

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТОПИРАМАТА НА НЕЙРОНЫ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

С. Н. Кожечкин¹, Ю. С. Медникова², Л. Г. Колик¹

С помощью микроэлектродной техники исследовали влияние топирамата на электрическую активность нейронов фронтальной коры большого мозга крыс. Топирамат при внутривенном введении в дозах 40 и 80 мг/кг уменьшал частоту потенциалов действия (ПД) нейронов через 17–30 мин после инъекции. При микроионофоретическом подведении агент также уменьшал частоту ПД через несколько секунд после аппликации. При обоих способах введения эффекты топирамата зависели от дозы. Агент не изменял величину потенциала покоя мембраны, амплитуду и форму ПД нейронов. При микроионофоретическом подведении топирамат уменьшал величину ответов возбуждающего типа на этанол, подведенный электроосмотически к нейронам в малых дозах, и увеличивал торможение нейронов, вызываемое этанолом в больших дозах. Сделано предположение, что уменьшение влечения к алкоголю под влиянием топирамата связано с подавлением активирующего эффекта этанола на нейроны большого мозга, а ослабление симптомов алкогольной абстиненции обусловлено его общим центрально-депрессирующим действием.

Ключевые слова: топирамат; этанол; нейрон; кора головного мозга; микроэлектрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Топирамат (топамакс®) — сульфат-замещенный моносахарид, известен как антиконвульсант и применяется при лечении эпилепсии и парциальных судорог [2]. Недавно в ряде клинических исследований было показано, что топирамат уменьшает влечение к алкоголю и число рецидивов пьянства после детоксикации и увеличивает частоту произвольного отказа от алкоголя [10]. Наряду с этим препарат уменьшает различные проявления абстинентного синдрома [4]. В опытах на крысах и мышах при использовании разных моделей алкоголизации обнаружено уменьшение алкогольной мотивации (потребления этанола) [3, 12].

Механизм противосудорожного и антиалкогольного действия топирамата выяснен недостаточно. Основные предположения следующие: уменьшение транспорта ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} через мембрану нейронов различных структур большого мозга [8, 14]; блокада глутаматных рецепторов АМРА\КА-типа [6]; потенцирование ГАМК-рецепторов и увеличение трансмембранного транспорта ионов Cl^- [13]. Экспериментальные результаты, подтверждающие эти гипотезы, весьма противоречивы.

Подавляющее большинство исследований проведено *in vitro* — на срезах мозга и культуре ткани. Объек-

тами служили, в основном, подкорковые структуры большого мозга, традиционно связываемые с мотивациями и аддиктивным поведением.

Объектом настоящего исследования явилась фронтальная область коры большого мозга бодрствующих крыс. Фронтальная кора — высший отдел лимбической системы, участвующий в механизмах сознания, самоконтроля и обеспечивающий психоэмоциональный компонент мотиваций и наркотической зависимости [5]. С помощью микроэлектродной техники мы исследовали влияние топирамата на активность нейронов коры, на нейрональные эффекты этанола при одновременном микроэлектрофоретическом подведении обоих агентов к постсинаптической мембране клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 5 беспородных кроликах-самцах, массой 3,5–4,0 кг, и 34 крысах-самцах Вистар, массой 180–220 г. Животных получали из питомника НИБМ РАМН “Столбовая”. Эксперименты проводили в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 09.06.2003 “Об учреждении правил лабораторной практики” с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986 г.). Кроликов использовали для внутриклеточного, а крыс для внеклеточного отведения потенциалов действия (ПД) нейронов. После трепанации черепа под эфирным наркозом животных помещали в стереотаксический аппарат и переводили на искусственное

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

² ФГБУ “Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии” РАН, 117485, Москва, ул. Бултерова, 5а.



Рис. 1. Топирамат при внутрибрюшинном введении в дозе 80 мг/кг уменьшает частоту спонтанных потенциалов действия нейрона фронтальной коры большого мозга крысы.

дыхание, применяя миорелаксант диплацин (20 мг/кг, внутривенно). Для внутриклеточного отведения использовали стеклянные одноствольные электроды с диаметром кончика < 1 мкм, заполненные 2 М раствором КСl и приклеенные к другому микроэлектроду (0,5 – 1,0 мкм), предназначенному для микроионофоретического подведения топирамата. Кончики электродов отстояли по длине на 10 – 25 мкм. Для микроэлектрофореза в сочетании с внеклеточным отведением ПД использовали 5-ствольные стеклянные микроэлектроды, два ствола которых были заполнены 2 М раствором NaCl и служили для отведения ПД, предотвращения токовых артефактов и контрольного подведения Na^+ . Топирамат апплицировали микроионофоретически, а этанол — микроэлектроосмотически из водных растворов в концентрации 0,03 М (рН = 4,5). Импульсную активность нейронов оценивали после цифроаналогового преобразования ПД. Внутрибрюшинно топирамат вводили в водном растворе в дозах 10, 40, 80 мг/кг. Топирамат в таких дозах уменьшает влечение крыс к этанолу [7].

Для определения статистической значимости различий средних величин пользовались пакетом статистического анализа STATISTICA 6.0. Для оценки малых выборок ($n < 20$) пользовались непараметрическим методом Манна-Уитни, для больших выборок с нормальным распределением вариантов использовали t-критерий Стьюдента. Различия средних считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение частоты спонтанной активности нейронов фронтальной коры большого мозга после внутрибрюшинного введения топирамата. Внеклеточное отведение ПД.

Доза 10 мг/кг. Топирамат уменьшал частоту ПД 4 нейронов у 4 крыс. Частоту ПД 2 нейронов (2 крысы) агент не изменял. Величина торможения ПД составляла в среднем 16 % от уровня до инъекции агента; эффект был статистически недостоверным ($p > 0,05$).

Доза 40 мг/кг. Топирамат уменьшал частоту ПД 6 нейронов у 6 крыс в среднем на 28 % от исходного уровня. Эффект был достоверным ($p < 0,05$).

Доза 80 мг/кг. Топирамат уменьшал частоту ПД 6 нейронов у 6 крыс в среднем на 39 % от контрольного уровня (рис. 1). Эффект статистически достоверен ($p < 0,05$).

Латентность максимального эффекта топирамата составляла 17 – 30 мин; торможение нейрональной активности продолжалось в течение всего времени наблюдения — максимально 250 мин.

Пассивные и активные электрические свойства мембраны нейронов при микроионофоретическом подведении топирамата. Внутриклеточное отведение.

а) Потенциал покоя (ПП) мембраны нейронов.

ПП нейронов равнялся –60 – (–70) мВ (14 клеток). Топирамат не изменял достоверно ($p > 0,05$) величину ПП всех нейронов при микроионофоретическом подведении с помощью изгоняющих токов силой 10 – 100 нА.

б) Спонтанные ПД нейронов.

Амплитуда ПД у 10 исследованных нейронов (65 – 78 мВ) достоверно не изменялась при микроионофоретическом подведении топирамата в течение 20 мин с помощью токов до 100 нА ($p > 0,05$). Форма ПД — крутизна переднего и заднего фронтов — также не была изменена. Частота спонтанных ПД достоверно уменьшалась у всех 10 нейронов ($p < 0,01$).

Изменение частоты внеклеточно отводимых ПД при микроионофоретическом подведении топирамата.

Исследовано 32 нейрона у 5 крыс. Топирамат, подведенный в небольших количествах с помощью тока до 30 – 40 нА, не вызывал достоверного изменения частоты ПД нейронов. При токах от 50 до 100 нА агент достоверно уменьшал частоту ПД ($p < 0,01$) у 25 нейронов. Активность 7 нейронов не изменилась при аппликации топирамата.

Максимальный тормозящий эффект топирамата при токе 100 нА составлял 70 % от исходной частоты (8 нейронов). У большинства клеток торможение было менее 50 %. Полного блока генерации ПД не наблюда-

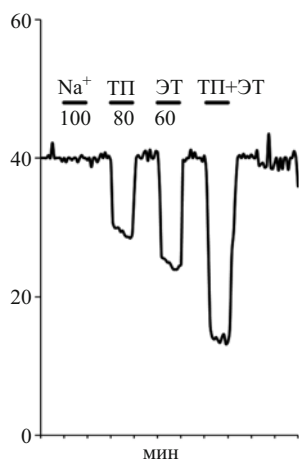


Рис. 2. Топирамат при микроионофоретическом подведении к нейрону уменьшает частоту потенциалов действия в дозозависимой манере.

ТП — топирамат. Na^+ -контрольное испытание тока максимальной величины (100 нА), исключающее токовые артефакты. Здесь и на рис. 3 линии на графике обозначают продолжительность подведения агентов; цифры над ними — величины токов в нА ($1 \cdot 10^{-9}$ А).

ли ни в одном случае. У 17 клеток депрессирующий эффект агента возрастал при увеличении его количества, т.е. силы изгоняющего тока (рис. 2). У 8 нейронов не выявлено зависимости эффекта от силы тока.

Взаимодействие топирамата и этанола при одновременном электрофоретическом подведении обоих агентов к мембране нейронов.

Этанол при электроосмотическом подведении к нервным клеткам коры переднего мозга может вызывать 2 противоположных эффекта. При аппликации в малых количествах (использовании изгоняющих токах менее 30 нА) этанол вызывает увеличение частоты спонтанных ПД многих корковых нейронов. Этанол при подведении с помощью токов более 30 нА вызывает уменьшение частоты ПД [1]. Нередко оба эффекта можно наблюдать на одном и том же нейроне.

Исследовано 42 нейрона с возбуждающим типом ответа на этанол и 52 нейрона с ответом тормозящего типа. Обнаружено, что возбуждающие ответы нейронов на этанол достоверно ($p < 0,01$) уменьшались под влиянием топирамата у 35 исследованных нейронов (рис. 3, а). У 15 из них топирамат полностью блокировал возбуждающие ответы на этанол. Если топирамат подводили к нейронам на фоне этанолового ответа тормозящего типа, то торможение нейрональной активности достоверно увеличивалось у всех 52 клеток (рис. 3, б). Во всех случаях наблюдали арифметическое сложение унитарных тормозных ответов нейронов на агенты (аддитивное взаимодействие).

Из приведенных данных следует, что топирамат не влияет на основные электрические параметры мембраны нейронов фронтальной коры, не изменяет базовые механизмы ее функционирования. Отсутствие изменения величины мембранного потенциала нервных

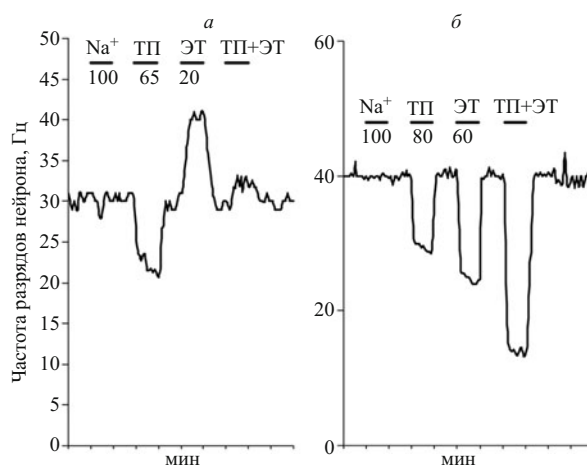


Рис. 3. Топирамат уменьшает нейрональные ответы возбуждающего типа (а) и увеличивает ответы тормозящего типа (б) на этанол, подведенный электроосмотически.

ЭТ — этанол. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

клеток при подведении к ним топирамата, деполяризации или гиперполяризации мембраны указывает на то, что действие Na^+/K^+ -насоса, активность клеточных АТФ-аз и другие компоненты энергетического и метаболического обеспечения нейронального электрогенеза не модулируются топираматом. Стабильность величины ПД, а также их формы свидетельствуют о непричастности Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -каналов мембраны, обеспечивающих генерирование ПД, к механизму действия агента. Этим обусловлена, по-видимому, довольно высокая безопасность препарата и малое число неврологических побочных эффектов при его применении. Наши данные противоречат утверждениям некоторых исследователей о возможной блокаде топираматом трансмембранного транспорта катионов и согласуются с возражениями их оппонентов [9, 11].

Основным эффектом топирамата, обнаруженным нами, является его центрально-депрессирующее действие, выражающееся в уменьшении частоты ПД нейронов. Как при внутрибрюшинном введении, так при электрофоретическом подведении агента непосредственно к мембране нервных клеток эффект топирамата зависит от дозы. Это свидетельствует о наличии на мембране нейронов химических локусов (мишеней, рецепторов), чувствительных к агенту.

Топирамат оказался способным модулировать ответы нейронов на этанол. Наиболее важным представляется уменьшение топираматом возбуждения нейронов, вызываемого малыми дозами этанола. Это возбуждение, по-видимому, связано с центрально-стимулирующим действием алкоголя в начальной стадии опьянения — эйфорией, речедвигательной активацией. Именно это, эмоционально окрашенное состояние, лежит в основе привлекательности спиртного и пристрастия к нему. Воспроизведение в памяти этого состояния толкает человека к повторным алкогольным эксцессам и, закрепляясь в долговременной памяти, к

хроническому алкоголизму. Подавление топираматом центрального возбуждения может обуславливать как снижение влечения к алкоголю, так и уменьшение количества рецидивов пьянства.

Углубление топираматом торможения нейронов, вызываемого большими количествами этанола по аддитивному типу, является типичным проявлением синергизма веществ однонаправленного действия. Отсутствие эффекта потенцирования указывает на то, что механизмы торможения корковых нейронов, вызываемые топираматом и этанолом, их мишени в ЦНС различны. Центральное-депрессивное действие топирамата обуславливает, по-видимому, его эффективность при устранении психоневрологических симптомов, возникающих непосредственно после отмены алкоголя, а также длительного воздержания от него.

ВЫВОДЫ

1. Топирамат не влияет на основные механизмы электрогенеза мембраны нервных клеток фронтальной коры переднего мозга крыс. Агент не изменяет величину потенциала покоя мембраны, амплитуду и форму потенциалов действия нейронов.

2. Топирамат обладает центрально-депрессивными свойствами. При внутрибрюшинном введении и микроионофоретическом подведении агент уменьшает частоту спонтанной электрической активности нейронов (в среднем на 32 %, $p < 0,01$). Эффект зависит от дозы.

3. Топирамат уменьшает возбуждение нейронов, вызываемое этанолом, подводимым к их мембране

электроосмотически в малых количествах, и увеличивает торможение клеток, вызываемое этанолом в больших дозах.

Работа поддержана РФФИ, проект № 13-04-01114.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Н. Кожечкин, *Клинико-биологические основы фармако-терапии алкоголизма*, Москва (1987), с. 76 – 81.
2. J. Bauer, S. Schwalen, *Nervenarzt*, **71**, 495 – 501 (2000).
3. F. J. Breslin, B. A. Johnson, W. J. Lynch, *Psychopharmacology*, **207**, 529 – 534 (2010).
4. G. Florez, P. Garcia-Portilla, S. Alvarez, et al., *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **32**, 1251 – 1259.
5. R. C. Goldstein, N. D. Volcov, *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**, 652 – 665 (2011).
6. D. S. Gryder, M. A. Rogawski, *J. Neurosci*, **23**, 7069 – 7074 (2003).
7. G. A. Hargreaves, I. S. McGregor, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **31**, 1900 – 1907 (2007).
8. A. I. Herrero, N. Del Olmo, J. R. Gonzalez-Escalada, et al., *Neuropharmacology*, **42**, 210 – 220 (2002).
9. S. S. Jaromi, M. R. Pelletier, P. J. McDonald, *Brain. Res.*, **872**, 20 – 28 (2000).
10. B. A. Johnson, N. Ait-Daoud, C. L. Bowden, et al., *Lancet*, **361**, 1677 – 1685 (2003).
11. M. J. McLean, A. A. Bukhari, A. W. Wamil, *Epilepsia*, **41**, Suppl. 1, S21 – 24 (2000).
12. S. A. Nguen, R. Malcolm, L. D. Middaugh, *Synapse*, **61**, 150 – 156 (2007).
13. H. S. White, S. D. Brown, J. H. Woodheda, et al., *Epilepsy Res.*, **28**, 167 – 179 (1997).
14. Sh-P. Wu, Tsai J-J., Gean P-W., *Brit. J. Pharmacol.*, **125**, 826 – 832 (1998).

Поступила 03.07.14

ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF THE EFFECTS OF TOPIRAMATE ON NEOCORTICAL NEURONS IN RATS

S. N. Kozhechkin¹, Yu. S. Mednikova², and L. G. Kolik¹

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

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5A, Moscow, 117485 Russia

The effect of topiramate (topamax) on the electrical activity of frontal cortical neurons of neocortex was studied by microelectrode techniques in rats. Topiramate upon acute intraperitoneal administration and microionophoretic application dose-dependently reduced the frequency of spike activity within 17 – 30 min after injection at a dose of 40 and 80 mg/kg. At the same time, the agent did not change the membrane rest potential, and the magnitude and form of action potentials. Microionophoretically applied topiramate decreased the excitatory response to electroosmotically applied ethanol at “small doses” (ejected current < 50 nA) and enhanced the neuronal depression induced by ethanol at “large doses” (ejected current > 50 nA). It is suggested that the attenuation of alcohol seeking behavior observed after topiramate administration is due to suppression of ethanol activating effects in neocortex neurons, while the alleviation of alcohol withdrawal is associated with the central depressant activity.

Keywords: topiramate; ethanol; neuron; neocortex; microelectrophoresis