

ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКИ ЩУРІВ З ХРОНІЧНОЮ ФОРМОЮ ЕПІЛЕПТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЕВЕТИРАЦЕТАМУ

©Т. М. Муратова

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

РЕЗЮМЕ. Коразол-індукований (30,0 мг/кг, в/очер щодобово потягом трьох тижнів) кіндлінг характеризувався редукцією рухової активності у відкритому полі, збільшенням числа заходів та проведеного часу у затемненій частині припіднятого лабіринту а також подовженням тривалості депресії у тесті Порсолта. Леветирацетам (ЛВР, 80,0 мг/кг, в/очер) викликав збільшення числа пересічених центральних квадратів в 3,2 раза, порівняно з вихідним значенням показника у кіндлінгових щурів, відновлював число підйомів на задні кінцівки, а також число дефекацій ($P < 0,05$). ЛВР також збільшував час, який проводили щури у відкритій частині лабіринту в 2,1 раза та зменшував число заходів у темні частини лабіринту на 24,8 %, порівняно з вихідними значеннями показників ($P < 0,05$). Крім того, час депресії у тесті Порсолта у кіндлінгових щурів скорочувався на 27,9 % ($P < 0,05$).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: леветирацетам, коразоловий кіндлінг, тривога, депресія.

Вступ. Леветирацетам (ЛВР) є протисудомною сполукою (препаратом), молекула якого за своєю структурою не нагадує жоден із антиепілептичних препаратів [1]. До сьогодні не є остаточно встановленими механізми здійснення антиепілептичного впливу ЛВР. Так, одним із можливих механізмів може бути здатність препарату зв'язуватись з синаптичним везикулярним протеїном 2A (SV2A), що має своїм наслідком непряме гальмування пресинаптичного вивільнення нейромедіаторів [2]. ЛВР вивільняє іони кальцію з внутрішньоклітинних депо, що підвищує внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+} [3]. Також ЛВР здатен гальмувати кальцієві канали N-типу, що також змінює внутрішньоклітинний вміст іонізованого кальцію [4]. Крім того, для дії препарату характерним є антагоністичний вплив щодо негативної алостеричної модуляції іонами цинку та Я-карболінів ГАМК та гліцинових викликаних трансмембранних струмів [5].

Важливою особливістю ЛВР є як широкий спектр здійснення антиепілептичних впливів, так і відсутність впливів на когнітивну активність пацієнтів [1], що складають значні переваги препарату перед відомими антиепілептичними засобами. Важливим аспектом дії ЛВР є його коригуючий вплив на порушення поведінки, які спостерігаються в міжпадовий період [6]. До останнього часу не проводилось досліджень особливостей кіндлінг-провокованих поведінкових порушень за умов використання ЛВР, які є еквівалентами відповідних клінічних синдромів, притаманних розвитку епілепсії [7].

Тому метою даного дослідження було вивчення особливостей поведінки кіндлінгових щурів – в тесті відкритого поля, а також в тестах припіднятого хрестоподібного лабіринту та плавальному тесті Порсолта за умов застосування ЛВР.

Матеріал і методи дослідження. Досліди проведено за умов гострого експерименту на

щурах лінії Вістар масою тіла від 180 до 270 г, яких утримували за звичайних умов доступу до їжі та пиття при 12 годинній зміні циклу освітлення та темряви. Дослідження проводили у відповідності до вимог GLP та комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 84 від 10 жовтня 2008 р.). Результати досліджень були схвалені комісією ОНМедУ з питань етичного проведення експериментальних досліджень.

Кіндлінг у щурів викликали шляхом щодобового застосування коразолу в підпороговій дозі (30,0 мг/кг, в/очер.). Всього здійснювали 21 введення епілептогену [7]. Тестування поведінкових реакцій проводили в 9.00–12.00 год, через 24 год з моменту останнього використання коразолу. Спостерігали тільки тих щурів, у яких останні три введення коразолу супроводжувались виникненням генералізованих клонікотонічних судомних нападів.

Дослідження поведінки щурів у відкритому полі проводили впродовж 3 хв [8, 9]. Визначали загальне число пересічених квадратів, число пересічених центральних квадратів, число вертикальних стійок із опорою та без опори на стінку камери для спостереження, число зазирань у отвори підлоги, число епізодів грумінгу, уринацій та дефекацій.

В тесті припіднятий хрестоподібний лабіринт (ПХЛ) проводили оцінку впливів анкісолітичних препаратів. Щурів розміщували в центрі приладу, який складався з чотирьох рукавів, які під прямим кутом хрестоподібно розходились у напрямку від центрального майданчика: два протилежних один до одного були відкритими та два – закритими, затемненими. Висота над підлогою складала 1 м. Експерименти проводили за умов звичайного освітлення впродовж 5 хв. Визначали час, який тварини проводили у відкритих та закритих рукавах, число заходів щурів до відкритих та закритих рукавів [8, 10].

Депресивноподібну поведінку вивчали в тесті Порсолта. Експериментальних тварин розміщували в скляному циліндрі (23/50 см), який на дві третини був заповнений водою температурою 25 °С на 15 хв, після чого діставали з води та обсушували протягом години. Через 24 г щура повторно опускали в циліндр з водою. Депресивноподібний стан оцінювали за тривалістю іммобілізації протягом 5 хв повторного спостереження. Під іммобілізацією розуміли повну відсутність плавальних рухів та пасивне утримання тварини на поверхні води [11].

ЛВР (УСВ, Бельгія) вводили внутрішньоочеревинно в дозах 20,0 та 80,0 мг/кг за 30 хв до спостереження. Щурам групи контролю за тих же умов застосовували розчин «Твін-80».

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням методу one-way ANOVA та критерію Newman-Keuls.

Результати й обговорення. Повторні введення коразолу у підпороговій дозі супроводжувались виникненням судомних проявів – посмикування окремих груп м'язів та клонічних м'язових скорочень, що спостерігалось після 3–5 інекцій коразолу. Вже після 7–15 застосувань коразолу у щурів спостерігали генералізовані судомні напади з падінням на бік та післясудомною депресією і після 19 застосування епілептогену подібні реакції реєструвались у всіх експериментальних тварин. Таким чином, поведінкові розлади спостерігали у тварин, які у відповідь на останні три інекції епілептогену демонстрували виникнення генералізованих тоніко-клонічних нападів.

Спостереження за поведінкою щурів у тесті відкритого поля показало, що загальне число пересічених квадратів кіндлінговими щурами було на 32,5 % меншим, порівняно з таким у щурів групи контролю ($P < 0,05$), тоді як число пересічених центральних квадратів було меншим в 3,9 раза (рис. 1, I і II). За умов застосування ЛВР в дозі 80,0 мг/кг, в/очер. загальне число пересічених квадратів та число пересічених центральних квадратів не відрізнялись від таких в групі інтактних щурів (група контролю) і перевищувало вихідне значення показника в групі на 25,3 % та в 3,2 раза ($P < 0,05$).

Число вертикальних стійок у кіндлінгових щурів було меншим, порівняно з показником у інтактних щурів – стійок з опорою в 2,3 раза та без опори в 6,1 раза ($P < 0,05$) (рис. 1, III IV). Застосування ЛВР в дозі 80,0 мг/кг в/очер. супроводжувалось зростанням досліджуваних показників, порівняно з вихідними, відповідно в 1,9 та в 4,3 раза ($P < 0,05$). При цьому досліджувані показники не відрізнялись від таких, які реєструвались у щурів групи контролю ($P > 0,05$). Слід зазначити, що ЛВР в дозі 20,0 мг/кг, в/очер викликав достовірне, порівняно з вихідним рівнем, збільшення числа пересічених центральних квадратів – в 2,7 раза ($P < 0,05$) (рис. 1, IV).

Кіндлінгові щури демонстрували збільшене число уринацій та дефекацій, які перевищували відповідні показники в групі контролю відповідно в 1,9 та в 2,0 рази ($p < 0,05$) (рис. 1, VII, VIII). На тлі застосування ЛВР (80,0 мг/кг, в/очер.) досліджувані показники не відрізнялись від таких, які було зареєстровано у інтактних щурів групи контролю і за цих умов число дефекацій достовірно (на 45,2 %) зменшувалось, порівняно з вихідним значенням показника в групі кіндлінгових щурів ($P < 0,05$) (рис. 1, VIII).

Кіндлінгові щури знаходились у відкритій частині лабіринту протягом проміжка часу, який був у 2,5 раза меншим від такого у щурів групи контролю ($P < 0,05$) (рис. 2, А). При цьому також достовірно, порівняно з групою контролю, зростав період перебування щурів у затемненій частині лабіринту (на 22,7 %, $P < 0,05$). У групі інтактних щурів, яким застосовували ЛВР (20,0 мг/кг, в/очер.) спостерігалось зменшення (на 7,7 %) часу перебування експериментальних тварин у відкритій частині лабіринту. В групі кіндлінгових щурів цей показник був вищим, порівняно з його вихідним значенням, в 1,65 раза ($P > 0,05$) і залишався меншим від такого в групі інтактних щурів, яким застосовували ЛВР (20,0 мг/кг) на 29,3 % ($p < 0,05$) (рис. 2, А). На тлі застосування ЛВР в дозі 80,0 мг/кг, в/очер. тривалість перебування кіндлінгових щурів у відкритій частині лабіринту збільшувалась, порівняно з вихідним значенням показника, в 2,1 раза і при цьому не відрізнялась від такої в групі контролю (інтактні щури) ($p > 0,05$) (рис. 2, А). Число заходів кіндлінгових щурів у закриті рукави лабіринту перевищувало відповідний показник в групі контролю в 1,8 раза ($P < 0,05$) (рис. 2, Б). Цей показник залишався більш високим на тлі застосування ЛВР кіндлінговим щурам в дозі 20,0 мг/кг, в/очер та перевищував відповідний показник в групі інтактних щурів із застосуванням ЛВР в аналогічній дозі в 1,4 раза ($P < 0,05$). Застосування ЛВР у дозі 80,0 мг/кг, в/очер. супроводжувалось зменшенням числа заходів щурів у закриті рукави лабіринту, порівняно з відповідним показником у вихідному фоні, на 24,8 % ($P < 0,05$) і при цьому досліджуваний показник не відрізнявся від такого, який реєструвався в групі контролю ($P > 0,05$) (рис. 2, Б).

В тесті Порсолта період депресії щурів групи контролю був меншим порівняно з тим, що спостерігався у кіндлінгових щурів, на 36,7 % ($P < 0,05$) (рис. 3). За умов застосування ЛВР в дозах 20,0 та 80,0 мг/кг, в/очер. досліджуваний показник залишався більш високим, ніж в групі контролю – на 38,6 % ($P < 0,05$) та на 10,6 % ($P > 0,05$) відповідно. Причому введення ЛВР в більш високій дозі зменшувало тривалість періоду депресії, порівняно з такою у вихідному фоні, на 27,9 % ($P < 0,05$) (рис. 3).

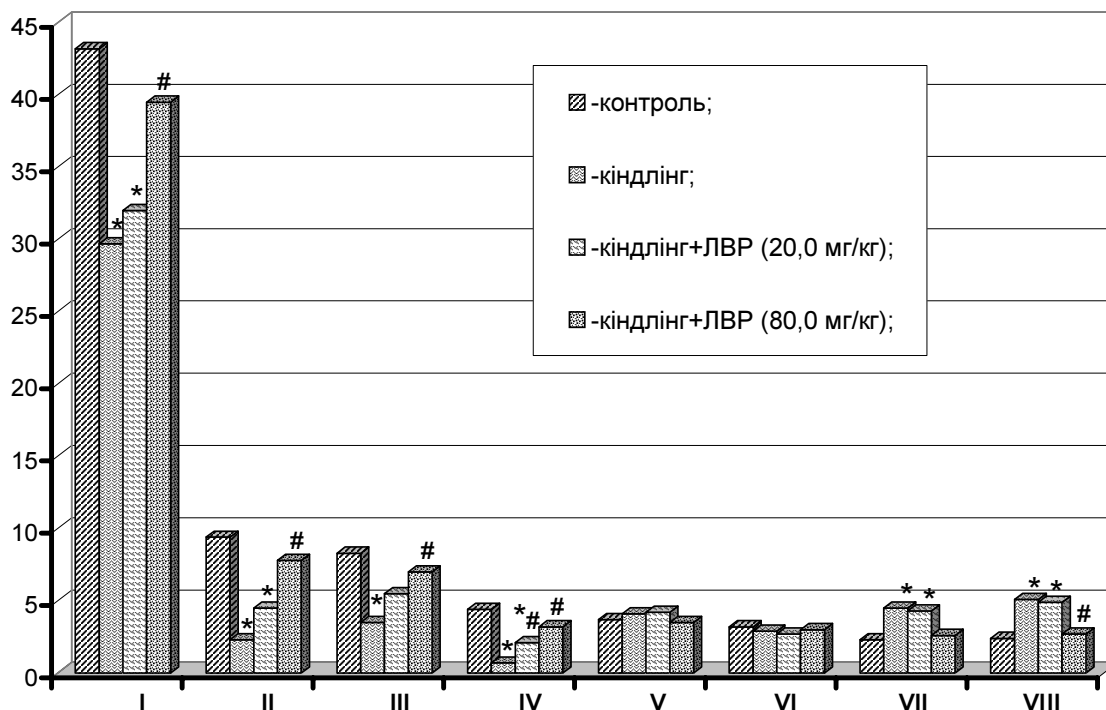


Рис. 1. Показники поведінки інтактних та кіндлінгових щурів в тесті «відкрите поле».

П о з н а ч к и: по осі абсцис – I – число пересічених квадратів; II – число пересічених центральних квадратів; III – вертикальні стійки з опорою; IV – вертикальні стійки без опори; V – зазирання у отвори підлоги; VI – грумінг; VII – число уринацій; VIII – число болюсів. По осі ординат – абсолютні значення досліджуваних показників.

* – $P < 0,05$ – порівняно до показників в групі контролю; # – $P < 0,05$ – порівняно до вихідного значення показників в групі кіндлінгових щурів (ANOVA+ Newman – Keuls тест).

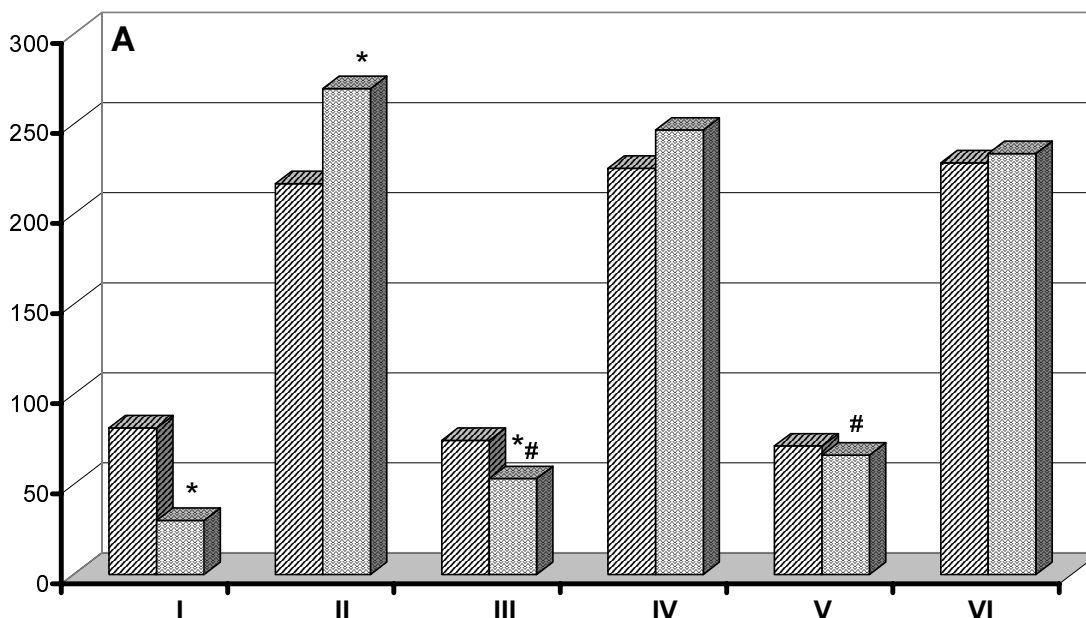


Рис. 2. Вплив ЛВР на поведінку інтактних і кіндлінгових щурів у припіднятому хрестоподібному лабіринті.

П о з н а ч к и: фрагмент А – тривалість перебування у відкритій (I, III, V) та закритій (II, IV, VI) частинах лабіринту. По осі ординат – секунди.

На обох фрагментах – III і IV – ефекти ЛВР в дозі 20,0 мг/кг та V, VI – 80,0 мг/кг, в/очер.

* – $P < 0,05$ – порівняно з показниками в групі контролю; # – $P < 0,05$ – порівняно з вихідним значенням показників в групі кіндлінгових щурів (ANOVA+ Newman – Keuls тест).

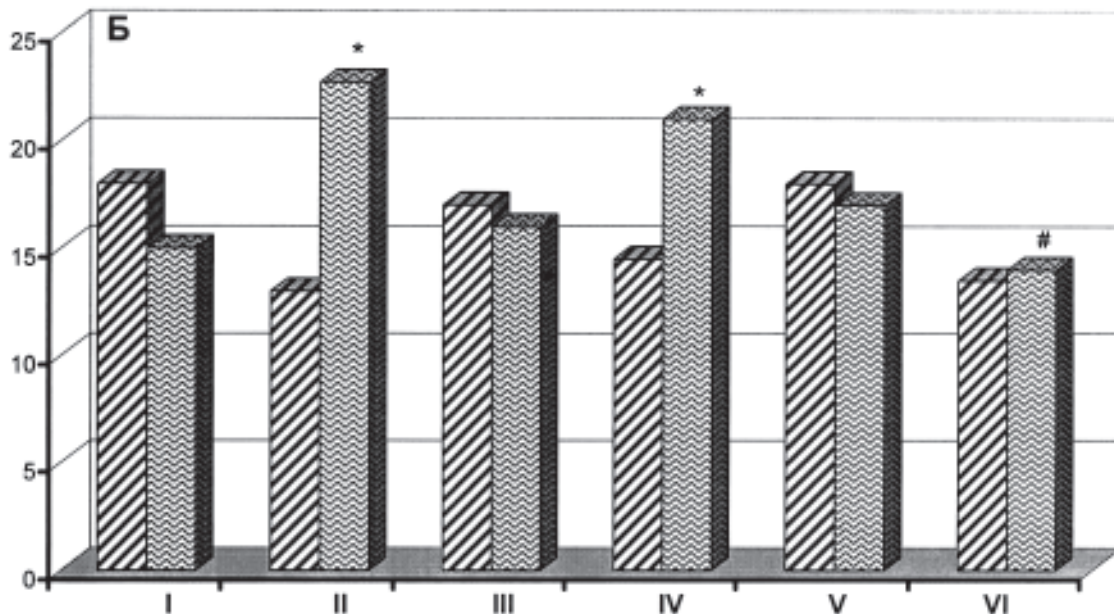


Рис. 2 (продовження). Вплив ЛВР на поведінку інтактних і кіндлінгових щурів у припіднятому хрестоподібному лабіринті.

П о з н а ч к и: фрагмент Б – число заходів у закриті (I, III, V) та відкриті (II, IV, VI) рукави лабіринту. По осі ординат – досліджуваний показник.

На обох фрагментах – III і IV – ефекти ЛВР в дозі 20,0 мг/кг та V,VI–80,0 мг/кг, в/очер.

* – $P < 0,05$ – порівняно з показниками в групі контролю; # – $P < 0,05$ – порівняно з вихідним значенням показників в групі кіндлінгових щурів (ANOVA+ Newman – Keuls тест).

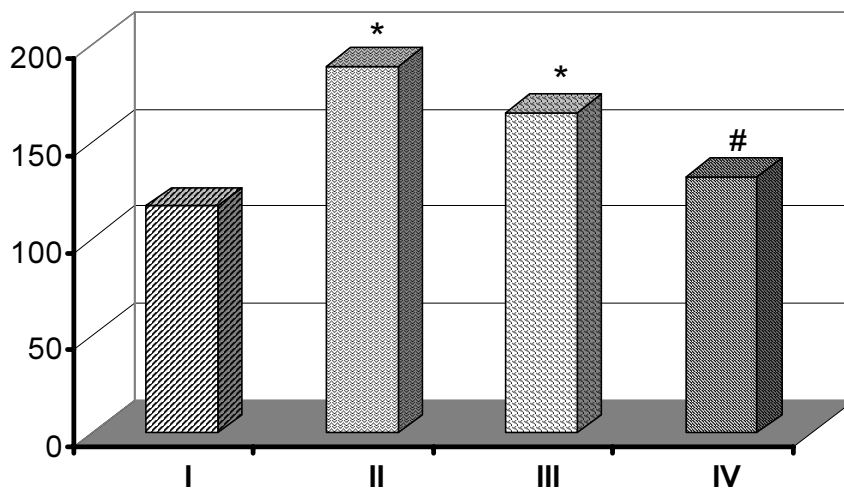


Рис. 3. Показники депресивної поведінки щурів в тесті Порсолта.

П о з н а ч к и: по осі абсцис – I – інтактні і II – кіндлінгові щури; III – введення кіндлінговим щурам ЛВР в дозі 20,0 мг/кг та IV – 80,0 мг/кг, в/очер. По осі ординат – секунди.

* – $P < 0,05$ – порівняно з показниками в групі контролю; # – $P < 0,05$ – порівняно з вихідним значенням показників в групі кіндлінгових щурів (ANOVA+ Newman – Keuls тест).

Таким чином, отримані результати засвідчили, що у щурів з хімічним кіндлінговим синдромом, який було викликано застосуванням коразолу, в міжнападковому періоді формуються порушення поведінки, які можливо характеризувати як тривожно-депресивні розлади. Так, за умов відтво-

рення коразолового кіндлінгу у щурів спостерігалось зменшення часу перебування у відкритих рукавах лабіринту в 2,5 раза та зменшення числа заходів щурів до цих рукавів, порівняно з відповідними показниками в групі контролю. Також у щурів реєструвалось збільшення тривалості де-

пресивного періоду в тесті плавання Порсолта, підвищення числа уринацій та дефекацій, зменшення числа заходів в центральні квадрати відкритого поля, що є свідченнями депресивного та тривожного компонентів в патогенезі кіндлінгового синдрому [8–11].

Слід зазначити, що формування кіндлінг-синдрому є залежним від вихідних показників експериментальних тварин щодо проявів тривожності та депресивної поведінки [10, 12]. Так, щури з високим вихідним рівнем тривожності здатні демонструвати високу швидкість формування кіндлінгу [10, 12]. Також більшу швидкість розвитку проявів кіндлінгового синдрому спостерігають у щурів, які мають більш виразну вихідну депресію, яка визначалась в тесті Порсолта [11].

Підвищення тривожності у щурів з експериментальним кіндлінгом, яка була визначена в нашому дослідженні, відповідає результатам досліджень [13], які свідчать про те, що пентилентетразоловий кіндлінг у щурів лінії Вістар характеризується зниженням числа пересічених квадратів в тесті «відкрите поле», зниженням числа вертикальних стійок, а також збільшенням числа дефекацій. Разом з тим, електростимуляційний амігдалярний кіндлінг залежно від вихідного рівня тривожності, міг супроводжуватись як анксиогенними так і анксиолітичними ефектами [12].

Зазначені відмінності коразолового та електроподразнювального кіндлінгу можуть пояснюватись взаємодією коразолу з бензодіазепіновими ре-

цепторами, забезпечуючи зниження їх активності в процесі формування кіндлінгу [14]. При цьому визначене в дійсному дослідженні збільшення часу перебування щурів у відкритих рукавах лабіринту слід розглядати в якості анксиолітичних впливів ЛВР. Також анксиолітичними є впливи ЛВР у відношенні до показників тривожності кіндлінгових щурів, які визначались в тесті відкритого поля.

Під впливом ЛВР також спостерігалось усунення депресії, яка визначалась у кіндлінгових щурів в тесті Порсолта, а також збільшувалась рухова активність експериментальних тварин в тесті відкритого поля. Можливо, що в основі ефективності ЛВР у відношенні до проявів тривожно-депресивних розладів у щурів із хронічною епілептичною активністю знаходиться зміна функціонального стану бензодіазепін-ГАМК-іоноформного рецепторного комплексу в напрямку збільшення афінності до лігандів бензодіазепінових рецепторів [10, 14].

Висновки. 1. У щурів з коразол-провокованим кіндлінгом в міжнападковому періоді спостерігається підвищення тривожності та депресивних поведінкових проявів.

2. Застосування леветирацетаму (100 мг/кг, в/очер.) усуває кіндлінг-провоковані тривожно-депресивні поведінкові прояви.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дозволяють розробити методи комбінованого лікування тривоги та депресії у хворих на епілепсію із використанням в лікувальному комплексі леветирацетаму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Cumbo E. Levetiracetam, lamotrigine, and phenobarbital in patients with epilepsy and Alzheimer's disease / E. Cumbo, L. D. Ligorì // *Epilepsy Behav.* – 2010. – Vol. 17. – P. 461–466.
2. The synaptic vesicle glycoprotein 2A ligand levetiracetam inhibits presynaptic Ca²⁺ channels through an intracellular pathway / C. Vogl, S. Mochida, C. Wolff [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 82. – P. 199–208.
3. Nagarkatti N. Levetiracetam inhibits both ryanodine and IP₃ receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture / N. Nagarkatti, L. S. Deshpande, R. J. DeLorenzo // *Neurosci. Lett.* – 2008. – Vol. 436. – P. 289–293.
4. Lukyanetz E. A. Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam / E. A. Lukyanetz, V. M. Shkryl, P. G. Kostyuk // *Epilepsia.* – 2002. – Vol. 43. – P. 9–18.
5. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents / J. M. Rigo, G. Hans, L. Nquyen [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 136 – P. 659–672.
6. Effect of levetiracetam on depression and anxiety in adult epileptic patients / M. Mazza, A. Martini, M. Scoppetta, S. Mazza // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2008. – Vol. 32, № 2. – P. 539–543.
7. Моделирование и механизмы подавления экспериментального эпилептического синдрома / Л. С. Годлевский, Е. В. Кобелев, В. Ф. Мустяца, Г. А. Дроздова. – Одесса : КП ОГТ, 2010. – 350 с.
8. Лапин И. П. Модели тревоги на мышах: оценка в эксперимента и критика методики / И. П. Лапин // *Эксп. и клин. фармакол.* – 2000. – № 3. – С. 58–62.
9. Маркель А. Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «открытое поле» / А. Л. Маркель // *Журн. высш. нервн. деят.* – 1981. – № 2. – С. 301–307.
10. Runke D. Assessment of anxiety-like behaviors in female rats bred for differences in kindling susceptibility and amygdala excitability / D. Runke, D. C. McIntyre // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1240. – P. 143–152.
11. Influence of carbamazepine on kindling grades in depressive and non-depressive rats / M. Barbakadze, I. Bilanishvili, M. Chkhetiani [et al.] // *Georgian Med. News.* – 2010. – Vol. 182. – P. 68–71.
12. Adamec R. Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling—role of baseline anxiety and anatomical location of the

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdale/ R. Adamec, T. Shallow, P. Burton // Behav. Brain Res. – 2005. – Vol. 159. – P. 73–88.

13. Effects of bee products on pentylenetetrazole-induced seizures in the rat/ N. Zarraga-Galindo, P. Vergara-Aragon, S. Rosales-Melendez [et al.] // Proc. West. Pharmacol. Soc. – 2011. – Vol. 54. – P. 33–40.

14. Свойства бензодиазепиновых рецепторов мозжечка крыс после острых судорог и развития коразолового kindlinga / А. С. Базян, Р. Н. Глебов, М. Н. Карпова [та ін.] // Журн. высш. нервн. деят. – 1998. – № 1. – С. 135–142.

PECULIARITIES OF RATS WITH CHRONIC FORM OF EPILEPTIC ACTIVITY BEHAVIOR UNDER CONDITIONS OF LEVETIRACETAM APPLICATION

©**T. M. Muratova**

Odesa National Medical University

SUMMARY. Corazol-induced kindling (30.0 mg/kg, i.p. daily during three weeks) was characterized by the reduction of behavior in open field, increasing visits and time spent in dark parts of elevated labyrinth and prolongation of depression in Porsolt test. Levetiracetam (LVR, 80.0 mg/kg, i.p.) caused the elevation of crossed central squares by 3.2 times pertained to their values registered after kindled state was fully developed, and restored rearings, number of boluses as well ($P<0.05$). Besides, LVR increased the time which kindled rats spent in open part of labyrinth by 2.1 times and reduced of the number of enterings into the dark parts of labyrinth by 24.8 % pertained to initial values ($P<0.05$). The time of depression determined in Porsolt test in kindled rats was shortened by 27.9 % as well ($P<0.05$).

KEY WORDS: levetiracetam, corazol kindling, anxiety, depression.

Отримано 15.05.2014