

Вплив неонатальних судомних нападів на синаптичну пластичність соматосенсорної кори мозку щурів

О.В. Ісаєва, О.О. Лунько, А.К. Романов, Д.С. Ісаєв

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: olena.isaeva@biph.kiev.ua

З використанням експериментальної моделі неонатальних повторюваних судом досліджено вплив епілептичних нападів на різні форми синаптичної пластичності нейронів соматосенсорної кори. Встановлено, що судомні напади, індуковані флюротилом у ранній період життя, не впливають на депресію постсинаптичних потенціалів нейронів II шару соматосенсорної кори головного мозку, викликану високочастотною стимуляцією IV шару відповідної колонки та посттетанічну потенціацію амплітуди постсинаптичних потенціалів, але призводять до хронічного підвищення довготривалої потенціації збуджувальної синаптичної передачі цих нейронів. Описані зміни синаптичної пластичності можуть впливати на обробку сенсорної інформації у пацієнтів, у яких спостерігалися рекурентні судоми в період раннього розвитку.

Ключові слова: епілепсія; соматосенсорна кора; синаптична пластичність; флюротил

ВСТУП

Судомні напади у новонароджених дітей – часті клінічні прояви уражень нервової системи і пов'язані зі значним ризиком хронічних наслідків, у тому числі з епілепсією, когнітивними та поведінковими порушеннями [1, 2]. Багато клінічних, а також фундаментальних досліджень вказують, що епілептичні напади незалежно від етіології негативно впливають на розвиток нервової системи [3, 4].

У попередніх дослідках, з використанням флюротилової моделі повторюваних епілептичних судом в неонатальний період, показано, що рекурентні конвульсії у перші тижні життя помітно підвищують вірогідність виникнення епілептичних нападів протягом наступних періодів постнатального розвитку, а також призводять до порушення балансу збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі в нейронах II шару соматосенсорної кори [5–7].

Метою нашої роботи було дослідження впливу рекурентних епілептичних нападів

© О.В. Ісаєва, О.О. Лунько, А.К. Романов, Д.С. Ісаєв

на різні форми синаптичної пластичності в цих нейронах.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Sprague-Dawley. Усі маніпуляції з експериментальними тваринами виконувалися з дотриманням правил роботи з дослідними тваринами в установах Національної академії наук України, а також відповідно до вимог міжнародної Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують із експериментальною та науковою метою. Протокол індукції судомних нападів включав розміщення дослідних тварин у пластиковій камері та повільне (30 – 40 мкл/хв) додавання флюротилу на фільтрувальний папір, розміщений у верхній її частині. Інгаляція флюротилу викликала повторні короткотривалі конвульсії, що проявлялося у поведінці та у характерній судомній активності в складі електроенцефалограми. Щури були

піддані дії флюоротилу (дослідна група) з 1-ї по 15-ту добу після народження (п'ять-шість нападів на добу) [7]. Контрольним тваринам проводили всі процедури, що і дослідним, за винятком використання флюоротилу.

Електрофізіологічні дослідження проводили на свіжоізолюваних зрізах мозку 46 – 60-добових шурів. Після виділення мозок швидко занурювали в холодний базовий розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 126; KCl – 3,5; CaCl₂ – 2,0; MgCl₂ – 1,3; NaHCO₃ – 25; NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 11 (pH 7,3). Зрізи товщиною 400 мкм отримували за допомогою вібратора («Campden Instruments LTD», Велика Британія) та залишали на одну годину (20 – 22 °C) у базовому розчині, що постійно насичували газовою сумішшю (95 % O₂ і 5 % CO₂).

Зрізи були перенесені до термостатичної камери, де їх постійно перфузували оксигенованим базовим розчином зі швидкістю 2 мл/хв. Досліди проводили при 30 – 32°C. Позаклітинні потенціали вимірювали з II шару соматосенсорної кори шурів за допомогою скляних мікроелектродів (1 – 3 МОм), заповнених базовим розчином, та з використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму («A-M Systems», США). Записи оцифровували із використанням аналогово-цифрового перетворювача («National Instruments», США) та накопичували на комп'ютері за допомогою програми WinWCP.

Для реєстрації синаптичної пластичності подразнювали IV шар соматосенсорної кори. Викликані постсинаптичні потенціали (ВПСП) фіксували у II шарі відповідної колонки. Базову лінію вимірювали за таким протоколом: наносили прямокутні (0,1 с) стимули амплітудою 30 – 80 мкА, здатні викликати половину максимальної амплітуди ВПСП. Подразнення наносили кожні 30 с. Запис стабільної базової активності тривав 10 – 30 хв. Короткотривалу депресію вимірювали під час прикладання серії з 10 стимулів з частотою 100 с⁻¹. Довготривалу потенціацію (ДП) викликали згідно з протоколом тетаніч-

ної стимуляції [8]. Наявність ДП визначали як статистично достовірне збільшення амплітуди ВПСП, що спостерігалось більше ніж 30 хв після тетанічної стимуляції порівняно з амплітудою ВПСП під час реєстрації базової лінії (P < 0,05). Аналіз результатів досліджень проводили з використанням критерію t Стьюдента та ANOVA-тесту.

РЕЗУЛЬТАТИ

Стимуляція IV шару соматосенсорної кори викликала постсинаптичні потенціали в II шарі відповідної колонки на зрізах мозку. Максимальна амплітуда ВПСП не відрізнялася між групами: 208,4 ± 5,7 мкВ, n = 12 у контрольній та 205,5 ± 9,9 мкВ, n = 7 у дослідній групі, P = 0,8 (рис. 1). При додаванні блокатора гальмівної синаптичної передачі SR 95531 (50 мкмоль/л) у позаклітинний розчин амплітуда ВПСП несуттєво збільшилась як у контрольній (217,2 ± 5,8 мкВ, n = 16), так і в дослідній (214,4 ± 7,4 мкВ, n = 14) групі (див. рис. 1).

Досліджуючи вплив повторюваних епілептичних нападів, викликаних флюоротилом, на синаптичну пластичність використовували протокол високочастотної стимуляції IV шару соматосенсорної кори на зрізах мозку

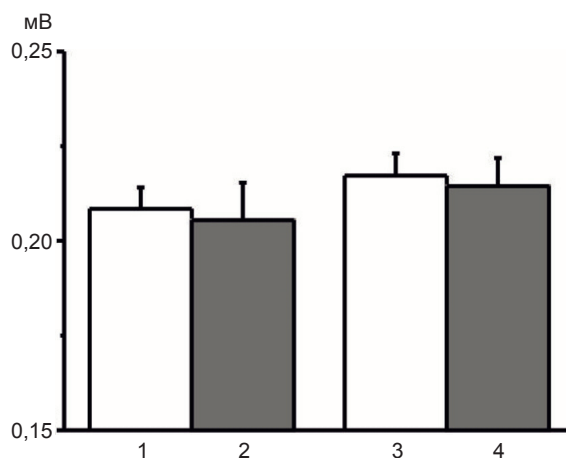


Рис. 1. Амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) до (1,2) і після (3,4) додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі SR 95531 в контрольній (1,3) та дослідній (2,4) групі

тварин обох груп [8]. Після подразнення ВПСП відводили від II шару соматосенсорної кори протягом 1 год із частотою $0,05 \text{ с}^{-1}$. Довготривалу потенціацію ВПСП (понад 30 хв) спостерігали в чотирьох із дванадцяти (33,3 %) зрізах контрольної групи та в двох із десяти зрізів (20 %) дослідної групи. В решті зрізів високочастотна стимуляція викликала короткотривалу потенціацію ВПСП (менше 2 – 3 хв). Підвищення амплітуди ВПСП після стимуляції в зрізах обох груп статистично не відрізнялося і становило $120,2 \pm 13,0 \%$ ($n = 8$) у контролі та $130,1 \pm 9,8 \%$ ($n = 8$) у дослідній групі від середнього значення базової активності.

Відомо, що пригнічення гальмівної синаптичної передачі може сприяти індукції довготривалої потенціації синаптичних відповідей [9]. За наявності SR 95531 в позаклітинному розчині тривале підвищення ВПСП спостерігали в шести з дев'яти (66,7 %) зрізах контрольної групи та в шести з семи зрізах (85,7 %) дослідної групи. Додавання специфічного блокатора N-метил-D-аспартат (НМДА)-рецепторів аміно-5-фосфоновалеріанова кислоти в концентрації 50 мкмоль/л пригнічувало потенціацію синаптичних відповідей в обох групах, що свідчить про залучення НМДА-рецепторів до індукції ДП в досліджуваних синапсах. Середня максимальна потенціація ВПСП суттєво не відрізнялася між групами: контроль ($n = 6$), $157,8 \pm 6,5 \%$ та дослід ($n = 6$), $152,0 \pm 11,9 \%$, $P = 0,7$ (Рис. 2). Через 50 хв після стимуляції потенціація амплітуди ВПСП спостерігалася лише в дослідній групі ($126,1 \pm 7,5 \%$). В контрольній групі через 50 хв після стимуляції амплітуда ВПСП повністю відновилася до базового рівня ($98,8 \pm 7,8\%$). Довготривала її потенціація була значно збільшена в дослідній групі порівняно з контролем ($P < 0,001$, див. рис. 2).

Упродовж високочастотної стимуляції амплітуда ВПСП значно знижувалась (Рис. 3). Ця форма короткотривалої синаптичної пластичності спостерігається в різних ділянках мозку [10–14] і, як вважають, забезпечує

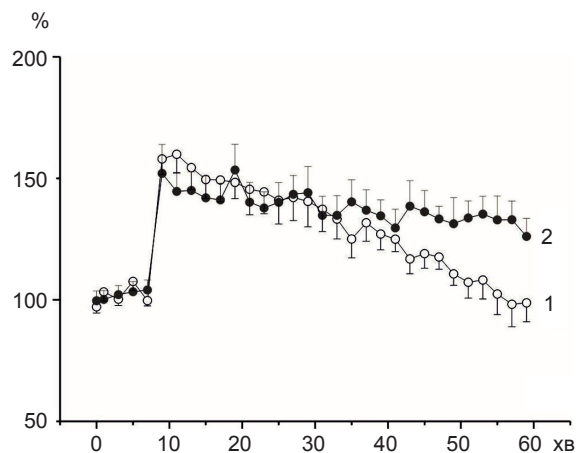


Рис. 2. Вплив флюротиліндукованих судом на довготривалу потенціацію синаптичних відповідей нейронів II шару соматосенсорної кори головного мозку, викликану високочастотною стимуляцією нейронів IV шару відповідної колонки. Представлено нормалізовані за середнім значенням базової активності амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) до і після додавання тетанічної стимуляції: 1 – середні амплітуди ВПСП у контролі; 2 – у досліді

специфічний синаптичний контроль кортикальних мереж [15]. У нашому дослідженні амплітуда ВПСП знизилася до $15,8 \pm 0,1\%$ ($n = 7$) в контролі та $25,2 \pm 0,1\%$ ($n = 5$) у

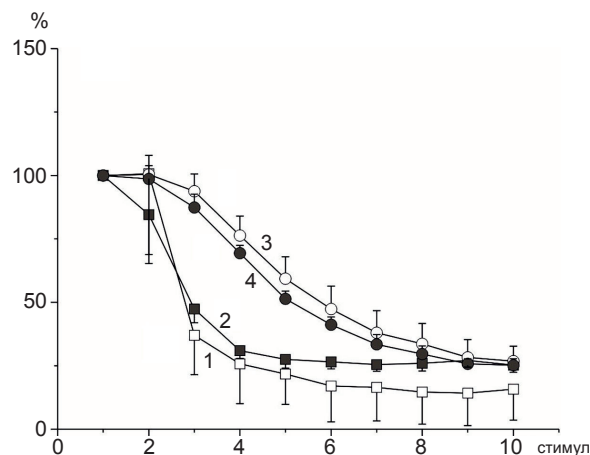


Рис. 3. Вплив судом, індукваних флюротилом, на короткотривалу депресію викликаних постсинаптичних потенціалів. Залежність викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) нормалізованих за значенням амплітуди ВПСП викликаних у відповідь на перший стимул від порядкового числа стимулу: 1,3 – середні амплітуди ВПСП в контролі до (1,2) і після (3,4) додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі SR 95531

дослідній групі ($P = 0,4$). За умов наявності SR 95531 в позаклітинному розчині зниження постсинаптичної відповіді під час високочастотної стимуляції відбувалося повільніше в обох досліджуваних групах порівняно з експериментами без додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі (див. рис. 3), але впродовж 100 мс стимуляції амплітуда ВПСР знизилася до значень, які спостерігали без додавання SR 95531 ($26,8 \pm 0,1\%$ ($n = 10$) в контрольній та $25,2 \pm 0,1\%$ ($n = 7$) в дослідній групі, $P = 0,9$). Не виявлено достовірної різниці між значенням амплітуд ВПСР в обох групах за наявності або без SR 95531 в позаклітинному розчині ($P < 0,05$, див. рис. 3).

ОБГОВОРЕННЯ

У попередній роботі показано, що епілептичні напади, спровоковані дією флюротили в неонатальний період життя, викликають хронічні зміни балансу збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі в нейронах II шару соматосенсорної кори та підвищення збудливості нервових мереж [5–7]. У нашому дослідженні амплітуда ВПСР у II шарі соматосенсорної кори, викликана подразненням IV шару, не відрізнялася між досліджуваними групами, що вказує на те, що неонатальні напади не впливають на синаптичну передачу в цьому вертикальному шляху неокортекса.

Епілептичні напади, індуковані флюротилом в неонатальний період, не впливали на депресію постсинаптичних відповідей, викликану високочастотною стимуляцією та середню максимальну посттетанічну потенціацію амплітуди ВПСР. Експерименти з блокатором НМДА-рецепторів показали, що останні залучені у фазу індукції довготривалої потенціації в досліджуваних синапсах. Відсутність впливу неонатальних нападів на максимальну посттетанічну потенціацію ВПСР узгоджується з нашим попереднім дослідженням [6], де було показано, що амплітуда мініатюрних НМДА-залежних збудливих постсинаптичних струмів (як індикатор

постсинаптичної зміни) не змінювалась у II шарі соматосенсорної кори в дослідній групі порівняно з контролем.

У нашому дослідженні довготривала потенціація синаптичних відповідей була значно підвищена в дослідній групі. Під час високочастотної стимуляції активація НМДА-рецепторів збільшує внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію. Внаслідок цього активуються різноманітні внутрішньоклітинні кальційзалежні месенджери, що мають вирішальне значення у підтриманні ДП [16, 17]. Вплив протеїнкіназ, аденілатциклаз, дофамінових рецепторів, а також пресинаптичних факторів у підтриманні ДП було встановлено на різних ділянках мозку [16]. Попередні роботи показали, що судомні напади впливають на довготривалу синаптичну пластичність, і ДП може бути змінена у тварин з генетичною схильністю до судом. Дослідження з використанням кіндлінгової моделі довели, що епілептичні напади знижують вірогідність виникнення ДП у відповідь на високочастотну стимуляцію, а також змінювати характеристики посттетанічної потенціації ВПСР [18]. Проте хронічне зниження порогу збудження нервової системи не завжди пов'язане з погіршенням спроможності синапсів до потенціації, яка швидше залежить від клітинних механізмів, що лежать в основі збільшення активності нейронів. Так, було встановлено, що у тварин з генетичною схильністю до судом підвищувалася ДП [19]. Відомо, що неонатальні напади, викликані інгаляцією флюротили, значно знижують ДП у гіпокампі [20]. У нашому дослідженні вона була значно підвищена в соматосенсорній корі щурів дослідної групи, що вказує на вибіркового впливу неонатальних судом на різні ділянки мозку. Той факт, що повторювані судомні, індуковані у новонароджених щурів, по-різному впливають на НМДА-опосередковану збуджувальну синаптичну передачу в соматосенсорній корі і гіпокампі щурів, підтримує це припущення [6, 21].

Отже, неонатальні судомні напади призводять до хронічного підвищення довготривалої потенціалії синаптичних відповідей у нейронах соматосенсорної кори головного мозку. Зміни синаптичної пластичності можуть впливати на обробку сенсорної інформації у пацієнтів, у яких спостерігалися рекурентні судоми в період раннього розвитку, а також порушувати сенсорні процеси.

Е.В. Исаева, А.А. Лунько, А.К. Романов, Д.С. Исаев

ВЛИЯНИЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ СУДОРОЖНЫХ ПРИСТУПОВ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫС

С использованием экспериментальной модели неонатальных повторяющихся эпилептических судорог исследовано их влияние на различные формы синаптической пластичности нейронов соматосенсорной коры. Установлено, что судорожные приступы, индуцированные флуротилом в ранний период жизни, не влияют на депрессию постсинаптических потенциалов нейронов II слоя соматосенсорной коры головного мозга, вызванную высокочастотной стимуляцией IV слоя соответствующей колонки и посттетаническую потенциацию амплитуды постсинаптических потенциалов, но приводят к хроническому повышению долговременной потенциации возбуждающей синаптической передачи этих нейронов. Описанные изменения синаптической пластичности могут влиять на обработку сенсорной информации у пациентов, у которых наблюдались рекуррентные судороги в период раннего развития. Ключевые слова: эпилепсия; соматосенсорная кора; синаптическая пластичность; флуротил.

E.V. Isaeva, O.O. Lunko, A.K. Romanov, D.S. Isaev

EFFECT OF NEONATAL SEIZURES ON THE SYNAPTIC PLASTICITY OF RAT SOMATOSENSORY CORTEX

Using an experimental model of neonatal recurrent seizures we investigated the influence of epileptic seizures in the various forms of synaptic plasticity in neurons of the somatosensory cortex. We found that early seizures do not affect the post-tetanic potentiation of the amplitude of the postsynaptic potentials and the depression of postsynaptic potentials during high-frequency stimulation. However they result in the chronic increase of the long-term potentiation of synaptic transmission. These changes of synaptic plasticity may affect the processing

of the sensory information in patients with a history of recurrent seizures during early development.

Key words: epilepsy; somatosensory cortex; synaptic plasticity; flurothyl

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

1. Holmes GL. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:101–5.
2. Ronen GM, Buckley D, Penney S, Streiner DL. Long-term prognosis in children with neonatal seizures: A population-based study. *Neurology.* 2007;69:1816–22.
3. Glass HC, Hong KJ, Rogers EE, Jeremy RJ, Bonifacio SL, Sullivan JE, et al. Risk factors for epilepsy in children with neonatal encephalopathy. *Pediatr Res.* 2011;70:535–40.
4. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP. Clinical Neonatal Seizures are Independently Associated with Outcome in Infants at Risk for Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *J Pediatr.* 2009;155:318–23.
5. Isaeva E, Isaev D, Khazipov R, Holmes GL. Long-term suppression of GABAergic activity by neonatal seizures in rat somatosensory cortex. *Epilepsy Res.* 2009;87:286–9.
6. Isaeva E, Isaev D, Savrasova A, Khazipov R, Holmes GL. Recurrent neonatal seizures result in long-term increases in neuronal network excitability in the rat neocortex. *Eur J Neurosci.* 2010;31(8):1446–55.
7. Isaev DS, Isaeva E V., Savrasova A V., Holmes GL. Effect of Neonatal Epileptic Attacks on the Activity of Neocortical Neurons. *Neurophysiology.* 2011; 43(3):227–8.
8. Diamond DM, Dunwiddie T V, Rose GM. Characteristics of hippocampal primed burst potentiation in vitro and in the awake rat. *J Neurosci.* 1988;8:4079–88.
9. Wigström H, Gustafsson B. Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature.* 1983 Feb 17;301(5901):603–4.
10. Varela JA, Sen K, Gibson J, Fost J, Abbott LF, Nelson SB. A Quantitative Description of Short-Term Plasticity at Excitatory Synapses in Layer 2/3 of Rat Primary Visual Cortex. *J Neurosci.* 1997 Oct 15;17(20):7926–40.
11. Castro-Alamancos MA, Donoghue JP, Connors BW. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *J Neurosci.* 1995;15:5324–33.
12. Galarreta M, Hestrin S. Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci.* 1998;1:587–94.
13. Hernan AE, Holmes GL, Isaev D, Scott RC, Isaeva E. Altered short-term plasticity in the prefrontal cortex after early life seizures. *Neurobiol Dis.* 2013;50:120–6.
14. Hernan AE, Alexander A, Jenks KR, Barry J, Lenck-Santini P-P, Isaeva E, et al. Focal epileptiform activity in the prefrontal cortex is associated with long-term attention and sociability deficits. *Neurobiol Dis.* 2014

- Mar;63:25–34.
15. Abbott LF, Varela JA, Sen K, Nelson SB. Synaptic depression and cortical gain control. *Science*. 1997; 275:220–4.
 16. Malinow R, Madison D V, Tsien RW. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature*. 1988;335:820–4.
 17. Matthies Jr. H, Behnisch T, Kase H, Matthies H, Reymann KG. Differential effects of protein kinase inhibitors on pre-established long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 1991;121:259–62.
 18. Hesse GW, Teyler TJ. Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electroconvulsive seizures. *Nature*. 1976 Dec 9;264(5586):562–4.
 19. Luthi A, Van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, et al. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 1997;17:4688–99.
 20. Zhou JL, Shatskikh TN, Liu X, Holmes GL. Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures. *Eur J Neurosci*. 2007;25(12):3667–77.
 21. Isaeva E, Isaev D, Khazipov R, Holmes GL. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizures. *Eur J Neurosci*. 2006;23(6):1559–66.

Матеріал надійшов до редакції 29.01.2015