

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ЛЕВЕТИРАЦЕТАМ ИЗМЕНЯЕТ ХАРАКТЕР АУДИОГЕННОГО ДВИГАТЕЛЬНОГО ОТВЕТА КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР И ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ

Л. А. Маликова¹, И. Б. Федотова², Н. М. Сурина², И. И. Полетаева²,
К. С. Раевский¹

Показано, что новое противоэпилептическое средство леветирацетам в дозе 80 мг/кг оказывает выраженный противосудорожный эффект на все изученные параметры аудиогенного двигательного ответа крыс линии Вистар, что сопровождается появлением почти 50 % резистентных к звуку животных. На фоне леветирацетама у крыс этой линии снижается интенсивность судорог, удлинняется в 2 раза по сравнению с контролем латентный период, а также изменяется характер двигательного возбуждения в сторону увеличения количества “одноволновых” ответов. Защитное влияние антиконвульсанта на параметры генерализованного клонико-тонического приступа у крыс линии Крушинского-Молодкиной не приводит к появлению резистентных особей и сопровождается изменением “одноволновой” аудиогенной судорожной реакции на “двухволновую”, т.е. противоположно, чем у крыс Вистар.

Ключевые слова: леветирацетам, противосудорожный эффект, аудиогенные судороги, крысы линии Вистар, крысы линии Крушинского-Молодкиной

ВВЕДЕНИЕ

В последние два десятилетия достигнуты значительные успехи в фармакотерапии эпилепсии. Подчеркивая высокую эффективность появившихся в этот период противоэпилептических средств (ПЭС), 9 из них выделены в отдельную группу и рассматриваются как “новейшие” или “препараты нового поколения”. В клиниках России последним из них был внедрен и широко используется леветирацетам (ЛВТ, (α S)- α -этил-2-оксо-1-пирролидинацетамид). Это препарат с низкой токсичностью и значительной терапевтической широтой: максимальная исследованная доза 5000 мг/кг, введенная однократно *per os*, не вызывала гибели мышей и крыс [16], тогда как противосудорожный эффект был обнаружен в дозе 7 – 36 мг/кг на различных моделях kindlingа и аудиогенных судорог у мышей и крыс [12]. М. Noyer и соавт. [15] сообщили о возможном уникальном механизме действия этого препарата, проявлявшего способность в экспериментах *in vitro* связываться с специфическим белком SV2A, локализованным преимущественно на мембранах синаптических пузырьков. Картирование мест связывания выявило оригинальный профиль распределения ЛВТ в мозге крыс, не совпадающий с описанным для классических ПЭС [10]. Установлено, что существует корреляция

между сродством производных ЛВТ к белку SV2A и их способностью проявлять противосудорожный эффект на модели аудиогенной эпилепсии у мышей [8]. Доказано, что ЛВТ проявляет также нейропротекторное и антиэпилептогенное действие [13]. Преимущества и эффективность применения данного ПЭС в клинике рассмотрены в ряде обзоров [8, 13]. В эксперименте отчетливое защитное действие препарата обнаруживается только на моделях kindlingа и аудиогенной эпилепсии, но не проявляется, в отличие от большинства известных антиконвульсантов, при использовании скрининговых тестов максимального электрошока или однократного введения коразола и других конвульсантов [8, 9, 13]. Учитывая этот факт, мы в ранее проведенных исследованиях [4] изучали противосудорожные эффекты ЛВТ на крысах инбредной аудиогенной линии Крушинского-Молодкиной (КМ). Линия КМ была селекционирована на Биологическом факультете МГУ по предрасположенности к судорожным припадкам и “затяжному возбуждению” из крыс линии Вистар [6]. Возможно, поэтому при изучении крыс КМ в качестве “бессудорожного контроля” наиболее часто используются животные линии Вистар. Однако известно, что до 30 % крыс Вистар отвечают на звуковой стимул клонико-тоническими судорогами, и только менее чем у 20 % животных этой линии не обнаруживается аудиогенных двигательных реакций [3]. В наших экспериментах из 60 крыс Вистар, поступивших в виварий МГУ из питомника РАМН “Столбовая”, удалось отобрать только 4 самки

¹ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

² Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы.

и 3 самца, у которых в 3-х последовательных тестах реакция на звук отсутствовала. Учитывая изложенное, цель данной работы — сравнительное изучение противосудорожного влияния нового ПЭС ЛВТ на параметры аудиогенного ответа у крыс линий Вистар и КМ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линий Вистар и КМ в возрасте 4–5 месяцев массой 220–250 г. В процессе работы с целью получения более однообразного аудиогенного двигательного ответа крысы линии Вистар были разделены по уровню предрасположенности к судорожным реакциям на две группы: “нечувствительные”, у которых в ответ на звук припадка не развивалось (балл “0”), и “аудиогенные” Вистар (АВ). Животных содержали в стандартных условиях вивария МГУ со свободным доступом к воде и пище. Исследование проводили в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003.

Опыты выполнены по стандартной методике [7]. Оценивали характер (паттерн) двигательного возбуждения (одно- или двухволновый), латентный период (ЛП) начала двигательной реакции (с), стадию судорожного припадка (шкала Крушинского) и ее интенсивность (условные баллы).

Водный раствор ЛВТ (фирма UCSB, Бельгия) в дозе 80 мг/кг или дистиллированную воду (контроль) вводили внутривентриально за 1 ч до воздействия звуком. Доза и условия введения препарата были выбраны, исходя из полученных нами ранее данных о его максимальном противосудорожном влиянии на развитие аудиогенного приступа у крыс КМ [4]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартного пакета программ Statistica 6.0. Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, а также корреляционный анализ (по Пирсону). Для определения достоверности разности между выборочными долями использовали *t*-критерий Стьюдента с

применением вспомогательной переменной Фишера “ ϕ ”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения параметров аудиогенной реакции крыс линий Вистар и КМ, получавших препарат или воду, приведены в таблице. Средние показатели судорожного ответа животных контрольной группы полностью соответствовали результатам многолетнего изучения этой линии.

Все животные линии КМ реагируют на звук клонико-тоническим судорожным припадком максимальной интенсивности с очень коротким ЛП. Эта реакция имеет только одну “волну”, т.е. после 6–9 с воздействия звуком двигательное возбуждение сразу же без перерыва переходит в судорожный припадок.

Из представленных в таблице результатов следует, что в контрольной группе животных линии Вистар было почти 80 % особей, отвечающих на звук увеличением двигательной активности. Однако реакция на звук у крыс этой линии сильно варьировала: от полного отсутствия двигательного возбуждения до клонических судорог, которые, в том числе и с падением на бок, наблюдали лишь у 6 особей. Аудиогенное возбуждение крыс этой линии, как правило, не было интенсивным и после продолжительного ЛП проявлялось в беспорядочном беге и прыжках. Стадия тонических судорог полностью отсутствовала.

У животных изученных линий различался также и паттерн двигательного возбуждения: если у КМ наблюдали только “одноволновый” аудиогенный ответ, то у крыс Вистар доля “двухволновых” реакций составляла около 40 % (т.е. почти каждый второй аудиогенный ответ крыс Вистар между беспорядочным бегом и прыжками включал и период отсутствия двигательных реакций длительностью 5–50 с).

Предварительное введение ЛВТ изменяло реакцию на звук животных обеих линий (таблица) и оказывало выраженный противосудорожный эффект по всем изученным параметрам их двигательного ответа. У крыс линии КМ на фоне ЛВТ обнаружено снижение интен-

Влияние леветирацетама (ЛВТ) на параметры аудиогенного двигательного ответа крыс линии Вистар и эпилептиформного судорожного припадка крыс линии Крушинского — Молодкиной (КМ)

Группа	Количество чувствительных животных, %	Латентный период, с	Интенсивность, усл. балл	“Двухволновые” реакции, %
Вистар, контроль, $n = 14$	78,80 ± 0,31 [#]	34,00 ± 10,62	1,41 ± 0,38 ^{###}	35,44 ± 0,16 ^{###}
Вистар, ЛВТ, 80 мг/кг, $n = 12$	58,33 ± 0,14*	47,29 ± 5,66	0,63 ± 0,22*	0***
Вистар, высокочувств. (АВ), контроль, $n = 10$	91,01 ± 0,09	14,00 ± 2,04 ^{###}	1,70 ± 0,21 ^{###}	72,73 ± 0,14 ^{###}
Вистар, высокочувств. (АВ), ЛВТ, 80 мг/кг, $n = 8$	62,50 ± 0,17*	35,80 ± 15,98*	0,88 ± 0,29*	25,00 ± 0,15***
КМ, контроль	100	1,40 ± 0,14	3,98 ± 0,02	0
КМ, ЛВТ, 80 мг/кг, $n = 11$	100	6,64 ± 0,87***	2,45 ± 0,27**	72,8 ± 0,13***

*. **. *** — различие с контролем статистически значимо при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ соответственно.

[#], ^{##}, ^{###} — различие с линией КМ статистически значимо при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ соответственно.

сивности припадка до практически полного исчезновения стадии тонических судорог, удлинение ЛП в 5 раз по сравнению с контролем, а также изменение характера первой фазы двигательного возбуждения и появление у более чем 70 % животных “двухволнового” ответа. Следует отметить, что у крыс этой линии ЛП “одноволнового” ответа почти в 2 раза превышал таковой в случае “двухволновой” аудиогенной реакции. При данной дозе препарата почти четверть животных КМ реагировали на звук только интенсивным бегом и прыжками, что свидетельствовало о способности ЛВТ подавлять не только тонические судороги, но у отдельных особей этой линии – и стадию клонических судорог.

У крыс линии Вистар противосудорожный эффект ЛВТ сопровождался не только снижением интенсивности двигательного возбуждения почти в 2 раза, но и появлением почти 50 % резистентных животных, у которых в ответ на звуковой стимул двигательных реакций не наблюдалось (таблица). У этих животных реакция на звук проявлялась в виде замирания, грумминга, подергивания ушей, но при этом моторная реакция на звук отсутствовала. У тех животных, которые на фоне ЛВТ демонстрировали аудиогенное двигательное возбуждение, оно было очень слабо выраженным и сильно отсроченным: ЛП увеличивался почти в 1,5 раза. Однако влияние ЛВТ на паттерн двигательного ответа у крыс этой линии принципиально отличалось от такового у животных линии КМ. У крыс Вистар на фоне препарата были выявлены только “одноволновые” ответы, хотя в контроле более 30 % животных демонстрировали две “волны” двигательного возбуждения. С целью проверки данного эффекта в последующих экспериментах была выделена группа высокочувствительных к звуку “аудиогенных” Вистар (АВ, таблица). В группе АВ у животных в ответ на звук развивался интенсивный бег и иногда клонические судороги, при этом доля “двухволновых” аудиогенных ответов превышала 70 %. У крыс этой группы были подтверждены все противосудорожные эффекты ЛВТ, выявленные ранее на животных линии Вистар, в том числе и изменение характера двигательного ответа из “двухволнового” в “одноволновый” (таблица).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном противосудорожном эффекте ЛВТ по всем изученным параметрам аудиогенной двигательной реакции крыс линии Вистар, что согласуется с данными о влиянии этого ПЭС на аудиогенный ответ крыс и мышей других линий [9, 11, 13]. Высокая избирательность противосудорожного действия ЛВТ была показана как *in vitro*, так и *in vivo*: препарат не влияет на электрофизиологические характеристики неизмененных нейронов, подавляя эпилептические реакции только патологически поврежденных [13]. Известно, что ЛВТ, в отличие от вальпроатов, клоназепама и карбамазепина, обладает также способностью уменьшать гиперсинхронизацию нейронов зоны СА3 гип-

покампа [14]. Можно предполагать, что у крыс линии Вистар, у которых наблюдается аудиогенный двигательный ответ небольшой интенсивности, однократного введения ЛВТ в дозе 80 мг/кг достаточно для подавления детерминантного очага судорожной активности, что приводит к появлению резистентных к действию звукового стимула животных. У высокорезистентных, отвечающих на звуковой стимул генерализованным клонико-тоническим судорожным припадком крыс КМ устранить полностью первую стадию (двигательное возбуждение, беспорядочный бег, прыжки) аудиогенного ответа в условиях однократного введения даже такого “мощного” антиконвульсанта как ЛВТ не удавалось. О снижении у животных этой линии уровня судорожной готовности, например, при систематической экспозиции к звуку, сообщали и другие авторы, но и они указывали на устойчивость у крыс КМ первой предсудорожной стадии — “двигательной ауры” [5].

Как у крыс линии Вистар, так и у животных линии КМ введение данного антиконвульсанта сопровождалось снижением интенсивности аудиогенных реакций, увеличением ЛП, а также изменением количества “волн” двигательного ответа. Появление на фоне ЛВТ у крыс КМ большого числа “двухволновых” реакций мы рассматривали как результат противосудорожного действия этого препарата. Такой вывод согласуется с ранее полученными данными, что у высоковозбудимых животных этой линии превращение “одноволновой” реакции в “двухволновую” служит показателем усиления процессов торможения [6]. Более того, из литературы известно, что у некоторых особей этой линии вначале происходит полное замещение “одноволновых” аудиогенных реакций на “двухволновые”, а затем следует резкое исчезновение всех двигательных реакций на звуковой раздражитель [1]. Ранее было показано, что способность других антиконвульсантов снижать интенсивность аудиогенных судорог не сопровождается изменением “одноволновости” ответа крыс КМ [7]. Более того, развитие только одной “волны” является довольно устойчивой характеристикой аудиогенной реакции крыс этой линии [6]. Мы предполагали, что появление “двухволновых” ответов у животных КМ может рассматриваться как специфическая характеристика именно ЛВТ. С другой стороны, электрофизиологические, иммуногистохимические и другие исследования показали, что у крыс разных аудиогенных линий единичные приступы развиваются сходным образом. Так, известно, что ЭЭГ во время такого припадка меняется незначительно, а пароксизмальная активность остается локализованной в стволовых отделах мозга: двигательное возбуждение связывают с преимущественной активацией нижних бугров четверохолмия и глубинных отделов верхнего двухолмия, а клонико-тоническую фазу судорог — с распространением эпилептических разрядов в ретикулярную форму ствола, околоводопроводное серое вещество и некоторые другие соседние области [2, 6]. Принимая

во внимание изложенное, можно было ожидать, что после введения ЛВТ изучаемые параметры аудиогенного ответа крыс линий Вистар и КМ будут изменяться сходным образом, в частности, — увеличением числа “двухволновых” ответов. Полученные результаты подтвердили способность ЛВТ изменять “волновую” характеристику аудиогенного ответа, однако направленность этих изменений у животных линии Вистар была противоположна наблюдавшейся у крыс КМ. Таким образом, проведенное изучение противосудорожного влияния нового ПЭС леветирацетама подтвердило, что, хотя крысы КМ ведут свое происхождение от аутбредной популяции Вистар, последующее длительное независимое разведение вызвало их неизбежное расхождение не только по чувствительности к звуку, но, по-видимому, и по механизму аудиогенного ответа, что делает сравнительное изучение животных этих линий корректным только до определенной степени [6].

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00257а и 09-04-00481а.

ВЫВОДЫ

1. Противозипилептическое средство леветирацетам в дозе 80 мг/кг у крыс линии Вистар изменяет “двухволновый” характер двигательного возбуждения на “одноволновый” и оказывает выраженный противосудорожный эффект на все изученные параметры аудиогенного двигательного ответа: снижает интенсивность аудиогенной реакции; удлиняет латентный период; уменьшает количество чувствительных к звуку животных.

2. На фоне леветирацетама у крыс линии Вистар происходит изменение “двухволнового” характера аудиогенного ответа на “одноволновый”, что противо-

положно наблюдаемому у крыс линии Крушинского — Молодкиной.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. И. Ватаев, *Росс. физиол. журн. им. Сеченова*, **91**, № 7, 740 – 751 (2005).
2. Л. В. Виноградова, *Журн. высш. нервн. деят.*, **54**, № 5, 638 – 647 (2004).
3. Г. Д. Кузнецова, *Журн. высш. нервн. деят.*, **48**(1), 143 – 151 (1998).
4. Л. А. Маликова, И. Б. Федотова, И. И. Полетаева, К. С. Раевский, *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**, № 6, 3 – 5 (2007).
5. Е. А. Рябинская, С. Ю. Коротун, *Бюл. exper. биол.*, № 12, 10 – 12 (1983).
6. А. Ф. Семиохина, И. Б. Федотова, И. И. Полетаева, *Журн. высш. нервн. деят.*, **56**, № 3, 298 – 316 (2006).
7. И. Б. Федотова, А. Ф. Семиохина, Е. С. Косачева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**, № 6, 6 – 9 (1996).
8. T. De Smedt, R. Raedt, K. Vonck, and P. Boon, *CNS Drug Rev.*, **13**, № 1, 43 – 56 (2007).
9. E. Donato Di Paola, P. Gareri, and A. Davoli, *Epilepsy Res.*, **75**, № 2 – 3, 112 – 121 (2007).
10. B. Fuks, M. Gillard, H. Michel, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **478**(1), 11 – 19 (2003).
11. D. G. Kasteleijn-Nolst Trenité and E. Hirsch, *Epileptic Disord.*, **5**, Suppl 1., 39 – 44 (2003).
12. H. Klitgaard, A. Matagne, J. Gobert, and E. Wulfert, *Eur. J. Pharmacol.*, **353**(2 – 3), 191 – 206 (1998).
13. H. Klitgaard, *Epilepsia*, **42**(4), 13 – 18 (2001).
14. D. G. Margineanu and H. Klitgaard, *Pharmacol. Res.*, **42**(4), 281 – 5 (2000).
15. M. Noyer, M. Gillard, A. C. Matagne, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **286**, 137 – 146 (1995).
16. O. Spiegelstein, N. Isoherranen, R. H. Finnell, et al., *Epilepsia*, **42**(7), 252 – 253 (2001).

Поступила 04.02.10

LEVETIRACETAM MODIFIES THE PATTERN OF AUDIOGENIC LOCOMOTIVE RESPONSE IN WISTAR AND KRUSHINSKY – MOLODKINA STRAIN RATS

L. A. Malikova¹, I. B. Fedotova², N. M. Surina², I. I. Poletaeva², and K. S. Raevskii¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

² Department of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory 1/12, Moscow, 119899, Russia

The novel antiepileptic drug levetiracetam (keppra, 80 mg/kg, i. p.) produces a pronounced anticonvulsant effect on all parameters of the audiogenic locomotion response in Wistar rats, leading to the prevention of acoustic seizures approximately in 50% animals. Keppra injection also led to a decrease in the intensity of single audiogenic convulsive episode, a twofold prolongation of the latency of motor reaction, and a change in the pattern of seizure reaction toward increasing number of rats with “one-wave” response. In contrast, a lack of sound resistant animals and the change from one- to two-wave audiogenic response were observed in Krushinsky – Molodkina strain rats.

Key words: Levetiracetam (keppra), anticonvulsant effect, audiogenic seizures, Wistar rat strain, Krushinsky – Molodkina rat strain