

Р.А. Копаладзе

Система оценки тяжести эпилептиформной реакции, индуцируемой ультразвуком у крыс

Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125215, Москва, Балтийская, 8

Разработан метод индукции эпилептиформной реакции у крыс с помощью ультразвука (24,3 кГц; 116 дБ) и система оценки тяжести эпилептиформной реакции. Ультразвук — частота выше 20 кГц — абсолютно бесшумный для человека, вызывает эпилептиформную реакцию у 6—13% крыс. Показаны возможности использования ультразвуковой эпилепсии у крыс для оценки противосудорожной активности лекарственных препаратов.

Ключевые слова: ультразвуковая эпилепсия, крысы, тяжесть эпилептиформной реакции, судорожные припадки, девятибалльная шкала, карбамазепин

R.A. Kopaladze

The system of assessment of the severity of ultrasound epilepsy in rats

Federal State Budgetary Institution «Institute of general pathology and pathophysiology» of Russian Academy of Medical Sciences: 125315 Moscow, Baltijskaya 8, Russia

The method of induction of epileptic reactions in rats by ultrasound (24.3 kHz; 116dB) and the system of severity estimation of epileptic reaction was developed. Ultrasound — frequency above 20 kHz — absolutely silent for a person, may cause epileptic reaction in 3—9% of the rats. The possibility of using ultrasound — induced epilepsy in rats to evaluate anticonvulsant activity of drugs it is shown

Key words: ultrasound-induced epilepsy, rats, the severity of the seizure, convulsive seizure, 9-points scale, carbamazepine

К числу экспериментальных моделей эпилепсии относится так называемая аудиогенная эпилепсия. Под аудиогенной эпилепсией понимаются варианты эпилепсии, при которых генерализованные припадки как у человека так и у животных возникают под влиянием резкого звукового раздражителя [1, 2, 4]. Аудиогенная эпилепсия у крыс Wistar, впервые была описана американским ученым Г. Дональдсоном в 20-е годы прошлого века [10]. Отметим, что именно Дональдсоном впервые в 1906 г. в Вистаровском институте США была выведена популяция белых крыс Wistar, широко используемых во всем мире [6]. В 40-х годах XX века в СССР на биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова на основе крыс Wistar была выведена линия крыс КМ, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии [2, 4]. Позже, в 1958 г., аналогичная генетическая модель звуковой эпилепсии была создана в США в Университете Аризоны на основе крыс Sprague—Dowley [5, 11].

Для корреспонденции: Копаладзе Реваз Александрович, канд. биол. наук, старш. научн. сотр. лаб. биохимических адаптаций ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН. E-mail: revazkop@mail.ru

В работах для индукции аудиогенной эпилептиформной реакции у крыс, как правило, используется слышимое для человека звуковое раздражение частотой до 20 кГц и силой 90—120 дБ (обычный сильный электрический звонок). Однако регулярное использование сильного звукового раздражителя крайне неприятно, оказывает вредное влияние на здоровье экспериментатора и окружающих. При этом требуется специальная прозрачная звуконепроницаемая камера из плексигласа с двойными стенками и с смонтированным в потолок электрическим звонком. Внутри камеры помещается подопытное животное. И, тем не менее, устранить полностью влияние звука на экспериментатора невозможно. Предлагаемый метод индукции эпилептиформной реакции с использованием ультразвукового раздражителя лишен этих недостатков. Звуковой раздражитель частотой излучения выше 20 кГц — ультразвук — абсолютно бесшумный для человека, может вызывать у крыс эпилептиформную реакцию.

Тяжесть аудиогенной эпилептиформной реакции, вызываемой обычным звуковым раздражителем (электрический звонок), как правило, оценивают по

форме проявления припадка, по 4-балльной шкале [2, 4], или по 9-балльной шкале, в которой учитывается не только форма проявления припадка, но и количество волн возбуждения (2 или 1), предшествующих припадку [9, 11]. Предлагаемый нами подход отличается тем, что в 9-балльной системе учитывается не только форма припадка и количество волн возбуждения (2 или 1), но и продолжительность тормозной паузы между двумя волнами возбуждения.

Цель работы — доказательство возможности использования ультразвука для создания экспериментальной модели эпилепсии на крысах и разработка системы оценки тяжести эпилептиформной реакции.

Методика

Отбор животных, чувствительных к ультразвуку

Нелинейные белые крысы содержались в стандартных условиях вивария по 10 особей в клетке. Еду и питье животные получали *ad libitum*. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003 г.

Эпилептиформные припадки у нелинейных белых самцов крыс вызывали с помощью ультразвукового раздражителя Dazer II (США, частота излучения 24,3 кГц, уровень звука 116 дБ). Для этого крысу помещали в пластмассовый бачок высотой 46 см и диаметром нижней и верхней частей 32 и 36 см соответственно. Бачок закрывали сверху металлической сеткой и направляли «луч» сигнала на крысу вертикально с расстояния одного метра в течение не более 90 с. Ультразвуком действовал непрерывно и отключался в момент наступления припадка. Для подбора чувствительных животных было протестировано 335 нелинейных белых крыс возрастом 1,5 мес., массой 160—200 г. Среди этих крыс сначала были выделены 30 крыс, давших эпилептиформную реакцию на ультразвук. Однако цель отбора заключалась не только в том, чтобы выделить группу крыс чувствительных к ультразвуку, но и в том, чтобы выделенные крысы стабильно давали эпилептиформную реакцию в ответ на ультразвук. Для этого крыс тестировали 1 раз в неделю и после каждого тестирования крысы, не давшие ответную реакцию на ультразвук, исключались из дальнейшего тестирования. В конце первого месяца тестирования выявилось, что у 23 крыс реакция на ультразвук носила нерегулярный характер, и они были исключены из дальнейшего тестирования. После этого из оставшихся 7 крыс в конце 2-го мес. тестирования были выделены две крысы, регулярно дававшие эпилептиформную реакцию на ультразвук с выраженными судорожными припадками абсолютно

во всех испытаниях. Эти крысы были протестированы 14 раз до испытания противозэпилептического средства карбамазепина.

Параметры ультразвуковой эпилептиформной реакции

Эпилептиформная реакция у крыс, вызываемая ультразвуком, протекает в виде двух- или одноволнового возбуждения, завершающегося судорожным припадком. Период между двумя волнами возбуждения представляет собой активное торможение, которое может временно оборвать двигательное возбуждение (ДВ), предшествующее судорожному припадку. Однако после истощения этого торможения в результате непрерывного действия ультразвука возникает вторая волна ДВ, завершающаяся клоническими и/или тоническими судорожными припадками. В этом случае мы имеем дело с 2-волновой реакцией возбуждения. Наличие тормозной паузы (ТП) между двумя волнами возбуждения указывает на эффективную работу тормозных механизмов мозга против патогенного действия ультразвука на животных. Если продолжительность ТП=0, то мы имеем дело с 1-волновой реакцией возбуждения, которая является более тяжелой формой УЭР по сравнению УЭР с 2-волновой реакцией.

Понятие ультразвуковая эпилептиформная реакция (УЭР) включает в свою структуру следующие параметры:

- 1) латентный период двигательного возбуждения (ЛДВ), т.е. продолжительность времени в секундах от момента включения ультразвука до начала двигательного возбуждения;
- 2) латентный период наступления судорожного припадка (ЛСП), т.е. продолжительность времени от момента включения ультразвука до наступления судорожного припадка;
- 3) тяжесть УЭР в баллах, т.е. форму проявления припадка с учетом количества волн ДВ.

Также учитывалось ДВ без припадка и полное отсутствие реакции.

Фармакологическое тестирование

Эффекты противозэпилептического средства карбамазепина, препарата, включенного в перечень жизненно необходимых препаратов [3], были проверены на отобранных крысах, стабильно чувствительных к индукции эпилептиформной реакции ультразвуком. Исследования проводили на животных, достигших взрослого возраста. Для подготовки суспензии 20 мг карбамазепина помещали в фарфоровую ступку, добавляли две капли твина и растирали фарфоровым пестиком. Затем добавляли 2 мл физиологического раствора (ФР) и вновь растирали пестиком до получе-

ния однородной гомогенной среды с конечной концентрацией 10 мг/мл. Суспензию карбамазепина вводили крысе внутривентриально в дозе 20 мг/кг в объеме 2 мл на кг массы. Контрольной крысе вводили такой же объем ФР с твином. Эксперименты на опытной и контрольной крысах проводили еженедельно, в течение 6 нед.

Результаты и обсуждение

Модифицированная девятибалльная шкала оценки тяжести ультразвуковой эпилептиформной реакции (УЭР) у крыс

Разработанная система оценки тяжести УЭР представлена в таблицах 1А и 1Б. В основной таблице 1А представлены формы припадков и соответствующие баллы с учетом количества волн возбуждения. В дополнительной таблице 1Б — данные для учета продолжительности ТП между волнами возбуждения (с).





Таблица 1А состоит из четырех столбцов: в столбце I дано словесное описание УЭР, в столбце II представлены формы припадков в виде рисунков в соот-

ветствии с описанием, в столбце III — количество волн (2 или 1), предшествующих судорожному припадку, и в столбце IV — баллы (0—9), отражающие тяжесть УЭР. Если в ответ на ультразвук крыса не реагирует, то в соответствии с данными таблицы 1А пишется «0» баллов, а если крыса на звук реагирует только ДВ, без припадков, пишется «1» балл (количество волн при этом не учитывается). Но, когда у крысы 1-волновое ДВ завершается судорожным припадком, то в зависимости от формы припадков находят в соответствующей строке число баллов 3; 5; 7; 9 (они выражены нечетными числами).

В случае 2-волновой реакции возбуждения, завершающегося судорожным припадком, помимо формы припадков учитывается продолжительность ТП между этими волнами. В этом случае возникает необходимость определения конкретного числа баллов в интервалах: 2,1—2,9; 4,1—4,9; 6,1—6,9 и 8,1—8,9. Каждому отдельному интервалу соответствует вполне определенная форма припадков. Для того, чтобы определить конкретное число баллов в указанных интервалах, используется другая таблица 1Б.

Девятибалльная шкала оценки тяжести ультразвукового эпилептического припадков (УЭП) у крыс

Таблица 1А

Тяжесть УЭП рисунки	Тяжесть УЭП Описание	Число волн возбуждения 2 или 1	Тяжесть УЭП баллы
I	II	III	IV
-	Нет реакции вообще	0	0
-	Двигательное возбуждение без припадков	2 или 1	1
	Судорожные клонические припадки с падением животного на брюшко	2 1	2,1÷2,9 3
	Судорожные клонические припадки с падением животного на бок.	2 1	4,1÷4,9 5
	Судорожные припадки с падением животного на бок с тоническим напряжением передних лап	2 1	6,1÷6,9 7
	Судорожные припадки, с падением животного на бок с тоническим напряжением всех лап	2 1	8,1÷8,9 9

Продолжительность тормозной паузы (ТП) между двумя волнами возбуждения в секундах и условных единицах

Продолжительность ТП в секундах	Продолжительность ТП в условных единицах
Столбец I	Столбец II
2,3	0,9
4,5	0,8
6,7	0,7
8,9	0,6
10,11	0,5
12,13	0,4
14,15	0,3
16,17	0,2
18,19	0,1

Таблица 1Б состоит из двух столбцов I и II. В столбце I представлена в возрастающем порядке продолжительность ТП в секундах (2—19 с). Такая продолжительность ТП наиболее часто встречается в экспериментальной практике. Существует обратная пропорциональная связь между продолжительностью ТП в секундах и тяжестью УЭР в баллах: чем меньше продолжительность ТП в секундах, тем больше тяжесть УЭР и наоборот. Поэтому в столбце II этой же таблицы продолжительность ТП представлена в виде убывающих сверху вниз девяти дробных условных единиц (0,9—0,1). Введение условных единиц позволяет представить различную продолжительность ТП (2—19 с) в удобной для расчетов форме. Представление секунд в возрастающем, а условных единиц — в убывающем сверху вниз порядке дает возможность установить *прямую зависимость* между продолжительностью ТП в условных единицах (0,1—0,9) и тяжестью припадка (2—9). Это необходимо для отражения продолжительности ТП с помощью дробных переходных чисел между четными и нечетными числами 9-балльной шкалы.

Примеры использования модифицированной системы оценки тяжести УЭР

Пример №1. Крыса в ответ на ультразвук дает 2-волновую реакцию возбуждения с продолжительностью ТП=4 с, с формой припадка в виде «падения животного на бок, тоническим сгибанием шеи, туловища и передних конечностей, неполным тоническим напряжением задних конечностей». В этом случае тяжесть припадка определяют следующим образом: на таблице 1А в столбцах I или II находят соответствующее указанной реально наблюдаемой форме припадка описание или рисунок — в данном примере, строка №5. Затем на этой же строке, в столбце III находят цифру, обозначающую число волн, т.е. число «2», а в столбце IV на этой же строке, рядом с числом «2» находят интервал между циф-

рами 6,1—6,9 в пределах которого и лежит число, отражающее тяжесть припадка в баллах. Для того, чтобы определить это число, используется таблица 1Б. На этой таблице в столбце «секунды» (столбец I) находят число «4» (так как в данном примере ТП=4 с), а затем на этой же строке в столбце II находят соответствующее условное дробное число «0,8». Затем определяется конкретное число баллов путем суммирования найденного на таблице 1А целого числа «6» и найденного на таблице 1Б дробного числа «0,8». В результате сложения этих двух цифр (6+0,8) получаем искомое число — 6,8 балла. Следует подчеркнуть, что без учета продолжительности ТП число баллов соответствовало бы «6», тогда как с учетом продолжительности ТП это число соответствует «6,8» т.е. числу, которое ближе к 7 баллам.

Пример №2. Реакция носит 1-волновый характер (т.е. ТП=0), но форма (тяжесть) припадка не отличается от припадка, приведенного в примере №1 (соответствует описанию в строке №5). В этом случае в столбце III находят число волн, т.е. число «1», и на этой же строке уже в столбце IV находят число «7», отражающее тяжесть припадка в баллах (использование таблицы 1Б в этом случае не требуется).

Новизна 9-балльной системы оценки тяжести УЭР состоит в том, что в случае 2-волновой реакции возбуждения между целыми числами (четными и нечетными), отражающими тяжесть припадка в баллах, нами впервые вводятся переходные, дробные числа, что повышает точность оценки тяжести УЭР и биологической активности лекарств в случаях их тестирования на животных, чувствительных к действию звука.

Характеристика отобранных животных

В наших экспериментах количество крыс чувствительных к ультразвуку в зависимости от партии крыс (97, 122, 116 крыс) составляло 6,2%; 7,4%; и 13%, а в — среднем 9%. Эпилептиформная реакция в ответ на ультразвук у большинства отобранных крыс

носила неустойчивый характер. Однако проверку на еженедельное тестирование выдержали только 2 крысы, которые и в дальнейшем демонстрировали устойчивый ответ на действие ультразвука по всем показателям УЭР при повторных измерениях.

Многолетний опыт автора и многих других исследователей показывает, что многократное использование линейных крыс с аудиогенной эпилепсией для испытания лекарств, вполне возможно. Эти крысы дают стандартную эпилептиформную реакцию в различные дни недели в ответ на действие звукового раздражителя частотой в слышимом для человека диапазоне (обычный сильный электрический звонок, 20 кГц, 90—120 дБ). Важно подчеркнуть, что между отобранными нами двумя крысами было различие в постприпадочных поведенческих реакциях на ультразвук. У опытной крысы судорожное состояние характеризовалось кататоническим ступором, у контрольной — судорожный припадок сопровождался выраженной взрывной наступательной агрессией и вокализацией. Эти животные были использованы для оценки противосудорожного эффекта карбамазепина.

Эффект карбамазепина

Влияние карбамазепина в сравнении с введением ФР продемонстрировано на опытном и контрольном животных в эксперименте по следующей схеме: за 48 ч до введения карбамазепина или ФР, через 1 ч и через 24 ч после введения препаратов. Результаты экспериментов по оценке влияния карбамазепина на УЭР представлены в табл. 2. Под противосудорожным эффектом понимается главным образом увеличение ЛДВ и уменьшение тяжести УЭР, а также увеличение ЛСП. При оценке тяжести УЭР в баллах были использованы представленные выше таблицы 1А и 1Б.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что опытное и контрольное животные до постановки опыта реагировали на ультразвук эпилептиформной реакцией. Введение карбамазепина оказало противосудорожное действие — крыса переставала реагировать на действие ультразвука в течение 90 с. Опыт показывает, что, если крыса в течение этого времени не реагирует на звук, то она не реагирует на него вообще.

В этом случае в графах ЛДВ и ЛСП проставлено значение «90+», что означает отсутствие ДВ и судорог.

Таблица 2

Параметры УЭР у крыс с введением карбамазепина и физиологического раствора

Время тестирования	№ недели тестирования	Параметры УЭР					
		ЛДВ, с		ЛСП, с		Тяжесть УЭР, баллы	
		Карбамазепин	ФР	Карбамазепин	ФР	Карбамазепин	ФР
За 48 ч до введения препаратов	1	6	17	12	37	9,0	6,6
	2	12	14	16	33	7,0	6,6
	3	9	13	31	23	9,0	7,0
	4	8	15	17	35	9,0	8,6
	5	9	19	16	28	9,0	9,0
	6	8	21	19	30	9,0	5,0
M±SD		8,7±2,0	16,5±3,1	18,5±6,5	31,0±5,1	8,7±0,8	7,1±1,5
Через 1 ч после введения препаратов	1	90+ (нет реакции)	15	90+ (нет реакции)	19	0	7,0
	2	90+ (нет реакции)	16	90+ (нет реакции)	35	0	6,8
	3	90+ (нет реакции)	9	90+ (нет реакции)	27	0	8,4
	4	90+ (нет реакции)	15	90+ (нет реакции)	28	0	8,9
	5	90+ (нет реакции)	11	90+ (нет реакции)	18	0	9,0
	6	90+ (нет реакции)	19	90+ (нет реакции)	36	0	6,9
M±SD		—	14,2±3,6	—	27,2±7,6	0	7,8±1,0
Через 24 ч после введения препаратов	1	11	14	20	21	3,0	9,0
	2	10	13	35	32	6,2	8,5
	3	9	19	28	33	4,7	9,0
	4	11	11	28	34	5,0	7,0
	5	12	13	45	18	4,6	9,0
	6	15	19	32	39	6,5	6,9
M±SD		11,3±2,1	14,8±3,4	31,3±8,4	29,5±8,2	5,0±1,3	8,2±1,0

Примечание. ЛДВ — латентный период двигательного возбуждения; ЛСП — латентный период наступления припадка; УЭР — тяжесть ультразвуковой эпилептиформной реакции. Число «90+» означает отсутствие УЭР у крыс на действие ультразвука в течение 90 с и более; цифра «0» — полное отсутствие реакции на ультразвук. М — среднее; SD — стандартное отклонение.

рожного припадка в течение 90 с и более. В графе тяжесть УЭР в баллах в этом случае проставляют цифру «0». Однако через 24 ч после введения карбамазепина реакция животного на ультразвук восстанавливалась.

По приведенным в табл. 2 данным видно, что через 24 ч после введения карбамазепина параметры УЭР отличаются от фоновых в сторону снижения уровня возбудимости и затруднения возникновения УЭР, что выражается в увеличении продолжительности ЛСП и, что особенно важно, в снижении тяжести УЭР в баллах. У контрольной крысы существенных изменений параметров УЭР не наблюдалось. Итак, в приведенном примере карбамазепин в дозе 20 мг/кг предотвращал возникновение УЭР у крысы через 1 ч после его введения, а через 24 ч его действие резко ослабевало. Карбамазепин может служить надежным маркером при испытании противосудорожных средств на животных, демонстрирующих вызванную ультразвуком эпилептиформную реакцию.

Ценность предложенного подхода заключается в том, что, не вводя животному никаких эпилептогенных химических препаратов, не используя таких сильных электрических раздражителей, как электрический ток, и не нарушая целостность нервной системы, можно получить на ультразвук генерализованные эпилептиформные припадки, весьма сходные по внешним проявлениям с эпилептическими припадками у человека. Кроме того, преимущество данного метода индукции эпилептиформной реакции состоит в том, что частота ультразвука лежит за пределами слышимости человека-экспериментатора.

Возможности использования предлагаемых методов и перспективы

Ультразвук безвреден для здоровых крыс, но вызывает эпилептиформную реакцию у крыс, генетически предрасположенных к эпилепсии. Метод индукции эпилептиформной реакции с использованием ультразвукового раздражителя может быть использован для предварительного тестирования партий крыс в возрасте 1,5 мес., предназначенных для научного проекта, с целью освобождения их от «нежелательных» особей. В этом случае экспериментатор, отбирая крыс, делает основную группу крыс более однородной и свободной от крыс с неврологическими отклонениями. С другой стороны, он приобретает дополнительную, небольшую группу крыс, позволяющую учитывать изменение параметров УЭР у животных, чувствительных к ультразвуку. В то же время метод индукции эпилептиформной реакции с использованием ультразвукового раздражителя и система оценки тяжести УЭР могут быть использованы при работе с аудиогенными крысами инбредной линии КМ и линии WAG/Rij, наиболее часто используемыми в отечественной практике, а также для других линий крыс

и мышей, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии.

Одной из методологических основ современной экспериментальной биологии и медицины является концепция генетической стандартизации лабораторных животных с целью получения воспроизводимых результатов. Уже получены сотни различных линий инбредных животных, главным образом мелких лабораторных грызунов [7]. Исследования с использованием инбредных линейных животных с заранее заданными генетическими характеристиками позволяют повысить эффективность научных исследований и способствуют сокращению количества подопытных животных [8]. В свете сказанного представляется перспективным выведение крыс инбредной линии, генетически предрасположенной к ультразвуковой эпилепсии. На основании данных, приведенных в настоящей работе, можно полагать, что в рамках предложенной модели ультразвуковой эпилепсии и системы оценки тяжести припадка в последующем возможно выведение как минимум крыс двух линий — с кататоническим ступором и с взрывной наступательной агрессией.

Список литературы

1. **Копаладзе Р.А.** Экспериментальные модели эпилепсии и внутриутробного дизонтогенеза. Проблемы биоэтики. — М., 2008: Деп. в ВИНТИ. №569-В2008. — 280 с.
2. **Крушинский Л.В.** Новое в изучении экспериментальной эпилепсии и физиологических механизмов, лежащих в ее основе // Успехи современной биологии. — 1949. — Т. XXVIII. — Вып. 1. — С. 108-133
3. Распоряжение Правительства РФ от 7 декабря 2011 г. №2199 р.г.Москва // Российская газета — Федеральный выпуск. — 2011. — №5660.
4. **Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.** Крысы линии КМ: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения // Журнал ВНД. — 2006. — №3. — С. 298-316.
5. **Consroe P., Piccioni A., Chin L.** Audiogenic seizure susceptible rats // Fed. Proc. — 1979. — Vol. 38. — №10. — P. 2411-1216.
6. **Donaldson H.H.** The history and zoological position the albino rat // J. Acad. Nat. Sci. Phila. — 1912. — Vol. 15. — P. 315-369.
7. **Festing M.F.W.** International index of laboratory Animals, 6th ed. — 1993.
8. **Festing M.F.W.** The choice of animal models and reduction // ATLA. — 2004. — Vol. 32. — Прилож. 2. — P. 59-64
9. **Jobe P.C., Piccioi A.L., Chin L.** Role of brain hydroxytryptamine in audiogenic seizure in the rat. // Life Sci. — 1973. — Vol. 13. — P. 1-13.
10. **Krushinsky L.V., Molodkina L.N., Fles D.A.** et al. The functional state of the brain during sonic stimulation In: Physiological Effects of Noise. Plenum, New York. — 1970. — P. 159-183.
11. **Tacke U.** Audiogenic seizures in rats — an experimental study of a genetic model of epilepsy. Department of Pharmacology and Toxicology University of Kuopio. — Kuopio, 1984. — 134 p.

Поступила 24.05.13