
МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

**ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОИНВАЗИВНОГО БЕСПРОВОДНОГО МЕТОДА
РЕГИСТРАЦИИ ЭЭГ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАГРУЗОК ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ У САМЦОВ КРЫС
В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2023 г. Д. С. Синяк¹, Г. А. Буков¹, В. В. Сизов², О. Е. Зубарева¹,
Д. В. Амахин¹, А. В. Зайцев^{1, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2023 г.

После доработки 14.01.2023 г.

Принята к публикации 15.01.2023 г.

В исследованиях последних лет показано, что важную роль в патогенезе многих нервно-психических заболеваний, таких как ишемия тканей мозга, черепно-мозговая травма, нейродегенеративные заболевания, эпилепсия и др., играет нейровоспаление. Поэтому при регистрации ЭЭГ в экспериментальных моделях этих заболеваний предпочтительнее использовать неинвазивные методы, чтобы исключить нейровоспаление. Однако такие подходы используются редко, так как у животных сложно осуществить надежную регистрацию ЭЭГ без использования вживленных электродов. В данной работе предложено новое устройство для малоинвазивной беспроводной регистрации ЭЭГ у крыс. Электроды располагаются на поверхности черепа и закрепляются прижимными язычками, расположенными на специальной платформе, закрепленной на черепе с помощью винтов. Данная конструкция позволяет избежать повреждения ткани мозга. Операция малотравматична, и регистрация ЭЭГ может быть произведена уже через 2–3 дня после нее. Высокая надежность крепления электродов позволяет производить длительную многомесячную регистрацию. Данный метод регистрации ЭЭГ апробирован на литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Запись ЭЭГ у экспериментальных и контрольных крыс была произведена в фоновых условиях и при использовании функциональных нагрузок – ритмической фото- и фоностимуляции, а также депривации сна. Показано, что эти функциональные нагрузки позволяют усилить выраженность эпилептиформных проявлений на ЭЭГ (частоты спайков), максимальные различия между группами проявляются при комбинации названных нагрузок. Таким образом, основной особенностью предлагаемого устройства для записи ЭЭГ является то, что оно позволяет проводить длительные исследования ЭЭГ на свободно двигающейся крысе без развития возможного нейровоспаления. Данное устройство может быть использовано в экспериментах по изучению эпилептогенеза и тестированию новых противоэпилептических препаратов на экспериментальных животных.

Ключевые слова: ЭЭГ, эпилепсия, ритмическая фотостимуляция, ритмическая фоностимуляция, функциональные нагрузки, депривация сна, икталная и интерикталная активность

DOI: 10.31857/S0869813923020097, **EDN:** NEBKYR

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы выявлено, что в патогенезе многих нейропсихических расстройств важную роль играет развитие нейровоспаления [1–3]. Одним из таких видов заболеваний является эпилепсия. Несмотря на многочисленные исследования и доступность большого количества противосудорожных препаратов, около трети больных эпилепсией страдают фармакорезистентной формой заболевания [4, 5].

Регистрация ЭЭГ является основным методом диагностики состояния нервной системы у больных эпилепсией. Эпилептиформная активность у пациентов выражается в появлении на ЭЭГ особой иктальной (полиспайки и спайк-волны, регистрируемые в течение десятков секунд) и интериктальной биоэлектрической активности (одиночных высокоамплитудных спайков, острых волн, комплексов спайк-волна, острых волн, полиспайков) [6]. Схожие изменения наблюдаются и у лабораторных грызунов в модели височной эпилепсии [7]. В большинстве опубликованных работ при регистрации ЭЭГ у животных используются вживленные электроды [8–10], что может усугублять воспалительные процессы, связанные с основной патологией, а это не позволяет получить объективную картину патологического процесса. В частности, на модели с внутримозговым введением бактериального липополисахарида было доказано, что бактериальное загрязнение, часто сопровождающее внутримозговую имплантацию электродов, может усиливать эпилептиформную активность (частоту и длительность спайк-волн) [11].

Поэтому при проведении исследований, ориентированных на изучение роли нейровоспаления в патогенезе эпилепсии (как и других заболеваний) предпочтительно использовать неинвазивные методы регистрации ЭЭГ. При этом важно, чтобы конструкция позволяла проводить длительную многодневную регистрацию ЭЭГ на свободно перемещающемся животном, то есть передача данных была беспроводной. Отработка такого метода явилась первой задачей данного исследования.

Вторая задача заключалась в оценке целесообразности использования функциональных нагрузок: ритмической фото- и фоностимуляции (РФФС) и депривации сна для оценки выраженности эпилептиформной активности в экспериментальной модели эпилепсии. Эти виды стимуляции широко используются при проведении ЭЭГ исследований у больных эпилепсией, они облегчают выявление патологической биоэлектрической активности, которая может не проявиться при регистрации фоновой ЭЭГ [12, 13]. Однако в экспериментальных исследованиях эпилепсии при регистрации ЭЭГ функциональные нагрузки практически не используются.

В работе использована литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии. Она позволяет достаточно точно воспроизвести процессы эпилептогенеза, наблюдаемые при развитии эпилепсии у человека [14]. Так же, как и при патологии человека, после острых судорог, возникающих сразу после введения пилокарпина и имитирующих первоначальное повреждающее воздействие на мозг, имеет место латентный период, когда внешне судороги еще не проявляются, но в ткани мозга идут проэпилептические изменения, которые в дальнейшем приведут к формированию спонтанных рецидивирующих судорог [14]. При развитии патологических процессов в этой модели большую роль играет нейровоспаление [15, 16].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Работа выполнена на самцах крыс Вистар. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 22°C со свободным доступом к воде и пище при световом режиме — с 8:00 до 20:00 — свет, с 20:00 до 8:00 — темнота.

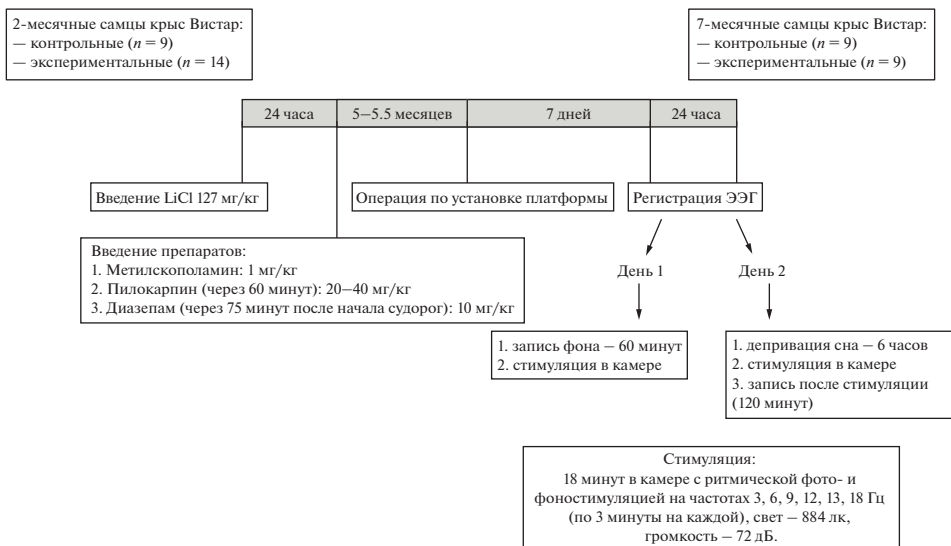


Рис. 1. Схема эксперимента. На временной шкале представлены основные этапы исследования. Эксперимент проводился на самцах крыс Вистар. В возрасте 2 месяцев у экспериментальных животных индуцировали височную эпилепсию путем введения пилокарпина. После развития хронической эпилепсии (в возрасте 7–7,5 месяцев), животным устанавливали платформу с электродами для записи ЭЭГ. После этого в течение двух суток регистрировали эпилептиформную активность: в первый день без депривации сна, во второй — после 6 ч депривации сна. Каждый экспериментальный сеанс состоял из записи фоновой ЭЭГ и записи ЭЭГ во время ритмической фоно- и фотостимуляции.

Литий-пилокарпиновая модель

Индукцию литий-пилокарпиновых судорог (рис. 1) проводили в возрасте 8 нед. у 14 крыс. За сутки до инъекций пилокарпина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) крысам вводили LiCl в/б в дозе 127 мг/кг. За час до введения пилокарпина — метилскополамин (1 мг/кг; в/б) для предотвращения периферических эффектов конвульсанта. Пилокарпин вводили в/б в суммарной дозе 20–40 мг/кг (2–4 инъекции, по 10 мг/кг, с 30-минутными интервалами, до тех пор, пока припадки не достигали стадии 4 (rearing) по шкале Расина [17]).

Через 75 мин после начала 4-й стадии судороги купировали введением диазепама (10 мг/кг, в/б, Московский эндокринный завод, Россия). В исследование были включены только крысы, у которых развилась 4-я стадия припадка по шкале Расина [17]. Три крысы, которым вводили пилокарпин, были исключены в связи со слабыми судорогами, еще 2 погибли в течение первой недели после введения конвульсанта. В основной эксперимент были включены 9 животных. В течение первой недели после введения пилокарпина крыс кормили влажным кормом (каши, фрукты) и в случае потери веса вводили им 5%-ный раствор глюкозы (подкожно, 2–3 мл). Далее крыс содержали небольшими группами по 4–5 животных в клетке до достижения возраста 7–7,5 мес. и начала экспериментов с регистрацией ЭЭГ. Контрольным животным ($n = 9$) вводили LiCl и метилскополамин без пилокарпина.

Метод неинвазивной регистрации ЭЭГ у свободно двигающихся крыс

Было разработано новое устройство для получения записей ЭЭГ от свободно двигающихся крыс. Устройство состоит из трех частей: 1) платформа с электрода-

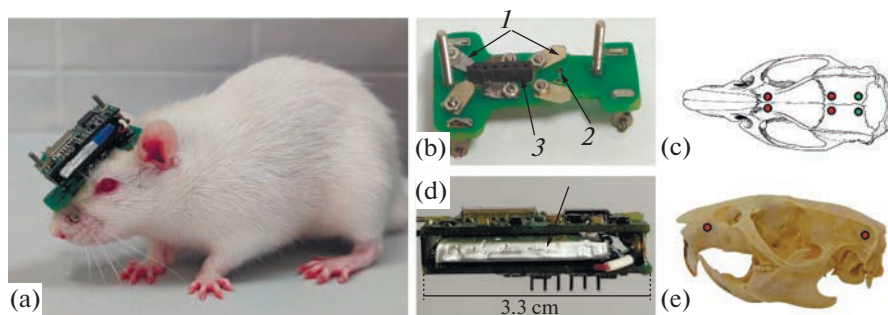


Рис. 2. Технические характеристики устройства для регистрации. (а) Собранное регистрирующее устройство, закрепленное на черепе крысы. (б) Общий вид платформы: 1 – зажимы для электрода; 2 – отверстие для электрода; 3 – разъем для подключения к передатчику. (с) Схема расположения регистрирующих (красные точки) и индифферентных электродов (зеленые точки). (д) Четырехканальный передатчик с интегрированным усилителем. Стрелкой отмечен сменный литий-полимерный аккумулятор. (е) Расположение крепежных винтов на черепе крысы (красные точки).

ми, которая крепится к черепу животного (рис. 2а, б); 2) съемный блок, состоящий из передатчика и батареи (указана стрелкой) (рис. 2д); 3) приемник, который вставляется в USB-порт персонального компьютера. Платформа крепится к черепу животного с помощью кронштейнов с крепежными винтами в нижней части и по бокам (рис. 2а). Сверху платформы располагается разъем для передатчика (рис. 2б, 3). Регистрирующие микроэлектроды, изготовленные из серебряной проволоки диаметром 0,5 мм, частично изолированы для более плотного размещения в отверстиях на платформе (рис. 2б, 2). Неизолированная часть электрода вставлялась в отверстие в платформе (рис. 2б, 2), а изолированная часть крепилась металлическими зажимами к верхней части платформы (рис. 2б, 1). Электроды фиксируются с помощью прижимных металлических фиксаторов (рис. 2б, 1). Неизолированная, располагаемая на черепе регистрирующая часть электродов, составляет примерно 1 мм в длину. Схема расположения регистрирующих и индифферентных электродов показана на рис. 2с. Мы использовали 2 индифферентных и 4 регистрирующих электрода. При многодневной регистрации, в случае необходимости, электроды могут быть легко подправлены или заменены без применения наркоза.

Непосредственно перед регистрацией ЭЭГ на платформе размещается 4-канальный модуль усилителя и модуль передатчика (рис. 2д, электрическая схема устройства доступна по следующей ссылке <https://disk.yandex.ru/d/I0eHvWxis-3g2w>). Используются входные усилители INA333 и промежуточные усилители ОРА2349 (Texas Instruments Incorporated, США), они обеспечивают хорошее подавление синфазной помехи (100 дБ) и низкий уровень шумов (<1 мкВ) в полосе пропускания (0,1–75 Гц). Оцифровка осуществляется с частотой 250 Гц и разрешением 16 бит сигма-дельта АЦП, встроенным в микроконтроллер STM32F373 (STMicroelectronics, Швейцария).

Положение головы животного регистрируется 3-осевым акселерометром LIS2DW12 (STMicroelectronics) с частотой 100 Гц и разрешением 16 бит в диапазоне ± 2 г. Передача данных осуществляется по каналу Bluetooth модулем SPBTLE-1S (STMicroelectronics). Регистрация сигналов ЭЭГ и передача по радиоканалу разнесены во времени, чтобы шумов было меньше. Сменный литий-полимерный аккумулятор обеспечивает непрерывную работу модуля в течение 10 ч. Масса модуля с аккумулятором составляет 15 г. Приемник разработан на базе SPBTLE-1S и

STM32F373 (STMicroelectronics). Он обеспечивает мост с радиоканала на USB-порт компьютера. Программа регистрации позволяет вести непрерывную многочасовую запись ЭЭГ, показаний акселерометра и меток пользователя в формате EDF. Длительность однократной записи лимитируется временем работы аккумулятора (приблизительно 10 ч). Замена аккумулятора производится в течение менее одной минуты.

Установку платформы производили под изофлурановым наркозом. Платформу закрепляли на черепе с помощью простерилизованных стопорных винтов из нержавеющей стали (рис. 2b). Крепежные винты были прикреплены к носовой и теменной кости (рис. 2b). Далее, через отверстия на платформе с помощью ручного сверла диаметром 0.6 мм производили расчистку посадочных углублений для установки микроэлектродов. Вращательными движениями из посадочных мест удаляли частички мягких тканей до кости черепа. Прочистка посадочного углубления сопровождалась прижиганием в целях достижения дополнительной стерильности и лучшего контакта микроэлектрода с черепом. Electrodes помещали в отверстия и фиксировали зажимом (рис. 2b, 1). После завершения операции места фиксации платформы в области вкрученных винтов обрабатывали антисептиком, после чего прооперированных крыс помещали в индивидуальные контейнеры со свободным доступом к воде и корму. Поскольку операция малотравматична, регистрацию ЭЭГ можно производить уже через 2–3 дня после нее. Крепление платформы очень надежное, крысы не снимают платформу при проведении многодневных исследований.

Регистрацию ЭЭГ у экспериментальных и контрольных крыс производили в течение двух дней. В первый день регистрировали фоновую ЭЭГ на протяжении 60 мин в домашней клетке, после чего запись ЭЭГ проводилась при РФФС (30 мин). Во второй день РФФС (и одновременная регистрация ЭЭГ) осуществлялась непосредственно после депривации сна, после чего крысу возвращали в домашнюю клетку и записывали ЭЭГ без стимуляции на протяжении 120 мин, в течение которых животное, как правило, засыпало. Дополнительно с помощью веб-камеры регистрировали поведение крысы.

Метод РФФС

Для проведения РФФС животное помещали в темную вентилируемую и звукоизолированную камеру, в которой располагался динамик и источник света, в качестве которого использованы сверхъяркие светодиоды белого свечения C513A-WSS-CV0Y0151 (30 штук). Перед стимуляцией животным позволяли адаптироваться к новой среде в течение 10 мин. Далее проводили РФФС на частотах 3, 6, 9, 12, 13 и 18 Гц, по 3 мин на каждой частоте без паузы между сериями с разной частотой. Длительность одного стимула в пачке — 1 мс. Освещенность пола установки при вспышках света составляла 884 лк, сила звука — 80 дБ.

Метод депривации сна

Использовали метод депривации сна с применением орбитального шейкера [18, 19]. В начале светового дня (с 8:30 до 14:30) крыс в индивидуальных контейнерах помещали на орбитальный шейкер (S-3L.A20, ELMi, Латвия), обеспечивающий непрерывное орбитальное вращение при частоте 175 об./мин.

Обработка сигналов

Записи ЭЭГ обрабатывали при помощи программы Spike Searcher, разработанной в лаборатории на основе программного пакета Wolfram Mathematica 12 (Wol-

fram Research, Champaign, IL, США). Исходный код программы доступен по ссылке <https://disk.yandex.ru/d/I0eHvWxis-3g2w>.

Алгоритм обработки ЭЭГ записей состоял из следующих этапов.

(1) Полученные записи подвергались визуальному осмотру. Фрагменты записи с чрезмерным электрическим шумом или сильной двигательной активностью (полученные по данным акселерометра) отбрасывались. Также выделяли фрагменты записи с иктальной активностью, сопровождавшей двигательные судороги, их анализ производили отдельно от интериктальных эпизодов.

(2) Для описания интериктальной активности осуществляли поиск одиночных спайков и спайк-волн, а также одиночных полиспайков. Спайк определяли как пароксизмальный электрический разряд на ЭЭГ, четко отличающийся от фоновой активности, имеющий острый пик и длительность от 20 до 80 мс, с амплитудой не менее 3 стандартных отклонений от фоновой записи каждой крысы (рис. 3b). Полиспайк — комплекс из как минимум трех последовательных спайков (рис. 3b). Спайк-волну определяли как комплекс элементов, сочетающих спайк с последующей медленной волной (рис. 3c). Сначала проводили предварительное автоматическое определение спайков и спайк-волн. Затем результаты автоматического обнаружения проверяли вручную и при необходимости корректировали. Координаты и амплитуды найденных спайков и спайк-волн автоматически заносили в базу данных.

(3) Далее, в качестве показателей интериктальной эпилептиформной активности мы рассчитывали частоту одиночных спайков [7]. В качестве показателя иктальной активности анализировали длительность полиспайковой активности.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводился с помощью программ IBM SPSS Statistics (IBM, США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Поскольку распределение частоты одиночных спайков не было нормальным, для сравнения экспериментальной и контрольной групп по данному показателю применяли *U*-критерий Манна—Уитни. При этом различия показателей в фоне и при отдельных функциональных нагрузках по показателю частоты одиночных спайков выявляли с помощью *T*-критерия Вилкоксона. Для сравнения длительности моторных судорог и продолжительности высокоамплитудной полиспайковой активности (эти данные были распределены нормально) использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$. Данные на графиках представлены как среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Каждая точка на графике соответствует конкретному животному.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ фоновой ЭЭГ

К возрасту 7–7.5 мес. спонтанные судороги были отмечены на видеозаписях у всех крыс экспериментальной группы и не были выявлены у контрольных животных. Таким образом, височная эпилепсия развилась у всех животных экспериментальной группы.

Сначала мы сравнили фоновую ЭЭГ в двух группах животных. Записывающее ЭЭГ устройство не вызывало у животных чрезмерного беспокойства, они не пытались избавиться от него и вели себя нормально. Примеры записи ЭЭГ у контрольных и модельных крыс в обычном состоянии представлены на рис. 3а–с. У большинства животных с эпилепсией наблюдались одиночные высокоамплитудные спайки и комплексы спайк-волна с частотой от 0.006 до 0.23 спайков/с. Также встречались единичные комплексы спайк-волна и одиночные полиспайки (рис. 3b, c).

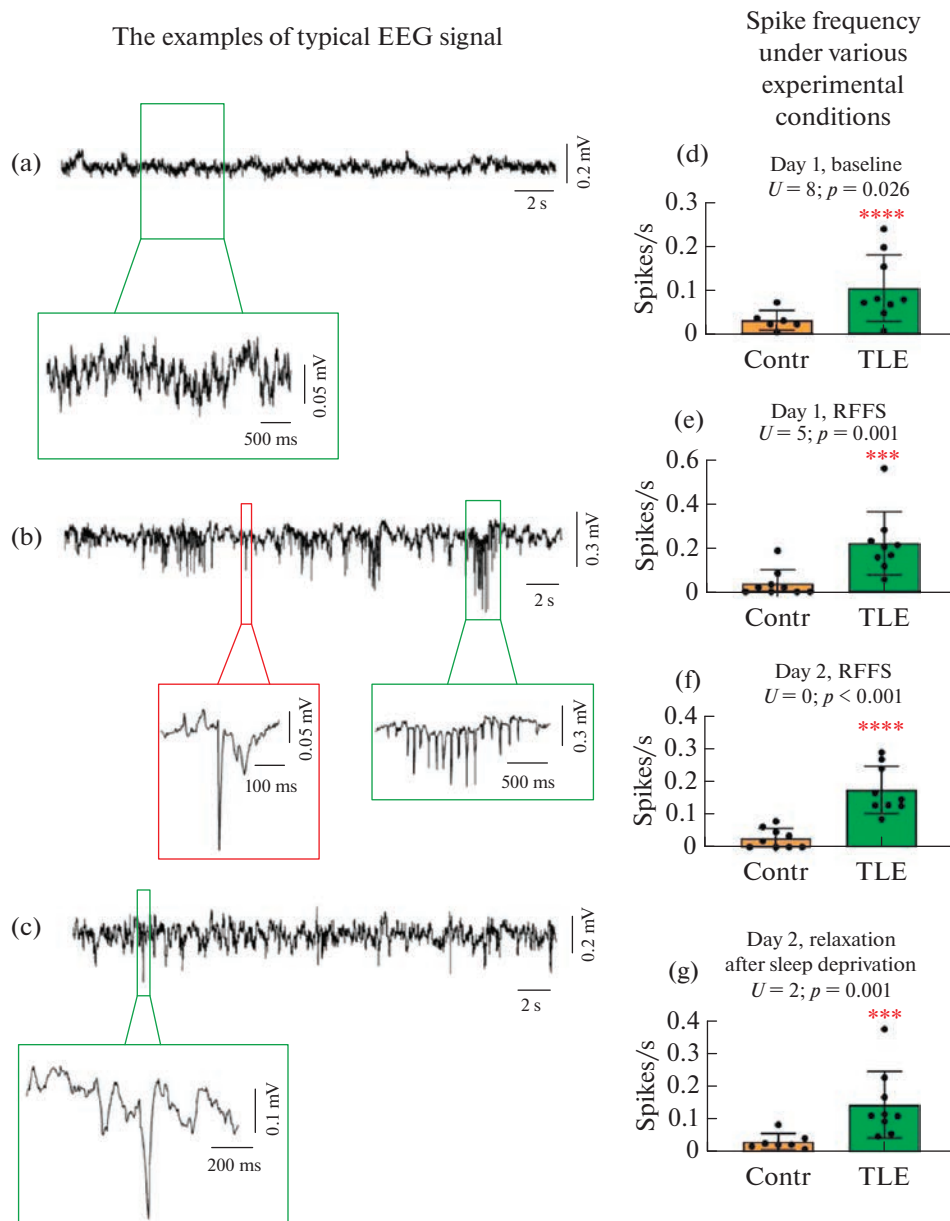


Рис. 3. Показатели эпилептиформной активности (спайки) и их выраженность в различных экспериментальных условиях. (а–с) Репрезентативные примеры ЭЭГ контрольных (а) и экспериментальных крыс (б–с) в фоне (без функциональных нагрузок). В рамках показаны увеличенные фрагменты: (а) отсутствие эпилептиформных событий; (б) красная рамка – одиночный спайк, зеленая рамка – полиспайк; (с) рамка – спайк-волна. (d–g) Показатели эпилептиформной активности в различных экспериментальных условиях: (d) день 1, фон без стимуляции; (е) день 1, во время фото- и фоностимуляции (RFFS); (f) день 2, во время фото- и фоностимуляции (RFFS), непосредственно после депривации сна; (g) отдых после стимуляции и депривации сна. Данные на гистограммах представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Каждая точка – значения конкретного животного.

У контрольных животных высокоамплитудные спайки встречались реже (частота от 0.004 до 0.07 спайков/с, тест Манна–Уитни: $U = 8$; $p = 0.03$, рис. 3d). Таким образом, одиночные спайки, встречающиеся с высокой частотой, можно использовать как признак эпилепсии.

Однако, несмотря на статистические различия между группами, частоты спайков в контрольной и экспериментальной группах существенно пересекались. Частота спайков во время фоновой записи ЭЭГ была относительно низкой в обеих группах. Схожие проблемы наблюдаются при диагностике эпилепсии у людей, при одиночной регистрации ЭЭГ у некоторых больных выявить эпилептиформную активность не удается, в этом случае для облегчения диагностики применяют функциональные нагрузки, в частности ритмическую фотостимуляцию и депривацию сна [12, 13]. Поэтому мы решили использовать данный подход для выявления выраженности эпилептиформной активности у крыс с височной эпилепсией.

Анализ ЭЭГ при функциональных нагрузках (РФФС и депривации сна)

При РФФС частота одиночных спайков не зависела от режима стимуляции (3, 6, 9, 12, 13, 18 Гц) ни у экспериментальных крыс, ни у контрольных животных, поэтому она была проанализирована суммарно за весь период стимуляции.

При РФФС частота спайков по сравнению с фоном возрастала у животных в экспериментальной группе в 2.2 раза (тест Вилкоксона, $T = 4$; $p = 0.03$; $n = 9$). В контрольной группе частота не изменилась. В этих условиях различий между группами были более явными, чем в фоне (рис. 3е; тест Манна–Уитни, $U = 5$; $p < 0.001$).

Депривация сна совместно с РФФС при регистрации во второй экспериментальный день также не влияла на частоту спайков у контрольных животных, однако увеличивала их у животных с эпилепсией ($T = 5$; $p = 0.04$; $n = 9$); различия между группами тоже стали более выраженными ($U = 0$; $p < 0.001$, рис. 3ф). В этих условиях распределения данных контрольной и экспериментальных групп не пересекались. Кроме того, депривация сна вызвала у нескольких экспериментальных крыс спонтанные рецидивирующие судороги (более подробный анализ приведен ниже).

Мы также проанализировали ЭЭГ у контрольных и экспериментальных крыс в период отдыха, после депривации сна и РФФС. В течение этого периода (2 ч регистрации) все животные засыпали, о чем можно было судить по наблюдению за их поведением и данным акселерометра. Из клинических исследований известно, что частота эпилептиформных разрядов у больных эпилепсией возрастает во время сна [20]. Анализ полученных нами данных показывает, что в этих экспериментальных условиях различия между группами по показателям одиночных спайков остаются статистически значимыми (рис. 3г; $U = 2$; $p = 0.001$). Следует отметить, что при отдыхе после депривации сна и РФФС несколько увеличивалась вероятность появления спонтанных рецидивирующих судорог (см. ниже).

Таким образом, различия между группами животных максимально выражены при использовании функциональных нагрузок.

Анализ иктальной активности

За время записи ЭЭГ у экспериментальных крыс было зарегистрировано 7 эпизодов спонтанных двигательных судорог. Они наблюдались у 4 экспериментальных крыс из 9, причем у одной крысы они отмечались трижды, еще у одной — дважды, и у двух — по одному разу. Только у одного животного судороги проявились в первый экспериментальный день (в условиях без депривации сна), и у всех 4 — во второй экспериментальный день, после депривации сна (при РФФС и/или отдыхе после функциональных нагрузок), то есть применение РФФС и депривации сна уве-

личивает вероятность появления спонтанных судорог. У контрольных животных судорог не было обнаружено ни при каких условиях.

На ЭЭГ во время судорог появлялась высокоамплитудная полиспайковая (комплексы спайк-волна) активность (рис. 4а), которая была более длительной, чем собственно двигательные судороги: средняя продолжительность моторных судорог у крыс составила 10.3 ± 3.0 с, средняя длительность высокоамплитудной полиспайковой активности — 46.4 ± 7.9 с (парный тест $t = 10.5$; $p < 0.001$; $n = 7$).

Таким образом, проведенное нами исследование доказало, что предложенная новая методика регистрации ЭЭГ может быть использована для анализа эпилептиформной активности у крыс в модели височной эпилепсии. Применение функциональных нагрузок увеличивает выраженность различий между группами по данному показателю.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе показано, что беспроводная методика регистрации ЭЭГ, а также функциональные нагрузки в виде РФФС и депривации сна могут быть успешно использованы для оценки эпилептиформной активности в хронической модели височной эпилепсии у крыс.

Особенностью предложенной модели регистрации ЭЭГ является то, что она позволяет проводить многодневные исследования ЭЭГ на свободно двигающейся крысе и при этом предотвратить развитие воспалительных процессов в мозге, вероятных при использовании вживленных электродов. Следует отметить, что неинвазивные методики редко используются при работе с экспериментальными моделями эпилепсии. Вероятно, это связано с трудностями в обеспечении надежного крепления электродов. Murthy Sindgi с соавт. предложили метод неинвазивной записи ЭЭГ, при котором электроды приклеиваются к коже головы крысы с помощью пластыря и клея [21]. Однако, используя такую конструкцию, трудно выполнить долговременную регистрацию свободно перемещающейся крысы. Гораздо чаще используется регистрация с помощью вживленных электродов [8–10]. Однако у этой методики есть существенный недостаток по сравнению с неинвазивной записью: риск нейровоспаления. Между тем, воспаление играет большую роль в формировании эпилептических изменений. Во-первых, сами по себе травмы мозга являются одним из факторов, повышающих риск развития эпилепсии [22], кроме того, провоспалительные факторы, в частности, бактериальный липополисахарид, усиливают последующее действие пилокарпина в хронической модели эпилепсии [23]. С другой стороны, применение противовоспалительной терапии — антагониста рецепторов провоспалительного цитокина интерлейкина- 1β (препарат анакинра) подавляет пилокарпин-индуцированный эпилептический статус [24] и последующее развитие психоневрологических нарушений [16]. Эти факты позволяют предполагать, что развитие воспалительных процессов, весьма вероятное при использовании вживленных электродов, может повлиять на выраженность эпилептиформной активности в моделях эпилепсии и привести к неправильным выводам.

Нейровоспаление играет большую роль в патогенезе не только эпилепсии, но и депрессивных расстройств [25], нейродегенеративных [2] и других нервных заболеваний. При работе с экспериментальными моделями таких нарушений периодически возникают задачи, требующие регистрации ЭЭГ, предложенный нами метод может быть успешно использован для их решения.

В данной работе нами также впервые в модели хронической эпилепсии исследовано действие сочетанных функциональных нагрузок — РФФС и депривации сна на показатели эпилептиформной активности. В качестве основного изучаемого показателя мы анализировали частоту интериктальных спайков. Данный показа-

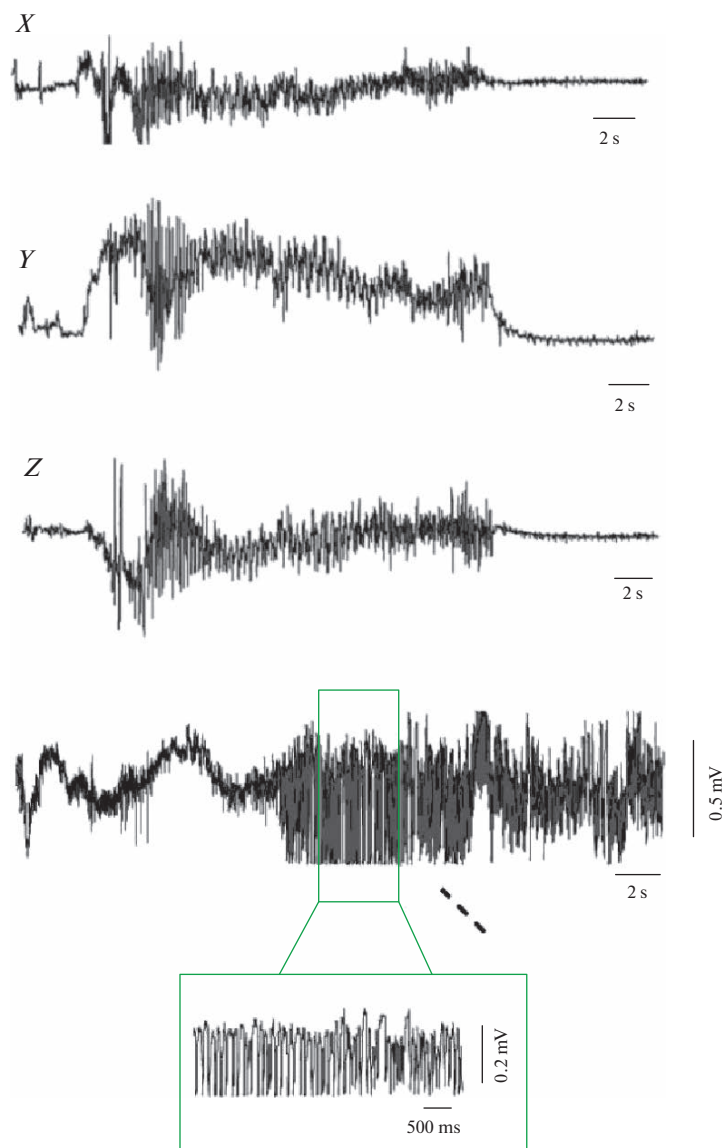


Рис. 4. Показатели акселерометра (X , Y , Z) и ЭЭГ (внизу) во время одного из эпизодов двигательных судорог у экспериментальной крысы.

тель является частым маркером эпилептических процессов. Частота интериктальных сайков позволяет предсказать успешность хирургического лечения больных с эпилепсией [26]. Она исследуется и в экспериментальных моделях эпилепсии, включая литий-пилокарпиновую [27]. В пилокарпиновой модели эпилепсии было показано, что частота спайков возрастает по мере развития эпилептических процессов [28].

Данные функциональные нагрузки широко используются в клинической диагностике состояния больных эпилепсией, однако они очень мало применяются в

экспериментальных исследованиях эпилепсии. Нам известно только одно исследование — Drinkenburg с соавт., в которой авторы показали, что у крыс эпилептической линии WAG/Rij в первые часы после депривации сна существенно увеличивались показатели эпилептиформной активности [29]. Результаты, полученные в настоящем исследовании, показывают, что применение функциональных нагрузок значительно усиливает эпилептиформную активность у литий-пилокарпиновых животных. Поскольку примененные нами воздействия позволяют значительно лучше дифференцировать контрольных и экспериментальных животных, подобный подход можно рекомендовать при проведении фармакологических исследований при поиске новых противоэпилептических средств.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU для проведения экспериментов на животных и одобрены Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 1-8/2022 заседания №1 комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН от 27.01.2022).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-15-00430.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.Е.З. и А.В.З.), разработка устройства (В.В.С.), сбор данных (Д.С.С, Г.А.Б), программа обработки данных (Д.В.А.), обработка данных (Д.С.С., Г.А.Б., О.Е.З., Д.В.А.), написание и редактирование манускрипта (Д.С.С., Г.А.Б, В.В.С., О.Е.З., Д.В.А., А.В.З.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radtke FA, Chapman G, Hall J, Syed YA (2017) Modulating Neuroinflammation to Treat Neuropsychiatric Disorders. *Biomed Res Int* 2017: 1–21.
<https://doi.org/10.1155/2017/5071786>
2. Calsolaro V, Edison P (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement* 12: 719–732.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
3. Jurcau A, Simion A (2021) Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 23: 14.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010014>
4. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N (2017) Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88: 296–303.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
5. Fattorusso A, Matricardi S, Mencaroni E, Dell'Isola GB, Di Cara G, Striano P, Verrotti A (2021) The Pharmacoresistant Epilepsy: An Overview on Existant and New Emerging Therapies. *Front Neurol* 12: 1030.
<https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.674483/BIBTEX>
6. Chen H, Koubeissi MZ (2019) Electroencephalography in Epilepsy Evaluation. *Contin Lifelong Learn Neurol* 25: 431–453.
<https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000705>
7. Salami P, Lévesque M, Benini R, Behr C, Gotman J, Avoli M (2014) Dynamics of interictal spikes and high-frequency oscillations during epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 67: 97–106.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.012>

8. Kim JE, Cho KO (2018) The Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy and EEG Monitoring Using Radiotelemetry System in Mice. *J Vis Exp* e56831.
<https://doi.org/10.3791/56831>
9. Castro OW, Santos VR, Pun RYK, McKlveen JM, Batie M, Holland KD, Gardner M, Garcia-Cairasco N, Herman JP, Danzer SC (2012) Impact of Corticosterone Treatment on Spontaneous Seizure Frequency and Epileptiform Activity in Mice with Chronic Epilepsy. *PLoS One* 7: e46044.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046044>
10. Wang S, Lévesque M, Avoli M (2019) Transition from status epilepticus to interictal spiking in a rodent model of mesial temporal epilepsy. *Epilepsy Res* 152: 73–76.
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2019.03.005>
11. Kovács Z, Czurkó A, Kékesi K, Juhász G (2011) Intracerebroventricularly administered lipopolysaccharide enhances spike–wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. *Brain Res Bull* 85: 410–416.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.05.003>
12. Flink R, Pedersen B, Guekht AB, Malmgren K, Michelucci R, Neville B, Pinto F, Stephani U, Özkara C (2002) Guidelines for the use of EEG methodology in the diagnosis of epilepsy. *Acta Neurol Scand* 106: 1–7.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2002.01361.x>
13. Renzel R, Baumann CR, Poryazova R (2016) EEG after sleep deprivation is a sensitive tool in the first diagnosis of idiopathic generalized but not focal epilepsy. *Clin Neurophysiol* 127: 209–213.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.06.012>
14. Lévesque M, Biagini G, de Curtis M, Gnatskovsky V, Pitsch J, Wang S, Avoli M (2021) The pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy: Over one decade later, with more rodent species and new investigative approaches. *Neurosci Biobehav Rev* 130: 274–291.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.08.020>
15. Vizuete AFK, Hansen F, Negri E, Leite MC, de Oliveira DL, Gonçalves C-A (2018) Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. *J Neuroinflammation* 15: 68.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1109-5>
16. Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals* 13: 340.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
17. Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281–294.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
18. Sinton CM, Kovakkattu D, Friese RS (2009) Validation of a novel method to interrupt sleep in the mouse. *J Neurosci Methods* 184: 71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.026>
19. Simonova VV, Guzeev MA, Ekimova IV, Pastukhov YF (2022) Chaperone Hsp70 (HSPA1) Is Involved in the Molecular Mechanisms of Sleep Cycle Integration. *Int J Mol Sci* 23: 4464.
<https://doi.org/10.3390/ijms23084464>
20. Wu T, Avidan AY, Engel J (2021) Sleep and Epilepsy, Clinical Spectrum and Updated Review. *Sleep Med Clin* 16: 389–408.
<https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2021.02.011>
21. Murthy Sindgi V, Basani M, Choudary P, Molugu K, Malothu R (2019) Development of Non-invasive Electroencephalography Technique in Animal Model. *Indian J Pharm Educ Res* 53: s619–s623.
<https://doi.org/10.5530/ijper.53.4s.157>
22. Fordington S, Manford M (2020) A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury. *J Neurol* 267: 3105–3111.
<https://doi.org/10.1007/s00415-020-09926-w>
23. Sankar R, Auvin S, Mazarati A, Shin D (2007) Inflammation contributes to seizure-induced hippocampal injury in the neonatal rat brain. *Acta Neurol Scand* 115: 16–20.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00804.x>
24. Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, Batra A, Carlton E, Najm I, Granata T, Janigro D (2009) Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis* 33: 171–181.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.002>
25. Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, Brizard B, El Hage W, Surget A, Belzung C, Camus V (2021) Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci* 53: 151–171.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14720>

26. Krendl R, Lurger S, Baumgartner C (2008) Absolute spike frequency predicts surgical outcome in TLE with unilateral hippocampal atrophy. *Neurology* 71: 413–418.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310775.87331.90>
27. Bajorat R, Goerss D, Brenndörfer L, Schwabe L, Köhling R, Kirschstein T (2016) Interplay between interictal spikes and behavioral seizures in young, but not aged pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsy Behav* 57: 90–94.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.01.014>
28. El-Hassar L, Milh M, Wendling F, Ferrand N, Esclapez M, Bernard C (2007) Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *J Physiol* 578: 193–211.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.119297>
29. Drinkenburg WHIM, Coenen AML, Vossen JMH, van Luijckelaar ELJM (1995) Sleep Deprivation and Spike-Wave Discharges in Epileptic Rats. *Sleep* 18: 252–256.
<https://doi.org/10.1093/sleep/18.4.252>

A Minimally Invasive Method of Wireless Electroencephalogram Recording in Rats in a Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy

D. S. Sinyak^a, G. A. Bukov^a, V. V. Sizov^b, O. E. Zubareva^a,
D. V. Amakhin^a, and A. V. Zaitsev^{a,*}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, St. Petersburg, Russia*

^b *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru

Recent studies have shown that neuroinflammation plays an important role in the pathogenesis of many nervous and mental diseases, such as cortical ischemia, craniocerebral trauma, neurodegenerative diseases, epilepsy, etc. Therefore, when recording EEG in experimental models of these diseases, it is preferable to use noninvasive recording methods to exclude neuroinflammation. However, such approaches are rarely used, since it is difficult to perform reliable EEG recording in animals without the use of implanted electrodes. In the present work a new device for minimally invasive wireless EEG recording in rats is proposed. The electrodes are located on the surface of the skull and are attached to a platform, which is fixed to the skull with screws. This design avoids damage to brain tissue. The surgery is minimally traumatic, and EEG registration can be performed as early as 2–3 days after surgery. High reliability of electrode attachment allows long-term registration. This method of EEG registration has been tested on a lithium–pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. EEG recordings in experimental and control rats were made under background conditions and with the use of functional loads — rhythmic photo- and phonostimulation, as well as sleep deprivation. It was shown that these functional loads allow increasing the severity of epileptiform manifestations on the EEG (spike frequencies), the maximum differences between the groups being manifested with a combination of the above loads. Thus, the main feature of the proposed EEG recording device is that it makes it possible to perform prolonged EEG studies on a free-moving rat without the development of possible neuroinflammation. This device can be used in experiments to study epileptogenesis and to test new antiepileptic drugs on experimental animals.

Keywords: EEG recording, epilepsy, intermittent photic stimulation, rhythmic auditory stimulation, sleep deprivation, ictal and interictal activity