

## ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И ДИАЗЕПАМА НА ЭПИЛЕПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Одесский государственный медицинский университет

Ранее было установлено, что бактериальный липополисахарид (ЛПС) обеспечивает в раннем периоде своего действия (4 ч с момента применения в дозе 0,1 мг/кг, внутривенно (в/вр)) сокращение латентного периода генерализованных судорог, индуцированных введением натриевой соли бензилпенициллина (3,0 млн МЕ/кг, в/вр) на 32,8 %, а также увеличение их тяжести на 29,3 % у крыс линии Вистар [1; 2]. В то же время, в отдаленном периоде — через 18 ч с момента применения ЛПС, латентный период пенициллин-индуцированных судорог увеличивался на 58,6 %, а их тяжесть уменьшалась вдвое. При этом на электроэнцефалограмме отмечалась редукция синхронизированной активности дельта- и альфа-диапазона, сочетающаяся с увеличением мощности активности тета-диапазона, наиболее выраженном в образованиях гиппокампа, а также возрастанием мощности бета- и гамма-ритмов.

Таким образом, ЛПС в отдаленном периоде действия оказывает эффект подавления эпилептогенного возбуждения. По-видимому, в основе данного эффекта может находиться восстановление ГАМК-ергического тормозного контроля, нарушаемого под влиянием натриевой соли бензилпенициллина [5]. Ранее было установлено, что препараты, увеличивающие тонус ГАМК-ергических механизмов мозга, потенцируют противосудорожные эффекты бензодиазепинов [3].

Поэтому задачей настоящего исследования явилось определение особенностей динамики активности эпилептических очагов, создаваемых у крыс во фронтальных отделах коры головного мозга, в условиях раздельного и сочетанного применения ЛПС и диазепама. Дополнительной задачей исследования стало изучение данных эффектов у крыс с коразоловым киндлингом в отсроченном периоде его развития, что позволяет воспроизводить фармакологическую устойчивость экспериментального судорожного синдрома [3].

### Материалы и методы исследования

Наблюдения проведены в условиях острожного эксперимента на крысах-самцах линии Вистар массой тела 180–250 г.

Киндлинг у крыс вызывали с помощью ежедневных введений коразола в подпороговой (25,0–30,0 мг/кг, в/вр) дозе. Всего проводилось 21 введение эпилептогена, после чего в наблюдении использовали только тех животных, у которых на протяжении последних трех инъекций отмечалось формирование генерализованных клонико-тонических судорожных приступов. При этом данных животных исследовали по истечении трехнедельного периода отсутствия применения коразола, что позволяет моделировать фармакологически устойчивый эпилептический синдром [3].

Крысам под кетаминовым наркозом (100,0 мг/кг, в/вр) и в условиях фиксации в стерео-

таксическом аппарате СЭЖ-5 экспонировали фронтальные отделы коры головного мозга обоих полушарий, где располагали активный электрод. Индифферентный электрод фиксировали в носовых костях черепа. Через 30 мин животным вводили d-тубокурарин («Орион», Финляндия, 0,15 мг/кг, внутривенно (в/в)) и переводили на искусственное дыхание. Места рассечения тканей головы и точки сдавления инфильтрировали раствором новокаина (0,25 %).

Электрическую активность структур мозга регистрировали через 1,5 ч с момента оперативного вмешательства с помощью компьютерной системы «DX-5000» («Научно-производственное объединение DX-системы», Харьков, Украина). При этом частота опроса каналов составила 256 имп/с, данные визуализировались на экране, их записывали на жесткий диск для последующей off-line обработки, которую проводили с помощью программы «Matlab 7.0». Частотный диапазон сигналов составил 0,5–40 Гц.

Очаги эпилептической активности (ЭПА) создавали путем аппликации на поверхность коры мозга кусочков фильтровальной бумаги, смоченной в свежеприготовленном растворе натриевой соли бензилпенициллина (30 000 МЕ/мл) [3].

Бактериальный ЛПС «Пирогенал» (НИИ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, РФ) вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/вр [1; 2; 4]. Диазепам («Гедеон Рихтер», Венгрия) применяли в дозах 0,1

и 0,5 мг/кг, в/бр. Животным контрольной группы в аналогичных условиях применяли 0,9%-й физиологический раствор NaCl.

Выраженность очаговой ЭпА оценивали по частотно-амплитудным характеристикам, показателю мощности эпилептогенного возбуждения, а также общей продолжительности существования очагов [3].

Статистическую обработку результатов исследований (латентный период и мощность биоэлектрической активности) проводили с применением метода one-way ANOVA и критерия Newman — Keuls. Тяжесть судорог оценивали с помощью критерия Kruscal — Wallis.

### Результаты исследования и их обсуждение

Создание очагов ЭпА на фоне предварительного применения ЛПС показало, что через 30 мин с момента достижения максимальной мощности очагов частота генерирования разрядов в них была на 17,6 % меньше, чем в группе контроля (отдаленный период киндлинга в отсутствие применения ЛПС;  $P < 0,05$ ; рис. 1, а). При

этом данный показатель составлял в экспериментальной группе  $(18,7 \pm 2,4)$  разряда в минуту. В течение последующих 30 мин непрерывного наблюдения частота генерирования разрядов в очагах у крыс с применением ЛПС была достоверно меньше, чем в группе контроля, в то время как в группе животных, которым тестирование эффектов осуществляли через 24 ч с момента применения ЛПС, различия с группой контроля отсутствовали в течение всего периода наблюдения (см. рис. 1, а). В группе животных, которым наблюдение проводили через 12–14 ч с момента введения ЛПС, также регистрировалась тенденция к снижению амплитуды эпилептических разрядов, которая на 50-й минуте с момента достижения разрядами в очаге максимальной амплитуды и частоты была меньше, нежели в группе контроля, на 17,9 % ( $P < 0,05$ ). Различия между группами сохранялись до конца наблюдения (рис. 1, б). При этом у животных с тестированием эффектов через 24 ч с момента применения ЛПС различия с контролем отсутствовали (см. рис. 1, б).

В задачу следующей части исследований вошло изучение характеристик динамики мощности пенициллин-индуцированных очагов в условиях применения диазепама в различных дозах (0,1 и 0,5 мг/кг) у крыс в отдаленном периоде коразол-индуцированного киндлинга. При этом препарат вводили в период достижения максимальных по амплитуде и частоте разрядов в очагах (5–10 мин с момента их возникновения в зоне нанесения эпилептогена).

Введение диазепама в дозе 0,1 мг/кг, в/бр не вызывало изменений исследуемых показателей в сравнении с таковыми в группе контроля (рис. 2). В то же время, под влиянием диазепама в дозе 0,5 мг/кг, в/бр на 30-й минуте с момента применения препарата отмечалось достоверное снижение частоты генерирования спайковых разрядов в очагах — на 28,9 % в сравнении с соответствующим показателем в группе контроля ( $P < 0,05$ ; см. рис. 2, а). Дальнейшее непрерывное наблюдение в течение 30 мин выявило сохранение достоверных различий между группами, которое на

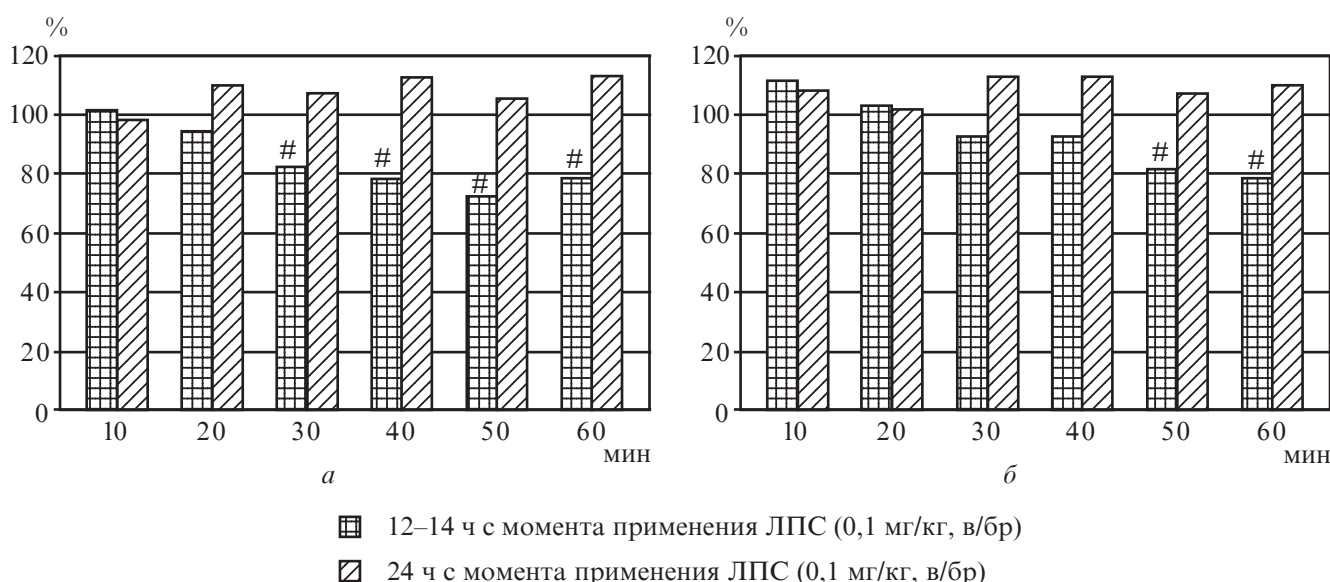


Рис. 1. Динамика частоты (а) и амплитуды (б) пенициллин-индуцированных очагов эпилептической активности в коре головного мозга интактных крыс в условиях воздействия липополисахарида: по оси абсцисс — время с момента появления устойчивой ЭпА (минуты); по оси ординат — исследуемые показатели (в процентах) по отношению к таковым в группе контроля, принятым за 100 %. На рис. 1–4: # —  $P < 0,05$  в сравнении с показателем в группе контроля

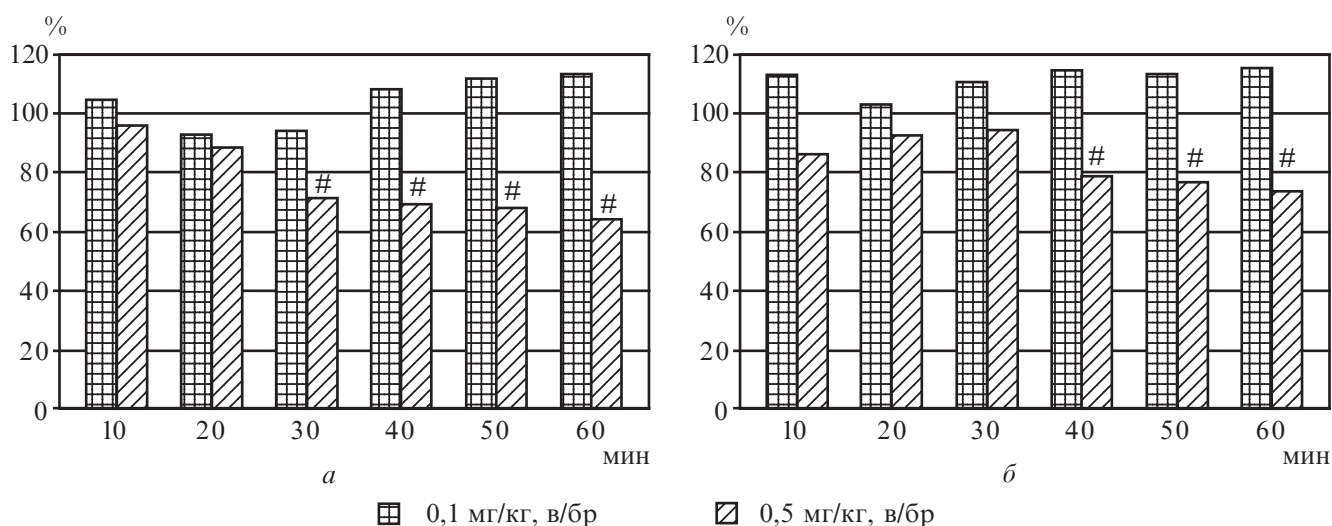


Рис. 2. Динамика частоты (а) и амплитуды (б) пенициллин-индуцированных очагов эпилептической активности в коре головного мозга крыс в отдаленном периоде коразолового киндинга в условиях воздействия диазепама: по оси абсцисс — время с момента введения диазепама (минуты); по оси ординат — исследуемые показатели (в процентах) по отношению к таковым в группе контроля, принятым за 100 %

60-й минуте составило 34,9 % ( $P < 0,05$ ; см. рис. 2, а).

Также в указанной дозе диазепам обеспечивал снижение амплитуды разрядов в сравнении с таковой в группе контроля на 20,0 %, что отмечалось на 40-й минуте с момента применения препарата ( $P < 0,05$ ; см. рис. 2, б). Достоверные различия между группами сохранялись до конца наблюдения и на 60-й минуте они составляли 24,3 % ( $P < 0,05$ ; см. рис. 2, б).

Задачей следующей серии экспериментальных исследований явилось изучение эффектов диазепама на фоне предварительного применения ЛПС (0,1 мг/кг, в/бр за 12–14 и 24 ч до наблюдения) на показатели амплитуды и частоты эпилептических разрядов, индуцируемых в коре головного мозга животных в отдаленном периоде киндинга аппликацией раствора натриевой соли бензилпенициллина (16 000 МЕ/мл). Причем для исследования была избрана доза диазепама 0,1 мг/кг, которая при самостоятельном применении не была эффективна в отношении исследуемых параметров очаговой ЭПА.

Проведенные исследования показали, что под влиянием диазепама, введенного группе

крыс, которым ЛПС применяли за 24 ч до наблюдения, уже на 20-й минуте с момента введения препарата регистрировалось достоверное снижение частоты генерирования разрядов в очагах — на 45,3 % в сравнении с группой контроля ( $P < 0,05$ ; рис. 3, а). В этой группе крыс на 40-й минуте с момента применения диазепама (0,1 мг/кг, в/бр) также регистрировалось снижение частоты генерирования спайковых разрядов в очагах — на 27,5 % в сравнении с группой контроля ( $P < 0,05$ ; рис. 3, а). Указанные достоверные различия между группами сохранялись до конца наблюдения.

Под влиянием диазепама в обеих экспериментальных группах на 30-й минуте с момента его введения регистрировалось снижение амплитуды спайковых потенциалов очагов в сравнении с соответствующим показателем в группе контроля — соответственно на 22,1 и на 26,4 % ( $P < 0,05$ ; см. рис. 3, б). Достоверные различия в сравнении с группой контроля сохранялись до конца наблюдения (см. рис. 3, б).

Исследование продолжительности существования пенициллин-индуцированных очагов ЭПА у крыс в условиях раздель-

ного и сочетанного применения ЛПС и диазепама показало, что в группе контроля этот показатель составлял от 59 до 86 мин (в среднем  $(72,9 \pm 3,3)$  мин). В группе животных, которым ЛПС применяли за 12–14 ч до наблюдения длительность существования очагов была меньше, чем в контроле, на 21,8 % ( $P < 0,05$ ; рис. 4). В то же время, в группе крыс, котрым ЛПС применяли за 24 ч до наблюдения, данный показатель превышал таковой в группе контроля на 5,1 % ( $P > 0,05$ ). Применение диазепама не изменяло длительность существования пенициллин-вызванных очагов, которая была меньше соответствующего показателя в группе контроля на 6,6 и 11,5 % соответственно при введении диазепама в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг, в/бр ( $P > 0,05$ ; см. рис. 4). У крыс, которым применяли диазепам на фоне введения ЛПС, исследуемый показатель был достоверно меньшим, чем в контроле, — на 34,2 и 38,2 % соответственно при применении ЛПС за 12–14 и за 24 ч до наблюдения ( $P < 0,05$ ; см. рис. 4).

Таким образом, представленные результаты показали, что создание с помощью аппликации на фронтальные отделы ко-

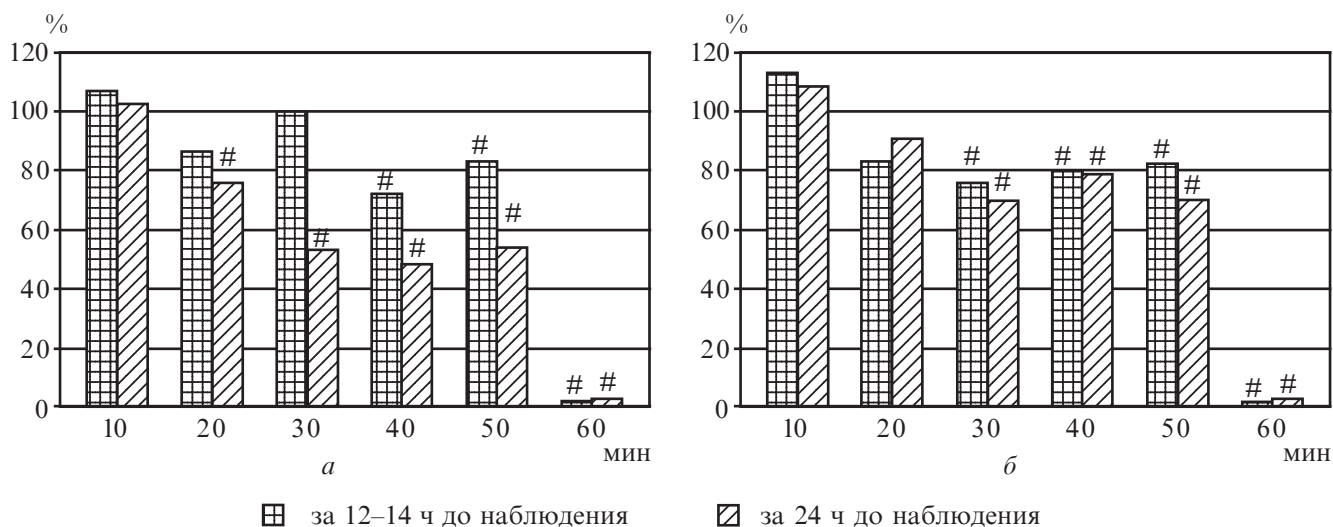


Рис. 3. Динамика частоты (а) и амплитуды (б) пенициллин-индуцированных очагов эпилептической активности в коре головного мозга крыс в отдаленном периоде коразолового киндлинга в условиях воздействия диазепама на фоне предварительного применения липополисахарида: по оси абсцисс — время с момента введения диазепама (минуты) в дозах 0,1 мг/кг, в/бр на фоне применения ЛПС; по оси ординат — исследуемые показатели (в процентах) по отношению к таковым в группе контроля, принятым за 100 %

ры головного мозга очагов ЭпА, осуществляемое на фоне предварительного применения ЛПС (за 12–14 ч до тестирования), сопровождается достоверным снижением динамики амплитудно-частотных характеристик спайковых потенциалов. Аналогичная динамика в условиях применения ЛПС за 24 ч до наблюдения не сопровождалась подавлением активности пенициллин-индуцированных очагов.

Применение диазепама в дозе 0,5 мг/кг, в/бр вызывало достоверное снижение амплитудно-частотных характеристик очагов, созданных аппликацией раствора пенициллина в коре головного мозга крыс в отдаленном периоде коразолового киндлинга, в то время как доза препарата 0,1 мг/кг, в/бр не оказывала подобного эффекта.

При сочетанном применении диазепама и ЛПС в дозах и в период, когда не отмечалось противоэпилептического действия при самостоятельном применении каждого из препаратов, наблюдался эффект сокращения времени генерирования спайковых потенциалов пенициллин-индуцированными очагами в коре головного мозга киндлинговых крыс. Этот эф-



Рис. 4. Длительность существования очагов эпилептической активности, созданных аппликацией раствора пенициллина в коре головного мозга крыс в отдаленном периоде киндлинга в условиях отдельного и сочетанного применения липополисахарида и диазепама: по оси абсцисс: I — эффекты ЛПС, примененного за 12–14 ч и за 24 ч до тестирования; II — влияние диазепама в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг, в/бр соответственно; III — применение диазепама в дозе 0,1 мг/кг, в/бр на фоне применения ЛПС; по оси ординат — длительность существования очагов в процентах по отношению к таковой в группе контроля, принятой за 100 %

фект свидетельствует о взаимном потенцировании противоэпилептического действия указанных факторов.

Можно полагать, что полученный результат усиления противосудорожных эффектов диазепама в отдаленном периоде действия ЛПС свидетельствует о важной роли активации бензодиазепиновых рецепторов в

контроле патологической возбудимости мозга крыс в отдаленном периоде киндлинга. Причем, по всей вероятности, речь может идти о том, что в условиях данной модели эпилепсии, отличающейся высокой резистентностью к действию противосудорожных препаратов [1; 3], наблюдаются существенные нарушения со стороны ГАМК-



бензодиазепиновой системы, представляющей собой один из возможных механизмов патогенеза киндлинг-индуцированной эпилептической активности.

### Выводы

1. Бактериальный липополисахарид (0,1 мг/кг, в/бр) вызывает подавление пенициллин-индуцированной очаговой эпилептической активности у крыс с моделированным фармакологически резистентным эпилептическим судорожным синдромом. Данный эффект наблюдается через 12–14 ч с момента применения ЛПС.

2. В дозе, которая самостоятельно не оказывает эффекта снижения амплитуды и частоты

эпилептических разрядов пенициллин-индуцированных очагов, диазепам на фоне предварительного применения ЛПС вызывает противоэпилептический эффект, проявляющийся как в период 12–14 ч, когда противосудорожный эффект ЛПС выражен и при самостоятельном применении препарата, и через 24 ч, когда данный эффект не определяется.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Годлевский Л. С.* Влияние бактериального липополисахарида на пенициллин-индуцированную судорожную активность у крыс / Л. С. Годлевский, Е. В. Коболев, И. В. Смирнов // *Нейрофизиология*. — 2008. — Т. 40, № 3. — С. 236-241.

2. *Смирнов И. В.* Вплив бактеріального ліпополісахариду на генералізовані клоніко-тонічні та клонічні судоми у щурів / І. В. Смирнов // *Досягнення біології та медицини*. — 2008. — Т. 11, № 1. — С. 26-31.

3. *Шандра А. А.* Киндлинг и эпилептическая активность / А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов. — Одесса : Астропринт, 1999. — 270 с.

4. *The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: possible role of cyclooxygenase-2 induction* / E. S. Akarsu, S. Ozdayi, E. Algan, F. Ulupinar / *Epilepsy Res.* — 2006. — Vol. 71, N 2/3. — P. 181-187.

5. *Woodbury D. M.* Convulsant drug: Mechanisms of action / D. M. Woodbury // *Antiepileptic drugs: Mechanism of action*. — N. Y. : Raven Press, 1980. — P. 249-303.

УДК 612.826+612.8.-009

Е. В. Коболев, О. Г. Овчинникова

### ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И ДИАЗЕПАМА НА ЭПИЛЕПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

В опытах на крысах-самцах линии Вистар, у которых с помощью повторного применения коразола (25,0–30,0 мг/кг, в/бр) формировали киндлинг-синдром и через три недели с момента его возникновения в условиях острого наблюдения на модели пенициллин-индуцированных очагов в коре головного мозга исследовали эффекты применения ЛПС (0,1 мг/кг, в/бр) и диазепам (0,1 и 0,5 мг/кг, в/бр). Установлено развитие потенцированного противосудорожного эффекта диазепам в отдаленном периоде действия ЛПС (12–14 ч с момента применения).

**Ключевые слова:** бактериальный липополисахарид, экспериментальный судорожный синдром, пенициллин, коразоловый киндлинг, диазепам.

UDC 612.826+612.8.-009

Ye. V. Kobolyev, O. G. Ovchinnikova

### THE INFLUENCE OF COMBINED USAGE OF BACTERIAL LYPOPOLYSACCHARIDE AND DIAZEPAM UPON EPILEPTIC ACTIVITY

Under conditions of acute observation in rats kindled with corazol repeated administration (25–30 mg/kg, i. p.) in three-week period free from epileptogen administrations the influence of bacterial lipopolysaccharide LPS (0,1 mg/kg, i. p.) and diazepam (0,1 and 0,5 mg/kg, i. p.) administrations upon penicillin-induced foci in frontal cortex have been investigated. The development of potentiated antiseizure effect of diazepam revealed in postponed period of LPS action (12–14 h from the moment of administration) have been described.

**Key words:** bacterial lipopolysaccharide, experimental seizure syndrome, penicillin, corazol kindling, diazepam.

УДК 616.853-08:615.213:616-092.9

Н. В. Копйова

## СПОНТАННА СУДОМНА АКТИВНІСТЬ ЗА УМОВ ПІЛОКАРПІН-ІНДУКОВАНОГО ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ: ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛІ

Одеський державний медичний університет

Однією з найбільш суттєвих і клінічно релевантних особливостей епілепсії є розвиток спонтанних судом, що значно лімітує кількість експериментальних моделей, за умов яких мож-

на відтворити хронічну судомну активність. Для проведення експериментальних досліджень, присвячених вивченню патологічних механізмів хронічного епілептогенезу та до-

сконаленню методів патогенетичного лікування епілепсії, загальноприйнятими вважаються модель кіндлінгу та постстатусні моделі. З використанням зазначених моделей можна до-