

*На правах рукописи*

**КАЛИНИНА  
ДАРЬЯ СЕРГЕЕВНА**

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
КОРЫ МОЗГА В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ  
ГИПОКСИЮ**

03.03.01. – Физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в лаборатории сравнительной физиологии и патологии центральной нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

**Журавин Игорь Александрович**

доктор биологических наук, зав.лабораторией сравнительной физиологии и патологии ЦНС Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН

**Официальные оппоненты:**

**Кропотов Юрий Дмитриевич**

доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией нейробиологии программирования действий Института мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН

**Рыбникова Елена Александровна**

доктор биологических наук, заместитель директора по науке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

**Ведущая организация:**


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Защита состоится «20» июня 2017 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.127.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, тел. (812)-552-79-01, электронная почта [office@iephb.ru](mailto:office@iephb.ru), сайт <http://www.iephb.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44), с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с авторефератом и диссертацией – на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Р.Г. Парнова

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность проблемы**

Гипоксия или стресс в период пренатального развития является широко распространенной патологией и может приводить к значительным нарушениям в формировании структур и функций головного мозга в последующем онтогенезе (Журавин и др., 2003; Golan et al., 2009; Айламазян и др., 2013). Такая патология эмбриогенеза, в свою очередь, может отражаться на поведении и способности к обучению в индивидуальном развитии, как животных, так и человека. Действие пренатальных средовых факторов на развивающуюся нервную систему – причина многочисленных нарушений развития, которые вносят вклад в патогенез неврологических заболеваний, что является серьезной медико-социальной проблемой. Исследование особенностей созревания мозга в условиях нормального и нарушенного эмбриогенеза у крыс может прояснить механизмы адаптивных перестроек, происшедших в результате патологического воздействия в эмбриогенезе человека.

Известно, что гипоксические воздействия в пренатальный период приводят к изменениям в работе генетического аппарата клетки (Caro, 2001; Rybnikova et al., 2008), нарушению структурно-функциональных свойств клеточных мембран (Mishra and Delivoria-Papadopoulos, 1999) и нейронов в целом (Derrick et al., 2001; Rybnikova and Samoilo, 2015). Выяснено также, что при действии гипоксии на 14 сутки эмбрионального развития крыс наиболее уязвимыми являются пирамидные клетки неокортекса, формирующие функциональные миниколонки, и лабильные шипики, обеспечивающие пластичность нервной системы, что приводит к нарушению поведения и когнитивным дисфункциям (Дубровская и др., 2008; Журавин и др., 2014; Vasilev et al., 2016). Нарушение синаптогенеза (Sousa et al., 2000) и формирования шипикового аппарата дендритов рассматривают в качестве основных факторов патологии развития и когнитивного дефицита (Shapiro and Ribak, 2005; Chen et al., 2010; Sanchez et al., 2012). Можно предположить, что избирательное воздействие пренатальной гипоксии на структуру нервной системы и межклеточные взаимодействия (Zhuravin et al., 2009; Журавин и др., 2014; Vasilev et al., 2016) влияет на общий уровень возбудимости и формирование электрической активности мозга в

постнатальном онтогенезе. Эти изменения могут быть причиной эпилепсии, за счет повышения судорожной готовности (Ahmadzadeh et al., 2010; Sadaghiani et al., 2010).

Показано, что пренатальный стресс повышает чувствительность к эпилептизации в пилокарпин-индуцированной эпилептической модели у самцов и самок крыс (Sadaghiani et al., 2010). Тем не менее, роль пренатальной патологии в патогенезе эпилепсии является спорной. Наблюдаются как просудорожные (Ahmadzadeh et al., 2010; Sadaghiani et al., 2010; Edwards et al., 2002; Frye et al., 1999), так и противосудорожные (Reddy et al., 2002) последствия нарушения эмбриогенеза в зависимости от сроков стрессирования и используемых моделей эпилепсии. Однако по каким причинам возникают эти изменения все еще не до конца ясно. Поэтому важно выяснить механизмы генерации эпилептиформной активности на разных уровнях организации ЦНС с участием различных структур и медиаторных систем мозга при нормальном и патологическом развитии. В исследованиях на животных получили широкое распространение различные модели эпилепсии. Например, модель фокальный кортикальной эпилепсии с использованием 4-аминопиридина (Weissinger et al., 2004), модель, основанная на системном введении пентилентетразола для выявления роли ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов в гиперсинхронизации (Klioueva et al., 2001), модель с использованием электрошока (André et al., 2002) для оценки вовлеченности в эпилептиформную активность ряда структур мозга, от ствола до коры больших полушарий, и многие другие модели. Моделирование эпилептиформной активности позволяет оценить риск развития гиперсинхронизации электрической активности после пренатального стресса, а также приблизиться к пониманию механизмов эпилепсии, ее генерации и распространения у животных и человека на разных стадиях постнатального развития. Последствия пренатального стресса в разные периоды постнатального онтогенеза могут быть различными за счет адаптивных механизмов и функциональных перестроек. Было показано, что локализация очага эпилептиформной активности при моделировании эпилепсии также претерпевает возрастные изменения (Weissinger et al., 2004), поэтому необходимо изучение возрастной динамики процессов гиперсинхронизации у животных с нормальным и нарушенным эмбриогенезом в постнатальном онтогенезе.

Таким образом, пренатальный стресс, нарушая процессы развития ЦНС, по-видимому, приводит к изменениям возбудимости и электрической активности мозга, а

также нарушениям в поведении животных и человека. Изучение возрастной динамики этих показателей у крыс, перенесших гипоксическое воздействие в эмбриональный период, не проводилось. Однако, можно полагать, что такого рода исследование позволит лучше понять процессы нормального и патологического развития мозга в постнатальном онтогенезе.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы заключалась в исследовании особенностей формирования электрической активности новой коры и изменений уровня возбудимости мозга в постнатальном онтогенезе (в частности, при моделировании эпилепсии) у крыс с нормальным эмбриональным развитием и перенесших пренатальную гипоксию.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследовать частотно-временные характеристики электрокортикограммы (ЭКоГ) крыс с нормальным и патологическим развитием в трех возрастных группах (P20-26, P30-45, P90-120) в разных физиологических состояниях в свободном поведении.
2. Сравнить изменения содержания переносчиков глутамата (EAAT1), ГАМК (GAT1) и ацетилхолина (VAChT) в коре и гиппокампе мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию.
3. Оценить возбудимость нервной системы крыс разного возраста с пренатальной патологией при помощи дозированного электрического воздействия.
4. Сравнить устойчивость к эпилептогену пентилентетразолу, антагонисту ГАМК-рецепторов, у крыс разного возраста с нормальным развитием и перенесших пренатальную гипоксию.
5. Сравнить изменение характера эпилептиформной активности в ЭКоГ, вызванной блокатором калиевых каналов 4-аминопиридином, в онтогенезе крыс с нормальным эмбриогенезом и после пренатальной гипоксии.
6. Оценить уровень тревожности и гиперактивности, а также способность к сложным формам обучения у взрослых крыс с пренатальной патологией.

### **Научная новизна результатов**

Впервые изучены особенности формирования электрической активности неокортекса у крыс в трех возрастных периодах, соответствующих детскому (P20-26), подростковому (P30-45) и взрослому (P90-120), перенесших пренатальную гипоксию на E14. Выяснено, что у крыс с нормальным эмбриогенезом в процессе постнатального

развития происходит смещение пика спектральной плотности мощности ЭКоГ тета-ритма бодрствования с низкочастотной к более высокочастотной области, в то время как у животных с пренатальной патологией наблюдается обратная тенденция. Также показано, что в процессе постнатального онтогенеза у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, происходит выраженное снижение суммарной спектральной плотности мощности ЭКоГ медленноволнового сна в диапазоне 1-5 Гц.

Впервые показано изменение содержания белков-переносчиков глутамата и аспартата (EAAT1), ГАМК (GAT1) и ацетилхолина (VAChT) в неокортексе и гиппокампе в возрасте P20, P35 и P90 у крыс, перенесших пренатальную гипоксию. Продемонстрировано увеличение содержания транспортера глутамата EAAT1 в коре мозга во всех исследованных возрастных группах по сравнению с контролем, в то время как в гиппокампе отмечено его снижение наряду с увеличением транспортера ГАМК GAT1 у взрослых крыс. Также впервые показано снижение содержания переносчика ацетилхолина VAChT в процессе постнатального онтогенеза у крыс, перенесших пренатальную гипоксию.

Впервые исследованы изменения возбудимости мозга крыс разного возраста, перенесших пренатальную гипоксию на E14, методами моделирования эпилептических состояний. Показано, что при использовании электрошока более тяжелые и длительные судороги наблюдается у крыс в возрасте P20-26 и P30-45 после пренатальной патологии. При формировании локального очага эпилепсии микроинъекцией 4-апинопиридина впервые было показано, что крысы, перенесшие пренатальную гипоксию, имеют более длительные эпизоды эпилептиформной активности по сравнению с контрольными животными. При системном введении антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пентилентетразола крысы с пренатальной патологией в возрасте P20-26 и P30-45 продемонстрировали большую, а в P90-120 – меньшую устойчивость к данному эпилептогену по сравнению с контрольными животными соответствующих возрастных групп.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

*Теоретическая значимость* данной работы заключается в раскрытии возможных механизмов формирования повышенной возбудимости, вызванной пренатальным стрессом. Продемонстрировано, что пренатальная гипоксия приводит к изменению баланса возбуждающих и тормозных медиаторов в коре мозга и гиппокампе крыс на

разных сроках постнатального онтогенеза. Показано, что в возрасте P20-26 происходит увеличение возбуждения в коре, в то время как у взрослых крыс (P90-120) наблюдается компенсаторное торможение со стороны гиппокампа за счет снижения содержания глутамата и увеличения ГАМК в этой структуре, о чем свидетельствуют изменения содержания транспортеров возбуждающих и тормозных аминокислот.

*Практическая значимость* работы состоит в том, что полученные данные о формировании электрической активности коры мозга в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию, могут быть использованы в анализе спектральной плотности мощности ЭЭГ человека и разработке диагностических критериев смещения баланса возбуждения и торможения при различных патологиях развития. Выявленные аномалии ГАМК-ергической системы мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию, могут быть основой разработки новых фармакологических препаратов для лечения эпилепсии у людей с патологией эмбрионального развития.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. В процессе онтогенеза у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, происходит нарушение в формировании тета-ритма ЭКоГ во время бодрствования и дельта-ритма ЭКоГ во время медленноволнового сна.
2. У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, в медиаторных системах мозга происходит смещение баланса в сторону возбуждения в возрасте P20-26 и P30-45 и торможения в возрасте P90-120, о чем свидетельствуют изменения содержания переносчиков возбуждающих и тормозных аминокислот.
3. В возрасте P20-26 и P30-45 у крыс с пренатальной гипоксией облегчена генерация гиперсинхронизации электрической активности по сравнению с контролем в электрошоковой и 4-аминопиридиновой моделях эпилепсии.
4. У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, в возрасте P20-26 и P30-45 в генерации гиперсинхронизации электрической активности заметно меньшую роль играет торможение, обусловленное ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, тогда как в P90-120 показана большая их вовлеченность при моделировании эпилепсии пентилентетразолом.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Работа изложена на 139 страницах, содержит 6 таблиц и 35 рисунков. Список литературы включает 234 источника, из них - 190 на иностранных языках.

## **Личный вклад**

Автор лично проводил экспериментальные исследования, лабораторную обработку проб, статистический анализ полученных результатов, осуществлял подготовку и описание материала, а также участвовал в написании тезисов и статей.

## **Апробация результатов исследования**

Результаты исследований, вошедшие в диссертационную работу, были представлены в виде устных и стендовых докладов на Всероссийских и международных конференциях: Methodological school: «Methods of data processing in EEG and MEG. Applied aspects of magneto- and electroencephalographic neuroimaging» (Moscow, Russian federation, 2013), Всероссийской молодежной конференции «Нейробиология интегративных функций мозга» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения» (Санкт-Петербург, Россия, 2014), научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА (Москва, Россия, 2016), XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), XV Всероссийского совещания с международным участием и VIII школы по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, Россия, 2016).

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней.



## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использовали 320 самцов крыс линии Wistar (*Rattus norvegicus*) с нормальным и нарушенным эмбриональным развитием трех возрастных групп (рис. 1А):

- P20-26, крысы соответствующие детскому возрасту, который отличается интенсивным формированием ЦНС (Semple et al., 2013);

- P30-45, крысы соответствующие подростковому периоду, в котором наблюдаются существенные изменения в лимбической и префронтальной областях, а также активный нейрональный и синаптический прунинг (сокращение синапсов и нейронов), а значит и реорганизация связей (Brenhouse and Andersen, 2011);

- P90-120, крысы соответствующие взрослому возрасту, отмеченному большей способностью к сложным формам обучения и завершенностью формирования нейрональных сетей (Andrzejewski et al., 2011; Choi et al., 2015).

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977» и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003». Часть работы была выполнена в сотрудничестве с лабораторией Молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ИЭФБ РАН и кафедрой Общей физиологии Санкт-Петербургского государственного университета.

### ***Моделирование пренатальной гипоксии***

Самок крыс линии Wistar на 14-е сутки беременности подвергали воздействию гипоксии в специальной камере емкостью 100 л, содержащей системы терморегуляции, вентиляции, газового анализа и адсорбции выдыхаемого CO<sub>2</sub>. В ходе эксперимента содержание кислорода в камере снижали с 20,7% до 7,0% и поддерживали на этом уровне в течение 3 часов (концентрация CO<sub>2</sub> не превышала 0,2%, t=22°C). Самки контрольной группы в течение трех часов находились в камере при нормальной концентрации O<sub>2</sub>. Далее потомство самок контрольной и экспериментальной групп содержалось в стандартных условиях вивария до достижения соответствующих возрастов (P20-26, P30-45, P90-120).

### ***Регистрация ЭКоГ***

Для регистрации электрокортикограммы (ЭКоГ) билатерально в область сенсомоторной коры имплантировали электроды (2 блока по 4 стальных электрода Ø

200  $\mu$ м, 20-50 кОм, координаты по Paxinos and Watson, 2013: R + 2.0 – 2.0 мм; L 1.5 мм для крыс P20-30 и P30-45, L 2 мм для крыс P90-120, h 1 мм, рис. 1Б). Операционные процедуры проводили под общим наркозом (Золетил 100 мг/кг, Virbac, Франция) и с применением местной анестезии (Новокаин 0.5%). В качестве референтного электрода использовалась серебряная пластина площадью 1-2 мм<sup>2</sup>, вживленная эпидурально над мозжечком. Для интракортикальных микроинъекций 4-аминопиридина (4-АП) эпидурально вживлялись две канюли: R+0.7 и -0,7 мм, L 0.2 (для P20-26, P30-45) и 0.5 мм (для P90-120) Регистрация ЭКоГ (с параллельным видеомониторингом) проводилась после восстановительного периода (3-5 дней) в свободном поведении в течение не менее 3 часов.

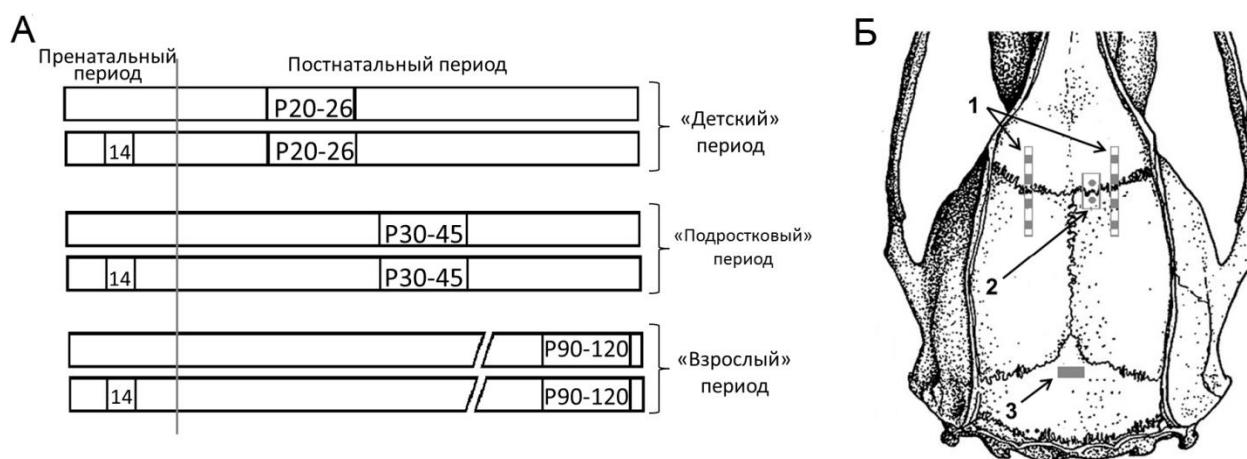


Рис. 1 Схемы эксперимента (А) и расположения электродов и канюль (Б).

Цифрой «14» отмечен день проведения пренатальной гипоксии на E14.

1 – блоки электродов (по 4 электрода в каждом блоке), 2 – блок канюль (2 канюли), 3 – референтный электрод.

### ***Анализ содержания транспортеров медиаторов***

Для оценки изменения баланса медиаторных систем проведен анализ содержания транспортеров основных возбуждающих и тормозных медиаторов коры мозга (координаты: R +2.0-2.0 мм) и гиппокампа (R + 3,30 мм) крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E14, а также контрольных животных в возрасте P20, P35, P90. В качестве отрицательного контроля использовали ткань печени крыс. Ткань коры мозга и гиппокампа гомогенизировали на льду в 50 мМ буфере Tris-HCl (pH 7,4) с 1% Triton X-100, центрифугировали в течение 5 мин при 2500 g при +4°C. Общее количество белков в образце определяли по Брэдфорду. Интересующие белки анализировали в супернатанте методом разделения электрофорезом в 8%

полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим иммуноблоттингом на мембранах из поливинилиденфторида (PVDF). Мембраны инкубировали в течение ночи при +4°C в растворе первичных антител (первичные антитела согласно протоколу производителя, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20 и 5% сухого обезжиренного молока). Были использованы первичные антитела для представляющих интерес белков: EAAT1 (ab416, Abcam, 1: 10000), GAT1 (Abcam, ab72448 1: 10000), VACHT (Abcam, ab101932, 1: 10000). Актиновый белок в тех же образцах анализировали с использованием первичных антител кролика (A5060, Sigma, 1: 5000). Иммунореактивность определяли с использованием вторичного IgG против мыши (Abcam, ab97265, 1: 5000) или против кролика (ab6721, abcam, 1: 5000, 1 час) и визуализировали при помощи набора Optiblot ECL Ultra Detect Kit (1.2pg- 2ng) (Abcam, ab133409). Относительную интенсивность иммунореактивных полос на мембранах определяли количественно методом компьютерного денситометрического измерения Image Studio Version 4.0.21 (LI-COR Biosciences, USA). Для каждой пробы рассчитывали отношение интенсивности полос интересующего белка к актину. Сравнение проводили в каждой возрастной группе попарно (данные по группе крыс, подвергшихся воздействию гипоксии, и контрольной группы животных) по однофакторному дисперсионному анализу (one-way ANOVA).

### ***Поведенческие тесты***

Для определения нарушений поведения у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипоксию, были проведены следующие тесты: тест на объектно-пространственное обучение для оценки формирования когнитивной пространственной карты при локализации целевых объектов; тест вынужденного плавания для оценки наличия гиперактивности; приподнятый крестообразный лабиринт и Суок-тест для оценки уровня тревожности.

### ***Моделирование эпилепсии***

Для исследования риска гиперсинхронизации электрической активности мозга у крыс разного возраста, перенесших пренатальную гипоксию, было проведено моделирование эпилепсии различными методами. Электрошоковое дозированное воздействие (с вовлечением практически всех структур мозга без фармакологических эффектов), подкожные инъекции пентилентетразола (фармакологическая модель на

системном уровне с блокадой ГАМКа-рецепторов), а также интракортикальные микроинъекции 4-АП (для моделирования фокального очага эпилепсии).

#### *Дозированный электрошок*

Подверженность судорогам выявляли в серии из 10 экспериментов (с интервалом 1-2 суток). Ток подавался через ушные электроды (клипсы) с помощью специализированного стимулятора ECT UNIT 57800 (Ugo Basile, Италия), сила тока в каждом последующем эксперименте возрастала на 10 мА, тестирование проводилось в диапазоне от 10 до 100 мА. Регистрировали силу судорожного припадка в баллах (1 - парциальные клонические судороги, 2 - дикий бег, 3 – тонические судороги без экстензии задних конечностей, 4 - тонические судороги с полной экстензией задних конечностей), латентные периоды и длительность каждой из стадий припадка. За основу оценки тяжести судорожного ответа была взята шкала Racine (1972).

#### *Инъекции пентилентетразола*

На следующие сутки после обязательного мониторинга фоновой ЭКоГ (в течение 3 часов) осуществлялось моделирование эпилепсии методом многократных повторяющихся подкожных инъекций пентилентетразола (ПТЗ), антагониста ГАМКа-рецепторов, подкожно по 10 мг/кг каждые 15 минут (в концентрации 2 мг на 0,1 мл 0,9% NaCl) до достижения генерализованного приступа эпилептиформной активности.

#### *Интракортикальные микроинъекции 4-аминопиридина*

На следующие сутки после обязательного мониторинга фоновой ЭКоГ (в течение 3 часов) осуществлялось моделирование эпилепсии методом интракортикального введения 25 мМ раствора 4-АП, блокатора потенциал-зависимых калиевых каналов (Wonga et al., 2001, Medina-Seja et al, 2008) в объеме 0,5-0,75 мкл микроинъектором в кору мозга через направляющую вживленную канюлю на глубину до 1 мм.

#### *Анализ ЭКоГ при эпилептиформной активности*

Регистрация ЭКоГ с параллельным видеомониторингом велась до, во время и после инъекций ПТЗ либо 4-АП. Анализировали длительность эпизодов эпилептиформной активности, частоту следования спайк-волновых комплексов, а также спектральную плотность мощности (методом преобразования Фурье). Статистический анализ проводили в среде программы GraphPad Prism v. 7.0 - осуществлялась проверка массива данных на нормальность распределений по тесту Колмогорова-Смирнова, далее определяли достоверность различия средних в

выборках по критерию Стьюдента (Т-тесту), критерию Манна-Уитни и двухфакторному дисперсионному анализу (two-way ANOVA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Формирование электрической активности неокортекса в онтогенезе крыс с нормальным эмбриогенезом и крыс, перенесших пренатальную гипоксию*

Наши исследования ЭКоГ крыс показали, что пренатальная гипоксия приводит к изменению частотно-временных характеристик основных ритмов ЭКоГ бодрствования и медленноволнового сна на протяжении всех исследованных возрастных периодов.

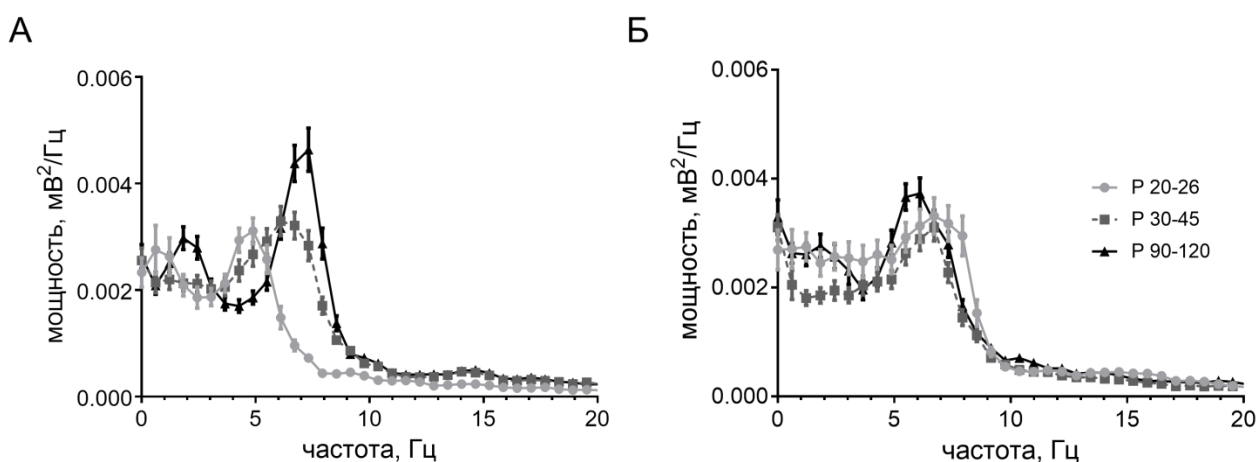


Рис. 2. Спектральная плотность мощности ЭКоГ бодрствования (А - контрольная группа, Б – экспериментальная группа).

Основным ритмом бодрствования для крыс является тета-ритм, который имеет гиппокампальное происхождение (Vertes and Kocsis, 1997; Buzsáki and Draguhn, 2004). Мы выяснили, что у крыс контрольной группы в процессе развития происходит увеличение спектральной плотности мощности (СПМ) ЭКоГ тета-ритма во время бодрствования, а также смещение пика СПМ тета-ритма от 4 Гц (P20-26) к 8 Гц (P90-120). В то время как у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, в процессе развития наблюдается обратная тенденция в смещении пика СПМ тета-ритма, напротив, к низкочастотной области, а также практически не происходит увеличения СПМ ЭКоГ тета-ритма (рис. 2).

СПМ ЭКоГ дельта-ритма, который является основным для медленноволнового сна, у крыс как контрольной, так и экспериментальной группы снижается в процессе взросления (рис. 3).

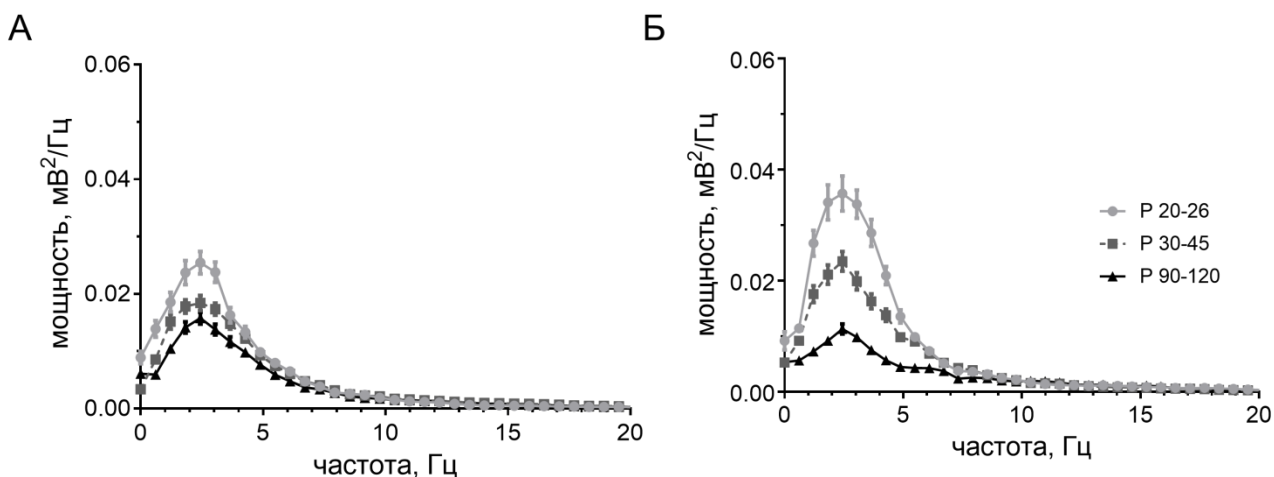


Рис. 3. Спектральная плотность мощности ЭКоГ медленноволнового сна (А - контрольная группа, Б – экспериментальная группа).

У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, и соответствующих детскому возрасту (P20-26) СПМ ЭКоГ медленноволнового сна достоверно выше, в то время как у взрослых животных (P90-120), напротив, этот показатель ниже по сравнению с контрольными крысами соответствующих возрастов. У крыс подросткового возраста (P30-45) достоверных различий относительно контроля не выявлено.

Возможным объяснением изменения спектральной плотности мощности ЭКоГ является смещение баланса возбуждающей и тормозной медиации. Такой анализ был проведен в нашей работе.

***Анализ содержания транспортеров медиаторов в теменной коре и гиппокампе мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию***

Выяснено, что в возрасте P20 у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, наблюдается увеличение содержания транспортера возбуждающих аминокислот глутамата и аспартата (EAAT1) и ацетилхолина (VAChT) в коре мозга по сравнению с контрольными крысами соответствующего возраста. Изменение содержания транспортера ГАМК (GAT1) по сравнению с контролем не происходит. У крыс, соответствующих подростковому возрасту (P35), показано увеличение содержания EAAT1 в коре мозга и GAT1 в гиппокампе, и снижение содержания GAT1 в коре мозга по сравнению с контролем. В возрасте P90 наблюдается увеличение содержания EAAT1 в коре мозга и GAT1 в гиппокампе, а также снижение содержания VAChT в коре мозга и EAAT1 в гиппокампе по сравнению с контрольными крысами того же возраста (рис. 4). Таким образом, пренатальная гипоксия приводит к увеличению возбуждения в коре мозга у крыс в младшие возрастные периоды (P20, и несколько

меньше в P35), в то время как у взрослых крыс (P90) - к снижению возбуждения в коре мозга и усилению торможения в гиппокампе, о чем свидетельствует изменение содержания переносчиков возбуждающих и тормозных аминокислот.

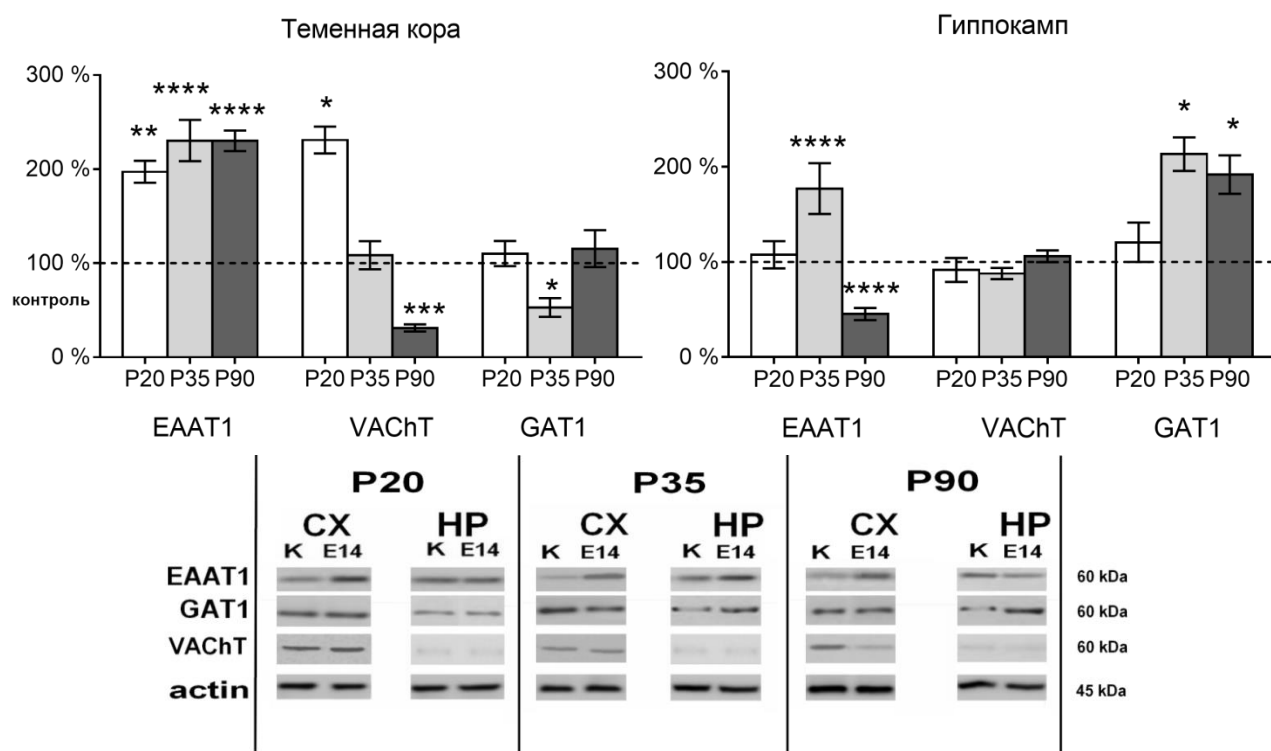


Рис. 4. Содержание транспортеров медиаторов в коре мозга и гиппокампе крыс, перенесших пренатальную гипоксию (значения контрольной группы приняты за 100%); CX – кора мозга, HP – гиппокамп, К - контрольная группа, E14 – экспериментальная группа.

\*- достоверное различие между группами по one-way ANOVA с  $p < 0.05$  (\*\*-  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\*\* -  $p < 0.0001$ , соответственно).

Считается, что гиппокампальный тета-ритм генерируется при взаимодействии возбуждающих нейронов (клеток-зерен и пирамидных клеток) и тормозных ГАМК-ергических интернейронов (Vertes and Kocsis, 1997). Смещение баланса в сторону возбуждения у крыс младшего возраста и отсутствие торможения гиппокампальной природы, которое наблюдается в возрасте P90, по-видимому, приводит к наблюдаемым изменениям СПМ ЭКоГ тета-ритма бодрствования и смещению пика СПМ тета-ритма относительно контроля. В поддержку этой гипотезы выступает тот факт, что у крыс с нормальным эмбриогенезом в процессе взросления происходит увеличение содержания транспортеров глутамата в коре мозга (GLAST и GLT-1) (Furuta et al., 1997), а это, в свою очередь, может приводить к увеличению плотности мощности ЭКоГ тета-ритма и смещению пика СПМ в более высокочастотную область у крыс контрольной группы. Также большой вклад в генерацию тета-ритма вносит и

ацетилхолин (Hasselmo, 2006), содержание транспортеров которого также меняется в процессе развития у крыс с пренатальной патологией. Нами была показана корреляция между изменениями содержания VAcHT в коре мозга и СПМ ЭКоГ дельта-ритма медленноволнового сна у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, в различные сроки постнатального онтогенеза. Это подтверждает мнение других авторов о связи между ацетилхолиновой передачей и СПМ медленноволнового сна: показаны аналогичные изменения в постнатальном онтогенезе крыс от P30 до P45 (Olini et al., 2013).

### ***Исследование поведения крыс, перенесших пренатальную гипоксию***

Изменение электрической активности и баланса возбуждения и торможения свидетельствуют о сложных комплексных перестройках в мозге, которые могут приводить к когнитивным нарушениям у перенесших пренатальную гипоксию животных.

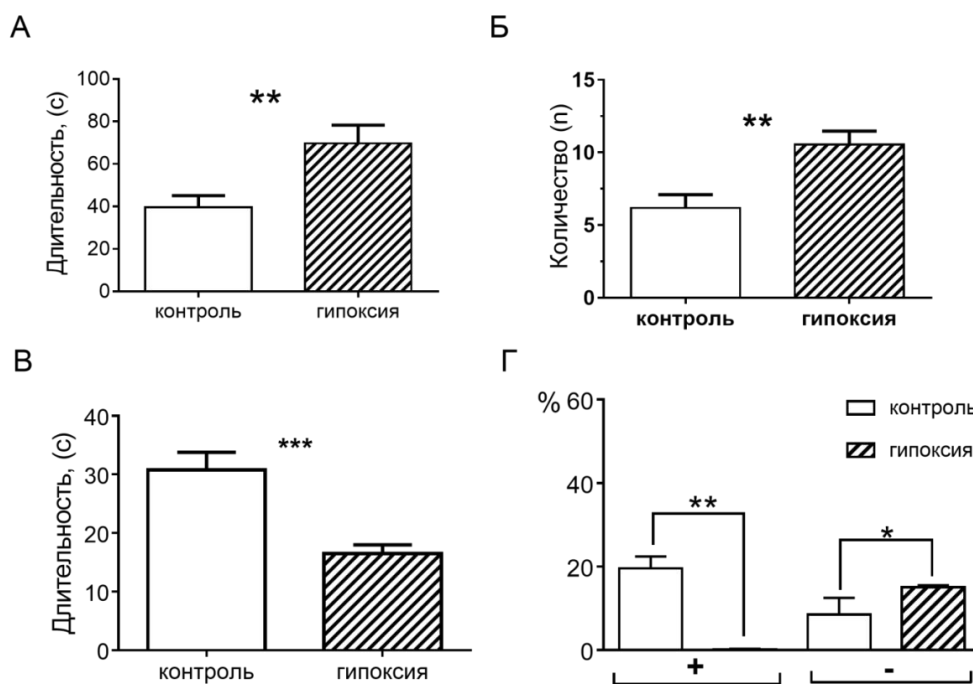


Рис. 5. Исследование поведения крыс, перенесших пренатальную гипоксию. А - Суммарная длительность фризинга в приподнятом крестообразном лабиринте. Б - Количество эпизодов груминга в Суок-тесте. В - Средняя длительность эпизодов пассивного плавания в тесте вынужденного плавания. Г - Процент правильных (+) и ошибочных (-) реакций в тесте на объектно-пространственное обучение.

\*- достоверное различие между группами по тесту Манна-Уитни с  $p < 0.05$  (\*\*-  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$  соответственно).

Было обнаружено, что у взрослых крыс, перенесших гипоксию на E14, нарушено поведение, связанное с формированием когнитивной пространственной карты при



изменении локализации целевых объектов (в тесте на объектно-пространственное обучение), что может свидетельствовать о долговременных последствиях пренатального стресса. Также получены данные о повышенном уровне тревожности (Суок-тест и приподнятый крестообразный лабиринт) и наличии гиперактивности (тест вынужденного плавания) у крыс с пренатальной патологией (рис.5).

Известно, что пациенты страдающие эпилепсией значительно чаще имеют сопутствующие когнитивные, поведенческие и неврологические расстройства, такие как тревожность, депрессия, синдром дефицита внимания с гиперактивностью. Интересно отметить, что многие антиэпилептические препараты оказываются эффективны и при данном спектре расстройств, что говорит о схожих или, по крайней мере, связанных механизмах их происхождения (Cutting et al., 2001).

### Моделирование эпилепсии

Проведено моделирование эпилептиформной активности на различных уровнях организации нервной системы для выявления наиболее уязвимых структур и периодов в онтогенезе для развития гиперсинхронизации электрической активности мозга.

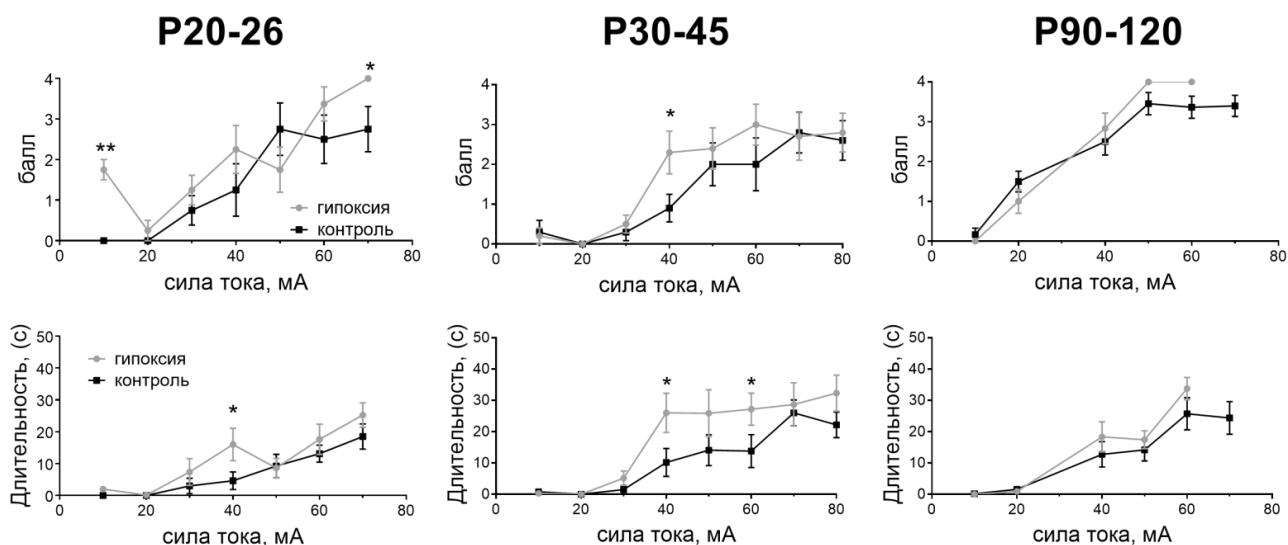


Рис. 6. Зависимость тяжести приступов (верхний ряд) и средней продолжительности судорог (нижний ряд) от амплитуды тока у крыс в модели дозированного электрошока. \*- достоверное различие между группами по post-hoc тесту Фишера с  $p < 0.05$  (\*\*-  $p < 0.01$ , соответственно).

При дозированном электрошоковом воздействии крысы, перенесшие гипоксию, демонстрируют более тяжелые и длительные судороги в детском (P20-26) и подростковом возрастах (P30-45), тогда как у взрослых крыс достоверных различий относительно контроля соответствующего возраста зарегистрировано не было (рис.6).

При моделировании *фокального коркового очага эпилептиформной активности микроинъекцией 4-аминопиридина* было показано, что длительность эпизодов спайк-волновой активности (СВА) у крыс в возрасте P20-26 и P30-45, перенесших пренатальную гипоксию, выше по сравнению с контрольными животными (рис.7А). Пики СПМ электрокортикограммы СВА у взрослых крыс (P90-120) смещаются сходным образом, что и пики СПМ ЭЖоГ во время бодрствования в соответствующих группах, что свидетельствует о возможном участии гиппокампа и коры мозга в генерации СВА.

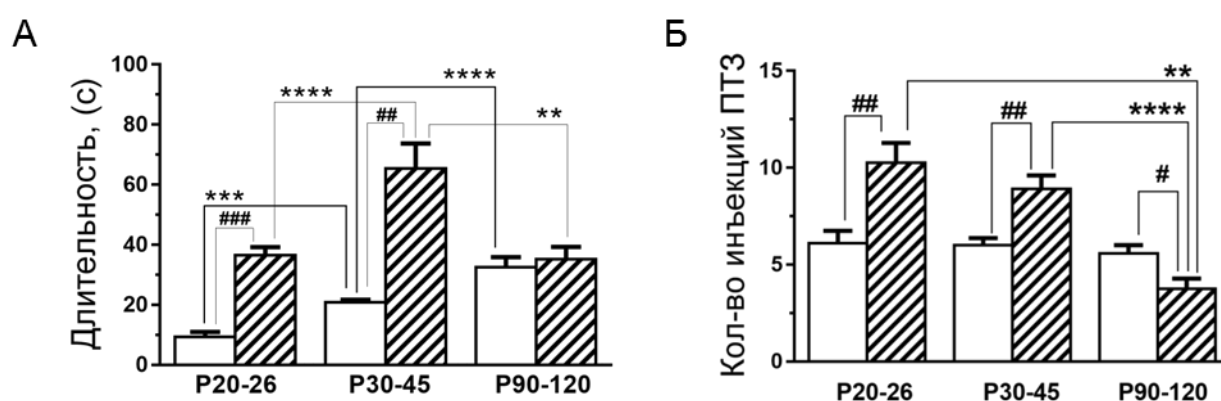


Рис. 7. Моделирование эпилепсии: А - Длительность эпизодов СВА в 4-АП модели. Б – количество инъекций ПТЗ, необходимое для генерации генерализованного приступа СВА. Белая заливка – контрольная группа, Полосатая заливка – экспериментальная группа.

\*- достоверное различие между возрастными группами по Т-тесту с  $p < 0.05$  (\*\*-  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\*\* -  $p < 0.0001$ ; # - достоверное различие между контрольной и экспериментальной группами, соответственно).

При моделировании эпилепсии повторяющимися системными *инъекциями антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пентилентетразола* крысы, перенесшие пренатальную гипоксию, демонстрировали в P20-26 и P30-45 большую, а в P90-120 меньшую устойчивость к действию этого эпилептогена, о чем можно судить по количеству инъекций, необходимых для достижения генерализованного приступа СВА (рис.7Б). Также интересно отметить, что длительность эпизодов СВА во всех исследованных возрастных периодах оказалась ниже по сравнению с контрольными крысами соответствующих возрастов.

В наших экспериментах в моделях эпилепсии с применением электрошока и 4-аминапиридина крысы в возрасте P20-26 и P30-45 в большей степени подвержены гиперсинхронизации электрической активности, чем контрольные животные. Это может быть связано с недостаточным тормозным влиянием гиппокампа у крыс

младших возрастов с пренатальной патологией. Вклад в повышенную возбудимость структур мозга, по-видимому, вносит также повышенное содержание глутамата и ацетилхолина у этих животных, о чем свидетельствует изменение содержания их переносчиков. В то же время мы предполагаем, что участие ГАМКа-ергической системы в созревании баланса торможения и возбуждения у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, менее значимо, поскольку животные возраста P20-26 и P30-45 более устойчивы к воздействию эпилептогена пентилентетразола.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что пренатальная гипоксия на E14 приводит к изменениям в формировании электрической активности и возбудимости мозга в постнатальном онтогенезе. Показано, что баланс медиаторных систем в ЦНС крыс, перенесших пренатальную гипоксию на E14, в возрасте P20-26 и P30-45 смещен в сторону возбуждения, в то время как в возрасте P90-120 – в сторону торможения, о чем свидетельствуют изменения содержания белков-транспортеров возбуждающих и тормозных аминокислот в коре мозга и гиппокампе. Выявлена корреляция между содержанием VAcHT в коре мозга (увеличенным на P20-26 и сниженным на P90-120) и изменениями спектральной плотности мощности ЭКоГ в период медленноволнового сна у крыс, перенесших пренатальную гипоксию. Пик спектральной плотности мощности ЭКоГ тета-ритма во время бодрствования у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, в возрасте P20-26 увеличивается, по-видимому, за счет большего содержания глутамата и ацетилхолина в коре мозга, о чем свидетельствует увеличение содержания их транспортеров. У взрослых (P90-120) крыс после гипоксии на E14 пик спектральной плотности мощности ЭКоГ тета-ритма во время бодрствования, напротив, оказался смещен в низкочастотную область спектра. По-видимому, большой вклад в генерацию тета-ритма также вносит ацетилхолин, пониженное содержание переносчика которого было показано у взрослых животных после пренатальной гипоксии.

Поскольку тета-ритм у крыс связывают с ориентацией в пространстве, процессами обучения и памяти (Wills et al., 2010), можно было предположить наличие у животных с пренатальной патологией нарушений этих когнитивных функций. Нами было показано, что у взрослых крыс экспериментальной группы нарушено адаптивное

поведение, связанное с формированием когнитивной пространственной карты при изменении локализации целевых объектов, что может свидетельствовать о долговременных последствиях пренатального стресса. Выявлено, что у крыс, перенесших гипоксию на E14, повышен уровень тревожности и присутствуют нарушения моторики в Суок-тесте и приподнятом крестообразном лабиринте, также этих животных наблюдается гиперактивность в тесте вынужденного плавания. Это согласуется с тем, что пациенты, страдающие эпилепсией, часто имеют различные когнитивные дисфункции и нарушения поведения, такие как тревожность, депрессия, синдром дефицита внимания с гиперактивностью (Schubert, 2009).

В моделях эпилепсии с применением электрошока и 4-аминипиридина впервые показано, что крысы с эмбриональной патологией в возрасте P20-26 и P30-45 в большей степени подвержены гиперсинхронизации электрической активности, чем контрольные животные того же возраста. Это может быть связано с недостаточным тормозным влиянием гиппокампа у крыс младших возрастов, поскольку в предшествующих работах было показано, что структурные изменения в коре мозга, вызванные пренатальной гипоксией на E14, приводят к нарушениям в формировании шипиков в гиппокампе (Журавин и др., 2014). Повышенная возбудимость структур мозга, по-видимому, также объясняется увеличенным содержанием глутамата и ацетилхолина у этих животных. В то же время мы предполагаем, что участие ГАМК-ергической системы в созревании баланса торможения и возбуждения у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, менее значимо, поскольку животные в возрасте P20-26 и P30-45 более устойчивы к воздействию эпилептогена пентилентетразола. В целом, полученные данные свидетельствуют о нарушениях адаптивного функционального развития мозга в период постнатального онтогенеза, вызванных пренатальной гипоксией на E14, что приводит к когнитивным дисфункциям и неврологическим расстройствам в процессе всей жизни.

## **ВЫВОДЫ**

1. Крысы, перенесшие пренатальную гипоксию на E14, имеют нарушенную возрастную динамику созревания ритмов ЭКоГ по сравнению с контрольными животными. У крыс с нормальным эмбриогенезом с возрастом наблюдается смещение пика спектральной плотности мощности тета-ритма бодрствования к более

высокочастотной области, у крыс с пренатальной патологией наблюдается обратная тенденция. Снижение спектральной плотности мощности ЭКоГ медленноволнового сна в постнатальном онтогенезе выражено сильнее по сравнению с контролем.

2. У крыс с пренатальной патологией выявлено изменение содержания переносчиков возбуждающих и тормозных аминокислот по сравнению с контрольными животными. Показано увеличение содержания переносчика глутамата EAAT1 и ацетилхолина VACHT в неокортексе в возрасте P20-26. В P30-45 увеличено содержание EAAT1 в коре мозга и гиппокампе, при этом только в гиппокампе наблюдается увеличение содержания переносчика ГАМК - GAT1. В возрасте P90-120 обнаружено увеличение содержания EAAT1 в коре мозга и GAT1 в гиппокампе, при этом содержание EAAT1 в гиппокампе и VACHT в неокортексе снижено.

3. При воздействии дозированным электрошоком было выявлено, что пренатальная патология приводит к более тяжелым и более длительным судорогам у крыс в возрасте P20-26 и P30-45.

4. При моделировании фокального эпилептического очага микроинъекцией 4-аминопиридина было выявлено, что у крыс с пренатальной патологией в возрасте P20-26 и P30-45 длительность эпизодов спайк-волновой активности вдвое больше, чем в контроле.

5. Крысы, перенесшие пренатальную гипоксию, в возрасте P20-26 и P30-45 более устойчивы к действию антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пентилентетразола, а в P90-120 – менее устойчивы, чем контрольные животные.

6. Крысы, перенесшие пренатальную гипоксию, демонстрируют повышенный уровень тревожности, гиперактивность и нарушение в формировании когнитивной пространственной карты при изменении локализации целевых объектов, что может быть связано с изменениями в балансе медиаторных систем, возбудимости нервной ткани мозга и параметров электрической активности у животных с пренатальной патологией.

#### **Список опубликованных научных работ по теме диссертации:**

##### **Статьи:**

1. **Калинина Д.С.**, Фролова Е.В., Лаврентьева В.В., Дубровская Н.М., Лукомская Н.Я., Ким К.Х., Зайцев А.В., Журавин И.А., Магазаник Л.Г. Отдаленное влияние

пренатальной гипоксии на подверженность крыс электросудорогам // Доклады Академии наук. -2015. – Т.465. -№5. –С.631-633.

2. **Калинина Д.С.**, Вольнова А.Б., Алексеева О.С., Журавин И.А. Электрическая активность неокортекса у взрослых крыс после пренатальной гипоксии и при моделировании эпилепсии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. -2016. – Т.52. -№5. –С.321-327.

3. **Калинина Д.С.**, Ленков Д.Н., Журавин И.А., Вольнова А.Б. Возрастная динамика ЭКоГ и судорожной активности крыс линии Wistar в корковой модели фокальной эпилепсии // Журнал высшей нервной деятельности. - 2017. - Т.67. -№3. -С.270-282.

#### **Тезисы докладов:**

1. **Kalinina D.S.**, Volnova A.B. Characteristics of neocortex spike-wave activity in the rat model of epilepsy // Methods of data processing in EEG and MEG. Applied aspects of magneto-and electroencephalographic neuroimaging, Moscow. - 2013. – Abstracts, P. 19.

2. **Калинина Д.С.**, Вольнова А.Б. Нейронная активность неокортекса на модели эпилепсии у крыс линии Wistar в остром эксперименте // Сб. тезисов 17-й Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино. - 2013. - С. 420.

3. **Калинина Д.С.** Особенности вызванной эпилептиформной активности у развивающихся крыс линии Wistar // Сб. тезисов XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», Санкт-Петербург. - 2013. - С. 180.

4. **Калинина Д.С.**, Ганина О.Р. Особенности эпилептиформной спайк-волновой активности и сонных веретен в раннем постнатальном онтогенезе крыс // Сб. тезисов докладов Всероссийской молодежной конференции «Нейробиология интегративных функций мозга», Санкт-Петербург. - 2013. - С. 34.

5. Ганина О.Р., **Калинина Д.С.**, Вольнова А.Б., Журавин И.А. Острая пренатальная гипоксия приводит к развитию спайк-волновой активности в коре мозга взрослых крыс линии Wistar // Сб. материалов Российской школы по детской неврологии и смежным специальностям, Санкт-Петербург. - 2014. - С. 44-45.

6. Ганина О.Р., **Калинина Д.С.** Влияние пренатальной гипоксии на возникновение эпилептиформной активности в неокортексе крыс в хроническом эксперименте // тезисы докладов конференции XXI Международная конференция студентов,

аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», подсекция «Нейрофизиология и физиология ВНД», Москва. - 2014. - С. 11.

7. Ганина О.Р., **Калинина Д.С.** Возрастные изменения в структуре сонных веретен и эпилептиформной спайк-волновой активности у крыс в раннем онтогенезе // Сб. тезисов 18-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Москва. - 2014. - С. 325.

8. **Калинина Д.С.**, Ганина О.Р., Вольнова А.Б. Журавин И.А. Патологическое состояние мозга: использование животных моделей для исследования эпилепсии // Сб. тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения», Санкт-Петербург. - 2014. - Т. 9. - № 1. - С. 127-129.

9. **Калинина Д.С.** Влияние пренатальной гипоксии на формирование электрической активности коры мозга у крыс в онтогенезе // тезисы докладов XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», подсекция «Нейрофизиология и физиология ВНД», Москва. - 2015.

10. **Калинина Д.С.** Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л., Алексеева О.С., Журавин И.А. Изменение регуляции глутаматергической медиации в гиппокампе мозга крыс после пренатальной гипоксии // Сб. материалов III Всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология», Москва. - 2015. - Т. 36. - С. 44.

11. **Калинина Д.С.** Пентилентетразоловый киндлинг в онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Сб. материалов конференции «Эпилептология в системе нейронаук», Санкт-Петербург. - 2015. - С. 98.

12. Каримова Д.А., Мильдер А.О., **Калинина Д.С.** Влияние пренатальной гипоксии на судорожную готовность у крыс // тезисы докладов XXIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», подсекция «Экспериментальные исследования», Москва. 2016.

13. **Калинина Д.С.**, Черныш М.А. Влияние пентилентетразолового киндлинга на электрическую активность неокортекса крыс, перенесших пренатальную гипоксию // тезисы научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА, Москва. - 2016. - С. 62-63.

14. Каримова Д.А., Мильдер А.О., **Калинина Д.С.** Влияние пренатальной гипоксии на судорожную готовность у крыс // тезисы XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург. - 2016. - С. 255.
15. **Калинина Д.С.** Разработка экспериментальной онтогенетической модели эпилепсии на крысах линии Wistar // Материалы VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург. - 2016. - С. 229.
16. **Калинина Д.С.**, Дубровская Н.М., Васильев Д.С., Зайцев А.В., Лаврентьева В.В., Журавин И.А. Судорожная готовность при электрошоковом воздействии у крыс, перенесших пренатальную гипоксию // тезисы XV Всероссийского совещания по эволюционной физиологии, Санкт-Петербург. - 2016.
17. Вольнова А.Б., Курзина Н.П., **Калинина Д.С.**, Журавин И.А. Нарушение процессов формирования пространственной памяти у крыс после пренатального гипоксического стресса // тезисы XV Всероссийского совещания по эволюционной физиологии, Санкт-Петербург. - 2016.