов и увеличением постсинаптических ответов на каинат

В зрелом гиппокампе КА-вызванная эпилептиформная активность обусловлена активацией каинатных рецепторов пирамидальных клеток

в СА3 поле. Поэтому следующая группа экспериментов была предпринята с целью выявления корреляции между феноменом резкого увеличения с возрастом предрасположенности гиппокампа к генерации эпилептиформных разрядов и увеличением чувствительности СА3 пирамидальных клеток к КА в течение первой постнатальной недели.

Чтобы определить возрастные изменения чувствительности СА3 пирамидальных клеток к КА, вещество добавляли в омывающий раствор в присутствии тетродотоксина (ТТХ, 1 мкмоль). В гиппокампах P0–P1 крысят аппликация КА (250 нмоль) не вызывала постсинаптического тока в СА3 пирамидальных клетках ($n = 9$). Начиная с двухдневного возраста, аппликация КА во всех экспериментах сопровождалась генерацией входящих токов, амплитуда которых с возрастом прогрессивно увеличивалась. КА-индуцированные токи генерировались и при добавлении в перфузирующий раствор блокаторов NMDA-, ГАМК(A)- и AMPA-рецепторов: APV (50 мкмоль), бикикуллин (10 мкмоль) и GYKI 56355 (30 мкмоль) соответственно, но были чувствительны к короткой аппликации неселективного антагониста AMPA/каинат-рецепторов CNQX (10 мкмоль), что указывает на то, что эти токи являются результатом активации высокоаффинных каинатных рецепторов.

Таким образом, в течение первой недели постнатального развития происходит постепенное увеличение постсинаптических токов в ответ на аппликацию КА, что коррелирует с возрастным профилем КА-вызванных эпилептиформных разрядов.

Возрастной профиль проведения эпилептиформных разрядов в лимбической системе

Для исследования возрастных особенностей проведения эпилептических разрядов между структурами лимбической системы, нами разработаны новые комбинированные препараты гиппокампа, включающие септум и/или энторинальный кортекс. У новорожденных животных (P2) КА генерировал серию интериктальных разрядов, которые проводились в септум с задержкой 54 ± 11 мс ($n = 6$). После перерезки связей между гиппокампом и септумом эпилептиформная активность наблюдалась только в гиппокампе ($n = 5$).

В препарате крыс возраста P2, который включал гиппокамп и энторинальный кортекс, гиппокампальные интериктальные разряды не проводились в энторинальный кортекс ($n = 4$). В препарате крыс P6 КА-вызванные иктальные разряды проводились и в септум и в энторинальный кортекс. Во всех экспериментах гиппокампальные разряды предшествовали разрядам, генерируемым в септуме (задержка составила 34 ± 15 мс, $n = 4$). Перерезка нейрональных связей между гиппокампом и септумом продемонстрировала, что в изолированном септуме КА не способен генерировать эпилептиформную активность, как и в гиппокампе более молодых (P2) крыс. Однако, в отличие от препарата P2 крыс, аппликация КА в препарате P6 крыс сопровождалась эпилептиформной активностью в энторинальном кортексе ($n = 6$). Перерезка нейрональных связей между гиппокампом и энторинальным кортексом показала, что КА-вызванные эпилептиформные разряды возникают в гиппокампе и проводятся в энторинальный кортекс.

Таким образом, в соответствии с данными, полученными в *in vivo* и в *in vitro* экспериментах, гиппокамп является первичной структурой, генерирующей пароксизмальную активность в незрелой лимбической системе в ответ на действие КА, а её генерация и распространение в лимбической системе крыс зависят от возраста.

2.3. Вторичный эпилептогенез в незрелом мозге *in vitro*

Для исследования контралатерального проведения эпилептиформных разрядов был разработан препарат, состоящий из двух связанных (комиссуральными волокнами) интактных гиппокампов новорожденных (P7–P9) крыс или мышей (Khalilov et al., 1997). Камера, специально разработанная для вышеописанного препарата, позволяет размещать левый и правый гиппокампы и соединяющие их комиссуральные волокна в три отдельные отсека и перфузировать их отдельно растворами, которые в камере не смешиваются (Khalilov et al., 2003). Разработанная модель вторичного эпилептогенеза позволяет вызывать иктальные разряды в одном из гиппокампов и изучать эпилептогенный эффект разрядов в контралатеральном гиппокампе.

Повторные иктальные разряды и формирование ЗЭФ

Короткая (2–3 мин) аппликация КА (250 нмоль) на один из гиппокампов приводила к генерации в этом гиппокампе иктального разряда, который с небольшой задержкой проводился в контралатеральный гиппокамп. Каждая последующая аппликация КА (с интервалом в 15 мин) приводила, во-первых, к прогрессивному увеличению длительности иктальных разрядов с $89,8 \pm 4,6$ с (на первую аппликацию) до $117,0 \pm 6,2$ с (на пятнадцатую аппликацию), и во-вторых, к увеличению генерации эпилептиформных клонических разрядов, берущих начало в контралатеральном гиппокампе и проводящихся в ипсилатеральный гиппокамп (Рис. 2А, Б, В).

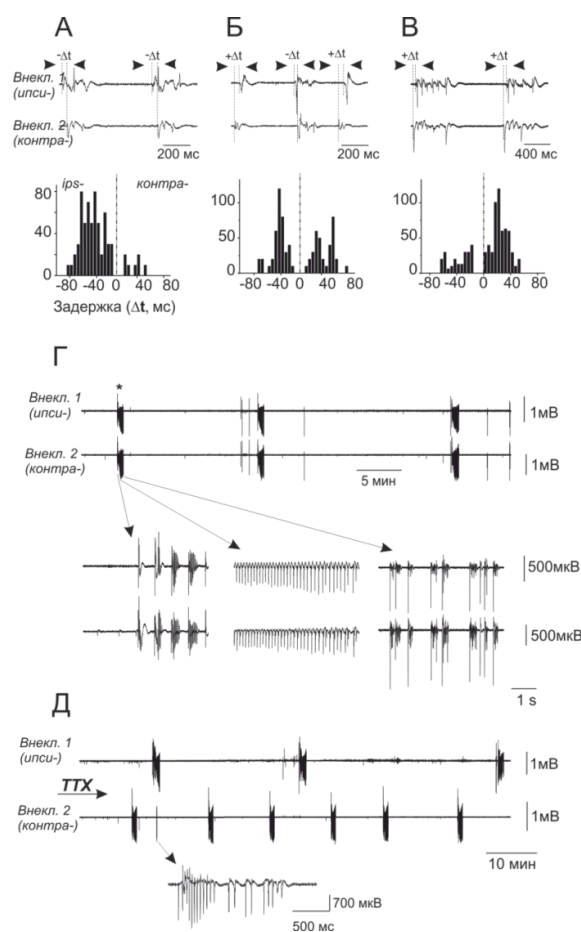


Рис. 2. Формирование зеркального эпилептического фокуса

(А, Б, В) Гистограммы распределения (нижний ряд) межгиппокампальных задержек (Δt) эпилептиформных событий во время клонической фазы иктального разряда (верхний ряд), вызванного после первой (А) и седьмой (Б) аппликациями КА. Во время первой аппликации КА, в сравнении с седьмой, эпилептиформные разряды преимущественно генерируются в ипсилатеральном гиппокампе и проводятся в контралатеральный. После формирования ЗЭФ спонтанные разряды зарегистрированы, главным образом, в контралатеральном гиппокампе (В, Г). (Д) Аппликация ТТХ в центральный отсек камеры. Видно, что спонтанные и вызванные (*) асинхронные иктальные эпилептиформные разряды генерируются как в ипсилатеральном, так и в контралатеральном гиппокампе.

После 15 аппликаций КА в 69 % экспериментов ($n = 42$) оба гиппокампа генерировали синхронные спонтанные иктальные разряды (Рис. 2Г).

Блокада межгиппокампальной проводимости аппликацией ТТХ в средний отсек или перерезка комиссуральных волокон подтвердили предположение о том, что контралатеральный гиппокамп трансформировался в эпилептический очаг, поскольку контралатеральный гиппокамп был способен самостоятельно генерировать спонтанные и/или вызванные эпилептиформные разряды (Рис. 2Д).

Таким образом, впервые экспериментально показано, что повторные иктальные разряды в незрелом гиппокампе способны вызывать формирование зеркального эпилептического фокуса.

Результаты наших экспериментов указывают на то, что повторяющиеся иктальные разряды способны превратить интактную структуру незрелого головного мозга в «хронический» эпилептический очаг (Рис. 3).

Роль активации NMDA-рецепторов в формировании ЗЭФ

Созданная нами модель вторичного эпилептогенеза позволила продемонстрировать, что для формирования ЗЭФ необходима многократная синаптическая активация нейронов контралатерального гиппокампа иктальными разрядами. Если во время эксперимента блокировать синаптическую активность нейронов контралатерального гиппокампа добавлением в перфузирующий раствор CNQX или ТТХ, то проведение иктальных разрядов блокируется и возникновение ЗЭФ полностью предотвращается. Если избирательно блокировать только NMDA-рецепторы в контралатеральном гиппокампе добавлением в перфузирующий раствор APV (100 мкмоль), то эпилептические разряды продолжают генерироваться в обоих гиппокампах, но ЗЭФ не возникает даже после 25 КА-вызванных иктальных разрядов.

Возбуждающее действие ГАМК во вторичном эпилептическом очаге

Известно, что в эпилептогенезе и в лечении эпилепсии важную роль играет ГАМКергическая синаптическая передача. Поэтому мы сравнили действие блокатора ГАМК(A)-рецептора в контрольной ткани и в срезах, полученных из ЗЭФ.

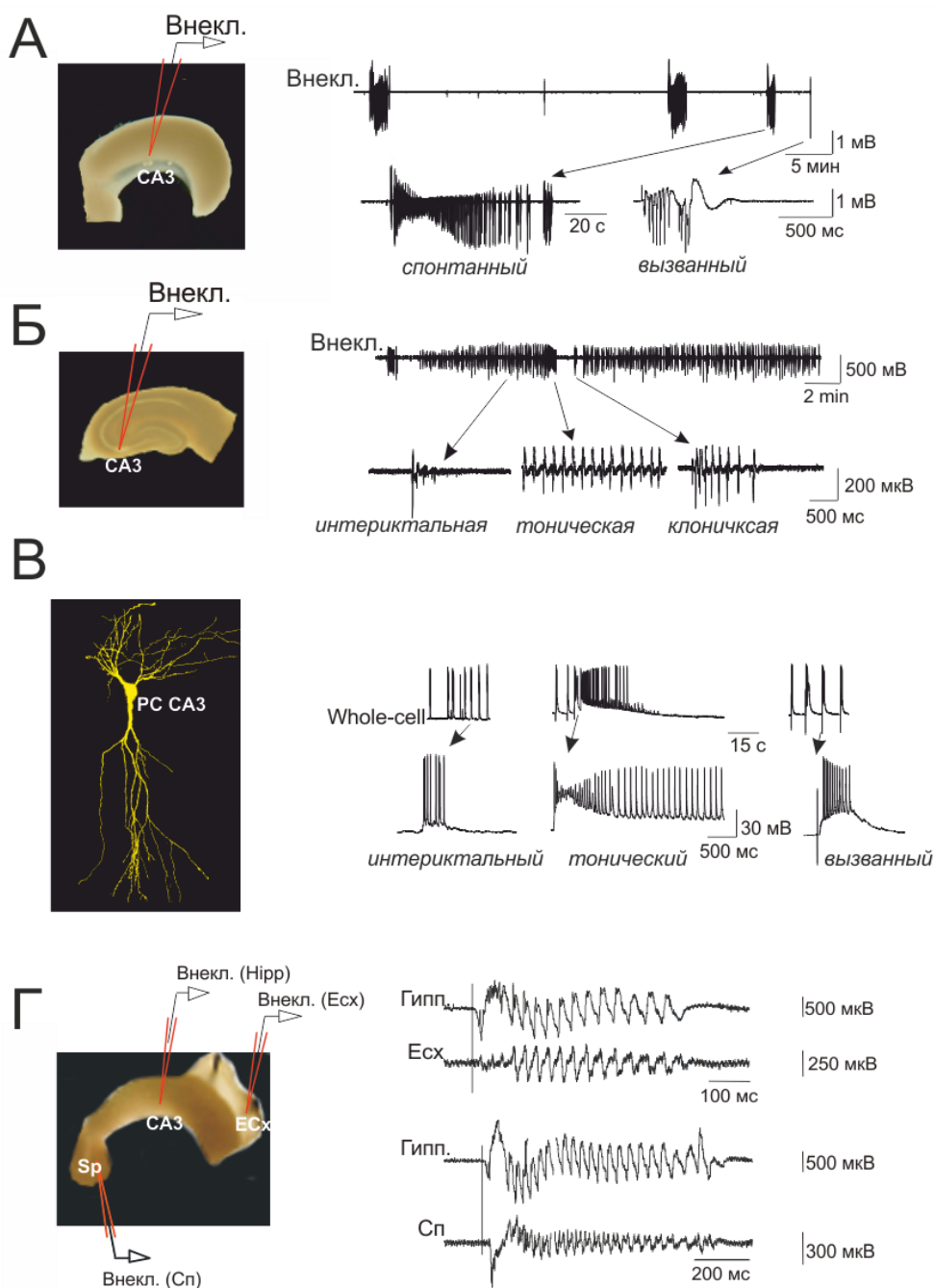


Рис. 3. «Хронический» эпилептогенез во вторичном очаге

(А–Г) Регистрация электрической активности в контралатеральном гиппокампе через 24 ч после формирования ЗЭФ: (А) интактный гиппокамп (Гипп.), (Б) срез, полученный из этого интактного гиппокампа, (В) окрашенная биоцитином СА3 пирамидальная клетка, (Г) интактный гиппокамп с септумом (*septum*, Сп) и энторинальным кортексом (Есх). Слева: фотографии регистрируемых препаратов и СА3 пирамидальной клетки. Справа: (А) Внеклеточная регистрация спонтанной и вызванной эпилептиформной активности в целом гиппокампе (ниже в расширенном временном масштабе); (Б) Внеклеточная регистрация в срезе гиппокампа с показом разных фаз спонтанного икталного разряда. (В) Спонтанные и вызванные разряды потенциалов действия в СА3 пирамидальной клетке среза, приготовленного из контралатерального гиппокампа после формирования ЗЭФ (ниже в расширенном временном масштабе); (Г) Парная внеклеточная регистрация, демонстрирующая возникновение и распространение спонтанной эпилептиформной активности из гиппокампа в септум и в энторинальный кортекс.

В контрольных срезах добавление бикикуллина в перфузирующий раствор приводило сначала к блокированию ГДП, а затем к генерации интериктальной эпилептиформной активности. В срезах, приготовленных из гиппокампа ЗЭФ, эффект был противоположным – бикикуллин полностью, но обратимо блокировал спонтанную эпилептиформную активность.

В контрольных срезах, в отличие от «эпилептических», APV и CNQX полностью блокировали вызванные электрической стимуляцией потенциалы действия. Потенциалы действия (ПД), которые не были заблокированы в присутствии блокаторов глутаматных рецепторов, в обоих срезах полностью блокировались добавлением бикикуллина, что указывает на то, что они были вызваны возбуждающим действием ГАМК.

Используя метод перфорированной (грамицидином) пэтч-кламп регистрации, сравнили потенциалы реверсии ГАМК-опосредованных постсинаптических токов (E_{Cl^-}) в срезах, полученных из контрольных и «эпилептических» гиппокампов, выдержанных 24 ч в одинаковых *in vitro* условиях.

Эксперименты показали, что в нейронах ЗЭФ, по сравнению с нейронами контрольных срезов, E_{Cl^-} был значительно смещен в сторону положительных значений (контроль: $-69,8 \pm 2,8$ мВ; ЗЭФ: $-55,2 \pm 1,9$ мВ, $p < 0,01$), а мембранные потенциалы покоя нейронов не имели статистически достоверных различий (контроль: $-67,7 \pm 0,5$ мВ, срез ЗЭФ: $-67,3 \pm 0,6$ мВ, $p > 0,05$). В этих же условиях пэтч-кламп регистрация в режиме фиксации тока показала, что в нейронах ЗЭФ, в отличие от нейронов контрольных срезов, одиночная электрическая стимуляция синаптических входов способна вызывать серию ПД, которые полностью блокировались при добавлении бикикуллина.

Таким образом, в ЗЭФ ГАМКергические синапсы являются возбуждающими.

Активация ГАМК(A)-рецепторов как необходимое условие возникновения вторичного эпилептического очага

Для исследования условий возникновения ЗЭФ в экспериментах вместо КА апплицировали антагонист ГАМК(A)-рецепторов – бикикуллин. Аппликация бикикуллина приводила к генерации эпилептиформных разрядов, которые распространялись в контралатеральный гиппокамп. Повторная аппликация бикикуллина, как и в случае с КА, сопровождалась формированием ЗЭФ. Однако оказалась, что изолированный ипсилатеральный гиппокамп, в отличие от контралатерального, не генерировал ни спонтанные, ни вызванные разряды. Поэтому можно предположить, что в незрелом гиппокампе антагонисты ГАМК(A)-рецепторов являются не эпилептогенными, а иктогенными агентами. Это наблюдение указывает на фундаментальное различие между иктальными разрядами, во время которых ГАМК(A)-рецепторы ингибированы или активированы. Частотно-временной анализ показал, что иктальные разряды в контралатеральном гиппокампе сопровождались генерацией ВЧО. Средняя длительность этих осцилляций составляла $120,0 \pm 4,3$ мс ($n = 63$). Иктальные разряды в присутствии антагонистов ГАМК(A)-рецепторов содержали осцилляции в более низком диапазоне частот ($19,4 \pm 0,9$ Гц, $n = 63$).

В аналогичных экспериментах нами был проведен частотно-временной анализ иктальных разрядов, вызванных аппликацией КА. Анализ показал, что в экспериментах, в которых возникал ЗЭФ, иктальные разряды сопровождались генерацией ВЧО (80–120 Гц). В экспериментах, в которых иктальные разряды в контралатеральном гиппокампе сопровождались ВЧО, перерезка комиссуральных волокон или аппликация ТТХ в центральный отсек выявили формирование ЗЭФ. Критическая роль ВЧО в формировании ЗЭФ подтверждается и другими наблюдениями. Во-первых, в 30 экспериментах ($n = 37$), в которых иктальные разряды сопровождались ВЧО, происходило формирование ЗЭФ; в экспериментах, в которых ВЧО отсутствовали (7 из 37), формирования ЗЭФ не происходило. Во-вторых, частотно-временной анализ иктальных разрядов, в которых APV, блокатор NMDA-рецепторов, предотвращал формирование ЗЭФ, также показал отсутствие ВЧО (средняя пиковая частота – $9,6 \pm 1,0$ Гц, $n = 4$).

Антагонисты ГАМК(А)-рецепторов обладают иктогенным, но антиэпилептогенным действием

На основе данных, полученных в экспериментах с блокаторами ГАМК(А)-рецепторов, мы предположили, что если ГАМК(А)-рецепторы участвуют в формировании эпилептического фокуса, то их блокада может предотвращать эпилептогенный эффект других конвульсантов. Мы провели эксперименты, в которых КА апплицировали на один гиппокамп, а контралатеральный гиппокамп перфузировали раствором, содержащим бикакуллин (20 мкмоль). В этих условиях ВЧО генерировались только в КА-аплицированном гиппокампе (81 ± 1 Гц), а в контралатеральном гиппокампе средняя пиковая частота осцилляций была значительно ниже – $19,4 \pm 0,9$ Гц (63 иктальных события, $p < 0,01$, $n = 5$). Разъединение гиппокампов выявило, что только ипсилатеральный гиппокамп был эпилептическим ($n = 5$). В экспериментах, в которых КА апплицировали на один гиппокамп в присутствии бикакуллина, а контралатеральный гиппокамп перфузировали контрольным раствором, были получены аналогичные результаты. ВЧО генерировались только в необработанном бикакуллином гиппокампе.

Таким образом, блокирование ГАМК(А)-рецепторов вызывает эпилептиформную активность, но предотвращает эпилептогенез, что позволяет предположить проэпилептогенное действие ГАМК(А)-рецепторов в незрелом гиппокампе.

В зрелых нейронах активация ГАМКергических синапсов не является необходимым условием эпилептогенеза

Чтобы подтвердить возможность проецирования на зрелый гиппокамп результатов, полученных в экспериментах на незрелом гиппокампе, срезы зрелого и незрелого гиппокампов одновременно перфузировали в одной общей камере. Апликация бикакуллина или габазина (10 мкмоль, 10 мин) в срезах зрелого и незрелого гиппокампов приводила к генерации эпилептиформной активности. Однако блокаторы ГАМК(А)-рецепторов оказывали эпилептогенное воздействие только в срезах гиппокампа взрослых крыс.

Вышеописанные эксперименты продемонстрировали, что в зрелом гиппокампе, в отличие от незрелого, активация ГАМК(A)-рецепторов не является необходимым условием эпилептогенеза.

2.4. Роль хлорных котранспортеров в генерации эпилептиформных разрядов и возникновении вторичного эпилептического очага в незрелом мозге

Используя одновременную внеклеточную и перфорированную пЭТЧ-кламп регистрацию, мы исследовали действие буметанида на физиологическую сетевую активность нейронов незрелого гиппокампа. Эксперименты продемонстрировали, что буметанид (10 мкмоль) полностью блокировал спонтанные ГДП и полностью нивелировал возбуждающее действие ГАМК.

Буметанид не предотвращает формирование ЗЭФ, но блокирует эпилептиформную активность в этом очаге

Для исследования влияния буметанида на формирование вторичного очага эпилепсии мы использовали разработанную нами модель ЗЭФ. В этих экспериментах короткие аппликации КА производились на фоне постоянной перфузии контралатерального гиппокампа раствором, содержащим буметанид (10 мкмоль). После 15 иктальных разрядов, вызванных КА на один гиппокамп, оба гиппокампа начинали генерировать спонтанные синхронные иктальные и интериктальные разряды, несмотря на присутствие буметанида в омывающем растворе контралатерального гиппокампа.

Анализ регистраций показал, что спонтанные иктальные разряды всегда сначала возникали в ипсилатеральном гиппокампе, где отсутствовал буметанид. Разъединение гиппокампов продемонстрировало, что эпилептиформная активность генерируется только в ипсилатеральном гиппокампе. Однако после отмывки буметанида контралатеральный гиппокамп также был способен генерировать эпилептиформные разряды.

НКСС1 только частично участвует в возбуждающем действии ГАМК в нейронах ЗЭФ

С целью исследования данного эффекта мы измерили и сравнили мембранные потенциалы (E_m) и движущую силу ГАМК-опосредованных ответов ($ДС_{ГАМК}$) в СА3 пирамидальных нейронах контрольных срезов гиппокампа и срезов ЗЭФ. В «эпилептических» нейронах E_m был меньше, чем в контрольных, но отличие было недостоверным ($p = 0,08$). Однако $ДС_{ГАМК}$ в «эпилептических» нейронах была значительно больше ($13,2 \pm 12,2$ мВ – в контрольном срезе и $37,3 \pm 8,1$ мВ – в «эпилептическом», $p < 0,001$), что проявляется в положительном сдвиге $E_{ГАМК}$. Буметанид значительно уменьшил $ДС_{ГАМК}$ в нейронах ЗЭФ (с $37,3 \pm 8,1$ до $14,2 \pm 7,6$ мВ, $p < 0,001$), хотя $ДС_{ГАМК}$ в нейронах ЗЭФ была больше, чем в контрольных нейронах ($14,20 \pm 7,6$ мВ против $2,02 \pm 4,8$ мВ в контрольных нейронах в присутствии буметанида). Увеличение концентрации буметанида (50 мкмоль) или блокада эпилептиформной активности добавлением CNQX + APV также не приводили к исчезновению повышенного положительного значения $ДС_{ГАМК}$.

Таким образом, при блокировании активности НКСС1 буметанидом деполяризующая $ДС_{ГАМК}$ в «эпилептических» нейронах, по сравнению с контрольными нейронами, была в 7 раз выше.

2.5. Повышение $[Cl^-]_i$ и возбуждающее действие ГАМК являются основной причиной аггравации эпилептиформной активности фенobarбиталом

Несмотря на более чем 100-летнюю историю, фенobarбитал (ФБ) до сих пор остается препаратом первого выбора при лечении судорожных состояний у детей (Wheless et al., 2007; Bassan et al., 2008), а препаратом второго выбора – диазепам (ДЗП). Механизм действия этих препаратов главным образом связан с потенциацией действия ГАМК. Однако часто эти препараты, особенно во время генерализованных приступов, малоэффективны (Painter et al., 1999) или могут спровоцировать аггравацию судорог (Boylan et al., 2002; Guillet, Kwon, 2007). Поэтому понимание причин и механизмов альтерации действия ФБ

под воздействием повторных эпилептиформных разрядов у детей раннего возраста является важным и с клинической точки зрения. Поскольку в основе действия ФБ лежит потенцирование действия ГАМК, возникает вопрос: обусловлена ли вызванная ФБ аггравация эпилептических судорог повышенной $[Cl^-]_i$ и возбуждающим действием ГАМК. Полученные нами результаты позволяют предположить, что в основе возбуждающего действия ГАМК могут быть два основных механизма: повышенная активность импортера ионов хлора – котранспортера NKCC1 (Dzhala et al., 2005; Dzhala et al., 2008) и даун-регуляция экспортера ионов хлора из клетки – котранспортера KCC2 (Rivera et al., 2004; Jin et al., 2005; Pathak et al., 2007; Viitanen et al., 2010).

Гипотетически, если действие ГАМК является возбуждающим, то ФБ не должен блокировать эпилептиформные разряды. Для проверки гипотезы и исследования механизмов, лежащих в основе перманентно повышенной внутриклеточной концентрации ионов хлора, мы использовали разработанную нами модель ЗЭФ.

Фенobarбитал подавляет начальные иктальные разряды, но аггравировает эпилептиформную активность в ЗЭФ

Для того чтобы протестировать эффект ФБ на начальные иктальные разряды и на вторичный эпилептогенез, за 15 минут до второй аппликации КА на контралатеральный гиппокамп апплицировали ФБ (100 мкмоль) в течение всего эксперимента. Добавление ФБ приводило к блокаде ВЧО и к значительному уменьшению мощности иктальных разрядов. После перерезки комиссуральных волокон (после 15 аппликаций КА) эпилептиформные разряды генерировались только в ипсилатеральном гиппокампе, что указывает на предотвращение ФБ формирования ЗЭФ.

Для тестирования эффекта ФБ на поздние иктальные разряды, когда ГАМК теряет своё ингибирующее действие, аппликация ФБ на контралатеральный гиппокамп производилась только после 14-й аппликации КА на ипсилатеральный гиппокамп. Аппликация ФБ приводила к увеличению длительности и амплитуды как вызванных, так и спонтанных иктальных

разрядов. Под действием ФБ также увеличивалась (на $24,2 \pm 7,3$ %) общая мощность иктальных разрядов.

Фенобарбитал повышает возбуждающее действие ГАМК и усиливает эпилептиформную активность в нейронах ЗЭФ

Срезы, приготовленные из ЗЭФ, генерируют спонтанные эпилептиформные интериктальные разряды с частотой в интервале 0,10–0,25 Гц. Фенобарбитал значительно увеличивал частоту интериктальных событий (на 71 ± 10 %, $p < 0,001$) и общую частоту спайков (на 65 ± 11 %, $p < 0,001$, $n = 20$), которые генерировались во время и между интериктальными разрядами.

Таким образом, фенобарбитал усиливает эпилептиформную активность в срезах ЗЭФ.

Мы протестировали действие ФБ на вызванные ответы нейронов в срезах ЗЭФ с использованием неинвазивного метода пэтч-кламп регистрации в конфигурации *cell-attached*. В этих условиях локальная аппликация ГАМК на пирамидальные клетки СА3 поля генерировала $4,0 \pm 0,3$ спайка. Такая же стимуляция, но в присутствии ФБ, вызывала достоверно большее количество спайков ($5,4 \pm 0,4$ спайка, $p < 0,01$, $n = 7$).

Таким образом, ФБ усиливает возбуждающее действие ГАМК в нейронах ЗЭФ, возможно, из-за перманентно повышенной концентрации внутриклеточных ионов хлора в результате нарушения функционирования хлорных котранспортеров.

Функциональная сохранность НКСС1 и даун-регуляция КСС2 в нейронах ЗЭФ

Нами показано, что постоянная перфузия контралатерального гиппокампа антагонистом НКСС1 не предотвращала формирование ЗЭФ. В экспериментах мы использовали препарат целого гиппокампа нокаутных мышей (P7–P8), у которых НКСС1 генетически поврежден (НКСС1^{-/-}). Как в гиппокампах контрольных мышей (дикого типа), так и в гиппокампах, приготовленных из НКСС1^{-/-} мышей, аппликация КА генерировала иктальные разряды с ВЧО. Повторная аппликация КА на один гиппокамп сопровождалась формированием

ЗЭФ ($n = 5/5$). Поэтому можно предположить, что функциональная целостность котранспортера NKCC1 не является необходимым условием формирования ЗЭФ.

Поскольку в незрелых клетках классический метод – пэтч-кламп регистрация в конфигурации *whole-cell* – дает значительную ошибку при измерении потенциала покоя (Tyzio et al., 2003), в экспериментах мы использовали неинвазивный метод пэтч-кламп регистрации токов одиночных ионных каналов ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов. Движущую силу ГАМК-опосредованных ответов ($ДС_{ГАМК}$) рассчитывали по вольт-амперной характеристике токов, протекающих через каналы ГАМК(A)-рецепторов (Tyzio et al., 2006). Потенциал покоя нейронов определяли по вольт-амперной характеристике токов, протекающих через одиночные каналы NMDA-рецепторов (Leinekugel et al., 1997).

В контрольных нейронах среднее значение $ДС_{ГАМК}$ было положительным ($13,24 \pm 12,16$ мВ). Аппликация буметанида (10 мкмоль) приводила к почти полному исчезновению деполяризующей $ДС_{ГАМК}$ ($2,56 \pm 3,84$ мВ), что указывает на участие NKCC1 в деполяризующем действии ГАМК в контрольных нейронах. Об этом прямо свидетельствует также значение $ДС_{ГАМК}$ ($-2,08 \pm 6,27$ мВ) в нейронах NKCC1^{-/-} мышей. В нейронах ЗЭФ деполяризующая $ДС_{ГАМК}$ была значительно выше ($37,28 \pm 8,08$ мВ), а величина E_m не отличалась от величины E_m контрольных нейронов ($75,2 \pm 5,4$ мВ ($n = 10$) и $78,5 \pm 2,3$ мВ ($n = 14$) соответственно, $p = 0,08$), что указывает на перманентное повышение $[Cl^-]_i$ в нейронах ЗЭФ. Следует отметить, что буметанид (10 мкмоль) значительно сильнее снижает $ДС_{ГАМК}$ в нейронах ЗЭФ, чем в контрольных нейронах. Это свидетельствует о том, что в нейронах ЗЭФ NKCC1 полностью функционален и обладает повышенной активностью. Однако в то время как значения $ДС_{ГАМК}$ в контрольных нейронах в присутствии буметанида и в нейронах NKCC1^{-/-} мышей находятся около 0 мВ, в тех же нейронах ЗЭФ деполяризующая $ДС_{ГАМК}$ в присутствии буметанида остается значительно повышенной ($14,19 \pm 7,64$ мВ ($n = 18$) и $19,09 \pm 2,71$ мВ ($n = 26$) соответственно). Поэтому логично

предположить, что в основе перманентного положительного сдвига $E_{\text{ГЛМК}}$ в нейронах ЗЭФ лежат другие механизмы.

Так как КСС2 нокаутные мыши (КСС2^{-/-}) погибают при рождении, то для изучения роли КСС2 в регуляции $[Cl^-]_i$ в контрольных нейронах и в нейронах ЗЭФ мы использовали антагонисты КСС2. В контрольных нейронах деполяризирующая $ДС_{\text{ГЛМК}}$ в присутствии буметанида практически отсутствовала. Блокирование КСС2 добавлением более высокой концентрации буметанида (100 мкмоль), блокирующего как НКСС1, так и КСС2 (Payne, 1997), или другого блокатора КСС2 – ДЮА (10 мкмоль) (Boulenguez et al., 2010) приводило к выраженному положительному сдвигу $ДС_{\text{ГЛМК}}$ (до $27,73 \pm 8,78$ и $29,06 \pm 4,36$ мВ соответственно).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о критически важной роли КСС2 в регуляции $[Cl^-]_i$ и $ДС_{\text{ГЛМК}}$ в контрольных нейронах.

В аналогичных экспериментах с нейронами ЗЭФ нами получены иные результаты. Блокирование НКСС1 низкой концентрацией буметанида (10 мкмоль) значительно снижало $ДС_{\text{ГЛМК}}$ в нейронах ЗЭФ (с ~ 37 мВ до 15 мВ). Примерно такое же значение $ДС_{\text{ГЛМК}}$ было в НКСС1^{-/-} нейронах. Поэтому очевидно, что НКСС1 играет значительную роль в регуляции $[Cl^-]_i$ и в нейронах ЗЭФ. Однако одновременная блокада НКСС1 и КСС2 не приводила к значительным изменениям $ДС_{\text{ГЛМК}}$, что указывает на сниженную функцию КСС2 в нейронах ЗЭФ. Поэтому причиной повышенной деполяризирующей $ДС_{\text{ГЛМК}}$ в нейронах ЗЭФ, кроме возможной повышенной активности НКСС1, может быть и пониженная активность КСС2.

Замедленное выведение ионов хлора из нейронов ЗЭФ обусловлено даун-регуляцией КСС2

Чтобы сравнить кинетику вывода ионов хлора из нейронов контрольного гиппокампа и гиппокампа после формирования ЗЭФ, мы использовали уже известную экспериментальную парадигму (Zhu et al., 2005; Achilles et al., 2007; Brumback, Staley, 2008), но с некоторыми модификациями. Вкратце, нейроны регистрировали перфорированным пэтч-кламп методом в конфигурации *voltage-*

clamp в присутствии антагонистов глутаматных рецепторов. Потенциал фиксации мембраны (V_{ϕ}) подбирали таким образом, чтобы при локальной аппликации ГАМК (200 мкмоль) не возникал ток, т. е. $V_{\phi} = E_{\text{ГАМК}}$. ГАМК апплицировали локально с помощью обычной стеклянной пэтч-пипетки через каждые 20 с посредством пневматического иньектора. Затем подавали прямоугольную ступеньку потенциала (до $V_{\phi} = 0$ мВ; 3 аппликации ГАМК). Сразу после деполяризующей ступеньки на аппликацию ГАМК во всех экспериментах возникал входящий ток, который со временем прогрессивно уменьшался до исходной величины. Время восстановления входящего тока к исходной величине является хорошим индикатором эффективности функционирования КСС2.

Анализ экспериментальных данных показал, что в нейронах ЗЭФ, по сравнению с контрольными нейронами, время восстановления полярности входящего тока было значительно (в 5 раз) больше ($68,4 \pm 7,8$ с – в контрольных нейронах ($n = 18$), $306,0 \pm 33,5$ с – в нейронах ЗЭФ ($n = 6$), $p < 0,001$). О том, что время рекупирации тока зависит в значительной степени от активности КСС2, свидетельствуют и эксперименты с блокатором этого котранспортера ДЮА и с буметанидом (100 мкмоль), в которых возвращение тока к исходной величине не происходило даже через 10 минут.

Интернализация КСС2 в нейронах ЗЭФ

Используя специфичные к КСС2 антитела, исследовали распределение данного котранспортера в нейронах крыс и мышей в контрольных срезах и в нейронах ЗЭФ.

В нейронах контрольных крыс и мышей КСС2 был главным образом локализован около мембраны тела и дендритов СА3 пирамидальных клеток. Маркеры КСС2 в клетках часто были локализованы в виде кластеров. В нейронах ЗЭФ маркеры КСС2 в СА3 пирамидальных клетках были расположены не около мембраны, а в основном внутри клеток, что свидетельствует об интернализации КСС2 в процессе формирования

эпилептического очага. Различия в локализации КСС2 в контрольных клетках и в нейронах ЗЭФ были статистически достоверными.

Буметанид предотвращает аггравацию эпилептиформной активности, вызываемую фенobarбиталом в ЗЭФ

Поскольку буметанид значительно уменьшает $[Cl^-]_i$ и деполяризующую $DC_{ГЛМК}$ в нейронах ЗЭФ, мы предположили, что буметанид может ослаблять или нивелировать проэпилептическое действие ФБ в эпилептическом очаге. Одновременная аппликация буметанида и ФБ приводила к ослаблению или к блокированию эпилептиформных разрядов. Однако очередность их аппликации имеет важное значение. Аппликация ФБ первым сопровождалась аггравацией разрядов. Если же первым апплицировали буметанид, то наблюдалось значительное уменьшение спонтанных сетевых разрядов, которые при добавлении буметанида превращались в разряды, сопоставимые с физиологическими ГДП.

2.6. Фенobarбитал ингибирует AMPA/каинат рецептор-опосредованные токи и, в отличие от диазепам, на начальных этапах эпилептогенеза оказывает ингибирующее действие

На данном этапе исследования, используя модель ЗЭФ, мы сравнили эффекты ФБ и ДЗП на глутамат-рецептор-опосредованные токи в контрольных нейронах и в нейронах эпилептического фокуса.

Диазепам аггравировает иктальные разряды и не предотвращает формирование ЗЭФ

Нами показано, что аппликация ФБ в контралатеральный гиппокамп сопровождалась выраженным ингибированием распространяющихся иктальных разрядов и предотвращением формирования ЗЭФ. Аппликация ДЗП в таких же экспериментах, напротив, приводила к усилению распространяющихся иктальных разрядов и не предотвращала формирования ЗЭФ.

Считается, что ВЧО являются важным фактором, определяющим патогенный эффект иктальных разрядов. Показано, что ВЧО (> 60 Гц), как при эпилепсии у людей, так и на экспериментальных моделях эпилепсии

у животных, являются одним из основных признаков чрезмерной патогенности эпилептических разрядов (Bragin et al., 1999; Khalilov et al., 2005; Jacobs et al., 2008). Как уже продемонстрировано нами экспериментально, в препарате интактного гиппокампа наличие ВЧО во время распространяющихся иктальных разрядов является одним из определяющих условий формирования ЗЭФ. В этих экспериментах ФБ значительно уменьшал частоту ВЧО и мощность иктальных разрядов, а ДЗП, напротив, увеличивал диапазон ВЧО, мощность и амплитуду иктальных разрядов контралатерального гиппокампа на $19,2 \pm 3,9 \%$ ($p < 0,05$, $n = 7$) и не предотвращал формирование ЗЭФ.

Таким образом, ФБ и ДЗП в незрелом гиппокампе имеют противоположные эффекты: ФБ ослабляет, а ДЗП аггавирует ранние иктальные разряды.

Диазепам усиливает эпилептиформную активность в зеркальном эпилептическом фокусе

В препарате целого гиппокампа после формирования ЗЭФ аппликация ДЗП значительно увеличивала частоту, амплитуду и длительность спонтанных иктальных разрядов и, соответственно, их общую спектральную мощность. Средняя спектральная мощность спонтанных иктальных разрядов после аппликации ДЗП увеличивалась на $80,0 \pm 19,8 \%$ ($p < 0,001$, $n = 4$). В срезах, приготовленных из ЗЭФ, ДЗП также увеличивал частоту спонтанных спайков и интериктальных разрядов. Как уже было описано выше, в таких же экспериментах ФБ аггавировал эпилептиформную активность в ЗЭФ. Таким образом, эффекты ФБ и ДЗП на эпилептическую активность зависят от стадии эпилептогенеза и даже могут полярно отличаться на разных стадиях эпилептогенеза. Если первичные разряды блокируются ФБ, но усиливаются ДЗП, то спонтанные разряды в уже сформированном ЗЭФ усиливаются обоими препаратами. Если проэпилептические эффекты обоих препаратов на поздних этапах эпилептогенеза наиболее вероятно объясняются положительным сдвигом $E_{\text{ГАМК}}$ и усилением ГАМКергического возбуждения, то их противоположные эффекты на ранних этапах эпилептогенеза (когда эпилептогенных сдвигов $E_{\text{ГАМК}}$ еще нет), вероятно, связаны с эффектами,

не опосредованными ГАМК(А)-рецепторами. Поэтому на следующем этапе исследования нами был проведен детальный фармакологический анализ ФБ и ДЗП, который включал исследование эффектов этих препаратов на физиологические паттерны активности в срезах гиппокампа, а также на синаптические ответы, опосредованные рецепторами глутамата.

Диазепам усиливает физиологическую нейрональную активность гиппокампа

Изучение фармакологических свойств ФБ и ДЗП проводили на срезах, полученных из контрольных гиппокампов. В контрольных условиях нейрональная активность незрелого гиппокампа характеризуется спонтанными спайками и ГДП. Аппликация ДЗП приводила к увеличению частоты ГДП на $215,1 \pm 13,6 \%$ ($p < 0,001$, $n = 14$) и частоты спайков на $170,0 \pm 14,8 \%$ ($p < 0,001$, $n = 14$). В таких же экспериментах ФБ, напротив, уменьшал частоту спонтанных спайков примерно на 50 %.

С целью изучения действия ДЗП на постсинаптические ГАМКергические ответы были протестированы эффекты ДЗП на фокальную аппликацию ГАМК. Аппликация ГАМК приводила к генерации ГДП. Аппликация ДЗП сопровождалась значительным увеличением как амплитуды и длительности постсинаптических токов (на $39,7 \pm 7,1 \%$ и $51,4 \pm 7,2 \%$ соответственно), так и общего заряда и времени полуспада. Также наблюдалось незначительное увеличение (на $17,2 \pm 2,7 \%$, $p < 0,05$, $n = 5$) амплитуды внеклеточно регистрируемых ГДП и значительное увеличение (на $98,1 \pm 6,7 \%$, $p < 0,001$) количества ГДП-ассоциированных спайков.

Таким образом, нами показано, что в физиологических условиях ФБ ослабляет нейрональную и сетевую активность, а ДЗП, наоборот, их увеличивает. Полученные данные также указывают на то, что эффекты ФБ могут быть обусловлены и другими механизмами, не опосредованными ГАМК-рецепторами.

Фенобарбитал ингибирует AMPA/каинат-рецептор-опосредованные интериктальные разряды

Для того чтобы сравнить эффекты ДЗП и ФБ на глутаматергическую синаптическую передачу, в контрольных срезах гиппокампа внеклеточными

электродами регистрировали спонтанные и вызванные ответы в присутствии антагонистов ГАМК(А)- и NMDA-рецепторов: бикикуллина (10 мкмоль), CGP 55845 (2 мкмоль) и APV (40 мкмоль). В этих условиях по принципу «всё или ничего» генерировались спонтанные и вызванные интериктальные разряды. Интериктальные разряды были опосредованы активацией AMPA/каинатных рецепторов, поскольку они полностью блокировались селективным антагонистом этих рецепторов CNQX. В этих экспериментах ($n = 7$) ФБ полностью блокировал спонтанную и вызванную интериктальную и спайковую активность. Аппликация ДЗП в этих условиях, в отличие от ФБ, не оказывала существенного влияния ни на вызванную, ни на спонтанную нейрональную активность. Таким образом, ФБ, в отличие от ДЗП, обладает ингибирующими свойствами, не опосредованными активацией ГАМК(А)-рецепторов.

Фенобарбитал, в отличие от диазепамы, ингибирует AMPA/каинат-рецептор-опосредованные постсинаптические токи

Для сравнения эффектов ДЗП и ФБ на AMPA/каинат-рецепторы нами были исследованы их эффекты на постсинаптические токи в ответ на локальную аппликацию глутамата. В присутствии антагонистов ГАМК(А)- и NMDA-рецепторов локальная аппликация глутамата в СА3 пирамидальные клетки сопровождалась генерацией высокоамплитудных постсинаптических токов, которые почти полностью блокировались CNQX. ФБ значительно (на $67,2 \pm 8,1 \%$, $p < 0,001$, $n = 4$) уменьшал амплитуду этих токов. Данный эффект ФБ был полностью обратимым. ДЗП в аналогичных экспериментах не вызывал статистически достоверного изменения токов.

Кроме того, мы исследовали действие ДЗП и ФБ на постсинаптические токи, опосредованные активацией NMDA-рецепторов. В присутствии антагонистов AMPA/каинат- и ГАМК(А)-рецепторов в омывающем растворе локальная аппликация глутамата (100 мкмоль, 100 мс) генерировала (при фиксации потенциала клетки на уровне +40 мВ) высокоамплитудные выходящие токи. Эти эксперименты показали, что ни ФБ, ни ДЗП существенно не изменяли амплитуду глутамат-опосредованных ответов.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что ФБ селективно ингибирует постсинаптические AMPA/каинат-рецептор-опосредованные токи.

Пре- и постсинаптические эффекты фенobarбитала на AMPA-рецептор-опосредованные возбуждающие постсинаптические токи

С целью изучения пре- и постсинаптических механизмов, лежащих в основе ингибирующего действия ФБ, мы регистрировали AMPA-рецептор-опосредованные возбуждающие постсинаптические токи (ВПСТ). В присутствии антагонистов ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов подавалась минимальная электрическая стимуляция, чтобы вызвать моносинаптические ВПСТ по принципу «всё или ничего». В этих экспериментах ФБ увеличивал количество выпадений AMPA-рецептор-зависимых ВПСТ на $92,1 \pm 30,1 \%$ ($p < 0,001$, $n = 8$). В параллельных экспериментах в присутствии ТТХ регистрировали миниатюрные AMPA-рецептор-опосредованные ВПСТ. Аппликация ФБ сопровождалась достоверным уменьшением амплитуды на $28,9 \%$ (с $25,9 \pm 1,4$ до $20,1 \pm 0,9$ пА, $p < 0,01$, $n = 8$) и частоты мВПСТ на $38,6 \pm 8,0 \%$ ($p < 0,01$, $n = 8$).

Таким образом, ФБ оказывает селективное, не связанное с ГАМК(A)-рецепторами, ингибирующее действие на AMPA/каинат-рецептор-опосредованные токи.

Сохранность ингибирующего действия фенobarбитала на AMPA/каинат-рецепторы нейронов в зеркальном эпилептическом фокусе

Срезы, полученные из гиппокампа после формирования ЗЭФ, генерируют спонтанную интериктальную активность. Блокада ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов в этих срезах сопровождалась трансформацией интериктальных разрядов в AMPA/каинат-рецептор-опосредованные иктальные разряды. Аппликация ФБ в этих условиях статистически достоверно уменьшала амплитуду (на $22,7 \pm 4,2 \%$, $p < 0,001$, $n = 5$) и частоту иктальных разрядов: усредненный интервал между иктальными разрядами в присутствии ФБ увеличивался на $318,1 \pm 66,5 \%$ ($p < 0,001$, $n = 5$). Аппликация ФБ также приводила к значительному уменьшению спектральной мощности иктальных разрядов (на $26,9 \pm 7,2 \%$, $p < 0,001$, $n = 5$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения диссертационной работы разработаны новые интактные препараты *in vitro* для исследования генерации и распространения сетевой активности в структурах лимбической системы незрелого мозга. Морфологические исследования продемонстрировали, что интактные препараты могут быть также чрезвычайно успешно применены для детального изучения морфологии нейронов, и, в отличие от препаратов тонких срезов, позволяют полностью реконструировать все дендритные и аксонные разветвления нейронов, получить их трехмерную реконструкцию и исследовать нейрональные связи между структурами лимбической системы.

Еще одним преимуществом препарата интактного гиппокампа является то, что в гиппокампе P3–P4 крысят аппликация КА вызывает длительные (1–2 мин) классические тонико-клонические иктальные разряды, характерные для детей раннего возраста с генерализованными тонико-клоническими судорогами. В традиционных тонких срезах гиппокампа P6–P7 крысят аппликация КА вызывает только короткие (несколько сотен мс) интериктальные разряды, которые, в отличие от иктальных разрядов, сопровождаются лишь незначительным увеличением внеклеточной концентрации ионов калия и кальция. Неспособность срезов гиппокампа генерировать иктальные разряды может объясняться тем, что: 1) во время их приготовления разрушаются многие межнейрональные синаптические связи и количество нейронов, минимально необходимых для генерации иктального разряда, становится недостаточным; 2) в тонких срезах, по сравнению с целым гиппокампом, ухудшены условия для экстраинаптических и полевых взаимодействий, а также для аккумуляции внеклеточных ионов калия. Следовательно, можно предположить, что для исследования генерации и распространения физиологических и эпилептиформных разрядов в незрелом мозге разработанные нами интактные препараты, по сравнению со срезами, являются более релевантными. На это указывает и тот факт, что в настоящее время препарат целого гиппокампа

используется в ведущих лабораториях Германии, Канады, России, США, Финляндии, Франции и других стран.

Комбинированные препараты гиппокампа, включающие септум и/или энторинальный кортекс, позволяют исследовать особенности проведения эпилептических разрядов между структурами лимбической системы уже в первую постнатальную неделю. Наши эксперименты показали, что: 1) усиление эпилептиформной активности в СА3 пирамидальных клетках гиппокампа с возрастом происходит параллельно с увеличением КА-вызванных постсинаптических токов; 2) гиппокамп является первичной структурой, генерирующей пароксизмальную активность в ответ на действие КА, и распространение этой активности в другие структуры лимбической системы является возрастзависимым.

Использование препарата, состоящего из двух взаимосвязанных комиссуральными волокнами гиппокампов и камеры с тремя отсеками, позволило разработать модель вторичного эпилептогенеза *in vitro*, с помощью которой были экспериментально выявлены основные механизмы и условия формирования вторичного эпилептического очага в незрелом мозге. Во-первых, наши эксперименты продемонстрировали, что: 1) иктальные разряды, вызванные в одном гиппокампе, проводятся в контралатеральный гиппокамп, 2) многократно (14–15 раз) повторяющиеся иктальные разряды способны превратить контралатеральный гиппокамп в ЗЭФ. Во-вторых, спонтанные или вызванные эпилептиформные разряды регистрируются также и в тонких срезах, приготовленных из контралатерального гиппокампа после формирования ЗЭФ. В-третьих, эпилептиформные разряды, возникающие в ЗЭФ, распространяются и в другие структуры лимбической системы, включая септум и энторинальную кору, что указывает на то, что киндлинг-эффект не ограничивается только контралатеральным гиппокампом. В-четвёртых, одним из важных условий формирования ЗЭФ является активация ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов во время иктальных разрядов. В-пятых, иктальные разряды без ВЧО

не сопровождаются возникновением ЗЭФ. Это указывает на то, что существует прямая связь между наличием ВЧО в иктальных разрядах и возникновением эпилептического очага. Поэтому можно предложить рассматривать наличие ВЧО в распространяющихся иктальных разрядах в качестве биомаркера эпилептогенности этих разрядов и серьёзной опасности возникновения вторичного эпилептического очага.

На основании данных, полученных в рамках диссертационного исследования, была сформулирована концепция «порочного круга» вторичного эпилептогенеза, который представляет собой каскад патофизиологических изменений в развивающемся гиппокампе, возникающих вследствие эпилептических разрядов и приводящих к формированию устойчивого вторичного эпилептического очага (Рис. 4).

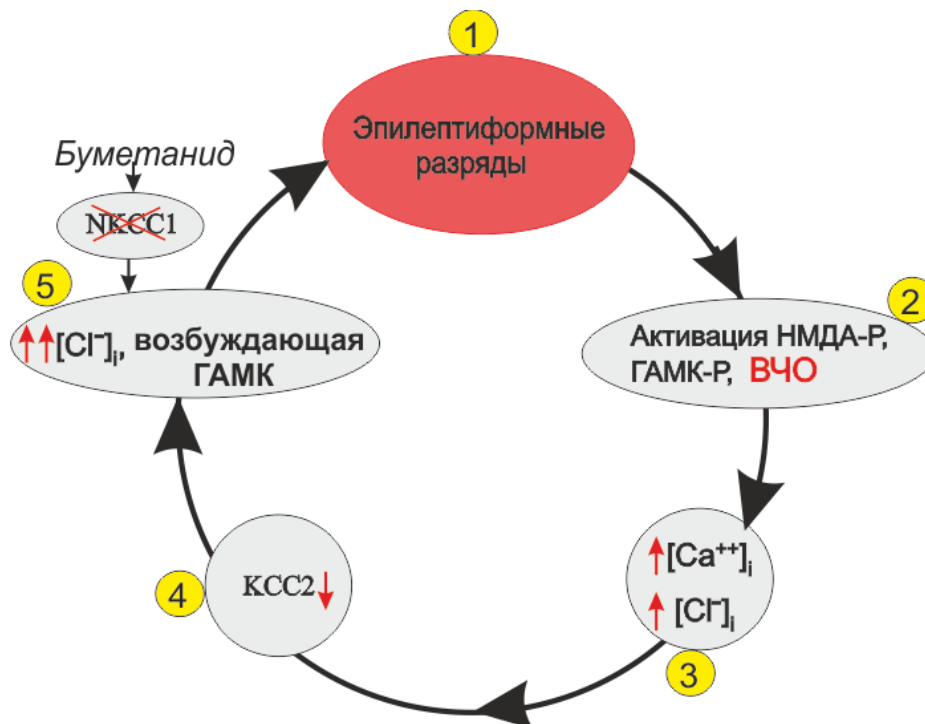


Рис. 4. «Порочный круг» вторичного эпилептогенеза

1) В исходных условиях баланс между возбуждением и торможением в гиппокампе предотвращает возникновение сверхсинхронной высокоамплитудной активности, которая характерна для эпилептических разрядов.

2) При проведении эпилептиформных разрядов из одного гиппокампа в контралатеральный запускаются процессы индукции эпилептогенеза, в основе которых лежит коактивация ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов, которая приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов хлора в нейронах формирующегося ЗЭФ. Прекурсором долговременных эпилептиформных изменений является наличие в эпилептиформных разрядах ВЧО, необходимым условием генерации которых также является коактивация ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов.

3) Основной причиной повышения внутриклеточной концентрации ионов хлора, а также снижения способности нейронов выводить ионы хлора в процессе эпилептогенеза является дисфункция хлорного экстрадера KCC2 в результате его интернализации посредством все еще не установленных внутриклеточных регуляторных каскадов.

4) Обусловленные снижением активности KCC2 нарушения внутриклеточного хлорного гомеостаза приводят к сдвигу потенциала реверсии синаптических ответов, опосредованных ГАМК(A)-рецепторами, в положительную сторону. В результате в нейронах ЗЭФ формируется стойкий возбуждающий ГАМК(A)-фенотип, что и является основным механизмом экспрессии эпилептогенного процесса. При этом на сетевом уровне происходит сдвиг баланса в сторону возбуждения, что в результате приводит к формированию ЗЭФ, способного самостоятельно генерировать эпилептическую активность и вновь запускать очередной цикл «порочного круга» вторичного эпилептогенеза.

5) Разорвать «порочный круг» вторичного эпилептогенеза возможно на уровне индукции путем блокирования ГАМК(A)- и NMDA-рецепторов и предотвращения таким образом ВЧО. В уже сформированном очаге подавление эпилептиформной активности возможно путем коррекции внутриклеточного гомеостаза ионов хлора посредством блокирования хлорного котранспортера NKCC1 селективным антагонистом буметанидом.

ВЫВОДЫ

1. Разработанные нами в процессе диссертационного исследования препараты целого и двойного гиппокампа, а также энторинально-гиппокампально-септального комплекса новорожденных крыс *in vitro* обладают рядом преимуществ перед препаратами тонких срезов, так как позволяют: а) полностью реконструировать дендритные и аксонные разветвления пирамидальных клеток и интернейронов и получить их трехмерную реконструкцию; б) исследовать межструктурные связи в лимбической системе и процессы генерации и распространения синхронизированной сетевой активности внутри и между структурами лимбической системы новорожденных крыс и мышей.

2. Исследования возрастных изменений в генерации и распространении вызванных КА эпилептиформных разрядов позволили сделать ряд важных наблюдений: а) возрастзависимое усиление эпилептиформной активности в гиппокампе в течение первой постнатальной недели происходит параллельно с увеличением КА-вызванных постсинаптических токов в СА3 пирамидальных нейронах; б) гиппокамп является первичной структурой, генерирующей пароксизмальные разряды в лимбической системе новорожденных крыс в ответ на действие КА; распространение этих разрядов в другие структуры лимбической системы является возрастзависимым; в) в препарате целого гиппокампа иктальные разряды могут быть вызваны в намного более раннем возрасте, чем в тонких срезах.

3. Повторные иктальные разряды, вызванные КА в препарате целого гиппокампа, могут инициировать долговременную эпилептиформную трансформацию активности нейрональной сети гиппокампа, проявляющуюся спонтанными пароксизмальными разрядами, персистирующими в течение нескольких дней. Иктальные разряды проводятся через комиссуральные волокна в контралатеральный гиппокамп, где также могут вызывать формирование ЗЭФ.

4. Необходимым условием долговременных эпилептиформных изменений и формирования ЗЭФ в гиппокампе новорожденных крыс является активация ГАМК(А)- и NMDA-рецепторов и наличие ВЧО во время повторных

распространяющихся иктальных разрядов. Наличие ВЧО в иктальных разрядах является достоверным биомаркером эпилептогенного процесса. Антагонисты ГАМК(А)-рецепторов обладают иктогенным действием, но предотвращают формирование ЗЭФ. В срезах гиппокампа взрослых крыс, в отличие от новорожденных крыс, блокирование ГАМК(А)-рецепторов не предотвращает эпилептогенез.

5. Формирование ЗЭФ в гиппокампе новорожденных крыс сопровождается усилением возбуждающего действия ГАМК на СА3 пирамидальные клетки гиппокампа, что обусловлено положительным сдвигом потенциала реверсии токов через ГАМК(А)-рецепторы. Повышение внутриклеточной концентрации ионов хлора и замедление скорости выведения ионов хлора из нейронов ЗЭФ обусловлены дисфункцией котранспортера КСС2 в результате его интернализации.

6. Восстановление хлорного гомеостаза и снижение возбуждающего действия ГАМК на нейроны ЗЭФ с помощью селективного блокатора катионно-хлорного котранспортера НКСС1 буметанида не предотвращают формирование ЗЭФ, но блокируют эпилептиформную активность в уже сформированном ЗЭФ.

7. Генетическое устранение НКСС1 также не препятствует формированию ЗЭФ, но, в отличие от фармакологического блокирования котранспортера НКСС1 буметанидом, не оказывает антиэпилептического действия в нейронах ЗЭФ.

8. Аллостерические модуляторы ГАМК(А)-рецепторов ФБ и ДЗП по-разному влияют на вторичный эпилептогенез. Диазепам не предотвращает ни генерацию, ни проведение КА-вызванных иктальных разрядов, ни формирование ЗЭФ. Фенобарбитал подавляет проведение иктальных разрядов и предотвращает вторичный эпилептогенез, что обусловлено дополнительным ингибирующим действием ФБ на AMPA/каинат-рецептор-опосредованные постсинаптические токи. В уже сформированном ЗЭФ оба препарата, и ФБ и ДЗП, усиливают возбуждающее действие ГАМК и аггравируют эпилептиформную активность. Блокада котранспортера НКСС1 буметанидом предотвращает аггравацию эпилептиформной активности, генерируемую ФБ в нейронах ЗЭФ.

**СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ
ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Khalilov I.**, Khazipov R., Esclapez M., Ben-Ari Y. (1997) Bicuculline induces ictal seizures in the intact hippocampus recorded in vitro // *European Journal of Pharmacology*. – V. 319 (2–3). – P. R5–R6.
2. **Khalilov I.**, Esclapez M., Medina I., Aggoun J., Lamsa K., Leinekugel X., Khazipov R., Ben-Ari Y. (1997) A novel in vitro preparation: the intact hippocampal formation // *Neuron*. – V. 19 (4). – P. 743–749.
3. Khazipov R., Leinekugel X., **Khalilov I.**, Gaiarsa J. L., Ben-Ari Y. (1997) Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices // *Journal of Physiology* (London). – V. 498 (3). – P. 763–772.
4. Leinekugel X., Medina I., **Khalilov I.**, Ben-Ari Y., Khazipov R. (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus // *Neuron*. – V. 18. – P. 243–255.
5. Leinekugel X., **Khalilov I. A.**, Ben-Ari Y., Khazipov R. N. (1998) Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex in vitro // *Journal of Neuroscience*. – V. 18 (16). – P. 6349–6357.
6. **Khalilov I.**, Dzhala V., Medina I., Leinekugel X., Melyan Z., Lamsa K., Khazipov R., Ben-Ari Y. (1999) Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures in vitro // *European Journal of Neuroscience*. – V. 11. – P. 3468–3480.
7. **Khalilov I.**, Dzhala V., Ben-Ari Y., Khazipov R. (1999) Dual role of GABA in the neonatal rat hippocampus // *Developmental Neuroscience*. – V. 21. – P. 310–319.
8. Leinekugel X., **Khalilov I.**, McLean H., Caillard O., Gaiarsa J.-L., Ben-Ari Y., Khazipov R. (1999) GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain // *Advances in neurology*. – V. 79. – P. 189–201.
9. **Khalilov I.**, Morozova E., Gozlan H. (2002) Status epilepticus induced by propagating seizures in the neonatal rat hippocampus in vitro // *Epilepsies*. – V. 14 (3). – P. 195–201.
10. **Khalilov I.**, Holmes G. L., Ben-Ari Y. (2003) In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures // *Nature Neuroscience*. – V. 6. – P. 1079–1085.

11. Khazipov R., **Khalilov I.**, Tyzio R., Morozova E., Ben-Ari Y., Holmes G. L. (2004) Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus // *European Journal of Neuroscience*. – V. 19 (3). – P. 590–600.
12. **Khalilov I.**, Le Van Quyen M., Gozlan H., Ben-Ari Y. (2005) Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus // *Neuron*. – V. 48 (5). – P. 787–796.
13. Le Van Quyen M., **Khalilov I.**, Ben-Ari Y. (2006) The dark side of high-frequency oscillations in the developing brain // *Trends in Neuroscience*. – V. 29 (7). – P. 419–427.
14. Nardou R., Ben-Ari Y., **Khalilov I.** (2009) Bumetanide, an NKCC1 antagonist, does not prevent formation of epileptogenic focus but blocks epileptic focus seizures in immature rat hippocampus // *Journal of Neurophysiology*. – V. 101 (6). – P. 2878–2888.
15. Tyzio R., **Khalilov I.**, Represa A., Crepel V., Zilberter Y., Rheims S., Aniksztejn L., Cossart R., Nardou R., Mukhtarov M., Minlebaev M., Epsztein J., Milh M., Becq H., Jorquera I., Bulteau C., Fohlen M., Oliver V., Dulac O., Dorfmueller G., Delalande O., Ben-Ari Y., Khazipov R. (2009) Inhibitory actions of the gamma-aminobutyric acid in pediatric Sturge-Weber syndrome // *Annals of Neurology*. – V. 66 (2). – P. 209–218.
16. Ben-Ari Y., **Khalilov I.** Seizures beget seizures in the developing and adult brains (2009) // In: Philip A. Schwartzkroin, editor Encyclopedia of *Basic Epilepsy Research*. – V. 2. – Oxford: Academic Press. – P. 1019–1023.
17. Nardou R., Yamamoto S., Chazal G., Bhar A., Ferrand N., Dulac O., Ben-Ari Y., **Khalilov I.** (2011) Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital // *Brain*. – V. 134 (Pt 4). – P. 987–1002.
18. Nardou R., Yamamoto S., Bhar A., Burnashev N., Ben-Ari Y., **Khalilov I.** (2011) Phenobarbital but not diazepam reduces ampa/kainate receptor mediated currents and exerts opposite actions on initial seizures in the neonatal rat hippocampus // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – V. 5. – A. 16.
19. **Khalilov I.**, Chazal G., Chudotvorova I., Pellegrino C., Corby S., Ferrand N., Gubkina O., Nardou R., Tyzio R., Yamamoto S., Jentsch T. J., Hübner C. A., Gaiarsa J. L., Ben-Ari Y., Medina I. (2011) Enhanced synaptic activity and

- epileptiform events in the embryonic *kcc2* deficient hippocampus // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – V. 5. – A. 23.
20. Ben-Ari Y., **Khalilov I.**, Kahle K. T., Cherubini E. (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological Disorders // *The Neuroscientist*. – V. 18 (5) – P. 467–486.
21. **Халилов И. А.**, Ситдикова Г. Ф., Хазипов Р. Н., Зефиоров А. Л. (2014) Вторичный эпилептогенез в незрелом мозге: роль ГАМК // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. – Т. 114 (4). – С. 41–51.
22. Khazipov R., Valeeva G., **Khalilov I.** (2015) Depolarizing GABA and developmental epilepsies // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. – V. 21 (2). – P. 83–91.

Е-mail автора: ilgam.khalilov@gmail.com
ilgam.khalilov@inserm.fr

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю диссертационного совета КФУ.03.06 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843) 238 76 01, e-mail: tania57vgl@rambler.ru