

На правах рукописи

БИКБАЕВ АРТУР ФАРИТОВИЧ

**РОЛЬ ПИРИФОРМНОЙ КОРЫ И КОРТИКАЛЬНОГО ЯДРА
МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА В ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ**

03.00.13 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Самара – 2000

Работа выполнена на кафедре морфологии и физиологии человека и животных Башкирского государственного университета

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор С.А. Чепурнов
доктор биологических наук,
профессор Л.Б. Калимуллина

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор А.Н. Инюшкин;
доктор медицинских наук,
профессор И.Е. Поверинова

Ведущая организация: Институт высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии РАН

Защита состоится «14» июня 2000 г. в «13» часов на заседании диссертационного совета К 063.94.10 в Самарском государственном университете по адресу: 443011, Самара, ул. Ак. Павлова, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета.

Автореферат разослан «12» мая 2000 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

О.А. Ведясова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Миндалевидный комплекс (МК) является элементом лимбической системы мозга и играет важную роль в эмоциогенезе, в регуляции процессов обучения и памяти, в обработке сенсорной информации и ряде других высших психических и висцеральных функций (Ильюченко и др., 1981; Чепурнов, Чепурнова, 1981; Акмаев, Калимуллина, 1993; Баклаваджян и др., 1996; Gloor, 1992; McDonald, 1998). Тесные анатомические связи со многими структурами как в пределах лимбической системы, так и в других отделах мозга, а также полиэффektorный характер влияний, оказываемых МК на регуляторные и интегративные процессы в здоровом мозге, обуславливают широкий спектр нарушений при его экспериментальных повреждениях или поражении в случае патологии.

Обширные экспериментальные и клинические данные показывают важное значение МК в патогенезе височной, или лимбической, эпилепсии (ВЭ) (Кандель, 1981; Чепурнов, Чепурнова, 1981; Cain, 1992; Gloor, 1992; Löscher et al., 1998; Pitkänen et al., 1998), одной из наиболее частых форм эпилепсии у человека (Кандель, 1981; Одинак, Дыскин, 1997; Sato et al., 1990; Cain, 1992; Schmidt, 1992; Löscher, Schmidt, 1994; Kelly, 1998; Pitkänen et al., 1998). Протекание данной формы локально обусловленной эпилепсии сопровождается сложными фокальными (парциальными) и вторично-генерализованными припадками (McNamara, 1984; Regesta, Tanganelli, 1999). Одной из особенностей ВЭ является значительная доля фармакорезистентных (рефракторных) случаев, когда с помощью существующих антиэпилептических препаратов (АЭП) не удается купировать припадки или снизить частоту их возникновения (Cain, 1992; Vreugdenhil et al., 1998; Löscher et al., 1998; Bregola et al., 1999).

Одной из наиболее адекватных и широко используемых экспериментальных моделей фокального эпилептогенеза является киндлинг («раскачка») МК, приводящий к возникновению сложных фокальных и вторично-генерализованных припадков, чрезвычайно сходных с припадками височной этиологии у человека (Майковский, 1996; Goddard et al., 1969; Racine, 1972; McNamara, 1984; Löscher et al., 1986, 1998, 1999; Löscher, Schmidt, 1988; Cain, 1992; Toyota et al., 1998). Суть феномена киндлинга заключается в увеличении электрографических и поведенческих показателей судорожной активности при повторяющейся неизменной подпороговой стимуляции, возникающем вследствие прогрессивного снижения судорожного порога (Ильюченко и др., 1981; Чепурнов, Чепурнова, 1981; Goddard et al., 1969; Racine, 1972; Cain, 1986, 1992; Edwards et al., 1999). Исследования киндлинга различных структур мозга показали, что быстрее всего он вырабатывается при стимуляции МК, височной коры, гиппокампа и некоторых областей неокортекса (Goddard et al., 1969; Löscher, Schmidt, 1988; Sato et al., 1998; Wlaz et al., 1998). В ряде исследований было продемонстрировано важное значение пириформной коры (РС) в возникновении и распространении судорожной

электрической активности в процессе киндлинга (Чепурнов, Чепурнова, 1981; Racine, 1972; McIntyre et al., 1982; Cain, 1992; De Curtis et al., 1996, 1999; Löscher, Ebert, 1996; Otsuki et al., 1999). Данные о роли кортикального ядра (СО) в эпилептогенезе малочисленны и противоречивы (Чепурнов, Чепурнова, 1981; Чепурнов и др., 1996; Cain, 1992; Pitkänen et al., 1998).

Между тем, пириформная кора и кортикальное ядро МК мозга имеют значительную ростокаудальную протяженность. Недооценка сложной пространственной организации при исследовании вовлеченности этих структур в механизмы развития эпилептического процесса может являться одной из причин противоречивости получаемых данных.

На основании различий в нейронном составе и анатомических связях, РС подразделяется на передний (РС_I) и задний (РС_{II}) отделы (Акмаев, Калимуллина, 1993; Haberly, Price, 1978; Hönack et al., 1991; Wahnschaffe et al., 1993; Löscher et al., 1995, 1998; De Curtis et al., 1999), а СО – на три отдела: переднее кортикальное ядро (СО_а), периамигдаллярную кору (РАС) и заднее кортикальное ядро (СО_р) (Scalia, Winnans, 1975; Krettek, Price, 1978; McDonald, 1992; Pitkänen et al., 1998; Bertram et al., 1999). При этом СО_а и СО_р рассматриваются как ядерные структуры, а РС и РАС – как палеокортикальные формации (Филимонов, 1958; Мухина, 1970, 1974, 1988; Акмаев, Калимуллина, 1993; Krettek, Price, 1978; Savander, Ledoux, 1981; McDonald, 1992).

В связи с этим, большое теоретическое и практическое значение имеет исследование роли РС и СО в развитии эпилептического процесса с учетом их ростокаудальной протяженности. Малоизученными остаются также взаимоотношения ядерных и палеокортикальных образований при локализации очага патологической активности в миндалевидном комплексе. Необходимо выяснить, каким образом изменения электрографических и поведенческих показателей эпилептогенеза при стимуляции отделов РС и СО зависят от их структурной организации. Кроме того, вызывает большой интерес сравнительный анализ киндлинга СО у самцов и самок, поскольку имеются данные о половых различиях в этой структуре МК (Акмаев, Калимуллина, 1993; Stefanova, 1998; Vinader-Saerols et al., 1998).

Вследствие высокой частоты возникновения фармакорезистентности, большое практическое значение имеют также поиск и последующее внедрение в клиническую практику новых АЭП, эффективных при эпилепсии височной этиологии. Исходя из того, что электрический киндлинг у самцов крыс рассматривается в качестве модели рефракторной эпилепсии (Albright, 1983; Löscher et al., 1986; Rundfeldt, Löscher, 1993), исследование противосудорожных свойств АЭП в рамках данной модели позволяет наиболее адекватно оценить его эффективность у человека.

Целью исследования являлось определение роли пириформной коры и кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга в эпилептогенезе.

Основные задачи исследования

1. Определить факторы, оказывающие наибольшее влияние на судорожную готовность РС и СО с дифференциацией на отделы у самцов.
2. Выявить различия в изменении электроэнцефалографических и поведенческих показателей судорожной активности при ежедневной подпороговой электрической стимуляции РС_I, РС_{II}, СОа, РС и СОр.
3. Сравнить динамику и выраженность эпилептического процесса при стимуляции РС и СО. Дать сравнительную характеристику роли ростокаудальных отделов РС и СО на различных этапах эпилептогенеза.
4. Выявить различия в характере изменений спектрального состава ЭЭГ и поведенческих коррелятов судорожной активности в течение процедуры киндлинга СО, обусловленные фактором пола.
5. Изучить пространственно-временные характеристики эпилептогенеза у самцов с учетом ростокаудального положения и принципа организации серого вещества.
6. Исследовать противосудорожное действие сакрицина на сложные фокальные и вторично-генерализованные эпилептические припадки у крыс на модели электрического киндлинга. Оценить достоверность изменений электрографических и поведенческих показателей судорожной активности под влиянием данного препарата.

Научная новизна

В настоящей работе впервые проведено детальное исследование роли пириформной коры и кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга в эпилептогенезе с учетом их ростокаудальной протяженности. Обнаружено наличие ростокаудального градиента судорожной предрасположенности в пределах этих структур. С помощью метода дисперсионного анализа показано достоверное влияние факторов структурной организации на электроэнцефалографические и поведенческие показатели эпилептического процесса. Проведен сравнительный анализ результатов киндлинга кортикального ядра у самцов и самок.

Полученные результаты свидетельствуют о сложных взаимоотношениях пириформной коры и кортикального ядра на различных этапах эпилептогенеза. Установлено, что ядерные образования играют доминирующую роль в возникновении лимбических стадий, а палеокортикальные формации ответственны главным образом за распространение судорожной активности и возникновение генерализованных стадий припадка.

При сравнении показателей киндлинга ростральных и каудальных частей исследуемых структур выявлены достоверные различия между отделами по динамике изменений ОСП θ -ритма, при этом в переднем отделе происходит ее достоверное увеличение. Также выявлена достоверная зависимость латентного периода генерализации судорожной активности и разработки киндлинга, а также количества I и III стадий от

принадлежности стимулируемого образования к ядерным или палеокортикальным формациям.

Впервые на модели электрического киндлинга, являющейся наиболее адекватной моделью фокальной эпилепсии, проведено исследование противосудорожных свойств нового отечественного препарата сакрицин. Показано, что введение данного препарата значительно снижает активность первичного эпилептического очага и блокирует генерализацию судорожной активности. Установлено, что болюсное введение сакрицина в дозе 200 мг/кг приводит к достоверному снижению относительной спектральной плотности колебаний в α -, β_1 - и β_2 -диапазонах.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты настоящего исследования позволяют подойти к пониманию механизмов, лежащих в основе патогенеза височной эпилепсии и определить перспективы дальнейших исследований участия структур МК мозга в возникновении и генерализации судорожной активности.

Настоящее исследование подтверждает и дополняет представления о наличии в МК ростокаудального градиента, определяющего функциональные различия между его передними и задними частями. Полученные данные о влиянии ростокаудальной локализации очага патологической активности на электроэнцефалографические и поведенческие показатели судорожной активности, а также их зависимости от вовлечения в эпилептический процесс ядерных и корковых формаций, могут быть использованы в фундаментальных исследованиях механизмов эпилептической активности нейронных популяций.

Результаты исследования действия сакрицина на сложные фокальные и вторично-генерализованные припадки у крыс свидетельствуют о его эффективности в качестве АЭП и могут служить показанием для его внедрения в клиническую практику.

Полученные данные могут быть использованы в учебном процессе по биомедицинским специальностям. Возможно практическое применение результатов настоящей работы в экспериментальных исследованиях, направленных на разработку и изучение новых противосудорожных препаратов для терапии фармакорезистентных форм эпилепсии.

Положения, выносимые на защиту

1. Передний и задний отделы пириформной коры и кортикального ядра МК у самцов различным образом вовлечены в процессы возникновения и генерализации судорожной активности.
2. Кортикальное ядро МК имеет важное значение для возникновения лимбических припадков.
3. Сакрицин является эффективным противосудорожным препаратом, блокирующим вторичную генерализацию судорожной активности и обладающим положительным терапевтическим действием на поведенческие показатели эпилептического процесса.

Апробация работы. Апробация работы проведена на кафедре морфологии и физиологии человека и животных Башкирского государственного университета. Основные результаты исследования доложены на научной конференции биологического факультета Башкирского государственного университета (2000).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования. 4 глав полученных данных, их обсуждения, выводов. Она изложена на 183 страницах печатного текста, содержит 17 таблиц и 33 рисунка. Список литературы включает 305 источников, из них 138 отечественных, 167 зарубежных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 82 крысах линии Вистар массой 290-370 г в момент операции. В течение экспериментального цикла крысы содержались в индивидуальных клетках, не испытывая недостатка в воде и пище.

Стереотаксическое вживление биполярных никромовых электродов в различные отделы РС и СО у самцов, и СО у самок производили под эфирным наркозом, руководствуясь координатами атласа мозга крысы (De Groot, 1959). Индифферентный электрод устанавливали в области обонятельных луковиц, для большей прочности крепления электродов в затылочную кость устанавливали небольшой винт из нержавеющей стали. Стимулирующий/регистрирующий электрод всегда располагался в правом полушарии. Для фиксации электродов использовали протакрил-М.

Регистрацию ЭЭГ с возникающими разрядами последствия (РПД) осуществляли монополярно (частота опроса канала 100 с⁻¹, верхняя граница полосы пропускания 100 Гц), с помощью программно-управляемого комплекса, включающего предварительный усилитель модели M 707 (WPI Inc.), выходной усилитель У5-10, IBM-PC совместимый компьютер 486DX4-100 с платой АЦП-ЦАП (DigiLine DL-160), а также электростимулятор.

По прошествии восстановительного периода в 7-10 дней после операции производили регистрацию фоновой ЭЭГ. После этого определяли величину судорожного порога, за которую принимали силу тока стимула, вызывавшего появление I стадии припадка по шкале Racine (1972). Со следующего дня приступали к разработке парциального киндлинга. Ежедневную электрическую стимуляцию исследуемых структур производили один раз в сутки в одно и то же время (18-19 ч) при неизменных параметрах стимула (сила тока 1/2 величины начального судорожного порога, прямоугольные двухфазные импульсы по 10 мс, частота следования 50 Гц, общая длительность 4 с). Критерием завершения парциального киндлинга считали возникновение двух генерализованных (III-V) стадий, соответствующих окончанию формирования

эпилептического фокуса и генерализации судорожной активности (Racine, 1972; Amano et al., 1998). Продолжительность ежедневного сеанса стимуляции и регистрации ЭЭГ у каждой крысы составляла 16-20 минут.

Зарегистрированную в течение сеансов электростимуляции ЭЭГ подвергали визуальному и спектральному анализу. Визуальный анализ был направлен на выявление эпилептиформных паттернов и оценку характера электрической активности стимулируемой структуры. Спектральный анализ на основе алгоритма быстрого преобразования Фурье проводили с использованием весовой функции Парзена в программе «Statistica 5.0» (Statsoft) с целью определения относительной спектральной плотности (ОСП) колебаний в следующих диапазонах – 1-4 Гц (Δ -диапазон), 4-8 Гц (θ -диапазон), 8-13 Гц (α -диапазон), 13-18 Гц (β_1 -диапазон) и 18-32 Гц (β_2 -диапазон). Эпоха анализа равнялась 4 с, усреднение производили по 30-50 эпохам. Полученные в результате спектрального анализа относительные спектральные плотности (ОСП) далее подвергали статистической обработке.

Помимо ЭЭГ, в течение сеанса электростимуляции регистрировали возникающие стадии припадка, которые определяли по шкале Р.Рэйсин (Racine, 1972), и другие поведенческие корреляты судорожной активности (груминг, жевательные движения, мышечный тонус).

Противосудорожные свойства сакрицина исследовали на 9 самцах с завершённым парциальным киндлингом. Приготовленный непосредственно перед введением раствор сакрицина вводили внутрибрюшинно из расчета 200 мг/кг за полчаса до электростимуляции. Параметры стимула использовались те же, что и в процедуре киндлинга.

Морфологический контроль проводили проекционным способом после окончания всех предусмотренных экспериментальных воздействий. После фиксации мозг извлекали из черепа и промывали в проточной воде в течение 12-24 часов. Затем на замораживающем микротоме делали последовательные фронтальные срезы толщиной 20-30 мкм. Содержавшие концы треков срезы переносили на предметные стекла в каплю воды, помещали в фотоувеличитель и проецировали изображение на фотобумагу. При этом использовались стандартные приборы, реактивы и материалы для черно-белой фотографии.

Статистическая обработка полученных данных, проведенная в программе «Statistica 5.0», включала вычисление выборочного среднего, стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего. Результаты исследования приведены далее в форме $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка}$. Оценку значимости различий между выборочными совокупностями и достоверности влияния исследуемых факторов проводили с помощью однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (модуль «ANOVA/MANOVA»), а также, при исследовании свойств сакрицина, t-критерия Стьюдента для зависимых выборок (модуль «Basic Statistics») в программе «Statistica 5.0». Расчет коэффициентов влияния факторов Вандер-Вардена и построение большинства диаграмм производили в программе «Excel 7.0» (Microsoft). За достоверные принимали отличия при

$p < 0,05$. Статистически значимые отличия выделены в таблицах полужирным шрифтом или отмечены звездочками.

При анализе влияния фактора «локализация» сравнено в качестве отдельных выборочных совокупностей подвергали пять структур у самцов – РС_I, РС_{II}, СО_A, РАС и СО_P. Таким образом, этот фактор насчитывал пять градаций.

При анализе зависимости исследуемых параметров эпилептогенеза от отдела, из анализа исключались данные по РАС. В дисперсионном комплексе фактор «отдел» имел две градации: передний отдел объединял данные по СО_A и РС_I, задний – данные СО_P и РС_{II}.

Фактор «структура» также насчитывал две градации: в первую вошли РС_I и РС_{II}, во вторую – СО_A, РАС и СО_P, то есть сравнено подвергали РС и СО у самцов без дифференциации по отделам.

При исследовании зависимости параметров эпилептогенеза от принципа организации серого вещества (фактор «принцип»), сравнивали данные, полученные при стимуляции ядерных – СО_A и СО_P, и палеокортикальных структур – РС_I, РС_{II} и РАС.

Таким образом, у самцов исследовали влияние четырех факторов: «локализация» (5 градаций), «отдел» (2), «структура» (2), «принцип» (2). В двухфакторных моделях вторым исследуемым фактором являлось время, включавшее 12 градаций, соответствующих 12 сеансам ежедневной электрической стимуляции.

Помимо этого, нами были подвергнуты анализу результаты киндлинга СО у самцов и самок без подразделения на отделы, с целью выявления половых различий в развитии эпилептогенеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе визуального анализа ЭЭГ, зарегистрированной в течение сеансов электрической стимуляции ростокаудальных отделов РС и СО, нами обнаружено, что изменения электрической активности стимулируемых образований выражались в увеличении амплитуды разрядов, а также частоты возникновения и продолжительности таких паттернов эпилептиформной активности, как одиночные и множественные спайки и острые волны, участки гиперсинхронного а-ритма высокой амплитуды. По мере развития эпилептического процесса, изменения на ЭЭГ приобретали более устойчивый и выраженный характер. К моменту окончания парциального киндлинга ЭЭГ стимулируемых структур характеризовалась устойчивым присутствием полифазных колебаний амплитудой до 120 мкВ, накладывающихся на нерегулярную медленную активность.

Наряду с повышением средней амплитуды колебаний, ежедневная электрическая стимуляция приводила к возрастанию частоты возникновения участков низкоамплитудной дизритмии («уплощения» ЭЭГ). Они имели четко дифференцируемое начало, выражавшееся в резком падении амплитуды до 5-10 мкВ. Окончание их выражалось, как правило, плавным возрастанием амплитуды и восстановлением исходной ритмики.

Результаты определения величины начального судорожного порога отделов РС и СО у самцов и СО у самок приведены на рис. 1.

В ходе проведенного однофакторного дисперсионного анализа значений судорожного порога у самцов обнаружено, что статистически значимым является только влияние фактора «отдел» (при $p < 0.001$; $F = 15.48$; $n = 28$). Различия между передним и задним отделами по данному показателю достоверны при $p < 0.001$. Коэффициент влияния этого фактора (η^2) составил 37,31%, то есть более трети от общей дисперсии определяется действием этого фактора. Анализ влияния других факторов на величину судорожного порога у самцов показал, что их действие не является статистически значимым. Между тем, хотя влияние фактора «локализация» не является статистически значимым, при сравнении пяти структур между собой выявлены достоверные отличия, определяемые главным образом более высоким порогом СОр (табл. 1).

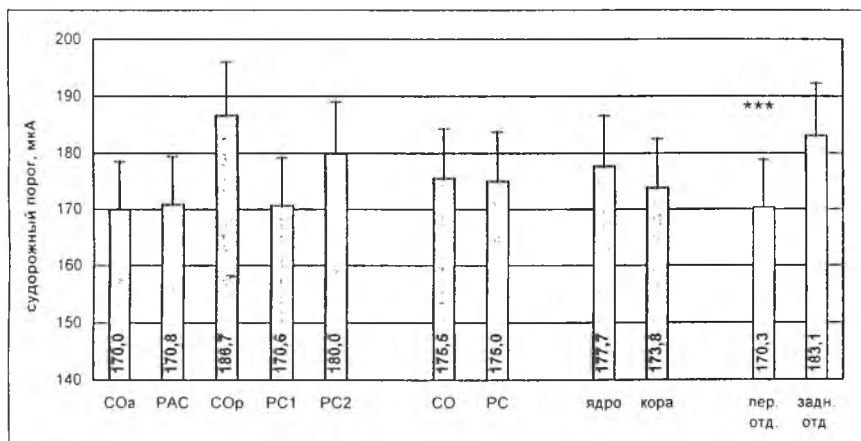


Рис. 1. Результаты определения начального судорожного порога в РС и СО

Определение судорожного порога кортикального ядра с учетом пола показало, что у самок он составил в среднем $179,17 \pm 2,53$ мкА, что несколько выше соответствующей величины у самцов ($175,53 \pm 3,69$ мкА).

Таблица 1

Уровни значимости различий величины судорожного порога (LSD test)

	СОа	РАС	СОр	РСІ	РСІІ
среднее, мкА	170,00	170,83	186,67	170,63	180,00
СОа		0.905907	0.023845	0.924074	0.147199
РАС	0.905907		0.037263	0.975712	0.199927
СОр	0.023845	0.037263		0.024957	0.348004
РСІ	0.924074	0.975712	0.024957		0.160008
РСІІ	0.147199	0.199927	0.348004	0.160008	

Таким образом, из числа исследованных факторов у самцов на величину судорожного порога достоверно влияет только фактор «отдел».

что свидетельствует о наличии ростокаудального градиента судорожной предрасположенности в пириформной коре и кортикальном ядре МК мозга. Это согласуется с имеющимися данными о структурных и функциональных особенностях ростральных и каудальных частей СО и РС, а также о различиях их анатомических связей (Чепурнов, Чепурнова, 1981; Акмаев, Калимуллина, 1993; Löscher et al., 1995, 1998; Österlund et al., 1998; Rosin et al., 1999).

Сравнение судорожного порога СО у самцов и самок показало, что различие не является статистически значимым. Необходимо отметить, что по данным недавних исследований, величина порога у самок меняется в различные фазы эстрального цикла и зависит от уровня эстрогена и прогестерона (Mohammad et al., 1998; Edwards et al., 1999a,b). Тем не менее, учет фазы цикла затрудняет сравнение по полу, ввиду отсутствия у самцов соответствующих четких циклов.

Определение среднего количества стимуляций, необходимого для возникновения I-III стадий припадка, позволило оценить скорость развития эпилептического процесса у самцов при стимуляции РС и СО, и у самок при стимуляции СО. Полученные данные приведены в табл. 2.

Таблица 2

Среднее количество сеансов электростимуляции, необходимое для возникновения I-III стадий и завершения парциального kindлинга

	Стадия			завершение kindлинга
	I*	II*	III*	
СОа (n=7)	2,14±0,14	3,57±0,30	7,67±0,21	9,00±0,37
РАС (n=6)	2,17±0,17	3,50±0,34	7,80±0,58	8,60±0,51
СОр (n=6)	2,83±0,17	4,67±0,33	9,50±0,43	10,20±0,66
РС _I (n=8)	2,63±0,18	3,29±0,29	6,60±1,03	7,40±1,03
РС _{II} (n=7)	2,57±0,20	4,00±0,31	6,80±0,66	8,00±0,89
СО _{male} (n=19)	2,37±0,11	3,89±0,21	8,58±0,36	9,25±0,32
СО _{female} (n=8)	2,75±0,16	3,86±0,34	8,50±1,06	9,50±1,09

Примечание: * – достоверное влияние фактора у самцов (при $p < 0,05$)

Проведенный дисперсионный анализ показал, что время ожидания I стадии достоверно зависит только от фактора «локализация» (при $p < 0,05$: $F=2,80$; $\eta^2=27,83$). Различия СОа и РАС при сравнении с СОр достоверны при $p < 0,05$. Несколько иным оказалось влияние факторов на латентный период II стадии. Сравнение выборок с учетом отдела показало, что влияние фактора «отдел» и различия между передним и задним отделами значимы при $p < 0,01$ ($F=8,04$; $\eta^2=24,34$) (табл. 3), тогда как уровень

значимости влияния фактора «локализация» ниже ($p < 0.05$; $F = 2.94$; $\eta^2 = 29.55$). В то же время, сопоставление коэффициентов η^2 свидетельствует о большей силе влияния последнего фактора на время ожидания II стадии. Наибольшее количество стимуляций требуется при стимуляции СОр, достоверно отличающегося по этому показателю от СОа (при $p < 0.05$), РАС (при $p < 0.05$) и РС_I (при $p < 0.01$).

Анализ количества стимуляций, необходимого для манифестации III стадии, показал статистически значимое влияние уже трех факторов – «локализация» (при $p < 0.05$; $F = 3.73$; $\eta^2 = 40.38$), «структура» (при $p < 0.05$; $F = 7.68$; $\eta^2 = 23.51$), «принцип» (при $p < 0.05$; $F = 6.63$; $\eta^2 = 20.95$). Однако сила влияния первого фактора значительно превышает соответствующие значения у остальных двух. Статистически значимы отличия СОр от СОа (при $p < 0.05$), РС_I (при $p < 0.01$) и РС_{II} (при $p < 0.01$).

Таблица 3

Среднее количество сеансов, необходимое для возникновения I-III стадий и завершения парциального киндлинга с учетом исследованных факторов

	«структура»		«отдел»		«принцип»	
	РС n=15	СО n=19	передний n=15	задний n=13	ядро n=13	кора n=21
I	2,6±0,13	2,4±0,11	2,4±0,13	2,7±0,13	2,5±0,14	2,5±0,11
II	3,6±0,23	3,9±0,21	3,4±0,20**	4,3±0,24	4,1±0,26	3,6±0,18
III	7,1±0,44	8,6±0,36*	7,2±0,48	8,3±0,56	8,4±0,31	6,7±0,58*
заверш.	7,7±0,65	9,3±0,32*	8,3±0,54	9,1±0,64	9,5±0,36	7,9±0,50*

Примечание: достоверное влияние фактора – * (при $p < 0.05$); ** (при $p < 0.01$)

Оценка достоверности влияния исследуемых факторов на количество сеансов стимуляции, необходимое для разработки парциального киндлинга, показала его достоверную зависимость от принципа организации серого вещества («принцип», при $p < 0.05$; $F = 6.18$; $\eta^2 = 20.49$) и принадлежности к РС или СО («структура», при $p < 0.05$; $F = 5.62$; $\eta^2 = 18.98$).

Таким образом, полученные в ходе анализа временных показателей парциального киндлинга результаты демонстрируют, что латентные периоды лимбических стадий припадков у самцов в большей степени зависят от ростокаудального положения фокуса стимуляции (факторы «локализация» и «отдел»). Зависимость времени ожидания от локализации еще более усиливается для III стадии, однако этот показатель достоверно зависит также от принципа организации серого вещества и принадлежности к РС или СО.

При сравнении среднего количества стимуляций у самцов и самок, достоверных отличий выявлено не было, что может отражать незначительную зависимость динамики эпилептического процесса от половой принадлежности.

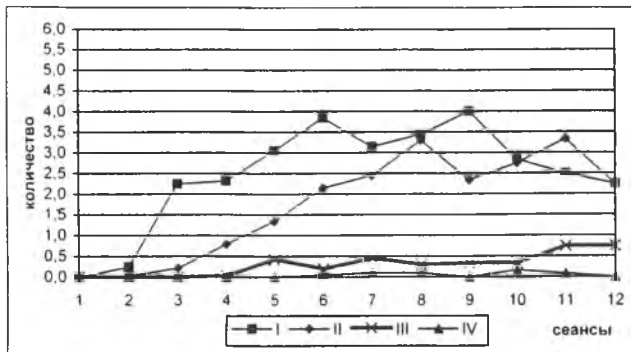


Рис. 2. Количество I-IV стадий при стимуляции РС₁

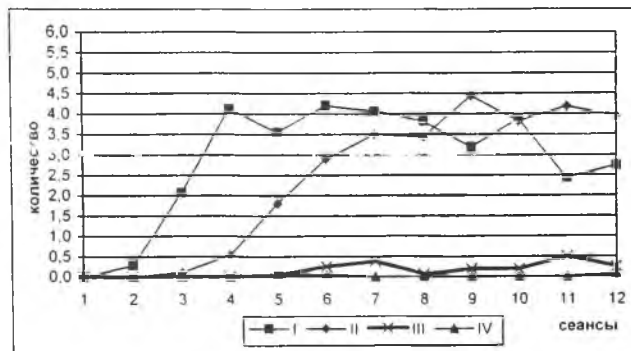


Рис. 3. Количество I-IV стадий при стимуляции РС_{II}

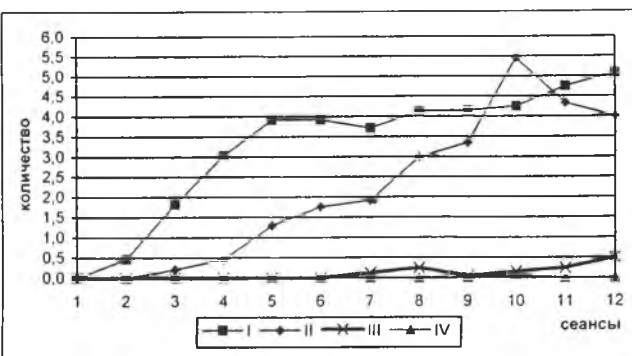


Рис. 4. Количество I-IV стадий при стимуляции СОа

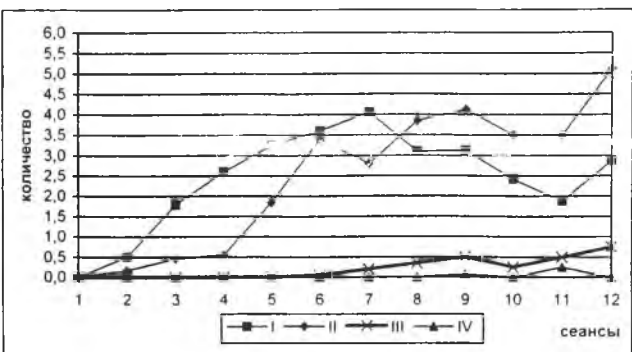


Рис. 5. Количество I-IV стадий при стимуляции PAC

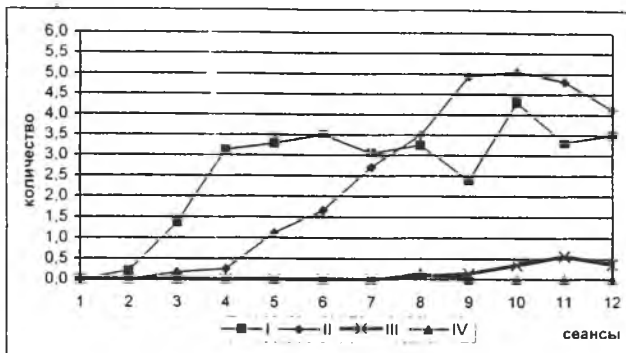


Рис. 6. Количество I-IV стадий при стимуляции СОР

Значения среднего количества I-IV стадий по отделам РС и СО у самцов приведены на рис. 2-6. Даже визуальный анализ данных показывает различия в паттернах изменения этого показателя в ходе киндинга.

Дисперсионный анализ по фактору «локализация» выявил высоко достоверное влияние его на количество стадий I-III, однако сила влияния невелика. Количество I стадий достоверно зависит от этого фактора ($p < 0,001$; $F = 7,01$; $\eta^2 = 2,99$) и от времени ($p < 0,001$; $F = 54,57$; $\eta^2 = 63,97$). На количество II стадий оказывают достоверное влияние не только факторы «локализация» ($p < 0,001$; $F = 5,62$; $\eta^2 = 1,55$) и «время» ($p < 0,001$; $F = 99,28$; $\eta^2 = 75,13$), но и их взаимодействие ($p < 0,001$; $F = 2,05$; $\eta^2 = 6,19$). Сила влияния на количество III стадий фактора «локализация» ($p < 0,001$; $F = 7,05$; $\eta^2 = 5,51$) и взаимодействия факторов ($p < 0,05$; $F = 1,48$; $\eta^2 = 12,76$) возрастает, влияние временного фактора, напротив, становится слабее ($p < 0,001$; $F = 15,31$; $\eta^2 = 32,97$). Результаты оценки влияния остальных факторов на данный показатель обобщены в табл. 4.

Таблица 4

Достоверные влияния факторов на среднее количество I-IV стадий

	«структура»	«время»	«отдел»	«время»	«принцип»	«время»
I	-	$p < 0,001$	-	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
II	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	-	$p < 0,001$
III	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
IV	-	-	-	-	-	-

Сравнительный анализ показал, что временной фактор оказывает устойчивое и сильное влияние на количество возникающих I-III стадий припадка. Обнаружено достоверное влияние всех факторов структурной организации на количество III стадий, причем уровень значимости фактора «принцип» значительно выше. Это свидетельствует о том, что при стимуляции корковых структур генерализованные припадки возникают

достоверно чаще, что свидетельствует о большей роли палеокортекса в процессе вторичной генерализации судорожной активности, что подтверждается данными о тесном вовлечении пириформной коры в распространение судорожных разрядов (Чепурнов, Чепурнова, 1981; Racine, 1972; McIntyre et al., 1982; Cain, 1992; De Curtis et al., 1996, 1999; Löscher, Ebert, 1996; Otsuki et al., 1999 и др.). В основе этого может лежать участие плексиформного слоя с ассоциативными волокнами, по которым возбуждение распространяется в ростокаудальном направлении и затем переходит в слои II и III (De Curtis et al., 1996; Timofeeva, Peterson, 1999).

Анализ результатов спектрального анализа, приведенных на рис. 7-11, выявил менее достоверное, по сравнению с предыдущим показателем, влияние исследуемых факторов на спектральные составляющие ЭЭГ в процессе киндинга. Выявлено значимое влияние фактора «локализация» на изменения ОСП Δ -ритма ($p < 0,05$; $F = 2,59$; $\eta^2 = 4,06$), β_1 -ритма ($p < 0,05$; $F = 2,74$; $\eta^2 = 4,18$) и β_2 -ритма ($p < 0,05$; $F = 2,83$; $\eta^2 = 4,43$). Анализ достоверности различий между отделами показывает, что РАС более всего отличается от других участков, что согласуется с данными об обособленности этой структуры от ростральных и каудальных частей кортикального ядра (Чепурнов, Чепурнова, 1981; Акмаев, Калимуллина, 1993; Gloor, 1992).

В ходе оценки влияния остальных факторов на изменения спектрального состава ЭЭГ у самцов в течение киндинга было выявлено только достоверное отличие между передним и задним отделом по θ -ритму (при $p < 0,01$) – в переднем отделе по мере прохождения стимуляций происходит достоверное возрастание ОСП колебаний в этом диапазоне, чего не наблюдается в заднем отделе («отдел», $p < 0,01$; $F = 8,14$; $\eta^2 = 3,20$).

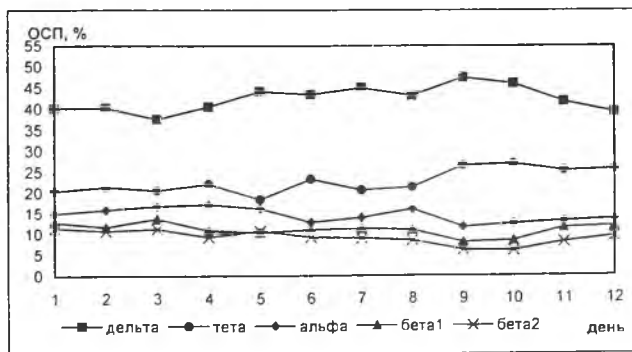


Рис. 7. Изменение спектрального состава ЭЭГ РС₁ в процессе киндинга

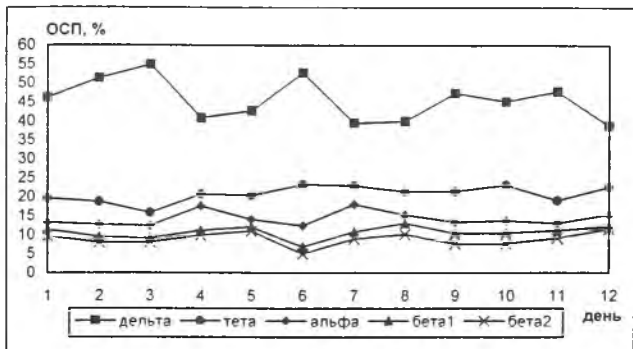


Рис. 8. Изменение спектрального состава ЭЭГ РС₁₁ в процессе киндлинга

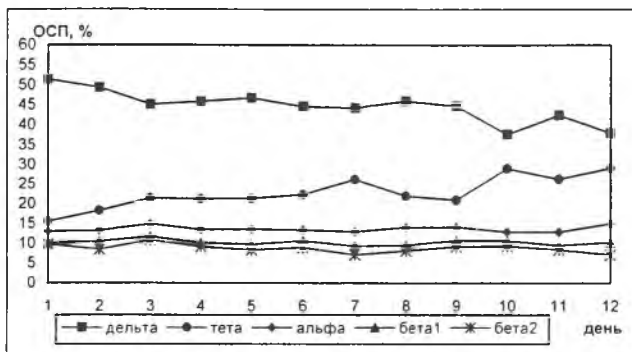


Рис. 9. Изменение спектрального состава ЭЭГ СОа в процессе киндлинга

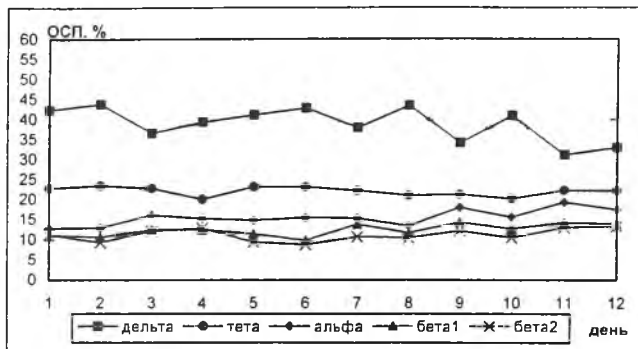


Рис. 10. Изменение спектрального состава ЭЭГ РАС в процессе киндлинга

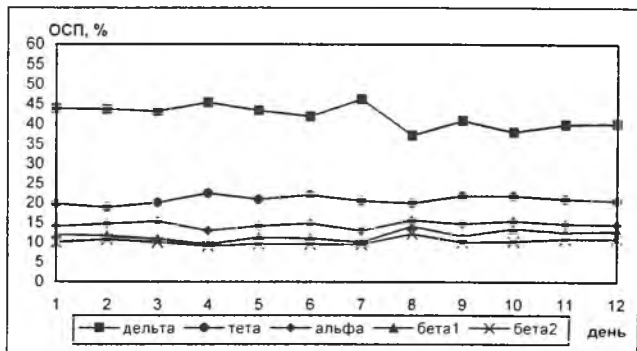


Рис. 11. Изменение спектрального состава ЭЭГ СОр в процессе киндлинга

Сравнение результатов спектрального анализа ЭЭГ СО у самцов и самок показало статистически значимое различие в ОСП Δ -ритма (при $p < 0,05$; $F = 4,68$; $\eta^2 = 2,18$). Спектральная мощность Δ -ритма у самок имеет большее значение, причем в течение киндлинга не обнаруживается значительных изменений. Напротив, у самцов в процессе киндлинга спектральная плотность медленных колебаний неуклонно снижается – с 46,23% в первый день до 37,25% в двенадцатый. Указанное различие может свидетельствовать о большей плотности популяции ГАМКергических нейронов в СО самок по сравнению с самцами, что согласуется с данными Стефановой (Stefanova, 1998).

Исследование противосудорожных свойств сакрицина

Визуальный анализ ЭЭГ, зарегистрированной на фоне сакрицина, показал, что внутрибрюшинное введение этого препарата в дозе 200 мг/кг крысам с завершённым парциальным киндлингом привело к изменению общего характера активности, значительному уменьшению частоты возникновения и длительности паттернов эпилептиформной активности. Высокоамплитудная β -активность и гиперсинхронный α -ритм, накладывающиеся на медленные колебания, на фоне сакрицина приобретали более спорадический и нерегулярный характер. Частота возникновения и длительность комплексов полиспайков, спайков и острых волн обнаружили тенденцию к снижению, в результате чего ЭЭГ в значительной мере утратила черты патологической. Эти изменения были отмечены нами у всех исследованных крыс. В целом влияние сакрицина на ЭЭГ можно охарактеризовать как «нормализующее».

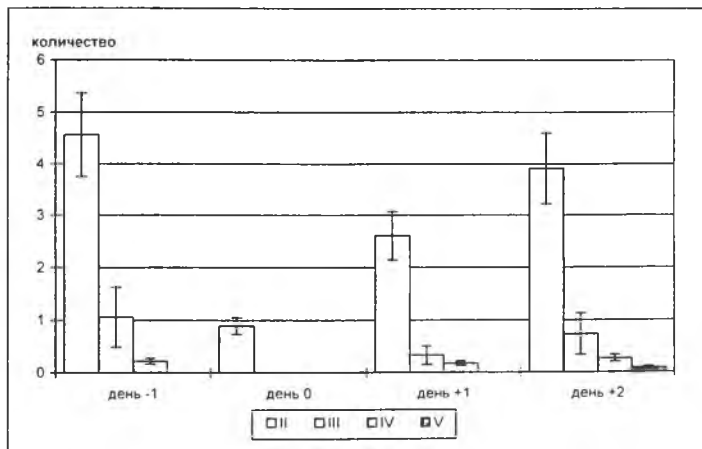


Рис. 12. Среднее количество II-IV стадий в течение сеансов стимуляции по дням до и после введения сакрицина

Максимальный моторный ответ в предшествующий введению сакрицина день составил в среднем $3,44 \pm 0,24$ стадии припадка. Введение сакрицина привело к резкому снижению силы моторного ответа. Среднее

значение этого параметра после введения составило $1,67 \pm 0,17$ стадии. Анализ показал, что различие достоверно при $p < 0,001$ ($t=5,49$; $n=9$).

Учитывая, что формирование эпилептического очага и последующая генерализация судорожной активности приводит к значительным функциональным сдвигам в нервной системе, приобретающим характер устойчивого патологического состояния (Бехтерева и др., 1978), мы проанализировали динамику восстановления количества II-V стадий припадка к исходному уровню, то есть в предшествующий до введения сакрицина день. На рис. 12 приведено среднее количество II-IV стадий по дням в соответствии с сеансами ежедневной электростимуляции. При этом день -1 предшествует введению сакрицина, день 0 соответствует регистрации стадий припадка на фоне сакрицина, а дни +1 и +2 – последующим сеансам стимуляции.

С помощью дисперсионного анализа выявлено статистически значимое влияние сакрицина на количество II (при $p < 0,001$; $F=7,32$; $\eta^2=43,97$) и III стадий ($p < 0,01$; $F=4,64$; $\eta^2=33,20$). Сравнение достоверности различий по дням показало, что по количеству II лимбической стадии нет отличий при сравнении дней -1 с +2 и дня +1 с днем +2 (табл. 5). Достоверно меньшее количество генерализованных III стадий наблюдается не только в день введения, но и на следующий день.

Таблица 5

Уровни значимости различий по среднему количеству II стадий (LSD test)

	день -1	день 0	день +1	день +2
<i>среднее</i>	4,56	0,89	2,61	3,91
день -1		0,00000	0,00859	0,43465
день 0	0,00000		0,01920	0,00050
день +1	0,00859	0,01920		0,11950
день +2	0,43465	0,00050	0,11950	

Влияние сакрицина на частоту возникновения генерализованной IV стадии не достигает критического уровня значимости, не обнаружено также различий между сеансами по этому показателю. Относительно появления в день +2 высшей V стадии, соответствующей генерализованному тонико-клоническому припадку, следует отметить, что исследование свойств сакрицина происходило на фоне продолжающейся ежедневной электростимуляции, являющейся субстратом дальнейшего поступательного развития эпилептогенеза (Майковский, 1996).

Сравнение данных спектрального анализа подтвердило результаты визуального анализа ЭЭГ, показавшего снижение выраженности высокочастотной активности. Введение сакрицина отразилось на повышении ОСП колебаний в области Δ - и θ -частот, и снижении спектральной мощности колебаний в высокочастотной области спектра – α -, β_1 - и β_2 -диапазонах (табл. 6).

Анализ достоверности различий показал, что статистически значимым является снижение ОСП колебаний в α - (при $p < 0,05$; $t=2,78$), β_1 -

(при $p < 0,01$; $t = 3,14$) и β_2 -диапазонах (при $p < 0,05$; $t = 2,59$). Изменения ОСП Δ - и θ -ритмов после введения сакрицина не достоверны. Некоторое повышение относительной спектральной плотности θ -ритма может рассматриваться как положительный момент, поскольку известно, что нарушения памяти как симптом височной эпилепсии, а также вследствие побочного действия применяемых АЭП, сопровождаются достоверным снижением θ -ритма в области гиппокампа-МК (Klimesch, 1999).

Таблица 6

Влияние сакрицина на спектральные характеристики ЭЭГ

диапазон	относительная спектральная плотность, 10^6	
	за день до введения	в день до введения
Δ (1-4 Гц)	$42,33 \pm 2,24$	$48,34 \pm 1,57$
θ (4-8 Гц)	$23,31 \pm 1,65$	$26,13 \pm 1,34$
α (8-13 Гц)	$14,30 \pm 0,75$	* $12,01 \pm 0,67$
β_1 (13-18 Гц)	$11,72 \pm 1,02$	** $7,84 \pm 0,63$
β_2 (18-32 Гц)	$8,34 \pm 0,84$	* $5,68 \pm 0,69$

Примечание: * достоверные различия при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$

В течение периода наблюдения (2-2,5 ч после введения) отмечено умеренное седативное действие сакрицина. Введение его в дозировке 200 мг/кг привело к некоторому снижению общей тревожности животных, уменьшению продолжительности и интенсивности груминга и других форм стереотипного поведения. Вместе с тем, не было замечено снижения уровня общей активности животных, продолжительности исследовательского поведения, а также нарушений поддержания позы, атаксии или заторможенности. Мышечный тонус в течение периода наблюдения оставался в пределах нормы.

Полученные результаты позволяют предположить, что механизм действия сакрицина заключается главным образом в блокировании распространения судорожной активности из эпилептического очага в структуры ствола мозга и двигательные зоны коры, что подтверждается полным отсутствием вторично-генерализованных припадков. Кроме того, этот препарат оказывает достоверное влияние и на судорожную активность первичного очага, приводя к снижению представленности на ЭЭГ высокочастотных колебаний (одиночных и множественных спайков и острых волн) и достоверному снижению количества лимбических стадий припадка.

Таким образом, внутрибрюшинное введение сакрицина в дозировке 200 мг/кг привело к достоверному снижению выраженности электрографических и двигательных показателей судорожной активности. Показано, что сакрицин эффективно действует на сложные фокальные и вторично-генерализованные припадки у самцов крыс. Действие этого препарата при данной дозировке носит более длительный характер, и продолжается по крайней мере в течение двух суток с момента введения.

ВЫВОДЫ

1. На модели развития электрического kindлинга в пириформной коре и кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга самцов крыс выявлен градиент судорожной предрасположенности, понижающейся в ростокаудальном направлении. Градиент имеет наибольшую выраженность в кортикальном ядре: значение судорожного порога минимально в переднем отделе (СОа) и максимально – в заднем отделе (СОр).

2. На начальном этапе развития kindлинга МК у самцов крыс доминирует активность переднего кортикального ядра и периамигдаллярной коры, но по мере развития эпилептического процесса, выражающегося в генерализации судорожной активности, ведущую роль начинает играть пириформная кора.

3. Возникновение генерализованных припадков и завершение парциального kindлинга достоверно быстрее происходят при стимуляции палеокортикальных структур – пириформной и периамигдаллярной коры. Для появления генерализованной III стадии и завершения парциального kindлинга в заднем кортикальном ядре требуется наибольшее количество стимуляций.

4. Выявлена принципиальная зависимость между интенсивностью возникающих моторных припадков и структурной организацией раздражаемого отдела миндалевидного комплекса: наибольшее количество лимбических стадий припадка возникает при стимуляции *ядерных структур* (СОа и СОр), а стимуляция *палеокортикальных структур* (передний и задний отделы пириформной коры и периамигдаллярная кора) приводит к возникновению большего количества генерализованных припадков.

5. Локализация стимулирующего электрода в пределах пириформной коры и кортикального ядра является определяющим фактором по отношению к спектральной плотности колебаний в Δ -, β_1 - и β_2 -диапазонах по мере развития эпилептического процесса. Спектральный анализ электрической активности исследуемых отделов РС и СО позволил выявить достоверную зависимость между спектральной мощностью θ -ритма и ростокаудальным положением эпилептического очага.

6. Выявлены достоверные отличия периамигдаллярной коры от других отделов кортикального ядра в характере изменений относительной спектральной плотности колебаний в Δ -, α -, β_1 - и β_2 -диапазонах в процессе kindлинга, что подтверждает гетерогенность структурно-функциональной организации кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга крыс.

7. На модели электрического kindлинга миндалевидного комплекса показана значительная противосудорожная эффективность сакрицина -- препарата, созданного на базе солей алициклической карбоновой кислоты. Сакрицин при системном введении достоверно снижал тяжесть моторного припадка, оказывал положительное влияние на поведенческие показатели эпилептического припадка у крыс. Выявлена возможность

долговременного снижения судорожной предрасположенности мозга под влиянием сакрицина.

8. У крыс с завершенным киндлингом введение сакрицина вызывало изменения спектрального состава ЭЭГ, выражающиеся в достоверном снижении относительной спектральной плотности высокочастотных колебаний в α -, β_1 - и β_2 -диапазонах, что отражает уменьшение частоты возникновения и продолжительности паттернов пароксизмальной активности в ЭЭГ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бикбаев А.Ф., Карпова А.В. Статистическая обработка данных электроэнцефалографии // Современные проблемы эволюционной морфологии и физиологии. – Уфа, 1996. – С. 64-68.

2. Бикбаев А.Ф. К вопросу об экспериментальных моделях эпилепсии // Итоги научн. иссл. биол. ф-та БГУ. – Уфа, 1997. – С. 95-96.

3. Переверзев М.О., Пономаренко А.А., Ключева Ю.А., Бердиев Р.К., Бикбаев А.Ф., Котликова О.Н. Исследование активности мозга крыс линии WAG/Rij с генетически врожденными абсансами // Тез. конф. мол.ученых, посв. 90-летию со дня рождения Л.Г.Воронина. – М., 1998.

4. Бикбаев А.Ф., Карпова А.В., Калимуллина Л.Б. Структурно-функциональные параллели в исследовании электрофизиологических характеристик мозга // Материалы Всеросс. научн. конф., посв. 150-летию И.П. Павлова. – СПб., 1999. – С. 93-94.

5. Бикбаев А.Ф., Чепурнов С.А. Роль переднего и заднего отделов миндалевидного комплекса в генезе судорожной активности // Материалы конф. «Механизмы структурной, функциональной и нейрохимической пластичности мозга». – М., 1999. – С. 14.

6. Karpova A.V., Bikbaev A.F., Kalimullina L.B. Structural-functional organization of amygdaloid posterior cortical nucleus in the rat // 5th IBRO World Congress of Neuroscience. – Jerusalem (Israel), 1999. – P. 190.

7. Karpova A.V., Bikbaev A.F., Kalimullina L.B. Evolutional morphology of amygdaloid anterior cortical nucleus // 5th IBRO World Congress of Neuroscience. – Jerusalem (Israel), 1999. – P. 190.

8. Chepurnov S.A., Saakyan S.A., Danilin A.G., Chepurnova N.E., Sergeev V.I., Pereversev M.O., Kalimullina L.B., Bikbaev A.F. Sacricin – new antiepileptic drug // 23rd International Epilepsy Congress. – Prague (Czech Republic). Epilepsia. 1999. – V. 40. – Suppl. 2. – P.127.

9. Bikbaev A.F., Karpova A.V., Kalimullina L.B., Nozmo Mukiibi, Chepurnova N.E., Chepurnov S.A. Inhibition of amygdalar cortical nucleus kindling in rat by sacricin // 6th Mediterranean Epilepsy Conference. – Cairo (Egypt), 1999.