

Л. Э. ДЕМЯНЕНКО<sup>1</sup>, Е. П. ПОДДУБНАЯ<sup>2</sup>, И. А. МАКЕДОНСКИЙ<sup>2</sup>,  
И. Б. КУЛАГИНА<sup>1</sup>, С. М. КОРОГОД<sup>3</sup>

## ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ ПАЧЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ ГИППОКАМПАЛЬНОГО ГРАНУЛЯРНОГО НЕЙРОНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ TRP-КАНАЛАМИ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, БИОФИЗИЧЕСКИЙ И КЛИНИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ

Поступила 23.09.15

Синхронные пачечные разряды потенциалов действия (ПД) нейронов являются одним из проявлений эпилептиформной активности мозга; такие разряды отражаются в ЭЭГ как эпизоды типа «вспышка–подавление». Для устранения резистентных к фармакологическим препаратам эпилептогенных очагов все шире начинает использоваться терапевтическая гипотермия (контролируемое снижение температуры тела), механизмы терапевтического эффекта которой во многом не известны. Один из возможных механизмов исследован нами на модели гранулярного нейрона (ГН) зубчатой извилины гиппокампа. Эти клетки являются первыми звеньями в трехсинаптических цепях гиппокампа – отдела мозга, где часто локализуются источники эпилептиформной активности. Особенностью модели ГН было включение в его соматодендритную мембрану, наряду с другими присущими данным нейронам ионными каналами, термочувствительных каналов семейства TRP, проводящих деполяризующий ток. Установлено, что такие каналы действительно экспрессируются в ГН. В ответ на тоническое синаптическое возбуждение, однородно распределенное по дендритам, ГН при температуре 37 °С (нормотермия) генерировал периодические многоимпульсные пачки разрядов. Понижение температуры до 36, 34, 32 и 30 °С (границы слабой, умеренной, умеренно глубокой и глубокой терапевтической гипотермии соответственно) приводило к деградации пачечных паттернов и их трансформации в низкочастотные последовательности одиночных ПД. Именно при указанных температурах происходит деактивация деполяризующего тока TRP-каналов. Феномену деградации пачечной активности модельного ГН соответствовало многократное уменьшение амплитуды, длительности и частоты повторения эпизодов «вспышка–подавление» в составе ЭЭГ новорожденных детей с гипоксическим ишемическим поражением ЦНС, которое отмечалось нами в клинике в условиях применения умеренной гипотермии (34 °С) для лечения таких пациентов. Указанные наблюдения позволяют предположить, что гипотермическое подавление пачечных разрядов гиппокампальных нейронов, обладающих термочувствительными TRP-каналами, может быть одним из механизмов терапевтического эффекта гипотермии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гранулярный нейрон (ГН) гиппокампа, TRP-каналы, температурная чувствительность, возбудимость, эпилептиформная ЭЭГ, терапевтическая гипотермия, компьютерные модели.

<sup>1</sup> Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины», Днепр (Украина).

<sup>2</sup> Коммунальное учреждение «Днепропетровский специализированный клинический медицинский центр матери и ребенка им. проф. М. Ф. Руднева Днепропетровского областного совета», Днепр (Украина).

<sup>3</sup> Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: liliya.mailss@gmail.com (Л. Э. Демяненко);  
piddubna.olena@gmail.com (Е. П. Поддубная);  
igor\_makedonsky@yahoo.com (И. А. Македонский);  
kulagina.iryna@gmail.com (И. Б. Кулагина);  
dnipro@biph.kiev.ua (С. М. Корогод).

## ВВЕДЕНИЕ

Эпилептиформная активность головного мозга связана с аномальным повышением возбудимости центральных нейронов и синхронизацией их сетевой активности [1]. Подобной синхронизации особенно способствует то, что многие нейроны генерируют пачечную импульсную активность; организация пресинаптических потенциалов действия (ПД) в пачки существенно повышает эффективность возбуждения постсинаптических нейронов [2]. Очаги эпилептиформной активности часто локализируются в гиппокампе [3], нейронные сети которого включают в себя трехсинаптические цепи. Первыми звеньями таких цепей являются гранулярные нейроны (ГН) зубчатой извилины, получающие синаптическое возбуждение из энторинальной коры. ГН в свою очередь синаптически возбуждают пирамидные нейроны области СА3, а те – пирамидные нейроны области СА1, являющиеся основным выходом гиппокампа [4]. По существующим данным, спонтанная синхронизация активности, отражающаяся в виде эпилептиформных ЭЭГ-паттернов типа «вспышка–подавление», часто возникает на границе зубчатой извилины и зоны СА3, а возникшие вспышки далее распространяются в зону СА1 и субикулум [5].

Некоторые виды эпилепсии не поддаются фармакологическому лечению, но могут подавляться путем использования терапевтической гипотермии [6]. Механизмы действия данного фактора на нейроны ЦНС пока остаются слабо изученными. В нашей предыдущей работе [7] мы впервые рассматривали такого рода механизм, связанный с температурными влияниями на ионные каналы нейронной мембраны. Биофизической основой действия рассмотренного механизма была гипотермическая деактивация термочувствительных каналов TRP-типа, которые экспрессируются в нейронах гиппокампа и проводят возбуждающие деполяризующие токи [8–10]. На упрощенной модели ГН нами было показано [7], что такая температурная модуляция активности TRP-каналов может приводить к существенному снижению клеточной возбудимости и уменьшению частоты разрядов ПД, генерируемых ГН.

В настоящей работе, выполненной на модели реального ГН с реконструированным дендритным разветвлением [11] и характерной для клеток данного типа композицией ионных каналов [12], которая включает в себя термочувствительные TRP-каналы [9, 13], впервые демонстрируются два эффекта –

возможность генерации таким нейроном сложных многоимпульсных пачечных разрядов при нормальной температуре (чего не наблюдалось на упрощенной модели ГН [7]) и подавление подобных пачек (их трансформация в низкочастотные последовательности одиночных ПД) в условиях гипотермии. Подобные результаты модельного исследования были сопоставлены с нашими клиническими наблюдениями эффектов применения гипотермии для лечения новорожденных детей с гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС. В ЭЭГ таких пациентов присутствуют характерные эпилептиформные паттерны типа «вспышка–подавление». Амплитуда, длительность и частота таких патологических пароксизмальных вспышек активности существенно ограничиваются в условиях гипотермии. Таким образом, индуцированной гипотермией деградации пачечной активности модельного ГН гиппокампа соответствует деградация патологических ЭЭГ-паттернов типа «вспышка–подавление» в условиях терапевтической гипотермии. Подобные результаты позволяют предполагать, что гипотермическое подавление пачечных разрядов ПД гиппокампальных нейронов, обладающих термочувствительными TRP-каналами, является одним из механизмов терапевтического эффекта гипотермии.

## МЕТОДИКА

*Клиническое исследование ЭЭГ новорожденных в условиях нормо- и гипотермии.* Нативную ЭЭГ новорожденных детей ( $n = 24$ ), у которых было диагностировано гипоксически-ишемическое поражение ЦНС с клинически выраженными судорогами, регистрировали в процессе мониторинга состояния их головного мозга. Этим пациентам, согласно унифицированному протоколу лечения, было назначено применение терапевтической системной гипотермии в течение 48 ч в комплексе с другими видами терапии, в частности фармакологической (сибазон, гидроксибутират натрия и тиопентал натрия). Контролируемое индуцированное снижение центральной температуры тела, непрерывно измеряемой с использованием ректального датчика, производили путем принудительной вентиляции кувеза с термоизолирующими стенками. Анализировали характеристики ЭЭГ, зарегистрированных при температуре 37 (нормотермия) и 34 (системная умеренная гипотермия) °С. Регистрацию и количественный анализ ЭЭГ осуществляли с приме-

нием компьютерной электроэнцефалографической системы «DX BrainTest» (Украина). Отводящие электроды располагали согласно общепринятой международной системе «10–20» в 10 симметричных проекциях (лобные Fs, Fd, височные Ts, Td, центральные Cs, Cd, теменные Ps, Pd и затылочные Os, Od). Использованная схема биполярных отведений (F–T, T–C, C–P, P–O) иллюстрируется рис. 2.

*Модель ГН зубчатой извилины гиппокампа* была разработана и исследована в программной среде «NEURON» [14]. Модель, подробно описанная в нашей предыдущей работе [7], была модифицирована. Дендриты, ранее упрощенно представленные неоднородными мембранными цилиндрами [12], были заменены реконструированным дендритным разветвлением биологического ГН-прототипа [15], которое представлено в базе данных открытого доступа ModelDB (каталоговый номер 95960, клетка 3). Дендритные ветви соответственно их пространственной локализации были условно разделены на четыре группы – наиболее проксимальные (расположенные в пределах слоя ГН) и следующие за ними проксимальные, медиальные и дистальные ветви (рис. 1, А; см. стр. 10). Геометрия сомы и аксона, типы ионных каналов и их распределение в мембране структурных элементов нейрона были такими же, как и в нашей исходной упрощенной модели [7]. Подобно последней, модель, использованная в настоящей работе, обладала ионными каналами, проводящими токи следующих типов: быстрый инактивирующийся чувствительный к тетродотоксину натриевый ( $J_{Na}$ ); кальциевые T-, N- и L-типа ( $J_{CaT}$ ,  $J_{CaN}$  и  $J_{CaL}$  соответственно); быстрый и медленный калиевые задержанного выпрямления ( $J_{IKDR}$  и  $J_{SKDR}$  соответственно); низкопороговый быстро инактивирующийся калиевый А-типа ( $J_{KA}$ ); кальцийзависимые калиевые малой и большой проводимости ( $J_{SK}$  и  $J_{BK}$  соответственно; проводимость последнего была также потенциалзависимой); ток пассивной утечки ( $J_{Leak}$ ); возбуждающий синаптический ток ( $J_{syn}$ ), а также термочувствительный ток TRP-типа ( $J_{trp}$ ).

*Протоколы вычислительных экспериментов.* Исследовали отводимые от сомы ответы модельного ГН на действие электрических и синаптических возбуждающих стимулов. В качестве электрических стимулов использовали приложение к соме (см. схему на рис. 1, А) коротких (2 мс) или длительных (500 мс) толчков деполяризирующего тока. Кратковременное (фазное) и длительное (тоническое) синаптическое возбуждение дендритов ГН

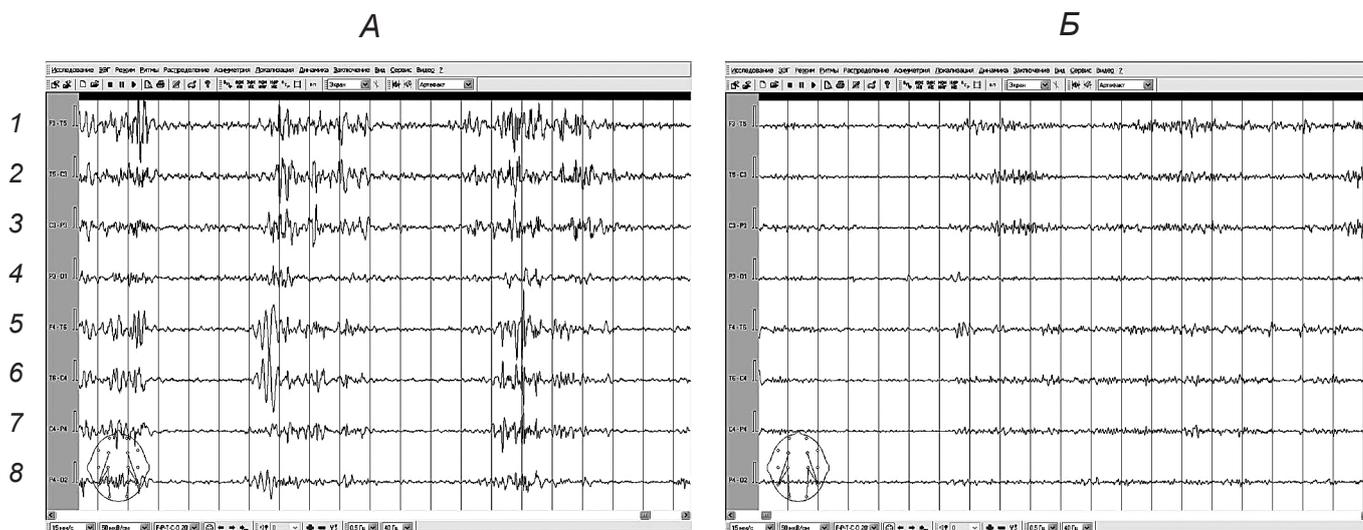
имитировали, соответственно, кратковременным (30 мс) или длительным (4–6 с) увеличением проводимости  $G_{syn}$  для деполяризирующего синаптического тока  $J_{syn}$  (потенциал равновесия  $E_{syn} = 0$  мВ), однородно распределенной по дендритной мембране и независимой от потенциала.

Вызванные действием таких стимулов разряды ПД, генерируемые ГН, исследовали при значениях температуры, которые соответствовали нормальной температуре тела (37 °С), а также верхним границам слабой, умеренной, умеренно глубокой и глубокой терапевтической гипотермии (36, 34, 32 и 30 °С соответственно) [7]. При каждом значении температуры вычисляли ответы ГН, варьируя проводимость TRP-каналов от 0 до 800 мкСм/см<sup>2</sup> с инкрементом 100 мкСм/см<sup>2</sup>.

Последовательности ПД, генерируемых ГН, характеризовали интервалограммами – графиками, на которых по оси абсцисс отложены номера ПД в порядке их следования, а по оси ординат – межимпульсный интервал (МИИ). В указанных последовательностях выделяли периодически повторяющиеся фрагменты. Для повторяющихся пачек ПД (например, на рис. 1, Б) в соответствующих интервалограммах выделяли межпачечные и внутripачечные МИИ (Б, 1, черные и белые кружки соответственно). Для более наглядного представления внутripачечной временной организации ПД использовали логарифмическую ось ординат, что контрастировало различия между короткими внутripачечными МИИ на фоне намного более длительных межпачечных интервалов (Б, 2,3). Влияния изменений проводимости TRP-каналов ( $G_{trp}$ ) на частоту и сложность паттернов ПД иллюстрировали сравнительными диаграммами с дискретной осью абсцисс; в таких диаграммах представлялись величины  $G_{trp}$  и с ними сопоставлялись интервалограммы повторяющихся фрагментов периодических последовательностей ПД, полученных в данных условиях (Б, 2; рис. 5).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*ЭЭГ новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС при нормотермии и умеренной гипотермии.* Для нативной ЭЭГ новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС характерными были паттерны типа «вспышка–подавление» (“burst-suppression”, согласно принятой классификации [16]); они имели вид чередующих-



**Рис. 2.** Влияние системной гипотермии на электрическую активность головного мозга новорожденного ребенка с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС.

Представлены типичные фрагменты нативной ЭЭГ, зарегистрированной при температурах тела 37 (А) и 34 (Б) °С, которые соответствуют условиям нормотермии и умеренной системной гипотермии. Калибровки амплитуды в начале записей 50 мкВ; временные интервалы между вертикальными линиями 1 с. Внизу слева – схема биполярных отведений (F–T, T–C, C–P, P–O) ЭЭГ от левого (1–4) и правого (5–8) полушарий.

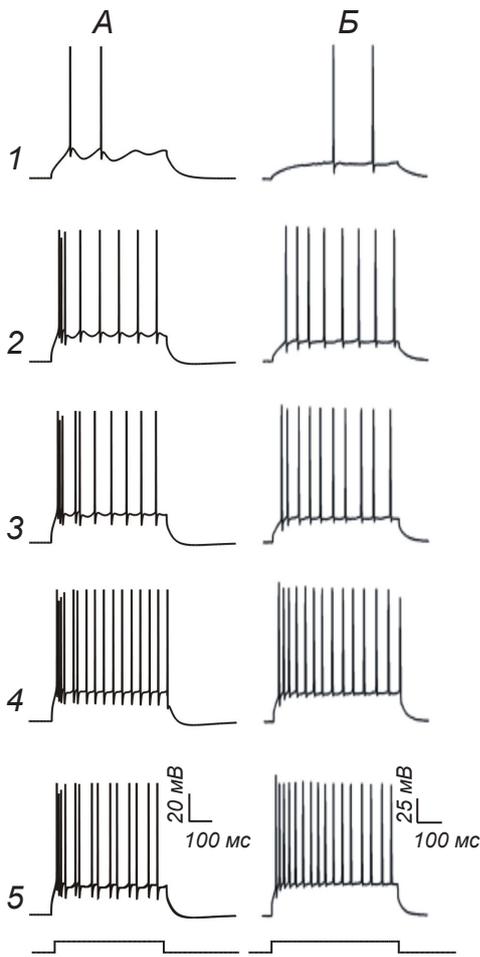
**Рис. 2.** Вплив системної гіпотермії на електричну активність головного мозку новонародженої дитини з перинатальним гіпоксично-ішемічним ураженням ЦНС.

ся последовательностей медленных волн высокой амплитуды (вспышка) и сегментов так называемой плоской ЭЭГ (подавление). Типичные примеры таких паттернов, наблюдавшихся при температурах 37 и 34 °С (условия нормотермии и умеренной системной гипотермии), приведены на рис. 2, А и Б соответственно. Наблюдаемые в условиях 37 °С вспышки имели относительно большие амплитуды (до 100 мкВ), длительность (3–5 с) и частоту повторения (межвспышечные интервалы 2–3 с). Для ЭЭГ при 34 °С характерными были вспышки вдвое-втрое меньшей амплитуды (около 40 мкВ) и длительности (1–3 с), разделенные значительно более длительными межвспышечными интервалами (3–10 с).

*Влияние гипотермии на активность модельного ГН, вызванную электрической стимуляцией.* В первой серии вычислительных экспериментов исследовали ответы ГН на приложение длительного (500 мс) толчка деполяризующего тока разной интенсивности в условиях наличия активности (включения) TRP-каналов (TRP<sup>+</sup>) при температуре 22 °С. Подобный протокол стимуляции применялся в экспериментах на ГН *in vivo* [17]. Модельный нейрон в ответ на приложение подобного стимула генериро-

вал разряды ПД (рис. 3, А), сходные с зарегистрированными в указанных нативных экспериментах разрядами ГН типа 2 (Б, ср. рис. 2, А в [17]). После начального переходного процесса длительностью около 200 мс генерировались ПД с постоянными значениями амплитуды и частоты. С увеличением интенсивности стимула частота ПД увеличивалась. В отличие от активности прототипа непрерывный разряд модельного ГН при большой интенсивности стимула переходил в последовательность дублетов. Другим отличием был характер переходного процесса. В частности, при малой интенсивности стимула ГН-прототип генерировал пару ПД со значительной задержкой относительно начала стимуляции, что не наблюдалось у модельного нейрона.

В следующей серии вычислительных экспериментов исследовали ответы ГН на короткий толчок деполяризующего тока (длительность 2 мс, амплитуда 1.1 нА) и их зависимость от максимальной проводимости TRP-каналов и температуры (рис. 3, А и Б соответственно). При температуре 37 °С и проводимости TRP-каналов  $G_{trp} = 400$  мкСм/см<sup>2</sup> ответ имел вид одиночного ПД, за которым развивалась высокоамплитудная длительная волна следовой деполяризации. На вершине последней ге-



**Р и с. 3.** Ответы модельного гранулярного нейрона – ГН (А) и реального ГН-прототипа (Б; фрагмент А рис. 2 из работы Ненова и соавт. [17]).

1–5 – ответы на приложение к сине длительных (500 мс) деполяризующих толчков тока, интенсивность которых в случае модельного ГН составляла 220, 240, 250, 280 и 295 пА соответственно.

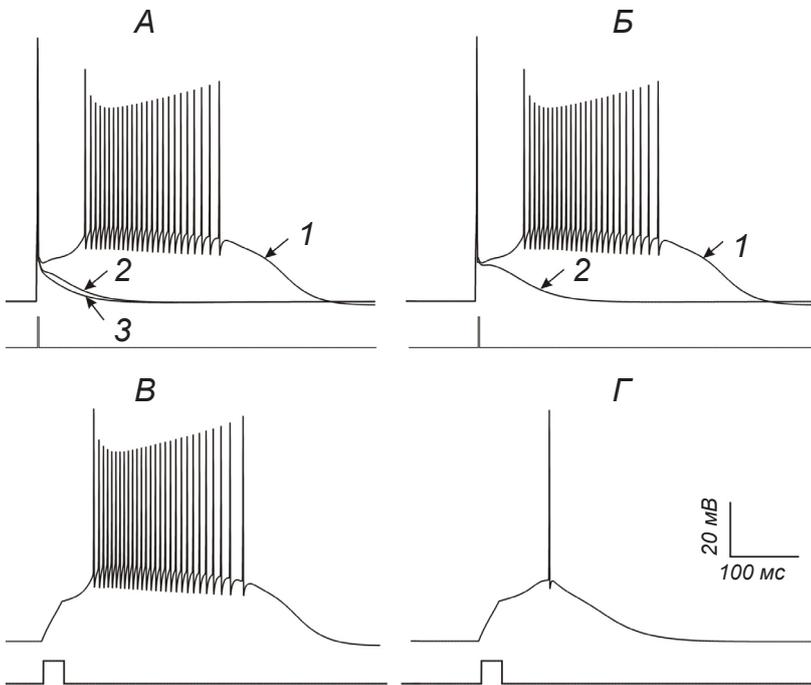
**Р и с. 3.** Відповіді модельного гранулярного нейрона – ГН (А) та реального ГН-прототипу (Б; фрагмент А рис. 2 взято з цитованої роботи [17]).

нерировалась пачка из нескольких ПД (рис. 4, А, 1). Уменьшение проводимости до 200 и 0 мкСм/см<sup>2</sup>, что имитировало частичное и полное блокирование TRP-каналов соответственно, приводило к значительному ослаблению следовой деполяризации после первого ПД и исчезновению пачечного характера разряда (2 и 3 соответственно). При исходной же проводимости  $G_{trp} = 400$  мкСм/см<sup>2</sup> аналогичное подавление пачечного разряда (рис. 4, Б, 1) наблюдалось в условиях снижения температуры с 37 до 34 °С, т. е. до уровня умеренной гипотермии (2).

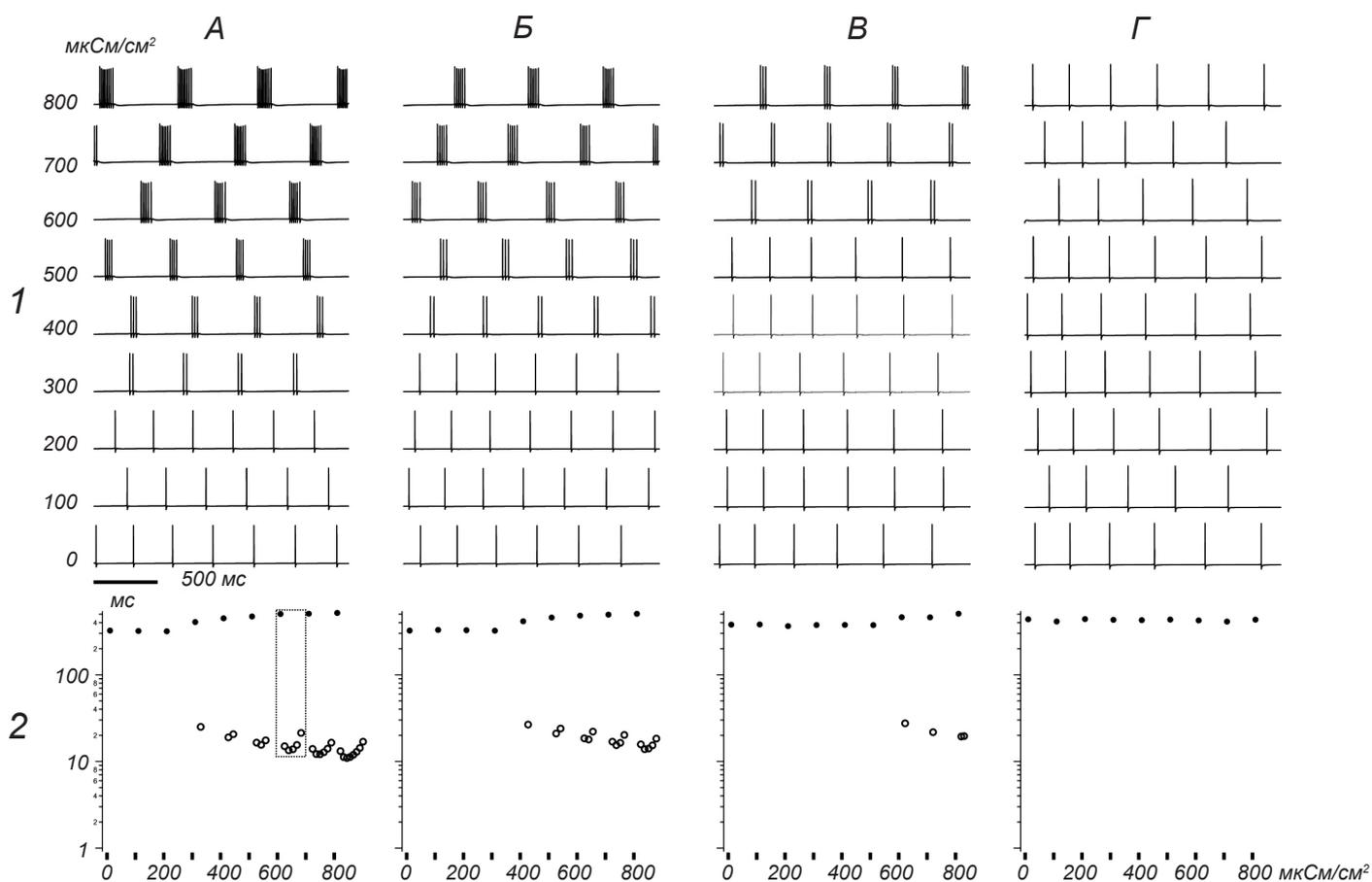
*Влияние гипотермии на активность модельного ГН, вызванную синаптическим возбуждением*

**Р и с. 4.** Влияния изменений проводимости TRP-каналов и температуры на активность модельного гранулярного нейрона, вызванную приложением к сине коротких толчков деполяризующего тока (А, Б) и импульсным синаптическим возбуждением дендритов (В, Г).

А – ответы на приложение толчка тока (1.1 нА, 2.0 мс) при температуре 37 °С и проводимости термозависимых TRP-каналов  $G_{trp} = 400, 200$  и  $0$  мкСм/см<sup>2</sup> (1–3 соответственно). Б – ответы на приложение такого же стимула при фиксированной проводимости  $G_{trp} = 400$  мкСм/см<sup>2</sup> и температурах 37 (то же, что и на А, 1) и 34 °С (значения температуры соответствуют нормотермии и верхней границе умеренной терапевтической гипотермии – 1 и 2 соответственно). В, Г – ответы на импульсное увеличение возбуждающей синаптической проводимости  $G_{syn}$ , однородно распределенной по дендритному дереву (длительность импульса 30 мс, интенсивность  $G_{syn} = 15$  мкСм/см<sup>2</sup>) при значениях TRP-проводимости  $G_{trp} = 400$  и  $0$  мкСм/см<sup>2</sup>, соответствующих условиям интактности (В, TRP<sup>+</sup>) и полного устранения (Г, TRP<sup>-</sup>) данных каналов. Калибровка общая для всех ответов; нижние записи на А–Г – стимулы.



**Р и с. 4.** Впливи змін провідності TRP-каналів і температури на активність модельного гранулярного нейрона, викликану прикладанням до сине коротких поштовхів деполяризуючого струму (А, Б) та імпульсним синаптичним збудженням дендритів (В, Г).



**Р и с. 5.** Вызванные тоническим синаптическим возбуждением дендритов пачечные разряды потенциалов действия (ПД), генерируемых гранулярным нейроном, и их гипотермическое подавление при разной проводимости TRP-каналов.

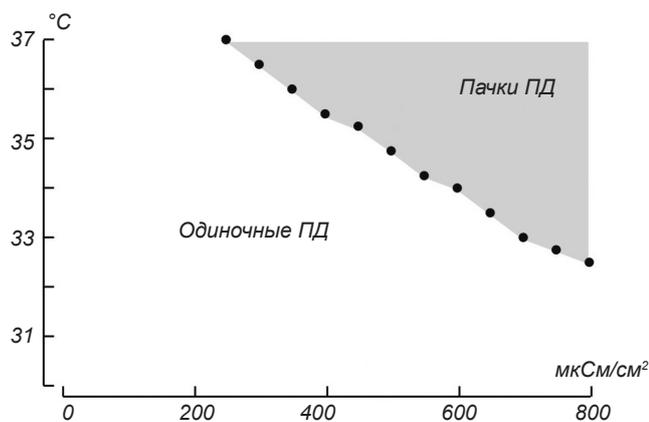
*A–Г* – последовательности ПД (1), генерируемые в условиях нормотермии и верхних границ слабой, умеренной и умеренно глубокой системной гипотермии (температуры 37, 36, 34 и 32 °С соответственно) при разных значениях проводимости TRP-каналов –  $G_{\text{TRP}}$  (указаны слева, мкСм/см<sup>2</sup>), а также интервалограммы (2) периодически повторяющихся фрагментов последовательностей ПД. На интервалограммах 2 по осям абсцисс – максимальная проводимость TRP-каналов, мкСм/см<sup>2</sup>; по осям ординат (логарифмическим) – межимпульсные интервалы (МИИ), мс. Белые и черные кружки соответствуют внутри- и межпачечным МИИ (см. также пояснения к рис. 1, фрагменту *B*, 3 которого соответствует ограниченный прямоугольником фрагмент *A*, 2). Переход от пачечных разрядов к тонической активности (непрерывным последовательностям одиночных ПД) происходит при температурах тем более низких, чем больше  $G_{\text{TRP}}$ .

**Р и с. 5.** Викликані тонічним синаптичним збудженням дендритів пачкові розряди потенціалів дії, генерованих гранулярним нейроном, та їх гіпотермічне пригнічення при різній провідності TRP-каналів.

*дендритов.* Далее мы исследовали зарегистрированные при 37 °С ответы ГН на кратковременное (30 мс) увеличение однородно распределенной по дендритам синаптической проводимости до значения  $G_{\text{syn}} = 15$  мкСм/см<sup>2</sup> в зависимости от проводимости TRP-каналов  $G_{\text{TRP}}$ . Если  $G_{\text{TRP}} = 400$  мкСм/см<sup>2</sup> (условие TRP<sup>+</sup>), ГН генерировал пачечный разряд с несколькими ПД (рис. 4, *B*), подобный наблюдавшемуся в случае стимуляции толчком тока (ср.

рис. 4, *A*, 1). При  $G_{\text{TRP}} = 0$  мкСм/см<sup>2</sup> (имитация полного блокирования или генетического нокаута TRP-каналов – условие TRP<sup>-</sup>) генерировался не пачечный разряд, а лишь одиночный ПД (*Г*).

Результаты последующих вычислительных экспериментов показали (рис. 5), как паттерн разряда, вызванного тоническим возбуждением дендритов ГН, зависит от соотношения максимальной проводимости термочувствительных TRP-каналов ( $G_{\text{TRP}}$ )



**Р и с. 6.** Фазовая диаграмма зависимости паттернов разряда гранулярного нейрона от соотношения максимальной проводимости TRP-каналов ( $\text{мкСм/см}^2$ , ось абсцисс) и температуры ( $^{\circ}\text{C}$ , ось ординат).

Разряды вызывались тонической активацией возбуждающей синаптической проводимости ( $G_{\text{syn}}$ ), равномерно распределенной по дендритам ( $G_{\text{syn}} = 37 \text{ мкСм/см}^2$ ). Показана граница раздела области значений параметров, соответствующих пачечным разрядам (пачкам потенциалов действия – ПД; указано серым цветом) – и тонической непрерывной импульсации (одиночным ПД).

**Р и с. 6.** Фазова діаграма залежності паттернів розряду гранулярного нейрона від співвідношення максимальної провідності TRP-каналів ( $\text{мкСм/см}^2$ , вісь абсцис) і температури ( $^{\circ}\text{C}$ , вісь ординат).

и температуры. В процессе рассмотрения периодических паттернов импульсной активности ГН, представленных на рис. 5, обращает на себя внимание следующая важная особенность. С понижением температуры переход от пачечных разрядов к непрерывным низкочастотным последовательностям ПД происходит при прогрессивно больших значениях проводимости TRP-каналов  $G_{\text{тр}}$ . Эта особенность переходов от одного паттерна к другому наглядно отображается фазовой диаграммой (рис. 6). Такие переходы отмечаются при определенных соотношениях максимальной проводимости TRP-каналов, которые коррелируют с границей фазового перехода (точки на рис. 6) между параметрическими областями, соответствующими пачечному паттерну (область показана серым цветом) и тоническому. Анализ паттернов ПД и построенной на их основе фазовой диаграммы показал, что данная граница фазового перехода практически не зависит от интенсивности тонического синаптического возбуждения дендритов  $G_{\text{syn}}$ , т. е. является инвариант-

ной относительно этого параметра. Увеличение или уменьшение синаптической проводимости приводит, соответственно, к увеличению или уменьшению частоты следования как пачек, так и одиночных ПД, не организованных в пачки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты данной работы продемонстрировали следующие основные эффекты гипотермии. В условиях клиники гипотермия существенно ослабляет эпилептиформную активность головного мозга у новорожденных детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС; этот эффект проявляется в уменьшении амплитуды, длительности и частоты повторения эпизодов «вспышка–подавление активности» в ходе мониторинга нативной ЭЭГ. У модельного ГН, имитирующего первое звено в трехсинаптических цепях гиппокампа – структуры, в которой часто локализуются очаги эпилептиформной активности, снижение температуры в аналогичных пределах приводит к подавлению вызванной тоническим синаптическим возбуждением пачечной активности. Продемонстрировано также, что термочувствительные TRP-каналы мембраны ГН играют существенную роль как в возникновении, так и в гипотермическом подавлении упомянутой пачечной активности. При этом возникают четыре ключевых вопроса. Какова возможная связь описанных выше эффектов гипотермического угнетения эпилептиформной активности типа «вспышка–подавление» и деградации пачечных разрядов ГН? Какова связь обоих указанных эффектов со свойствами TRP-каналов? Насколько адекватно отображает упомянутые связи используемая модель ГН, включающая в себя TRP-каналы? Какое значение полученные результаты могут иметь для теории и практики терапевтической гипотермии?

*Связь эпилептиформной ЭЭГ-активности и пачечной активности нейронов.* Синхронизация патологической активности нейронов в более или менее обширных областях мозга находит отражение в характерных паттернах ЭЭГ, называемых эпилептиформными [1]. В частности, такими паттернами являются комплексы «пик–волна» или «множественный пик–волна» (“spike-wave” и “polispikes-wave” соответственно), а также специальный паттерн типа «вспышка–подавление» (“burst-suppression”). Общеизвестно, что на клеточном уровне наиболее выраженным атрибутом эпилептиформных паттер-

нов ЭЭГ является активность нейронов в виде пачек (групп) ПД [5, 18–20]. Это было показано уже в ходе ранних клинических ЭЭГ-исследований пациентов, страдающих психомоторной эпилепсией, которым для предоперационного выяснения локализации эпилептогенного фокуса были имплантированы микроэлектроды в гиппокамп [18]. Осуществляемое одновременно с мониторингом ЭЭГ внеклеточное микроэлектродное отведение активности одиночных нейронов показало, что наблюдаемые во время субклинических электрографических и клинических судорожных приступов (sub-clinical EEG seizures and clinical seizures) интериктальные разряды нейронов, расположенных вблизи эпилептогенного фокуса, в большинстве случаев организованы в пачки [18]. Стериаде и соавт. [19] впервые выявили клеточные корреляты паттерна «вспышка–подавление», продемонстрировав, что ЭЭГ-вспышки связаны с возрастанием импульсной активности кортикальных нейронов, а фазы подавления отражают отсутствие кортикальных сетевых взаимодействий. В экспериментах на кошках с имплантированными микроэлектродами было обнаружено, что генерируемые кортикальными нейронами спонтанные последовательности и пачки ПД (spike trains and spike bursts) явно соотносились во времени с ЭЭГ-феноменами типа «пик–волна» или «полипик–волна» [21].

Как отмечалось выше, перечисленные эпилептиформные ЭЭГ-паттерны коррелируют с повышенной синхронизацией активности нейронов в церебральных сетях. Считается, что синхронизация базируется на действии следующих трех основных факторов: 1) «внутренне присущая» (“intrinsic” обусловленная собственными свойствами клетки) способность нейрона генерировать пачечную активность; 2) наличие мощных рекуррентных возбуждающих связей и 3) отсутствие торможения, препятствующего распространению пачечной активности по рекуррентным связям [2]. Пачечная активность внутренне присуща основным клеткам (principal cells) каждой из областей гиппокампа; эти клетки образуют множественные возбуждающие связи как между собой, так и с тормозными интернейронами, которые обеспечивают прямое и возвратное торможение основных клеток.

Эпилептиформные паттерны типа «вспышка–подавление» часто наблюдаются на ЭЭГ детей с гипоксически-ишемическими поражениями мозга [22]. Именно такие паттерны были характерны для обследованных нами новорожденных детей с по-

добной патологией (рис. 2). Как можно предположить, ЭЭГ-вспышки у таких детей обусловлены активностью механизмов, аналогичных тем, которые определяют формирование комплексов «вспышка–подавление» при эпилепсии у взрослых (см. выше), т. е. с синхронизацией пачечной активности нейронов. С учетом данных ряда экспериментальных исследований анализ условий возникновения и подавления пачечной активности именно в ГН зубчатой извилины, предпринятый в нашей работе (рис. 5; 6), и сопоставление полученных на модели результатов с феноменологией изменений ЭЭГ-паттернов «вспышка–подавление» в условиях терапевтической гипотермии (рис. 2) представляются достаточно обоснованными. Результаты исследований динамических характеристик спонтанной синхронизации активности в срезах гиппокампа крыс позволили установить локализацию источников инициации интериктальных вспышек [5]. Подавляющее большинство таких вспышек (~95%), возникавших в гипервозбудимой сети, начинались на границе зубчатой извилины (основными клетками – principal cells – которой являются ГН) и зоны CA3, распространяясь далее по трисинаптическому пути в зону CA1 и субикулум [23]. Реверберация возбуждения, получаемого из энторинальной коры и передаваемого по тресинаптической гиппокампальной цепи (ГН – CA3 – CA1) обратно в энторинальную кору, рассматривается как один из основных возможных механизмов синхронизации возбуждения и его распространения по мозгу, в том числе и при генерации эпилептиформных ЭЭГ-эпизодов «вспышка–подавление» [20]. В подобных экспериментах на срезах гиппокампа крыс было также обнаружено, что синхронизация активности нейронной сети может быть устранена охлаждением [24]. Поскольку устранение синхронизации может быть достигнуто воздействием на любой из трех упомянутых выше факторов, обеспечивающих ее инициацию [2], логично предполагать, что в данном случае таким фактором является именно пачечная активность гиппокампальных нейронов, подавляемая охлаждением.

*Адекватность и ограничения модели.* Наша модель адекватно воспроизводила основные особенности реакций ГН-прототипа на приложение к соме толчков деполяризующего тока при температуре 22 °С (ср. рис. 3, А и рис. 2, А из сообщения Ненова и соавт. [17]). На этом основании мы предполагаем, что модель отображает так же адекватно и реакции на синаптическое возбуждение (рис. 4, В,

Г; 5). В отличие от исходной модели ГН с упрощенным представлением дендритов, которая в ответ на приложение коротких стимулов генерировала лишь одиночные или парные ПД (их дублиеты) [7], данная модель с реконструированным (т. е. приближенным к реальному) дендритным разветвлением позволяла получить при такой же стимуляции ответы в виде пачки из множества ПД (рис. 5). Представляется вероятным, что такие изменения разрядных свойств ГН связаны с увеличением размеров «бассейна источников» деполяризующих токов, генерируемых в дендритах в условиях активации лиганд- и потенциалуправляемых каналов, а также с более сложной пространственной организацией локальных кальцийзависимых процессов в дендритах, подобных тем, которые отмечались в сходном с ГН по геометрии дендритном дереве неокортикального поверхностного пирамидного нейрона [25].

Важнейшей особенностью нашей модели является то, что в соматодендритную мембрану были включены термочувствительные каналы деполяризующего тока, которые по своим свойствам соответствуют каналам семейства TRP. Имеются убедительные свидетельства того, что термочувствительные TRP-каналы экспрессируются в гиппокампальных нейронах [9, 27], включая ГН зубчатой извилины [13]. Особый интерес в контексте нашей работы представляет то, что эти каналы в развивающихся культивируемых нейронах гиппокампа транспортируются в дендриты [28] и участвуют в температурозависимой регуляции возбудимости указанных клеток, активируясь в физиологическом диапазоне температур 27–34 °С [9]. Таким образом, включение TRP-каналов в дендритную мембрану модельного ГН вполне оправдано, и участие TRP-каналов в температурозависимом подавлении пачечных разрядов повышает адекватность подобной модели. Вопрос о конкретном типе TRP-каналов, вовлеченных в изучаемые температурозависимые процессы возбуждения ГН, остается пока открытым.

*Клиническое значение полученных результатов.* Согласно унифицированным протоколам лечения, новорожденным с гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС назначается применение умеренной системной терапевтической гипотермии в комплексе с введением антиконвульсантов, являющихся, как и в нашем случае, агонистами ГАМК-рецепторов. Активация таких рецепторов в зрелом мозгу приводит к генерации гиперполяризационных тормозящих токов. Подобная активация тор-

мозных путей обуславливает ослабление синхронизации активности церебральных нейронов и тем самым делает менее вероятным возникновение таких связанных с синхронизацией эпилептиформных паттернов, как ЭЭГ-пики. Однако этого, по видимому, недостаточно для полного подавления подобных феноменов, также связанных с синхронизацией сетевой активности (в частности, эпизодов «вспышка–подавление»). Такие паттерны, наблюдаемые при нормальной температуре (рис. 2, А), значительно ослабляются под действием умеренной системной гипотермии, но не исключаются полностью (Б).

Согласно многочисленным данным, хлорные токи через ГАМК-чувствительные каналы в незрелом мозгу являются деполяризующими, т. е. возбуждающими [29, 30], а не гиперполяризующими, как в более поздние периоды онтогенеза. Это обстоятельство рассматривалось как возможная причина ограниченности антиконвульсивного действия ГАМК-эргических препаратов (или даже их проконвульсивного действия) в условиях незрелости мозга [29]. Следует, однако, отметить, что против такой точки зрения выдвинуты ряд контраргументов [31]. Возможным альтернативным способом подавления синхронизации нейронной активности являлось бы ослабление возбуждения основных нейронов путем частичного или полного блокирования каналов деполяризующего тока. Однако в унифицированных протоколах лечения состояний, сопровождающихся эпилептиформной ЭЭГ, известные блокаторы каналов натриевых и кальциевых деполяризующих токов разных типов не являются препаратами первой линии. Возможной причиной являются множество побочных эффектов, связанных с повсеместным распространением указанных каналов в организме.

В нашей работе обнаружено, что подавление пачечной активности гиппокампальных нейронов, важное для снижения эпилептиформной синхронизации, более эффективно при сочетании терапевтической гипотермии с блокированием термочувствительных каналов деполяризующего TRP-тока (рис. 5; 6). В этой связи результаты нашей работы убедительно указывают на актуальность поиска фармакологических антагонистов именно TRP-каналов, экспрессируемых в гиппокампальных нейронах.

Протокол клинических ЭЭГ-исследований, проведенных в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных, был одобрен Комитетом по медицинской

етике Коммунального учреждения «Днепропетровский специализированный клинический медицинский центр матери и ребенка им. проф. М. Ф. Руднева Днепропетровского областного совета». На проведение данных исследований было получено письменное информированное согласие родителей и лечащих врачей всех детей.

Л. Э. Демяненко, Е. П. Поддубная, И. А. Македонский, И. Б. Кулагина и С. М. Корогод подтверждают, что в процессе работы отсутствовали конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

Л. Е. Демяненко<sup>1</sup>, О. П. Піддубна<sup>2</sup>, І. О. Македонський<sup>2</sup>,  
І. Б. Кулагіна<sup>1</sup>, С. М. Корогод<sup>3</sup>

#### ГІПОТЕРМІЧНЕ ПРИГНІЧЕННЯ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ ПАЧКОВОЇ АКТИВНОСТІ ГІПОКАМПАЛЬНОГО ГРАНУЛЯРНОГО НЕЙРОНА, ЩО МАЄ ТЕРМОЧУТЛИВІ TRP-КАНАЛИ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, БІОФІЗИЧНИЙ І КЛІНІЧНИЙ АСПЕКТИ

<sup>1</sup> Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро (Україна).

<sup>2</sup> Комунальний заклад «Дніпропетровський спеціалізований клінічний медичний центр матері та дитини ім. проф. М. Ф. Руднева Дніпропетровської обласної ради», Дніпро (Україна).

<sup>3</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Синхронні пачкові розряди потенціалів дії (ПД) нейронів є одним із проявів епілептиформної активності мозку; такі розряди відображаються в ЕЕГ як епізоди типу «спалах–пригнічення». В клініці для усунення резистентних до фармакологічних препаратів епілептогенних осередків все ширше починає використовуватися терапевтична гіпотермія (контрольоване зниження температури тіла), механізми терапевтичного ефекту якої здебільшого не відомі. Один із можливих механізмів був досліджений нами на моделі гранулярного нейрона (ГН) зубчастої звивини гіпокампа. Ці клітини є першими ланками в трисинаптичних ланцюгах гіпокампа – відділу мозку, де часто локалізуються джерела епілептиформної активності. Особливістю моделі ГН було включення в його соматодендритну мембрану, поряд з іншими притаманними даним нейронам іонними каналами, термочутливих каналів родини TRP, що проводять деполяризуючий струм; встановлено, що такі канали дійсно експресуються в ГН. У відповідь на тонічне синаптичне збудження, однорідно розподілене по дендритах, ГН при температурі 37 °С (нормотермія) генерував періодичні багатопульсні пачки розрядів. Пониження температури до 36, 34, 32 і 30 °С (межі слабкої, помірної, помірно глибо-

кої і глибокої терапевтичної гіпотермії відповідно) призвело до деградації пачкових патернів та їх трансформації в низькочастотні послідовності поодиноких ПД. Саме при вказаних температурах відбувається деактивація деполяризуючого струму TRP-каналів. Феномену деградації пачкової активності модельного ГН відповідало багаторазове зменшення амплітуди, тривалості і частоти повторення епізодів «спалах–пригнічення» в складі ЕЕГ новонароджених дітей з гіпоксично-ішемічним ураженням ЦНС, котре відмічалось нами в клініці в умовах застосування помірної гіпотермії (34 °С) для лікування таких пацієнтів. Вказані спостереження дозволяють припустити, що гіпотермічне пригнічення пачкових розрядів гіпокампа нейронів з термочутливими TRP-каналами може бути одним із механізмів терапевтичного ефекту гіпотермії.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. D. A. McCormick and D. Contreras, “On the cellular and network bases of epileptic seizures,” *Annu. Rev. Physiol.*, **63**, 815-846 (2001).
2. R. K. S. Wong, R. Miles, and R. D. Traub, “Local circuit interactions in synchronization of cortical neurones,” *J. Exp. Biol.*, **112**, No. 1, 169-178 (1984).
3. R. D. Traub, J. G. R. Jefferys, R. Miles, et al., “A branching dendritic model of a rodent CA3 pyramidal neurone,” *J. Physiol.*, **481**, Part 1, 79-95 (1994).
4. D. Amaral and P. Lavenex, “Hippocampal neuroanatomy,” in: *The Hippocampus Book*, P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, et al. (eds.), Oxford Univ. Press, Oxford, (2006), pp. 37-115.
5. A. Hazra, R. Rosenbaum, B. Bodmann, et al., “ $\beta$ -Adrenergic modulation of spontaneous spatiotemporal activity patterns and synchrony in hyperexcitable hippocampal circuits,” *J. Neurophysiol.*, **108**, No. 2, 658-671 (2012).
6. G. K. Motamedi, R. P. Lesser, and S. Vicini, “Therapeutic brain hypothermia, its mechanisms of action, and its prospects as a treatment for epilepsy,” *Epilepsia*, **54**, No. 6, 959-970 (2013).
7. S. M. Korogod and L. E. Demianenko, “Temperature deactivation of depolarizing TRP-current as a mechanism of neuronal activity inhibition during hypothermia,” *Neurophysiology*, **48**, Nos. 5/6, 406-414 (2016).
8. C. Harteneck and K. Leuner, “TRP channels in neuronal and glial signal transduction,” in: *Neurochemistry*, T. Heinbockel (ed.), InTech (2014).
9. K. Shibasaki, M. Suzuki, A. Mizuno, and M. Tominaga, “Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4,” *J. Neurosci.*, **27**, No. 7, 1566-1575 (2007).
10. A. Menigoz, T. Ahmed, V. Sabanov, et al., “TRPM4-dependent post-synaptic depolarization is essential for the induction of NMDA receptor-dependent LTP in CA1 hippocampal neurons,” *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **468**, No. 4, 593-607 (2016).
11. C. Schmidt-Hieber, P. Jonas, and J. Bischofberger, “Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus,” *Nature*, **429**, No. 6988, 184-187 (2004).
12. I. Aradi and W. R. Holmes, “Role of multiple calcium and calcium-dependent conductances in regulation of hippocampal dentate granule cell excitability,” *J. Comput. Neurosci.*, **6**, No. 3, 215-235 (1999).

13. A. Chávez, V. Hernández, A. Rodenas-Ruano, et al., "Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus," *J. Neurosci.*, **34**, No. 50, 16621-16629 (2014).
14. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
15. C. Schmidt-Hieber, P. Jonas, and J. Bischofberger, "Subthreshold dendritic signal processing and coincidence detection in dentate gyrus granule cells," *J. Neurosci.*, **27**, No. 31, 8430-8441 (2007).
16. H. O. Lüders and S. Noachtar, *Atlas and Classification of Electroencephalography*, W. B. Saunders (ed.), Philadelphia (2000).
17. M. N. Nenov, F. Tempia, L. Denner, et al., "Impaired firing properties of dentate granule neurons in an Alzheimer's disease animal model are rescued by PPAR $\gamma$  agonism," *J. Neurophysiol.*, **113**, No. 6, 1712-1726 (2015).
18. T. L. Babb and P. H. Crandall, "Epileptogenesis of human limbic neurons in psychomotor epileptics," *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **40**, No. 3, 225-243 (1976).
19. M. Steriade, F. Amzica, and D. Contreras, "Cortical and thalamic cellular correlates of electroencephalographic burst-suppression," *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **90**, No. 1, 1-16 (1994).
20. D. Kroeger, B. Florea, and F. Amzica, "Human brain activity patterns beyond the isoelectric line of extreme deep coma," *PLoS One*, **8**, No. 9, e75257 (2013).
21. M. Steriade, F. Amzica, D. Neckelmann, and I. Timofeev, "Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. II. Extra- and intracellular patterns," *J. Neurophysiol.*, **80**, No. 3, 1456-1479 (1998).
22. M.-D. Lamblin, E. W. Esquivel, and M. André, "The electroencephalogram of the full-term newborn: review of normal features and hypoxic-ischemic encephalopathy patterns," *Neurophysiol. Clin.*, **43**, Nos. 5/6, 267-287 (2013).
23. S. R. Sinha and P. Saggau, "Imaging of 4-AP-induced, GABA(A)-dependent spontaneous synchronized activity mediated by the hippocampal interneuron network," *J. Neurophysiol.*, **86**, No. 1, 381-391 (2001).
24. S. P. Javedan, R. S. Fisher, H. G. Eder, et al., "Cooling abolishes neuronal network synchronization in rat hippocampal slices," *Epilepsia*, **43**, No. 6, 574-580 (2002).
25. I. B. Kulagina, V. I. Kukushka, and S. M. Korogod, "Structure-dependent electrical and concentration processes in the dendrites of pyramidal neurons of superficial neocortical layers: Model study," *Neurophysiology*, **43**, No. 2, 77-89 (2011).
26. L. El-Hassar, A. M. Hagenston, L. B. D'Angelo, and M. F. Yeckel, "Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal *CA1* pyramidal neuron excitability via Ca<sup>2+</sup> wave-dependent activation of SK and TRPC channels," *J. Physiol.*, **589**, Part 13, 3211-3229 (2011).
27. K. Shibasaki, M. Tominaga, and Y. Ishizaki, "Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **458**, No. 1, 168-173 (2015).
28. J. Ben-Ari, J.-L. Gaiarsa, R. Tyzio, and R. Khazipov, "GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations," *Physiol. Rev.*, **87**, No. 4, 1215-1284 (2007).
29. J. Ben-Ari, M. Woodin, E. Sernagor, et al., "Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever!" *Front. Cell. Neurosci.*, **6**, Art. 35, 1-18 (2012).
30. P. Bregestovski and C. Bernard, "Excitatory GABA: How a correct observation may turn out to be an experimental artifact," *Front. Pharmacol.*, **3**, Art. 65, 1-8 (2012).