



DOI 10.56618/20712693_2022_14_4_84

МОДИФИКАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ТОКОМ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРИСТУПОВ У ЖИВОТНЫХ

И. А. Семёник¹, М. А. Корнеева¹, В. С. Терехов², А. О. Паращенко¹,
Е. В. Федорова¹, Т. Б. Мелик-Касумов¹, С. Н. Рябцева¹

¹Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Академическая ул., 28, Минск, Беларусь, 220072,

²Учреждение здравоохранения «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Ф. Скорины ул., 24, Минск, Беларусь, 220114

РЕЗЮМЕ. Новые препараты для лечения эпилепсии появляются достаточно редко, одной из причин является отсутствие воспроизводимых экспериментальных моделей различных типов приступов при эпилепсии. Актуальной задачей является разработка экспериментальных моделей конкретных эпилептических приступов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: адаптировать экспериментальную модель электрической стимуляции парциальных и генерализованных эпилептических приступов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: экспериментальное исследование проведено на крысах линии Wistar (n=40). Первая группа (n=20) — животные, после имплантации внутримозгового электрода и электрической стимуляции парциальных эпилептических приступов; вторая группа (n=20) — животные с последующей стимуляцией генерализованных эпилептических приступов. Оценка развивающихся эпилептических приступов проводилась по пяти-бальной шкале Расина.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведена модификация и адаптация импульс-зависимой экспериментальной модели электрической стимуляции парциальных и генерализованных приступов: контролируя диапазон амплитуды импульса подаваемого тока (напряжение тока) в эксперименте, можно вызывать различные по характеру эпилептические приступы у подопытных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Модифицирована и отработана недорогая современная, хорошо воспроизводимая, импульс-зависимая модель формирования простых парциальных моторных приступов и генерализованных эпилептических приступов у крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эпилепсия, парциальные и генерализованные приступы, экспериментальная модель.

Для цитирования: Семёник И. А., Корнеева М. А., Терехов В. С., Паращенко А. О., Федорова Е. В., Т. Б. Мелик-Касумов, С. Н. Рябцева. Модификация экспериментальной модели индуцированных электрическим током эпилептических приступов у животных. Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2022;14(4):84–88. DOI 10.56618/20712693_2022_14_4_84

MODIFICATION OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF ELECTRICALLY INDUCED SEIZURES IN ANIMALS

I. A. Siamionik¹, M. A. Korneeva¹, V. S. Terekhov², A. O. Parashchenko¹,
E. V. Fiodarava¹, T. B. Melik-Kasumov¹, S. N. Rjabceva¹

¹State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Belarus, 28, Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Belarus

²Health Institution “Republican Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery”,
24, F. Skorina st., Minsk, 220114, Belarus

SUMMARY. New medicines for the treatment of epilepsy appear rather rarely, one of the reasons is the lack of reproducible experimental models of different types of seizures. The designs of experimental models for specific seizures are needed. **PURPOSE OF THE STUDY:** to modify the experimental model of electrical stimulation of partial and generalized seizures.

MATERIALS AND METHODS: Wistar rats (n=40) were included in this experimental study. The rodents of the first (n=20) group after intracranial electrode implantation and were electrically stimulated for partial seizures; rats of the second group (n=20) were electrically stimulated for generalized seizures. The development of seizures was assessed using the five-point Racine scale.

RESULTS. Modification and adaptation of the experimental model of electrical stimulation of partial and generalized impulse-dependent seizures were made: by controlling the range of impulse amplitude in the experiment, it is possible to induce seizures of various types in rodents.

CONCLUSION. An inexpensive modern, well-reproducible, impulse-dependent model of the formation of simple partial motor seizures and generalized seizures in rats has been modified and tested.

KEY WORDS: epilepsy, focal and generalized seizures, experimental model.

For citation: Siamionik I. A., Korneeva M. A., Terekhov V. S., Parashchenko A. O., Fiodarava E. V., Rjabceva S. N. Modification of the experimental model of electrical induced seizures in animals. Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova. 2022;14(4):84–88. DOI 10.56618/20712693_2022_14_4_84

Введение.

В настоящее время по результатам международных исследований отмечается возрастание количества заболевших эпилепсией на 90–100/100 000 человек в год [1, 2]. До 20 % пациентов страдают истинной фармакорезистентной эпилепсией. «Фармакорезистентная эпилепсия определяется как невозможность достижения стойкой ремиссии приступов при применении двух хорошо переносимых, правильно выбранных и в адекватных дозах назначенных антиприступных медикаментов (в монотерапии или в комбинации)» [3–4]. Резистентными также считаются лица, у которых отмечается лекарственная непереносимость. Новые препараты для лечения эпилепсии появляются достаточно редко. Одной из причин является отсутствие воспроизводимых экспериментальных моделей различных типов эпилептических приступов у животных. Сам процесс тестирования является многоэтапным, трудозатратным, и дорогостоящим. Одни препараты, демонстрирующие хороший противоэпилептический эффект, оказываются чересчур токсичными, другие препараты, оказывавшие благоприятный эффект у лабораторных животных, оказываются непригодными для применения у человека в связи с разной биологической доступностью или побочными эффектами. Кроме того, противоэпилептические препараты часто избирательно лучше работают на определенном типе приступов. К примеру, карбамазепин лучше купирует простые парциальные моторные приступы, вальпроаты — абсансы, клоназепам — вегето-висцеральные приступы [5–6].

По вышеперечисленным причинам актуальна разработка моделей конкретных типов эпилептических приступов. Цель данного исследования — адаптировать экспериментальную модель электрической стимуляции парциальных и генерализованных эпилептических приступов.

Материалы и методы.

Экспериментальное исследование проведено на белых крысах линии Wistar массой 280–320 г. с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии принципами биоэтики и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986) [7]. Животные содержались в условиях вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» при температуре $22,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, с 12-ти часовым режимом день / ночь. Манипуляции проводились в утренние часы.

В исследование были включены 40 животных, которые были разделены на две группы: первая вклю-

чала грызунов, которым выполнена имплантация внутримозгового электрода и электрическая стимуляция парциальных эпилептических приступов ($n=20$); вторая группа — животные после имплантации внутримозгового электрода с последующей стимуляцией генерализованных эпилептических приступов ($n=20$). Оценка характера развивающихся эпилептических приступов во время стимуляции проводилась по пятибалльной шкале Расина (1972) [8]. Сопоставление типов приступов — парциальных и генерализованных — проводилось на основании соответствия приступов у человека по Гасто со шкалой Расина (таблица 1) [9].

Таблица 1. Сравнение классификаций типов приступов у крысы и человека [8–9].

Table 1. Comparison of classifications of rat and human seizures [8–9].

Баллы по шкале Расина (1972)	Соответствующий тип приступа по Гасто (1970)
1 балл — лицевые клонусы	парциальные
2 балла — клонические судороги шеи	парциальные
3 балла — клонические судороги передних конечностей без стойки на задних лапах	парциальные или вторично генерализованные
4 балла — стойка на задних лапах, клонические судороги передних конечностей со стойкой на задних лапах	вторично генерализованные
5 баллов — клонические судороги передних конечностей со стойкой на задних лапах и потерей постурального контроля	вторично генерализованные

Экспериментальная часть. Медикаментозная седация перед имплантацией электродов проводилась смесью из двух препаратов: кетамина (в дозе 75 мл/кг) и диазепама (в дозе 5 мг/кг). После наступления наркозного сна (животные не двигались, болевая реакция отсутствовала) выполнялась обработка операционного поля: над местом предполагаемого разреза на голове животного от уровня глазниц до шеи состригали шерсть, кожу обрабатывали 5 % спиртовым р-ром йода, подкожно вводили 1 мл 1 % раствора лидокаина. Разрез выполнялся строго по средней линии головы крысы, начиная от линии соединяющих центр глаз и заканчивая на 3 см каудальнее. Проводилось скелетирование кости, с помощью специальных фиксаторов края раны разводились в стороны.



Рисунок 1. Этапы установки электродов: А — определение точки фрезевого отверстия с помощью стереотаксического аппарата, Б — фрезевое отверстие в кости черепа животного, В — расположение внутримозгового и подкожного электродов.

Figure 1. Electrode installation stages: А — point determination using a stereotaxic apparatus, В — burr hole in the animal's skull bone, В — location of the intracerebral and subcutaneous electrodes.

Для определения точки трепанации кости черепа использовали стереотаксический аппарат. Координаты точки трепанации на черепе устанавливались на 2 мм роstralнее и правее от брегмы (точки пересечения сагитального и венечного шва на черепе подопытного животного), которая помечалась с помощью маркера. Далее с помощью фрезы диаметром 2 мм в данной точке делали фрезевое отверстие (рисунок 1А-Б).

В экспериментальной модели использовали два игольчатых электрода. Красный электрод (диаметром 0,6 мм и длиной 5 мм) сгибали под углом в 90° таким образом, что внутримозговая часть была длиной не более 3 мм и помещали во фрезевое отверстие, протыкая твердую мозговую оболочку и внедряя в ткань коры моторной зоны правого полушария головного мозга животного на глубину 2–3 мм. Фиксация внутримозгового электрода выполнялась с помощью быстротвердеющего цианоакрилата. Черный электрод (диаметром 0,6 мм и длиной 5 мм) сгибали в виде петли и фиксировали к мягким тканям апоневроза и/или надкостницы левой половины черепа крысы (рисунок 1В). Через контраптертуру в шейной области крысы на спине выводились концы игольчатых электродов. Ушивания ран выполнено рассасывающимся полидиоксановым шовным материалом «Сургикрол» 3/0. Швы обрабатывали спиртовым раствором йода. Для предотвращения инфицирования подопытным животным подкожно вводили растворенный в воде для инъекций цефтриаксон в дозе 200 мг/кг. Свободные наружные концы электродов зачищали от защитного материала, оголяя металлические стержни. В послеоперационном периоде и на протяжении всего эксперимента каждое животное находилось в индивидуальной клетке. Через неделю после имплантации начиналась электростимуляция с помощью тест-стимулятора «Медтроник-3625» (The Medtronic Model 3625 Test Stimulator). На период электрической стимуляции к оголенным свободным концам электродов прикрепляли зажимы тест-стимулятора. Экспериментальным путем выбраны следующие

параметры для стимуляции электрическим током: частота импульсов — 80 Гц, ширина пульса — 800 в мкс, амплитуда пульса (напряжение) — от 0 до 10 В. Подопытные крысы стимулировались один раз в сутки в течении двух недель.

Результаты.

В процессе электрической стимуляции были установлены границы амплитуды пульса тока, позволяющие получить парциальные или генерализованные приступы (согласно таблице 1) у подопытных животных. При амплитуде пульса тока до 4,5 В у крыс наблюдались парциальные судороги (стадии 1 и 2 по шкале Расина), в диапазоне от 4,5 до 5,5 В — парциальные или со вторичной генерализацией (стадия 3 по шкале Расина) и выше 5,5 В — генерализованные судороги (стадии 4 и 5 по шкале Расина).

Средняя длительность электрически-индуцированного парциального приступа у грызунов первой группы исследования составила $2,007 \pm 0,36$ с (таблица 2). Во время приступа на первой стадии по шкале Расина наблюдалась следующая двигательная активность: прищуривание глаз, чаще всего животные прищуривали оба глаза или только правый, открывание рта, миоклонические подергивания лицевой мускулатуры и вибрисс. Следующая стадия характеризовалась поджиманием головы под себя и прижатием к туловищу, поворотами головы влево и вверх, вправо и вверх, либо же вправо и вниз, влево и вниз, запрокидыванием головы назад. На третьей стадии животные продолжали запрокидывание головы в стороны и к ним присоединялась одна из передних конечностей, с миоклоническими судорогами, которая двигалась в том же направлении, что и голова. Было установлено, что при движении головы влево, клонус начинался в правой передней лапе, при движении головы вправо — в левой. Если же животное поджимало голову под себя, то миоклонические судороги наблюдались сразу в двух передних лапах. Далее следовал клонус передних конечностей с подъемом на задние (рисунок 2).

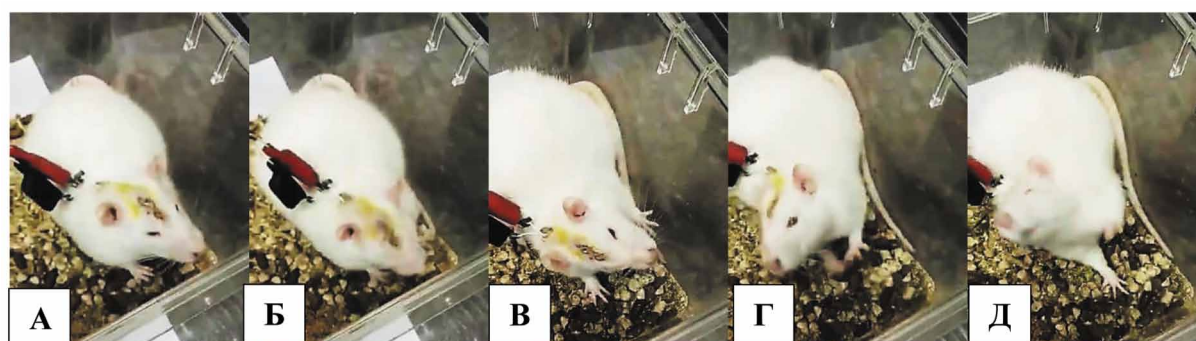


Рисунок 2. Парциальные приступы при диапазоне амплитуды пульса тока (до 4,5 В):

А — зажмуривание глаз, Б — полное закрытие глаз и прижимание головы к туловищу, В — поворот головы вправо и с наклоном, Г — поворот головы и начало клонуса левой передней лапы, Д — запрокидывание головы и клонус левой передней лапы.

Figure 2. Partial seizures with a current pulse amplitude range (up to 4.5 V):

А — eyes squinting, Б — complete closure of the eyes and pressing the head to the body, В — turning the head to the right and with an incline, Г — turning the head and the clonus onset of the left front paw, Д — tilting of the head and clonus of the left front paw.

Таблица 2. Длительность стадий двигательной активности у грызунов (среднее значение ± стандартная ошибка).

Table 2. Duration of motor activity stages in rodents (mean value ± standard error).

Группа	Стадии по Расина, с				
	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	5 стадия
первая	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,02	1,79 ± 0,42	-	-
вторая	0,05 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,3 ± 0,14	1,54 ± 0,49	4,2 ± 1,43

У 44% животных отмечалось скрещивание и разведение передних лап. Другая часть грызунов по время приступа прижимала передние конечности (обе или по очередности) к телу и отводила вперед и/или в сторону. У 12% крыс отмечен «груминг»-подобные судороги (движения передними лапами по типу «умывания»). При этом голова запрокидывалась сильнее назад, либо животные начинали двигать головой из стороны в сторону.

Во второй группе эксперимента генерализованные электрически-индуцированные эпилептические приступы характеризовались развитием всех пяти стадий поведенческих реакций грызунов. Четвертая стадия характеризовалась подъемом тела крыс на задние лапы, пятая стадия — падение на бок с развитием генерализованных клонических или тонических судорог. У 75% крыс сразу по прекращению стимуляции развивался тремор передних лап продолжительностью $6,64 \pm 2,11$ с. У остальных животных отмечалась практически полная неподвижность (по типу ступора) длительностью $6,4 \pm 1,89$ с, что, вероятно, объясняется постиктальной слабостью.

Длительности различных стадий поведенческой реакции экспериментальных животных в группах исследования отражена в таблице 2.

Следовательно, контролируя напряжение подаваемого тока мы смогли вызывать различные по характеру эпилептические припадки у подопытных животных.

Заключение. Экспериментальные модели эпилепсии для изучения патогенеза заболевания и при доклинических исследований противоэпилептических лекарственных препаратов требуют дальнейшего развития. Выделен широкий спектр физических и химических факторов, позволяющих вызвать развитие эпилептических приступов у подопытных грызунов. Наиболее распространены и применимы фармакологическая (использование агонистов или блокаторов различных типов клеточных рецепторов — пентилентетразол, каиновая кислота, пикротоксин, пилокарпин и др. рецепторов нейронов) и химическая (использование токсических химических соединений, например, хлорида железа (III) или органофосфатов) экспериментальные модели эпилептических приступов у грызунов. В данных моделях происходит индукция спонтанных генерализованных эпилептических приступов с развитием эпилептического статуса у крыс после инъекции вещества. Однако при фармакологической и химической модели эпилептические приступы у грызунов возникают не постоянно, не «по команде» и у разных тестируемых животных в группе частота возникновения приступов может сильно варьировать. Фармакологическая и химическая экспериментальные модели эпилептических приступов позволяют изучать патогенез эпилепсии и оценивать эффективность разрабатываемых противоэпилептических препаратов только при генерализованных эпилептических приступах. При использовании данных моделей в докли-

нических испытаниях новых препаратов проблемой становится оценка в интерпретации получаемых результатов с определенной дозой вещества (оценкой дозозависимого эффекта). Также для начала работы препарата необходимо время от момента его поступления в организм лабораторного животного до начала работы по предотвращению возникновения приступов. Поскольку как уже отмечалось ранее приступы возникают не «по команде» и с разной частотой у разных подопытных животных в группе, то интерпретация получаемых результатов по времени начала и окончания действия противосудорожного вещества является затруднительной.

Менее широко используется экспериментальная модель индукции эпилептических приступов электрическим током, так как требует имплантации электродов в вещество головного мозга подопытных животных и регулярной стимуляции для развития эпилептических приступов. Однако данная модель является оптимальной для стимуляции различных эпилептических приступов в заданном промежутке времени и у всех подопытных животных групп исследования.

Нами была модифицирована и отработана недорогая современная, хорошо воспроизводимая, пульсозависимая модель формирования простых парциальных моторных приступов и генерализованных эпилептических приступов у крыс.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Фундаментальные и прикладные науки — медицине», задание 1.31 «Изучение структурных изменений ткани головного мозга при прогрессировании эпилепсии от фокальных к вторичным генерализованным эпилептическим приступам» (2019–2020 гг.). **Financing.** The work was carried out within the framework of the State Research Program of the Republic of Belarus “Fundamental and applied sciences — for medicine”, project 1.31 “Study of structural changes in brain tissue during the progression of epilepsy from focal to secondary generalized epileptic seizures” (2019–2020).

ORCID авторов / ORCID of authors

Семёник Ирина Александровна/
Siamionik Iryna Alexandrovna
<https://orcid.org/0000-0002-7520-1945>

Корнеева Марина Александровна/
Korneeva Marina Alexandrovna
<https://orcid.org/0000-0002-7882-6107>

Терехов Владимир Сергеевич/Terekhov Vladimir Sergeevich
<https://orcid.org/0000-0003-0268-9318>

Паращенко Анастасия Олеговна/
Parashchenko Anastasia Olegovna
<https://orcid.org/0000-0002-2611-9726>

Фёдорова Екатерина Викторовна/
Fiodarava Ekaterina Viktorovna
<https://orcid.org/0000-0003-3592-6252>

Мелик-Касумов Тигран Бегларович / Melik-Kasumov Tigran
<https://orcid.org/0000-0002-7927-6266>

Рябцева Светлана Николаевна/
Rjabceva Svetlana Nikolaevna
<https://orcid.org/0000-0001-5960-3656>

Литература/References

- Schachter SC. Vagal nerve stimulation in the treatment of Epilepsy. Singapore: Blackwell Publishing Ltd. 2009;1017–1023.
- Dharmarajan K, Rich M. W. Epidemiology, pathophysiology, and prognosis of heart failure in the older adults. Heart Failure Clinics. 2007;3(4):381–387. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2017.02.001>
- Трифонов И.С., Магомедсултанов А. И., Синкин М.В. Прогноз исходов хирургического лечения фармакорезистентных форм эпилепсии (обзор литературы). Российский нейрохирургический журнал им. проф. А.Л. Поленова. 2021;13(3):85–92. [Trifonov IS, Magomed Sultanov AI, Sinkin MV. Prediction of outcomes of surgical treatment of drug-resistant forms of epilepsy (literature review). Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova. 2021;13(3):85–92. (In Russ.).]
- Котов А.С., Фирсов К.В., Санду Е.А. Фармакорезистентная эпилепсия. Клиническая лекция. Русский медицинский журнал. 2021;6:33–39. [Kotov AS, Firsov KV, Sandu EA. Pharmacoresistant epilepsy. Clinical lecture. Rossiiskii medicinskii zhurnal. 2021;6:33–39. (In Russ.).]
- Rho JM, White HS. Brief history of anti-seizure drug development. Epilepsia Open. 2018;3(2):114–119. <https://doi.org/10.1002/epi4.12268>
- Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. Seizure. 2010;19(10):650–655. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.10.027>
- European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Explanatory Report. Strasbourg. 1986;123. Accessed March 18, 1986.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1972;32:281–294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
- Pitkanen A, Schwartzkroin P, Moshe S. Models of Seizures and Epilepsy. Elsevier Inc. 2005. <https://www.elsevier.com/books/models-of-seizures-and-epilepsy/pitkanen/978-0-12-088554-1>