

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ВДЫХАНИЯ ПАРОВ ТОЛУОЛА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ
АУДИОГЕННОГО СУДОРОЖНОГО ПРИПАДКА У КРЫС
ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ

© 2019 г. И. И. Полетаева¹, *, Н. М. Сурина¹, И. Б. Федотова¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2019 г.

После доработки 30.03.2019 г.

Принята к публикации 06.04.2019 г.

Значимый процент случаев эпилепсии человека не поддается лечению современными противосудорожными препаратами, в связи с чем остается актуальным поиск альтернативных путей терапии этого заболевания. Цель работы – исследование эффектов вдыхания паров толуола (как сильнейшего одоранта) на эпилептиформные судорожные припадки у крыс линии Крушинского–Молодкиной с высокой предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии (тонические судороги всего тела, а также аудиогенные миоклонические судороги, развивающиеся после серийной звуковой стимуляции). Крыс ($n = 14$) подвергали 15-секундному действию паров толуола с последующим (через 20 с) тестированием интенсивности судорог, характерных для аудиогенной эпилепсии. Действие толуола вызвало значимое (по сравнению с данными в “фоне”, за 1 неделю до эксперимента) ослабление интенсивности аудиогенных судорог обоих типов. У 13 животных из 14 эпилептиформный припадок заканчивался фазой клонических судорог (без развития тонических), тогда как в “фоне” у всех крыс развивались тонические судороги. Миоклонические судороги (аудиогенный киндлинг) обнаруживались у всех крыс до применения толуола, тогда как после этого воздействия они отсутствовали у всех животных. Полученные результаты дополняют ранее полученные сведения о связи проявлений эпилепсии с обонятельной системой, и, в частности, результаты, полученные на крысах линии WAR. Противосудорожный эффект вдыхания паров толуола на проявления аудиогенной эпилепсии показывают и важность использования генетических моделей в таких условиях, и важность использования обонятельной стимуляции как потенциального противосудорожного средства.

Ключевые слова: аудиогенная эпилепсия, аудиогенный киндлинг, генетическая модель, обоняние, толуол, линия крыс Крушинского–Молодкиной

DOI: 10.1134/S0869813919060050

По данным ВОЗ в настоящее время насчитывается около 50 миллионов больных эпилепсией, что составляет 1–2% населения. Значимая доля случаев эпилепсии относится к категории “устойчивых к противосудорожной терапии”, что заставляет искать новые подходы к лечению этого заболевания, включая моделирование судорожных состояний на лабораторных животных. Одной из таких моделей является так называемая аудиогенная эпилепсия (АЭ), когда у животного в ответ на включение сильного звука (100–120 дБ) развивается типичный эпилептиформный припадок [1]. Существует ряд линий грызунов (мышей, крыс и хомяков), у которых этот признак

закреплен селекцией и устойчиво проявляется у большей части животных. Линия Крушинского–Молодкиной (КМ) – первая из таких селектированных линий, в настоящее время она поддерживается в инбредном статусе. Эти крысы реагируют на сильный звук развернутым клонико-тоническим эпилептиформным припадком, который начинается через 2–4 с после включения звука и достигает максимальной интенсивности через 7–9 с. Эта линия – востребованная генетическая модель судорожных состояний. Ее используют и для оценки эффективности противосудорожных средств [2–4], и для анализа участия мозговых механизмов реализации данного патологического признака [5, 6]. Одним из факторов эффективной модуляции интенсивности АЭ оказалось предъявление животному сильного обонятельного стимула. В работе с крысами WAR (линия крыс с АЭ, выведенная в Бразилии) было четко показано, что кратковременное вдыхание запаха толуола (метил-бензол) вызывает достоверное снижение интенсивности и клонико-тонического припадка, и миоклонических судорог [7]. Миоклонические судороги имеют иную локализацию очага, нежели “стволовой” судорожный припадок. Они связаны с вовлечением в судорожное состояние структур лимбической системы и формируются в ходе серийных ежедневных экспозиций крыс действию звука [8]. Миоклонические судороги имеют сходное фенотипическое проявление у всех предрасположенных к АЭ линий крыс и, по существующим представлениям могут служить экспериментальной моделью височной эпилепсии человека, развитие которой представляет собой отдельную неврологическую проблему [9, 10]. Настоящее сообщение посвящено описанию небольшого по объему выборки животных эксперименту, в котором оценивалось влияние запаха толуола на интенсивность проявлений АЭ у крыс линии КМ. Важность проведения такого эксперимента была продиктована необходимостью установить более надежную ассоциацию эффекта вдыхания запаха толуола на АЭ у животных, которые, хотя так же, как и WAR, выведены из аутбредной линии Вистар, но имеют иную историю селекционного эксперимента и соответственно могут иметь свои особенности генетического фона. Иными словами, у крыс линий КМ и WAR генетический фон может несколько различаться, и возможное влияние этого фактора на подавление АЭ под влиянием толуола следовало исключить.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Работа была проведена на 14 крысах-самцах линии КМ (возраст 4 месяца, 43-е поколение инбридинга). Эпилептиформный судорожный припадок грызунов в ответ на предъявление сильного звука (аудиторный звонок, 120 дБ) имеет четкий “рисунки”. Начало приступа (у крыс КМ – через 2–3 с после включения звука) – это так называемый “клонический” бег, быстрый бег с прыжками, в проявлении которого, как было показано [1], присутствуют элементы судорожной реакции и интенсивной реакции избегания неприятного для животного стимула. По классификации, принятой для крыс КМ, этой стадии соответствует условный балл “1”. Следующая фаза – это клонические судороги в позе на животе (через 4–6 с), когда обнаруживаются ритмические судорожные сокращения мышц туловища и конечностей (условный балл “2”). Фаза клонических судорог через 5–7 с после включения звука переходит в следующую – фазу тонических судорог “субмаксимальной” интенсивности. В этой фазе в позе на боку у животного развиваются тонические судороги мышц туловища и задних конечностей (условный балл “3”). Максимальная интенсивность судорог (условный балл “4”) – это тонические судороги мышц туловища, передних и задних конечностей, которая у крыс КМ развивается через 7–9 с после включения звука. Аудиогенные миоклонические судороги можно наблюдать как результат ежедневной (в течение 1–18 дней) экспозиции животных действию звука.

Проведение экспериментов с животными находится в соответствии с требованиями Декларации ЕС 2010.

Предъявление запаха. Толуол, нанесенный на кусок мягкой ткани внутри пластикового конуса, поднесенного к носу крысы, давали вдыхать в течение 15 с. После этого (через 20 с) крысу помещали в камеру для предъявления звука. Все животные (после прекращения воздействия толуола) не обнаруживали признаков падения мышечного тонуса и/или изменения общего физического состояния.

Предъявление звука. Использовали приглушающую звук камеру с двойными стенками, выполненную из твердого оргстекла (Фирма OpenScience). На ее потолке прикреплен звонок. Его включение вызывает сначала двигательное возбуждение крысы (клонический бег), которое переходит в клонические, а затем тонические судороги. Время развития фаз судорожного припадка АЭ регистрировали вручную. Интенсивность припадка оценивали по шкале условных баллов (см. выше) [4]. После развития тонических судорог звук выключали. По окончании тонической фазы припадка в экспериментах с ежедневной экспозицией действию звука можно было наблюдать наличие (или отсутствие) судорог иного типа – так называемых миоклонических судорог, т.е. ритмических подергиваний групп мышц животного. Максимальная интенсивность этих судорог – подергивание всей мускулатуры тела. Отмечали также наличие (или отсутствие) постиктальной катаlepsии – по удержанию крысой искусственно приданной ей вертикальной позы [11]. Показатели АЭ после действия толуола сравнивали с таковыми, полученными на тех же животных ранее, после успешного формирования у них миоклонических судорог, т.е. в “фоне”.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия Вилкоксона для парных сравнений с помощью программы Statistica 6. Достоверность различий долей оценивали с помощью метода ϕ по Фишеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стадия “клонического бега” (условный балл “1”) у крыс данной выборки в “фоне” составляла 4.4 ± 3.9 с, тогда как после 15 с вдыхания паров толуола – 20 ± 4 с (различия достоверны по парному критерию Вилкоксона, $p < 0.001$). Стадия тонических судорог в “фоне” развивалась в среднем через 16 ± 4 с после включения звука, тогда как после обонятельной стимуляции тонические судороги (не затрагивавшие задние конечности, балл “3”) выявились только у 1 крысы (через 45 с после включения звука), у остальных животных тонические судороги отсутствовали (различия долей достоверно, $p < 0.001$).

Миоклонические судороги, для появления которых требовалась длительная (в течение 15–18 дней ежедневная экспозиция действию звука) в “фоне” наблюдались у всех 14 крыс. У 12 животных они имели максимальную интенсивность, тогда как у 2 крыс они затрагивали только мышцы морды и передних конечностей. После действия толуола ни у одной крысы миоклонических судорог не наблюдалось (различия долей достоверно, $p < 0.001$) (рис. 1).

Постиктальная катаlepsия (специфическое состояние мышечного тонуса, “восковая гибкость”), ассоциированная у крыс КМ с эпилептиформным припадком [11], наблюдалась в фоне у 11 из 14 крыс, тогда как после действия толуола – у 8 животных (различия долей недостоверны).

Таким образом, кратковременное вдыхание паров толуола вызвало у крыс линии КМ четкое снижение интенсивности эпилептиформных судорог (как тонических, так и миоклонических). Этот эффект выявился в виде резкого снижения количества животных, обнаруживающих судороги двух типов, характерных для АЭ, в увеличении времени развития первой фазы эпилептиформного приступа АЭ, а также по снижению числа животных, у которых развивается постиктальная катаlepsия.

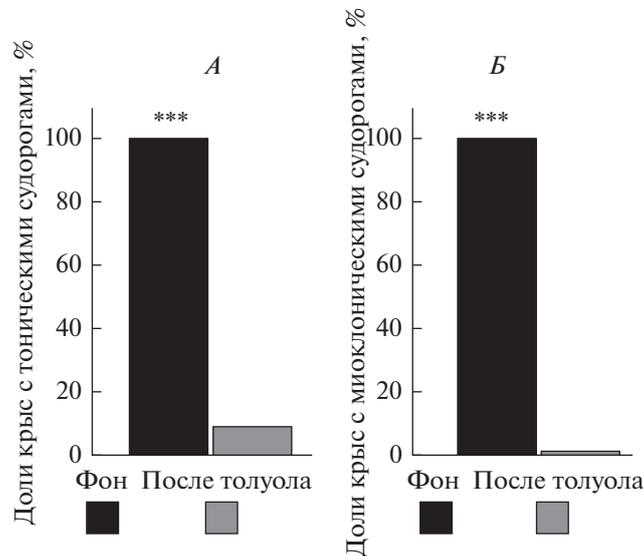


Рис. 1. Доли крыс с тоническими (А) и миоклоническими судорогами (Б) до применения толуола, и при действии звука через 20 с после вдыхания паров толуола. *** – достоверное различие долей (метод ф по Фигеру).

Эти данные являются подтверждением полученных на линии WAR данных о сходном противосудорожном эффекте толуола. Они показывают, что возможные различия в генетическом фоне двух линий, выведенных на разных континентах, не оказали влияния на исследуемый феномен, и что противосудорожный эффект данного соединения ассоциирован именно с АЭ как генетически детерминированном признаком.

Влияние интенсивной обонятельной стимуляции на снижение интенсивности судорог было показано не только для АЭ феноменов, но и для судорог, вызванных электрошоком, коразолом и электрической стимуляцией миндалины [12, 13]. Толуол вызывает реакцию ЦНС как при вдыхании его паров, так и при внутрибрюшинном введении. Существуют многочисленные свидетельства его модулирующего влияния (как потенцирующего, так и ингибиторного) на рецепторы ряда нейротрансмиттеров (ГАМК, глутамат, глицин, дофамин, серотонин, ацетилхолин [7]), что заставляет предположить его неспецифическое влияние на мембранные процессы. Конкретные механизмы этого влияния еще надлежит установить. Описаны токсические и про-судорожные эффекты толуола [15, 16]. В то же время в клинике эпилепсии человека существуют свидетельства позитивного, снижающего симптомы заболевания действия “аромотерапии” (главным образом, с использованием запаха растительных масел), в особенности, при случаях височной эпилепсии [17–19]. Имеются данные о противосудорожном действии такой обонятельной стимуляции на симптомы как височной эпилепсии, так и генерализованных судорожных припадков [7, 20–22]. Описаны также случаи появления предвестников припадков (ауры) в виде ощущения запаха (как правило, неприятного) [23, 24]. Следует отметить, что существует и более общая проблема – влияние сенсорной стимуляции (в частности, поступающей от тройничного нерва) в модуляции судорожной готовности [25, 26]. Таким образом, как накопленный опыт экспериментального исследования эпилептогенеза, так и клинические данные свидетельствуют о важной роли обонятель-

ной системы – структур обонятельной коры и лимбической системы в формировании предрасположенности мозговой ткани к генерации судорог [7]. Очевидно также, что выявленный эффект вдыхания паров толуола – это удачный методический подход в поиске новых средств терапии судорожных состояний человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом физиологические основы противосудорожного эффекта обонятельной стимуляции, подобного тому, который был получен и в эксперименте бразильских исследователей [7], и в наших, описанных выше опытах сегодня не имеют однозначного объяснения. Описанные эффекты важны как указание на потенциальную возможность использования обонятельной стимуляции в качестве средства, модулирующего судороги при эпилепсии человека. Несомненно также, что эффект подавления эпилептиформных “аудиогенных” судорог при подобном воздействии указывают на ценность данной модели в исследовании механизмов эпилептогенеза.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФФИ грант № 18-015-00173 и Госпрограммой N AAA-A16.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B.* The Krushinsky–Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. Review Article. *Epilepsy Behav.* 71(Part B): 130–141. 2017.
2. *Medvedev A.E., Rajgorodskaya D.I., Gorkin V.Z., Fedotova I.B., Semiokhina A.F.* The role of lipid peroxidation in the possible involvement of membrane-bound monoamine oxidases in gamma-aminobutyric acid and glucosamine deamination in rat brain. Focus on chemical pathogenesis of experimental audiogenic epilepsy. *Mol. Chem. Neuropathol.* 16(1–2): 187–201. 1992.
3. *Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* Крысы линии Крушинского–Молодкиной: исследование аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. *Журн. высш. нерв. деят.* 56(3): 298–316. 2006. [*Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I.* Rats of Krushinsky–Molodkina strain: investigation of audiogenic epilepsy, vascular pathology and behavior. *Zh. vysh. nerv. deiat. im I.P. Pavlova.* 56(3): 298–316. 2006. (In Russ.)].
4. *Федотова И.Б., Семиохина А.Ф., Косачева Е.С., Башкатова В.П., Раевский К.С.* Влияние ламотриджила и карбамазепина на развитие аудиогенной судорожной реакции у крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Эксп. клин. фарм.* 59(6): 6–9. 1996. [*Fedotova I.B., Semiokhina A.F., Kosacheva E.S., Bashkatova V.G., Raevsky K.S.* The effects of lamotridigile and carbamazepine on the development of audiogenic seizure reaction in rats of Krushinsky–Molodkina strain. *Eksp. Clin. Pharm.* 59(6): 6–9. 1996. (In Russ.)].
5. *Фирстова Ю.Ю., Абаймов Д.А., Сурина Н.М., Полетаева И.И., Федотова И.Б., Ковалев Г.И.* Связывание специфических лигандов D2- и NMDA-рецепторами клеток стриатума крыс двух линий, контрастных по предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 154(8): 158–161. 2012. [*Firstova Yu. Yu., Abaimov D.A., Surina N.M., Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Kovalev G.I.* The binding of specific ligands by D2 and NMDA receptors by striatal cells in rats of two strains, contrasting by audiogenic epilepsy predisposition. *Bull. Exper. Biol. Med.* 154(8): 158–161. 2012. (In Russ.)].
6. *Полетаева И.И.* Аудиогенная эпилепсия грызунов. *Природа.* (9): 40–47. 2017. [*Poletaeva I.I.* Rodent audiogenic epilepsy. *Nature.* (9): 40–47. 2017. (In Russ.)].
7. *Delfino-Pereira P., Bertti-Dutra P., Umeoka E.H.L., Cortes de Oliveira J.A., Santos V.R., Fernandes A., Marroni S.S., Vecchio F., Garcia-Cairasco N.* Intense olfactory stimulation blocks seizures in an experimental model of epilepsy. *Epilepsy Behav.* 79: 213–224. 2018.
8. *Ross K.C., Coleman J.R.* Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24(6): 639–53. 2000.
9. *Савина Т.А., Левин С.Г., Полетаева И.И., Федотова И.Б., Шчапкина Т.Г.* Аудиогенный киндлинг изменяет субъединичный состав bk-каналов в зубчатой фасции крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Биол. мембр.* 30(5–6): 462–466. 2013. [*Savina T.A., Levin S.G., Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Shchipakina T.G.* Audiogenic kindling changes the sub-unit range of bk-channels in dentate fascia of Krushinsky–Molodkina strain rats. *Biol. Membr.* 30(5–6): 462–466. 2013. (In Russ.)].

10. Nirwan N., Vyas P., Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev. Neurosci.* 29(7): 757–770. 2018. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0086>
11. Федотова И.Б., Сурина Н.М., Маликова Л.А., Раевский К.С., Полетаева И.И. Исследование каталептического состояния мышечного тонуса у крыс после аудиогенных судорог. *Журн. высш. нерв. деят.* 58 (5): 620–627. 2008. [Fedotova I.B., Surina N.M., Malikova L.A., Raevsky K.S., Poletaeva I.I. The study of cataleptic state of muscle tone in rats after audiogenic seizures. *Zh. Vysch. Nerv. Deiat. im I.P. Pavlova.* 58(5): 620–627. 2008. (In Russ.)].
12. Ebert U., Löscher W. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. *Neurosci. Lett.* 287(3): 199–202. 2000.
13. Wood R.W., Coleman J.B., Schuler R., Cox C. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene. *J. Pharm. Exp. Therap.* 230 (2): 407–412. 1984.
14. Riegel A.C., French E.D. An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute toluene exposure. *Pharmacol. Toxicol.* 85: 37–43. 1999.
15. Jacquot L., Pourie G., Buron G., Monnin J., Brand G. Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicol. Lett.* 165: 57–65. 2006.
16. Takahashi T. Seizures induced by odorous stimuli. *Clin. EEG.* 17: 769. 1975.
17. Spinella M. Herbal medicines and epilepsy: the potential for benefit and adverse effects. *Epilepsy Behav.* 2: 524–532. 2001.
18. Betts T. Use of aromatherapy (with or without hypnosis) in the treatment of intractable epilepsy – a two-year follow-up study. *Seizure.* 12: 534–538. 2003.
19. Jaseja H. Scientific basis behind traditional practice of application of “shoe-smell” in controlling epileptic seizures in the eastern countries. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 110: 535–538. 2008.
20. Silva-Filho A.R., Pires M.L., Shiotsuki N. Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 79–82. 1992.
21. Páez-Martínez N., Cruz S.L., López-Rubalcava C. Comparative study of the effects of toluene, benzene, 1,1,1-trichloroethane, diethyl ether, and flurothyl on anxiety and nociception in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193: 9–16. 2003.
22. Lunardi M.S., Lin K., Mameniškienė R., Beniczky S., Bogacz A., Braga P., Mirian S.B., Guaranha M.H.B., Yacubian E.M.T., Samaitienė R., Baykan B., Hummel T., Wolf P. Olfactory stimulation induces delayed responses in epilepsy. *Epilepsy Behav.* 61: 90–96. 2016.
23. Acharya V., Acharya J., Lüders H. Olfactory epileptic auras. *Neurology.* 51: 56–61. 1998.
24. Chen C., Shih Y.-H., Yen D.-J., Lirng J.-F., Guo Y.-C., Yu H.-Y. Olfactory auras in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 44: 257–60. 2003.
25. Fanselow E.E., Reid A.P., Nicoletis M.A. Reduction of pentylenetetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J. Neurosci.* 20: 8160–8168. 2000.
26. DeGiorgio C.M., Shewmon D.A., Whitehurst T. Trigeminal nerve stimulation for epilepsy. *Neurology.* 61: 421–422. 2003.

The Effects of Toluene Vapor Inhalation on the Intensity of Audiogenic Seizure Fits in Rats of Krushinsky–Molodkina Strain

I. I. Poletaeva^{a, *}, N. M. Surina^a, I. B. Fedotova^a

^aBiology department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Abstract—The significant proportion of human epilepsy is resistant to anticonvulsant drug therapy, which makes actual the problem of search for new alternative antiepileptic therapies. The goal of this work was the analysis of the effects created by the inhalation of toluene vapor (the strong odorant) on epileptic seizures in rats of Krushinsky–Molodkina strain, which is highly prone to audiogenic epilepsy (AE), the tonic convulsions of the musculature as well as audiogenic myoclonic seizures which develop as the result of serial daily sound exposure. **Methods.** Rats ($n = 14$) were exposed to 15-s inhalation of toluene vapor with the subsequent (in 20 s) testing of their audiogenic seizure intensity. **Results.** The toluene action induced a significant reduction in tonic and myoclonic seizure intensity in comparison to the background data of AE sensitivity obtained 1 week prior to the toluene test. In 13 of 14 animals, the seizures ended as the clonic seizures (no tonic seizures developed), while all animals developed tonic seizures in the “background” experiment. All rats developed myoclonic seizures (audiogenic kindling) prior

to toluene action while no myoclonic seizures were noted after toluene inhalation in all animals. Conclusion. The results obtained complement the previously published data using WAR strain of rats on the relationship between epilepsy and olfactory system. The anticonvulsive effects of toluene vapor inhalation on the expression of AE signs demonstrate both the importance of genetic models usage in such investigations and the importance of olfactory stimulation as the potential anti-convulsant agent.

Keywords: audiogenic epilepsy, audiogenic kindling, genetic model, olfaction, toluene, Krushinsky–Molodkina rat

ЦИТИРОВАТЬ:

Полетаева И.И., Сурина Н.М., Федотова И.Б. Влияние вдыхания паров толуола на интенсивность аудиогенного судорожного припадка у крыс линии Крушинского-Молодкиной. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(6): 742–748.

DOI: 10.1134/S0869813919060050

TO CITE THIS ARTICLE:

Poletaeva I.I., Surina N.M., Fedotova I.B. The effects of toluene vapor inhalation on the intensity of audiogenic seizure fits in rats of Krushinsky-Molodkina strain. Russian Journal of Physiology. 105(6): 742–748.

DOI: 10.1134/S0869813919060050