

© Коллектив авторов, 2014
УДК 616-092.616.9-76.29.51

Кузнецова Л.В.¹, Карпова М.Н.¹, Зиньковский К.А.², Клишина Н.В.¹

Влияние цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга (пентилентетразолового киндлинга) и острую судорожную реакцию мышей C57Bl/6, подвергшихся киндлингу

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Тверская государственная медицинская академия Минздрава России, 170100, Тверь, ул. Советская, 4

В экспериментах на мышах C57Bl/6 изучали влияние цитиколина (500 мг/кг, в/бр.) на развитие хронической эпилептизации мозга — пентилентетразолового (ПТЗ) киндлинга (30 мг/кг, в/бр. в течение 24 сут.) и на острые генерализованные судороги (в/в, 1% ПТЗ со скоростью 0,01 мл/с). Показано, что ежедневное введение цитиколина за час до введения ПТЗ не влияло на развитие хронической эпилептизации мозга — ПТЗ киндлинга (латентный период появления судорог и их тяжесть). Однако цитиколин оказывал антиконвульсивное действие на острые судороги у мышей, подвергшихся киндлингу. У животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга и тяжестью судорог 2—3 балла введение цитиколина после 14 сут. киндлинга оказывало противосудорожное действие, повышая порог клонической фазы судорог. Введение цитиколина в течение 24 сут. животным с тяжестью судорог 3—5 баллов приводило к повышению судорожного порога, необходимого как для появления клонических судорог, так и тонической фазы судорог с летальным исходом. Следовательно, противосудорожный эффект цитиколина более выражен при его длительном применении.

Ключевые слова: цитиколин, судороги, киндлинг, пентилентетразол

Kuznetsova L.V.¹, Karpova M.N.¹, Zinkovsky K.A.², Klishina N.V.¹

Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of the brain (pentylentetrazole kindling) and acute seizures reaction of kindled mice C57Bl/6

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

² — Department of psychiatry, narcology, Tver State Medical Academy, Russia, 170100, Tver, Sovetskaya str., 4

In experiments on mice C57Bl/6 was studied effects of citicoline (500 mg/kg, i.p.) on development of chronically epileptization of the brain — pentylentetrazole (PTZ) kindling (30 mg/kg PTZ, i.p. during 24 days) and on acute generalized seizures (i.v., 1% solution of PTZ with the speed of 0,01 ml/s). It was shown that daily injection of citicoline an hour before the introduction of PTZ had no effect on development of chronically epileptization of the brain — PTZ-kindling (the latency of seizures appearance and their severity). However, citicoline posses anticonvulsive effects on acute seizures in kindled mice. In animals with increased seizure susceptibility of the brain caused by kindling and severity of seizures 2—3 points injection citicoline after 14 days of kindling had anticonvulsive effect, increasing the threshold clonic seizures. Injection of citicoline during 24 days of kindled animals and severity of seizures 3—5 points caused the increase of thresholds as clonic and tonic phase of seizures with lethal outcome. Thus, the anticonvulsant effect of citicoline more pronounced in the long-term use.

Key words: citicoline, seizures, kindling, pentylentetrazole

Эпилепсия — сложное по этиологии и патогенезу нервно-психическое заболевание — имеет хронически-прогредиентное течение и характеризуется полиморфностью как пароксизмальных проявлений, так и

нарушений психической деятельности. Классические и новые противоэпилептические лекарственные средства могут купировать повышенную судорожную активность мозга, но, как правило, не обладают защитными свойствами в отношении нейродегенерации. Кроме того, действие большинства противоэпилептических препаратов сопровождается рядом побочных эффектов, к числу которых можно отнести нарушение

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна (Karpova Margarita Nikolaevna), д.б.н., главный научный сотрудник лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН; e-mail: karpovamn@gmail.com

основных когнитивных функций — внимания, памяти, восприятия и др. В связи с изложенным представлялось целесообразным исследовать влияние цитиколина — аналога эндогенного цитиколина, который в настоящее время широко применяется в лечении когнитивных, чувствительных, двигательных неврологических нарушений дегенеративной и сосудистой этиологии, и обладает нейрорегенеративными и нейропротективными свойствами [1—5].

Цель исследования — изучение влияния цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга и острые генерализованные судороги у животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга.

Методика

Эксперименты выполнены на мышах самцах линии C57Bl/6 ($n = 120$) с начальной массой 18—24 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пищи. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003 г.).

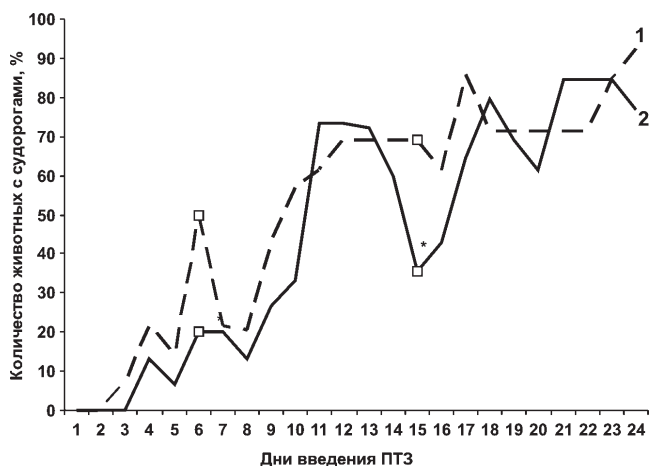
Проведено 5 серий опытов. Во всех сериях цитиколин (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») вводили внутривентриально в дозе 500 мг/кг за час до введения (киндинг) и титрования (острые судороги) конвульсанта пентилентетразола (ПТЭ).

В 1-й серии опытов ($n = 30$) изучали возможное влияние цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга — киндинга, который осуществляли путем ежедневного внутривентриального введения ПТЭ в субконвульсивной дозе 30 мг/кг животным в течение 24 сут. Как известно, феномен киндинга заключается в том, что повторные введения субсудорожных доз конвульсанта вызывают постепенное повышение судорожной активности мозга, проявляющейся в возникновении судорог и нарастанием их тяжести при последующих введениях конвульсанта. Феноменологически киндинг проявляется в снижении судорожного порога в ответ на тестирующую дозу конвульсанта. Ежедневно у каждого животного оценивали тяжесть судорожной реакции в баллах по 5-балльной шкале [6, 7]. Судорожную реакцию в ответ на введение конвульсанта оценивали по усредненному баллу у животных каждой группы. Опытным животным этой серии цитиколин вводили внутривентриально перед каждой инъекцией ПТЭ в течение 24 сут. Контрольным животным в аналогичных условиях опыта в том же объеме вводили физиологический раствор.

Во 2—5-й сериях опытов на модели острой генерализованной эпилептической активности определяли порог судорожной реакции мышей, подвергшихся ПТЭ киндлингу. С этой целью животным внутривенно вводили 1%-ный раствор ПТЭ со скоростью 0,01 мл/с и регистрировали пороги клонических судорог и тонической фазы судорог с летальным исходом. Пороговую дозу ПТЭ вычисляли для каждого животного в мг/кг. Величину порогов судорожной реакции мышей определяли через сутки после 14-й и 24-й инъекции ПТЭ.

Через сутки после 14-й и 24-й инъекции ПТЭ опытным животным 2-й и 3-й серий цитиколин вводили за час до титрования ПТЭ однократно, а опытным мышам 4-й и 5-й серий — ежедневно в течение 14 и 24 сут. и за час до титрования ПТЭ. Контрольным животным этих серий в тех же условиях опыта и в том же объеме вводили физиологический раствор.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «IBM SPSS Statistic 20». Проводили предварительную проверку предположения о нормальном характере распределения эмпирических данных в каждой экспериментальной группе по тестам Колмогорова—Смирнова. Оценку значимости показателей и различий рассматриваемых выборок проводили по t-критерию Стьюдента. Частоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка среднеарифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего.



Влияние ежедневного введения цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга мышей C57Bl/6.

По оси ординат — количество животных с судорогами, %; по оси абсцисс — дни введения ПТЭ.

1 — контроль — ежедневное введение физиологического раствора за час до инъекции ПТЭ; 2 — опыт — ежедневное введение цитиколина за час до инъекции ПТЭ.

Результаты и обсуждение

Оценка влияния цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга (1-я серия) показало, что судороги появлялись на 4-е сут. киндлинга у 13,30% животных; в контроле — на 3-и сут. у 7,14% животных, то есть введение цитиколина существенно не влияло на латентный период появления судорог. Дальнейшее наблюдение показало, что цитиколин не оказывал влияния на динамику развития киндлинга и тяжесть судорог. Однако следует отметить тенденцию к уменьшению числа животных с судорогами у животных с введением цитиколина: на 6-е и 15-е сут. киндлинга число животных с судорогами в этой группе было статистически значимо меньше (рисунок).

Во 2-й серии опытов после 14 сут. киндлинга однократное введение цитиколина за час до титрования ПТЗ животным, у которых тяжесть судорог в этот период составила 2—3 балла, приводило, к повышению судорожного порога (увеличению дозы ПТЗ),

необходимого для появления клонической фазы судорог на 19,29% по сравнению с контролем и не оказывало влияние на тоническую фазу судорог (табл. 1).

В 3-й серии опытов после 24 сут. киндлинга однократное введение цитиколина за час до титрования ПТЗ животным, у которых тяжесть судорог в этот период составила 3—5 баллов, оказалось не эффективным (табл. 1).

Таким образом, однократное введение цитиколина оказывает противосудорожное действие, повышая порог клонической фазы судорог у животных с повышенной в результате киндлинга, судорожной готовностью мозга и тяжестью судорог 2—3 балла.

В 4-й серии опытов ежедневное введение цитиколина в течение 14 сут. и за час до титрования ПТЗ животным с тяжестью судорог 2—3 балла, так же как и во 2-й серии опытов, приводило к повышению на 16,83% порога клонической фазы судорог по сравнению с группой контроля и не оказывало влияния на тоническую фазу судорог (табл. 2).

Таблица 1

Влияние однократного введения цитиколина на пороги острой судорожной реакции у мышей С57В1/6 с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга ($M \pm m$)

Серия опытов	Группы и число (n) животных	Доза ПТЗ, вызывающая судороги			
		Клонические судороги		Тонические судороги	
		мг/кг	%	мг/кг	%
II; 14 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 13	26,33 ± 0,88	100,00 ± 3,34	52,91 ± 1,19	100,00 ± 1,63
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 12	31,41 ± 0,91*	119,29 ± 3,46	55,46 ± 1,32	104,82 ± 2,50
III; 24 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 10	25,30 ± 0,83	100,00 ± 3,28	36,15 ± 0,75#	100,00 ± 1,72
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 11	24,89 ± 1,17	98,38 ± 4,63	36,63 ± 1,52#	101,58 ± 4,22

Примечание. * — $p < 0,001$ — по сравнению с соответствующим контролем; # — $p < 0,001$ — по сравнению с контролем и опытом IV серии (14 сут. киндлинга)

Таблица 2

Влияние ежедневного введения цитиколина в течение 14 и 24 сут. на пороги острой судорожной реакции у мышей С57В1/6 с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга ($M \pm m$)

Серия опытов	Группы и число (n) животных	Доза ПТЗ, вызывающая судороги			
		Клонические судороги		Тонические судороги	
		мг/кг	%	мг/кг	%
IV; 14 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 14	26,26 ± 0,59	100,00 ± 2,25	53,87 ± 1,25	100,00 ± 2,32
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 15	30,68 ± 0,91***	116,83 ± 3,47	52,62 ± 0,77	97,68 ± 2,45
V; 24 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 13	23,55 ± 0,64	100,00 ± 2,72	35,46 ± 1,84##	100,00 ± 5,19
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 11	27,27 ± 1,45**	115,80 ± 6,16	44,09 ± 2,30*#	124,34 ± 6,49

Примечание. *** — $p < 0,001$; ** — $p < 0,02$; * — $p < 0,01$ — по сравнению с соответствующим контролем; ## — $p < 0,001$; # — $p < 0,01$ — по сравнению с контролем и опытом IV серии (14 сут. киндлинга)

В 5-й серии опытов ежедневное введение цитиколина в течение 24 сут. и за час до титрования ПТЗ животным с тяжестью судорог 3—5 баллов приводило к повышению судорожного порога, необходимого как для появления как клонических судорог, так и тонической фазы судорог с летальным исходом, на 15,80% и 24,34% соответственно. Таким образом, у животных с более длительной терапией цитиколином, противосудорожный эффект более выражен.

Следует отметить, что доза ПТЗ, необходимая для появления клонических и тонических судорог после 24 сут. киндлинга была меньше по сравнению с 14-ми сут. (табл. 1, 2). Данное обстоятельство связано с тем, что киндлинг — как процесс постепенно нарастающей судорожной активности мозга — имеет стадийность. Выделение стадий весьма условно. Вместе с тем, каждая стадия характеризуется своими присущими ей особенностями, являющимися результатом изменений, происшедших на предыдущей стадии. На ранней стадии киндлинга, до появления судорог, развитию эпилептогенеза предшествует усиление защитных саногенетических механизмов (активация антиэпилептогенных механизмов) и пока они эффективны — судороги не развиваются. На средней и заключительной стадии киндлинга, когда судороги возникли и их тяжесть нарастает, происходит ослабление анти- и усиление проэпилептогенных механизмов [8—10]. Поэтому на заключительной стадии киндлинга (24-е сут.) по сравнению со средней стадией (14-е сут.) и уменьшается доза ПТЗ, необходимая для появления судорог.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что цитиколин оказывает противосудорожное действие у животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга. У животных с более длительной терапией цитиколином, противосудорожный эффект более выражен. Противосудорожный эффект цитиколина связан с его нейропротективным и нейрорегенеративным действием [3, 4, 11]. Экзогенно введенный цитиколин активирует механизмы защиты от действия повреждающих факторов. Показано, что он восстанавливает поврежденные цитоплазматические и митохондриальные мембраны нейронов, предотвращая гибель клеток. Цитиколин снижает интенсивность выброса возбуждающего нейротрансмиттера глутамата и подавляет экспрессию проапоптотных белков, ингибирует механизмы апоптоза. Помимо этого он препятствует избыточному образованию свободных радикалов. [2, 3, 5, 12—14]. Эти свойства цитиколина способствуют улучшению функционирования таких мембранных структур, как ионные насосы и рецепторы, без регуляции которых невозможно нормальное проведение нервных импульсов.

Таким образом, экзогенно введенный цитиколин (длительное введение в течение 24 сут.) оказывает противосудорожный эффект на развитие острых генерализованных судорог у животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга.

Список литературы

1. Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Карпова М.Н. Аутоантитела к глутамату, ГАМК, серотонину и дофамину в динамике развития хронической эпилептизации мозга мышей C57Bl/6. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 2010; 2: 11—4.
2. Зиньковский К.А. *Клинико-патохимические, иммунологические изменения и их терапевтическая коррекция у больных эпилепсией*: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. М., 2004. 22 с.
3. Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю. Повышение порогов судорожной реакции после активной иммунизации конъюгатом глутамат-БСА мышей и при системном введении антител к глутамату. *Патогенез.* 2011; 1: 21—6.
4. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузина О.С., Кузнецова Л.В. СГ-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на раннем этапе развития хронической эпилептизации мозга. *Бюл. эксперим. биол.* 2006; 142 (8): 139—41.
5. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузнецова Л.В. СГ-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на средней стадии развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга). *Бюл. эксперим. биол.* 2007; 144 (11): 507—9.
6. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузнецова Л.В. СГ-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс после развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга). *Бюл. эксперим. биол.* 2008; 145 (3): 255—58.
7. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73 (3): 308—15.
8. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395—14.
9. Hurtado O., Cardenas A., Pradillo J.M., Morales, J.R., Ortego F., Sobrino T. et al. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 2007; 26 (1):105—11.
10. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A., Sanchez V., Fernandez-Tome P., Leza J.C. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (2): 336—45.
11. Krupinski J., Ferrer I., Barrachina M., Secades J.J., Mercadal J., Lozano R. et al. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase

activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology*. 2002; 42 (6): 846–854.

12. Mir C., Clotet J., Aledo R., Durany N., Argemi J., Lozano R. et al. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. *J. of Molecular Neuroscience*. 2003; 20: 53–9.

13. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5 (4): 167–77.

14. Secades J.J. Probably role of citicoline instroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54 (3) 173–79.

References

1. Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Karpova M.N. Autoantibodies to glutamate, GABA, serotonin and dopamine in the dynamics of development of chronic brain epileptization C57BL/6 mice. *Patol. fiziol. i eksper. terapiya*. 2010; 2: 11–4. (in Russian)

2. Zin'kovskiy K.A. *Clinico-pathochemical, immunological changes and their therapeutic correction in patients with epilepsy*: Author. diss. for the degree of PhD Moscow; 2004. 22. (in Russian)

3. Karpova M.N., Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu. Raising the threshold of convulsive reactions after active immunization with conjugate glutamate-BSA and mice with systemic administration of antibodies to glutamate. *Patogenez*. 2011; 1: 21–6. (in Russian)

4. Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuzina O.S., Kuznetsova L.V. Cl⁻-conductance of the GABA_A receptor complex synaptic membranes of rat cerebral cortex at an early stage of chronic epileptization brain. *Byul. eksper. biol.* 2006; 142 (8): 139–41. (in Russian)

5. Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuznetsova L.V. Cl⁻-conductance of the GABA_A receptor complex synaptic membranes of rat cerebral cortex in the middle stages of chronic brain epileptization (pharmacological kindling). *Byul. Eksper. Biol.* 2007; 144 (11): 507–9. (in Russian)

6. Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuznetsova L.V. Cl⁻-conductance

of the GABA_A receptor complex synaptic membranes of rat cerebral cortex after the development of chronic brain epileptization (pharmacological kindling). *Byul. eksper. biol.* 2008; 145 (3): 255–58. (in Russian)

7. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73 (3): 308–15.

8. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395–414.

9. Hurtado O., Cardenas A., Pradillo J.M., Morales J.R., Ortego F., Sobrino T. et al. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 2007; 26 (1):105–11.

10. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A., Sanchez V., Fernandez-Tome P., Leza J.C. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (2): 336–45.

11. Krupinski J., Ferrer I., Barrachina M., Secades J.J., Mercadal J., Lozano R. et al. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology*. 2002; 42 (6): 846–54.

12. Mir C., Clotet J., Aledo R., Durany N., Argemi J., Lozano R. et al. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. *J. of Molecular Neuroscience*. 2003; 20: 53–9.

13. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5 (4): 167–77.

14. Secades J.J. Probably role of citicoline instroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54 (3) 173–79.

Поступила 27.06.14
Received 27.06.14

Сведения об авторах:

Кузнецова Лада Владимировна (Kuznetsova Lada Vladimirovna) — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ НИИОПП РАМН

Карпова Маргарита Николаевна (Karpova Margarita Nikolaevna) — д.б.н., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, e-mail: karpovamn@gmail.com

Зиньковский Константин Александрович (Zin'kovskiy Konstantin Aleksandrovich) — к.м.н., доцент каф. психиатрии, наркологии и медицинской психологии ГБОУ ВПО «Тверской ГМА» Минздрава России

Клишина Наталья Юрьевна (Klishina Nataliya Yur'evna) — науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН