

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ,

Медицински факултет

Катедра по фармакология и токсикология

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ
МЕХАНИЗМИ НА НЕВРОВЪЗПАЛЕНИЕ ПРИ
ЕПИЛЕПСИЯ**

Д-р Евгений Юриев Харитов

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“**

**Научна специалност: ФАРМАКОЛОГИЯ (вкл. ФАРМАКОКИНЕТИКА и
ХИМИОТЕРАПИЯ)**

Научен ръководител: Проф. д-р Надка Бояджиева, дмн

Официални рецензенти: Проф. д-р Иванка Костадинова, дмн

Доц. д-р Жоржета Бочева, дм

София • 2015

Дисертационният труд е написан на 118 страници. Той е онагледен с 35 фигури и 3 таблици. Цитирани са 225 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в Катедрата по фармакология и токсикология към Медицински факултет на Медицински университет-София.

Експерименталните изследвания са проведени в Катедрата по фармакология и токсикология.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от катедрен съвет на Катедрата по фармакология и токсикология към МФ на МУ-София, състоял се на 18.06.2015г.

Дисертантът е отчислен с право на защита със Заповед N РК 36-1285/26.06.15г. на ректора на МУ-София, Акад. Д-р Ваньо Митев, дмн.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Н. Бояджиева, дмн

Проф. д-р И. Костадинова, дмн

Доц. д-р Ж. Бочева, дм

Проф. д-р Д. Гетова, дмн

Доц. д-р И. Ламбев, дм

Резервни членове: Доц. д-р Г. Ставрева-Маринова, дм и Доц. д-р Емил Гачев, дм.

Защитата на дисертационния труд ще се осъществи на 29.09.2015г. от 16 ч. часа в Аудитория №2, етаж 2, Предклиничен университетски център, ул. Здраве №2, София.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра фармакология и токсикология на Медицински Факултет, Медицински Университет-София, и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

Съдържание

1. Въведение.....	5
2. Цел и задачи.....	13
3. Материал и методи.....	14
4. Резултати от собствени изследвания с дискусия.....	17
5. Изводи.....	49
6. Справка за научни приноси.....	49
7. Списък на публикации свързани с дисертацията.....	50
8. Списък на участия в конгреси и конференции свързани с дисертацията.....	51
9. Участия в проекти свързани с дисертацията.....	53
10. Награди свързани с дисертационния труд.....	53
11. Summary.....	54

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АЕЛ-antiepileptични лекарства

АТФ-аденозинтрифосфат

ГАМК-гама-аминомаслена киселина

КД-кетогенна диета

НСПВС-нестероидни противовъзпалителни средства

ХЕБ-хемато-енцефална бариера

АМРА-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-йонотропен рецептор

СОХ-циклооксигеназа

ELISA-ензимно-свързан имуносорбентен анализ

HMGB 1-high-mobility group box-1

ICE-интерлевкин-конвертиращ ензим

IL-1beta-интерлевкин -1бета

МАРК-митоген-активируема протеин киназа

NF-kB-нуклеарен фактор капа В

NMDA-N-methyl-D-aspartat

PPAR-пероксизомен пролифератор-активиран рецептор

TLR-toll-like receptor

TNF-alpha-Туморен некрозен фактор-алфа

WDS-wet dog shakes

Въведение

Епилепсията е едно от най-честите хронични неврологични заболявания, което се характеризира с спонтанни рекурентни гърчове, наличие на когнитивен дефицит и съпътстващи невропсихиатрични коморбидности. Болеста засяга 1% от човешката популация от различни възрасти, пол и етноси. Въпреки наличието на повече от 20 антиепилептични лекарства (АЕЛ), при 30-50% от пациентите се установява незадоволителен контрол над гърчовете.

Изследвания в последното десетилетие разкриват ключовата роля на невровъзпалението в механизма на епилепсията. Не е изяснено напълно, възможно ли е чрез фармакологични и нефармакологични средства да се подтисне този тип възпаление и по този начин да се повлияе патогенетичния механизъм на заболяването- епилептогенезата. Хроничното невровъзпаление снижава гърчовия праг, което от своя страна усилва невроналната възбудимост.

Съвременните изследвания на епилепсията все повече проучват антиинфламаторните ефекти на утвърдени АЕЛ с презумцията, че те имат по-голямо значение за терапевтичните им ефекти в сравнение с чисто невроналните им въздействия. В **експеримент 1** ние сравняваме антиепилептичните и антиинфламаторни ефекти на леветирацетам и валпроева киселина и взаимната връзка между тези два ефекта.

Нефармакологичните методи за лечение на епилепсия се налагат все повече в клиничната практика. Един от тях е прилагането на кетогенна диета (КД). В литературата има задълбочени опити за разкриване на механизма и, но липсващи до оскъдни са доказателствата за антиинфламаторните и ефекти, както и за продължителността на прилагането и с цел достигане на максимален терапевтичен ефект. В **експеримент 2** се проследяват антиконвулсивните ефекти на КД при 3, 6 и 9 седмично прилагане.

Статините са утвърдени холестеролпонижаващи лекарства. Доказани са и техните антиинфламаторни ефекти. В литературата няма убедителни доказателства за техни въздействия върху епилептогенната активност и нивата на проинфламаторните цитокини. В **експеримент 3** се проучват техните предполагаеми ефекти в този аспект.

Винпоцетин е много широко използвано лекарство в неврологията, за което в последните години се натрупват доказателства за антиинфламаторни свойства. Не са достатъчно добре проучени ефектите му върху епилептогенната активност и влиянието му върху нивата на проинфламаторни цитокини. В **експеримент 4** ние привеждаме доказателства показващи възможност за прилагане на винпоцетин като средство променящо патогенетичния ход на епилепсията.

Един от молекулярните пътища за които има доказателства, че е активиран в резултат на епилептогенната активност е този свързан с невроналната циклооксигеназа (СОХ). Възможностите чрез съвместно прилагане на два медикамента с различен механизъм на подтискане на невровъзпалението да се повлияе епилептогенезата не са добре проучени. В **експеримент 5** ние насочваме вниманието към комбинация от СОХ-инхибитора целекоксиб и тетрациклиновия антибиотик доксициклин, като сравняваме техните ефекти върху гърчовата активност и показателите за невровъзпаление.

Ролята на СОХ в процесите на епилептогенеза и невровъзпаление се дискутират в литературата, но няма достатъчно научни доказателства, кой от двата типа циклооксигеназа (СОХ-1 или СОХ-2) имат по-важна роля в хода на епилепсията. **Експеримент 6** проучва този въпрос, сравнявайки ефектите на селективен (целекоксиб) и неселективен (ибупрофен) СОХ-инхибитор.

В заключение може да обобщим, че данните от клинични и експериментални изследвания в последното десетилетие установяват участието на възпалението в патогенезата на епилепсията. В този процес са включени, както мозъчни клетки, така и периферни имунни клетки проникващи в мозъка през увредената ХЕБ. Активирания имунен отговор в мозъка намалява гърчовия праг, увеличава невроналната възбудимост, води до дисфункция на ХЕБ и в крайна сметка стимулира епилептогенезата. Въпреки напредъка в изясняване ролята на имунния отговор и възпалението в патогенезата на епилепсията, ефективна терапия която е насочена към нарушените имунни механизми в мозъка все още липсва. Настоящото проучване дава доказателства, както за нови свойства на някои утвърдени АЕЛ, така и лекарства от други фармакологични групи, свързани с възможността за прилагането им като антиепилептични и антиепилептогенни средства. По този начин изследването очертава нова терапевтична стратегия, насочена към повлияване не само на симптомите на епилепсията, но също така и на самия патогенетичен механизъм на заболяването.

Литературен обзор

Епилепсия и невровъзпаление

Научни факти от експериментален и клиничен характер в последното десетилетие, показват по неоспорим начин, че мозъчното възпаление е характерен феномен на хипервъзбудимата мозъчна тъкан при фармакорезистентни епилепсии. Възпалителни процеси са доказани не само в мозъчни тъкани при хронична епилепсия, а също така непосредствено след епилептогенно увреждане. Такъв тип процеси се установяват и по време на т.нар. латентния период, който предшества появата на спонтанни рекурентни гърчове. Тези факти дават основание за изграждане на хипотезата, че невровъзпалението има роля не само за процеса на генериране на гърчове, а също и за процеса на епилептогенеза.

Хипотезата, че мозъчното възпаление има роля в механизмите на епилепсията се подкрепя от редица автори. Повишените нива на цитокини са отличителен белег на невровъзпалението, но тяхната роля в патогенезата на епилепсията не е добре изяснена.

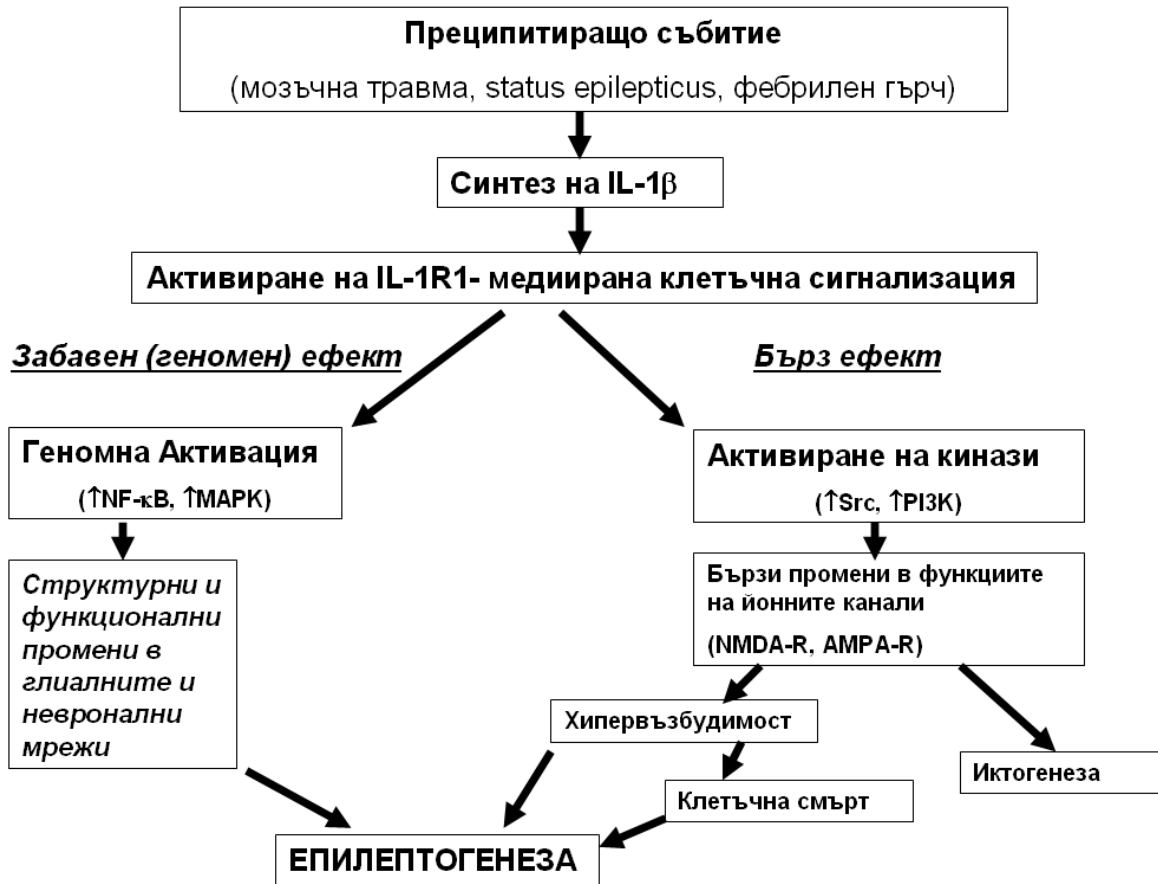
Експериментални данни подкрепят горните факти. Сигнификантно увеличение на експресията на т.нар. Toll-like-рецептори и проинфламаторни цитокини се установяват в животински модели след status epilepticus (Turrin et al., 2004). По-изразено е увеличението на TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 в ранните етапи след гърчовете. Нивата на IL-1beta остават увеличени седмици след status epilepticus и са съчетани с реактивна глиоза. Факта, че прилагането на антиинфламаторни средства, стероиди и имуноглобулини оказва антиепилептичен ефект в експериментални модели подкрепят хипотезата за реципрочната връзка между епилепсията и невровъзпалението:

Епилептична активност ► имунен отговор ► епилептична активност.

В експериментални модели с плъхове е доказано, че индукцията на гърчовете води до бърза повишаване на инфламаторни медиатори в мозъчните зони с гърчова генерация и пропация (Vezzani et al., 2011b). От друга страна обратно, доказано е, че тези проинфламаторни цитокини довеждат до повишена невронална възбудимост и гърчове, с увеличена вероятност за поява на спонтанни рекурентни гърчове (Vezzani et al., 20011).

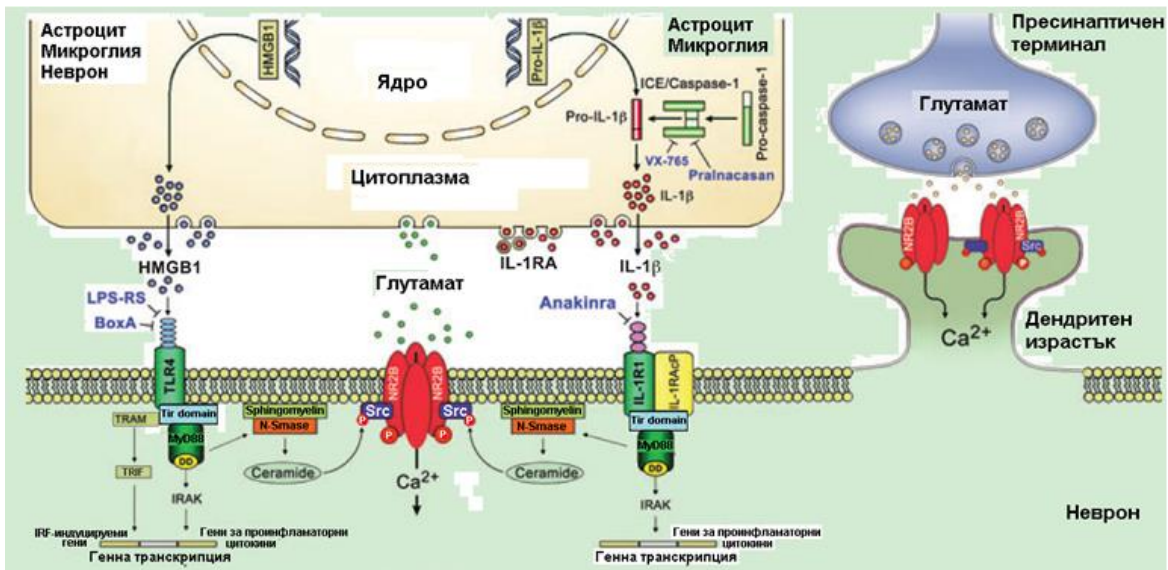
Горепосочените научни факти дават основание да се приеме хипотеза за наличие на порочен кръг с положителна обратна връзка между епилептичните гърчове и невровъзпалението.

Един от водещите проинфламаторни цитокини е IL-1beta и неговата роля при епилепсия се изучава интензивно през последните години. **Фиг.1** обобщава предполагаемото про-епилептогенно действие на IL-1beta, медирано чрез неговия IL-1R1 рецептор. Предполага се, че тези процеси се развиват по време на епилептогенезата.



Фиг.1. Роля на IL-1beta в процеса на епилептогенеза. Схема на поредицата от промени, показващи ефекта на IL-1beta върху ЦНС, след продукцията и освобождаването му в резултат на преципитиращо събитие. Мозъчния IL-1beta се продуцира основно от глия. Факта, че клетките продуциращи IL-1beta експресират IL-1 тип 1 рецептори(IL-1R1) показва, че този цитокин притежава автокринни и паракринни действия. Активацията на IL1R1 от IL-1beta води до два ефекта: 1) Класически геномен, свързан с транскрипционна активация на NF-kB и MAPK-свързани гени, свързан със структурни функционални промени в глията и невроналните клетки. 2) Бърз негеномен ефект, свързан с промяна на невроналната възбудимост, водещ до бързи промени в проводимостта на йонни канали, медирано чрез въздействие върху кинази като Src-kinase и PI3K.

В хода на епилептогенезата основна роля се отдава на активирането на вродения имунитет в ЦНС. TLR рецепторите са включени в активирането на този вид имунитет. TLR-рецепторите, които са трансмембранни протеини се експресират от имунокомпетентни клетки, като дендритните и микроглиалните клетки. Тези рецептори имат цитоплазмен домейн, подобен на IL-1beta и имат частично общ интрацелуларен сигнален път. Това е причината за обозначаването им като TLR/ IL-1beta рецептори. IL-1/TLR сигналния път е с основно значение за тъканното възпаление, тъй като е активатор на придобития имунитет. **Фиг.2.** дава обобщена картина на молекулярни пътища, които свързват IL-1/TLR сигналния път с невроналната възбудимост и възможността чрез фармакологични средства да се повлияе епилептогенната хипервъзбудимост.



Фиг. 2. IL-1R/TLR-сигнализация при епилепсия. Проконвулсивни събития в ЦНС (като локално увреждане или гърчове) или в периферните тъкани след инфекции, води до активация на микроглия, астроцити и неврони. Активираната глия освобождава проинфламаторни цитокини (IL-1beta), а увредените неврони – “опасни сигнали” (HMGB1). Това довежда до активиране на IL-1R1 и TLR4 рецепторите съответно. Активирането на невроните по този начин довежда до: 1) Бързо активиране на NMDA-рецепторната Ca^{2+} проводимост, чрез ceramide/Src-медирано фосфорилиране на NR2B субединицата, което води до невронална хипервъзбудимост. 2) Активиране транскрипцията на гени, свързани с невронални и клетъчни промени от значение за епилептогенезата довежда до трайно снижение на гърчовия праг. Оформя се порочен кръг между гърчовете и мозъчното възпаление.

Повлияване на мозъчното възпаление–терапевтична стратегия при епилепсия

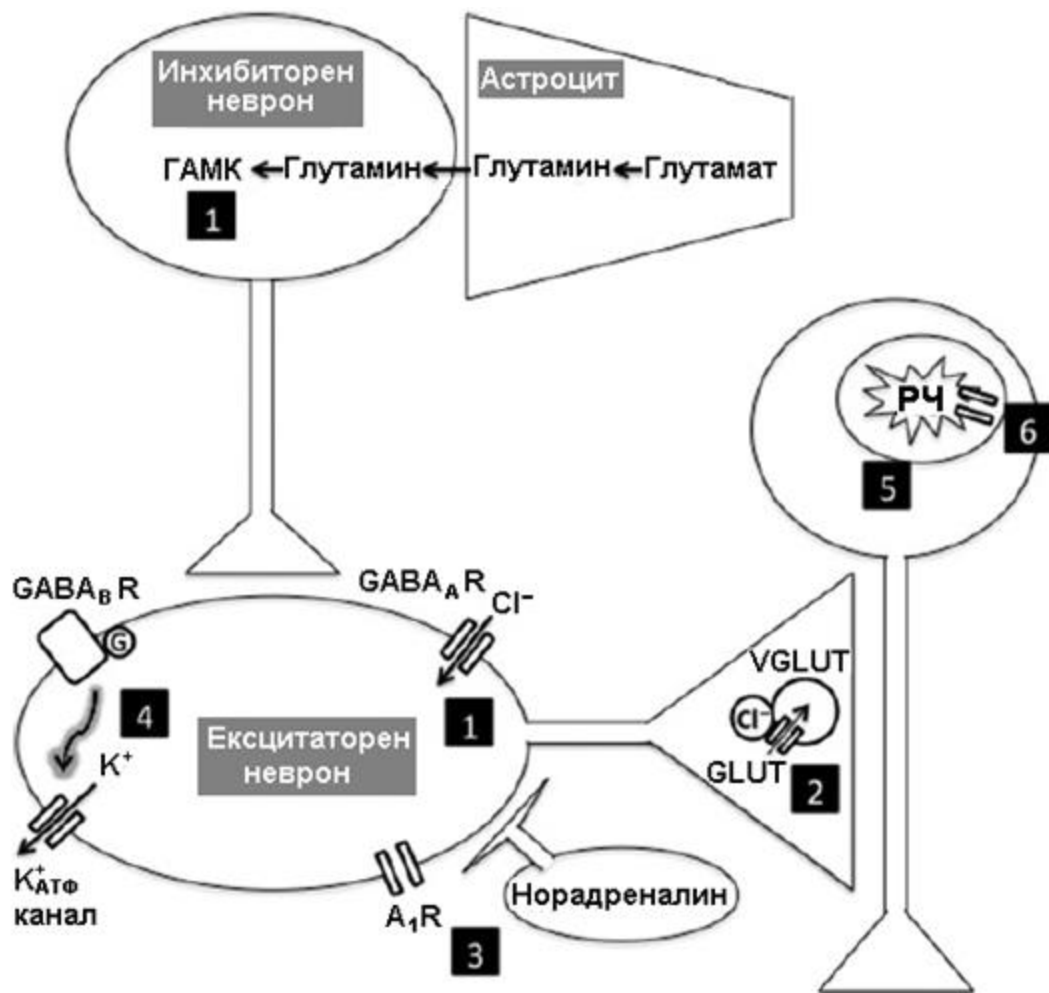
Клинични факти, които показват, че повлияването на мозъчното възпаление е рационална терапевтична стратегия при епилепсията са ограничени. Противовъзпалителните агенти се разглеждат като кандидати за нов клас антиепилептични лекарствени средства. Съединения, показващи обещаващи резултати чрез влияние върху мозъчното възпаление са инхибиторите на интерлевкин-конвертиращия ензим (ICE)/caspase 1 и IL-1R антагонисти. ICE/caspase-1 е протеаза, която катализира превръщането на неактивния прекурсор pro-IL-1beta в биологично активен IL-1beta.

Натрупани са много доказателства за антиконвулсивния ефект на съединението VX-765 (специфичен инхибитор на ICE/caspase1) след системното му приложение, както в модел на остри гърчове при мишки, така и в хронични гърчове (Фиг. 2).

Друг подход в блокирането на IL-1beta сигнализацията е блокирането на неговия рецептор, IL-1 рецептор тип 1, чрез Anakinra (Фиг. 2). Това е човешки конкурентен рецепторен антагонист получен чрез рекомбинантна технология. До момента лекарството се използва в лечение на ревматоиден артрит при пациенти, неповлияли се от метотрексат. Anakinra подтиска изразено гърчовете, като блокира кортикалната им генерализация от хипокампуса, и редуцира появата на status epilepticus при плъхове.

Гърсенето на средства с антиинфламаторни свойства, за които се предполага, че биха имали и антиконвулсивни свойства се насочва и към утвърдени в клиниката лекарства, които имат и други показания. Във връзка с установените антиинфламаторни свойства интерес представлява проучването на антиепилептичните свойства на статини, леветирацетам, тетрациклини, COX-инхибитори.

Независимо от въвеждането в клиничната практика в последните две десетилетия на голям брой нови антиепилептични лекарства (АЕЛ), 30-50% от пациентите са фармакорезистентни. Това показва необходимостта от нови подходи. Кетогенната диета (КД) е нефармакологично средство, с прилагането на което се постига контрол върху гърчовете в 30-40% от фармакорезистентните пациенти. Повече от век има опити за разгадаване на антиконвулсивните и механизми. Предполага се, че кетонните тела които се увеличават след прилагането и имат основна роля за наблюдаваните антиконвулсивни ефекти. Фиг. 3. Дава обобщена представа за предполагаемите механизми на антиепилептично действие на КД.



Фиг. 3. Механизми в антиепилептичното действие на кетонните тела. (1) Ускорена синтеза на ГАМК в резултат повишени нива на глутамат в глутамат-глутаминовия цикъл. (2) Намалено глутаматно освобождаване чрез компетитивно инхибиране на везикуларния глутаматен транспортер (GLUT). (3) Повишени нива на аденозин и въздействие върху A₁-рецептори. Усилена норадреналинова активност има антиконвулсивен ефект. (4) Хиперполяризация на неврона посредством отваряне на Катф-каналы – ефект свързан с понижени нива на АТФ, под влияние на кетонните тела. (5) Антиоксидантен ефект поради понижена продукция на реактивни кислородни частици. (6) Промени в транскрипцията на компоненти от дихателната транспортна верига в митохондриите и увеличени нива на АТФ.

Освен описаните ефекти на кетонните тела, интерес представляват и други хипотези за механизма на КД. Изследвания в последните години показват и антиинфламаторните ефекти на КД. Не е добре проучено, какъв е срока на

прилагане на КД, за постигане на задоволителен антиепилептичен ефект, и дали той е свързан с антиинфламаторни ефекти на диетата.

Заклучение

В заключение може да се обобщи, че изследванията в последните години показват, че мозъка е имунологично активен. Мозъчният вроден имунен отговор към различни увреждания се осъществява основно от микроглия и астоцити.

Антиконвулсивният ефект на средства, антагонизиращи IL-1R/TLR сигнализацията се изследва активно. Лекарства, които блокират специфични инфламаторни сигнали се използват в клиничната практика за лечение на болести с инфламаторна и автоимунна генеза. Повлияването на възпалението като нова антиепилептична стратегия би имал болест-модифициращо действие поради действието на тези нови средства върху ключови патогенетични механизми в епилептогенезата. Необходими са бъдещи проучвания, както върху утвърдени, така и върху нови лекарства с антиинфламаторни свойства, които биха оказали антиконвулсивни ефекти. Този нов подход в лечението на епилепсията дава надежди за повлияване на фармакорезистентни форми на заболяването.

2. Цел и задачи

Цел на настоящото проучване е да се изследват механизми на невровъзпаление при експериментална епилепсия чрез фармакологични и нефармакологични средства.

За постигане на посочените цел бяха определени следните задачи:

1. Да се създадат експериментални модели на епилепсия на плъхове и се направи оценка на степента и тежестта на гърчовете.
2. Да се изследва влиянието на фармакологични средства (леветирацетам, валпроева киселина) върху неонатален каинатен експериментални модели на епилепсия, като се отчитат параметрите на гърчове, преживяемост на животните и показатели на невровъзпаление.
3. Да се проучи сравнително влиянието на леветирацетам и валпроева киселина върху про-възпалителните цитокини TNF-alfa и IL-1beta на мъжки полови незрели плъхове.
4. Изследване влиянието на кетогенна диета върху степен и тежест на гърчове в експериментален пилокарпинов модели на епилепсия при полови незрели мъжки плъхове.
5. Да се проучи влиянието на статини върху експериментален модел на епилепсия и се определят степен и тежест на гърчовете, преживяемост на животните на мъжки полови незрели плъхове.
6. Да се проучи влиянието на винпоцетин върху експериментален модел на епилепсия, като се отчитат степен и тежест на гърчовете, преживяемост на животните, концентрации на мъжки полови незрели плъхове.
7. Да се проучи самостоятелното и комбинирано влияние на doxusuciline и celecoxib при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия, като се отчетат тежестта на гърчовете, WDS, концентрации на TNF-alfa и IL-1beta плазма на мъжки полови незрели плъхове.
8. Да се проучи сравнително влиянието на неселективен COX-инхибитор (ibuprofen) и селективен COX-2 инхибитор (celecoxib) върху показатели за епилептогенна активност, при пилокарпинов експериментален модел на епилепсия.

3. Материали и методи

Експериментите по дисертационния труд бяха проведени при спазване на Изискванията и Правилата за работа с лабораторни животни, както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според КЕНИМУС (Комисия по Етика на Научните Изследвания при Медицински Университет).

3.1. Експериментални животни

За целите и задачите на експерименталните изследвания бяха използвани мъжки и женски полово незрели плъхове (линия Wistar) (на възраст 15-20 дни). Общият брой на животните беше 120, при начално тегло 40-60 g. Броят на животните в групите е 6. Подробностите са посочени в съответните части на раздел резултати.

При отглеждането на животните се спазваше циркадният ритъм (12 ч. светло/ 12 ч. тъмно), стандартните изисквания за температура 22°C и изискванията за помещението.

Храненето включва, както използването на стандартната храна с пелети (предимно при контролните групи), така и хранителен режим от кетогенна диета (при част от изследванията с експерименталните групи-експеримент 2). Достъпът до вода на всички животни беше Ad libitum.

3.2. Фармакологични средства

3.2.1. Каинова киселина (Sigma). Използвана е субстанция, която се прилага i.p., след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.2. Леветирацетам (USB, Белгия). Използвана е субстанция, която се прилага i.p (50 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.3. Валпроева киселина (Sanofi-Aventis, Франция). Използвана е субстанция, която се прилага i.p (50 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.4. Пилокарпинов хидрохлорид (Alcon, Швейцария). Използвана е субстанция, която се прилага i.p (400 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.5. Ketogen (Briogen). Използвана е храна със специално предназначение на Biogen с високо съдържание на мазнини и ниско на въглехидрати и протеини-кетогенна диета (**Табл.1**). Прилагана беше през устата след разтваряне в хладка вода, според инструкциите на производителя.

3.2.6. Розувастатин (KRKA, Словения). Използвана е субстанция, която се прилага per os (10, 20, 40 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.7. Винпоцетин (Gedeon Richter, Унгария). Използвана е субстанция, която се прилага per os (10 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.8. Доксициклин (Aktavis, България). Използвана е субстанция, която се прилага per os (20 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.9. Целекоксиб (Pfizer, UK). Използвана е субстанция, която се прилага per os (10, 20 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

3.2.10. Ибупрофен (Aktavis, България). Използвана е субстанция, която се прилага per os (20, 40 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

Таблица 1. Състав на кетогенна диета

Състав на съдържанието в 100 г.

Състав на съдържанието в 100 г.	
Протеини	15 гр.
Бъглехидрати	3 гр.
Мазнини	72 гр.
Калории	720 Kcal

3.3. Експериментални методи

3.2.1 Експериментални модели на епилепсия

Каинатен модел – животните бяха инжектирани с каинова киселина (10 mg/kg, i.p.). Дозата в първия експеримент е съобразена с ниската възраст на плъховете (20 дни). Появата и степента на тежестта на гърчовете се оценяваше визуално по скалата на Racine (1972). Всички животни получиха първи признаци на епилептигенна активност 5 мин. след прилагане на конвулсанта. Скалата на Racine, за тежестта на гърчовете има 5 степени: 1) Орални автоматизми, премигвания и слаб лицев клонус, треперене; 2) Ритмично поклащане на главата, повдигане на опашката; 3) Миоклонус на предната част на тялото; 4) Клонични конвулсии и повдигане на задните лапи; 5) генерализирани тонично-клонични конвулсии с загуба на баланс.

Пилокарпинов модел – животните бяха инжектирани подкожно (s.c.) с Scopolamine (1mg/ kg) за редуциране на периферните холинолитични ефекти на пилокарина. 30 мин. по-късно беше предизвикана гърчова активност с интраперитонелано приложение на Pilocarpine (400mg/kg). Процеса на поява, развитие и тежестта на гърчовете бе проследена визуално и беше определяна чрез използване на скалата на Racine (1972). 120 мин. след индукцията на гърчовете беше приложен Diazepam с цел намаляване на смъртността. Контролните животни бяха третирани по подобен начин, с разлика на това, че им бе прилаган 0,9% NaCl, вместо пилокарпин.

3.4. ELISA методи

3.4.1. Метод за определяне на RAT, TNF-alpha, ELISA Kit.

Беше приложен подвид на ELISA метода, Сандвич-ELISA. Този метод се базира на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаката предварително е инкубирана с антитяло насочено към единия край на TNF-alpha. Това антитяло се свързва с TNF-alpha в стандарта и кръвната проба. На следващия етап в ямките се прилага второ антитяло, което се свързва с свободния край на TNF-alpha. По този начин двете антитела се свързват с различни краища на TNF-alpha, при което се оформя сандвич. По-късно се прибавя субстратен разтвор, който спира реакцията. Резултатите се отчитат със спектрофотометър на 450 nm. Концентрацията на TNF-alpha се определяше спрямо стандартна крива на база на резултатите от спектрофотометрията, в pg/ml.

3.4.2. Метод за определяне на IL-1beta

Определянето на концентрацията на IL-1beta се извършваше чрез метода Сандвич-ELISA по инструкциите на производителя. Крайният резултат се отчиташе спектрофотометрично при дължина от 450 nm. Концентрацията се изчисляваше за всяка проба от експерименталните животни, спрямо стандартна крива, изработена при същите условия, както експерименталните проби.

3.6. Статистически методи. Данните от всички експерименти бяха анализирани с програма GraphPad Prism и Excel (Office 2007). Получените резултати са обработени статистически и представени като средна стойност \pm средна грешка ($m \pm SEM$); статистически значима разлика между групите се приема при $p < 0.05$; n е броя на животните в група. Използвана е дескриптивна статистика и Student T-test.

4. Резултати от собствени изследвания с дискусия

4.1. Сравнително проучване на ефекти на леветирацетам и валпроева киселина върху степента и тежестта на гърчовете и нива на проинфламаторни цитокини при неонатален каинатен модел на епилепсия

Ролята на невровъзпалението в процеса на епилептогенезата се дискутира активно и търсенето на антиепилептични средства не само със симптоматично, но и с болестмодифициращ ефект е от ключово значение. Настоящото проучване има за цел сравняване на ефекта на Levetiracetam (LEV) и Valproic acid (VPA) върху поведенческите промени и нивата на проинфламаторните цитокини – TNF-alfa и IL-1beta в хипокампус на новородени плъхове при каинат-индуциран модел на епилепсия.

Резултатите биха дали основание за използване на Levetiracetam, като средство, повлияващо не само симптомите на епилепсията, но също така променящо клиничния ход на епилепсията (епилептогенеза).

Експериментален дизайн

Използван беше модел на неонатална епилепсия с прилагане на каинова киселина и отчитане продължителността и тежестта на гърчовете по скалата на Рейсин, както и последващо определяне плазмените нива на проинфламаторни цитокини – TNF-alfa и IL-1beta в плазма. Същия експериментален дизайн бе използван, но с предварително третиране на животните с Levetiracetam и Valproic acid.

Използвани бяха 20-дневни мъжки плъхчета. Животните бяха разделени в 4 групи по 6 животни.

1) Първа група – **негативна контролна** без епилепсия. Третиране с физиологичен разтвор, i.p. (0,1мл/100г).

2) Втора група – **позитивна контрола**. Животните бяха третирани с каинова киселина (10 mg/kg, i.p.).

3) Трета група – **експериментална 1** с Levetiracetam (50mg/kg, i.p.)

4) Четвърта група – **експериментална 2** с Valproic acid (50mg/kg, i.p.)

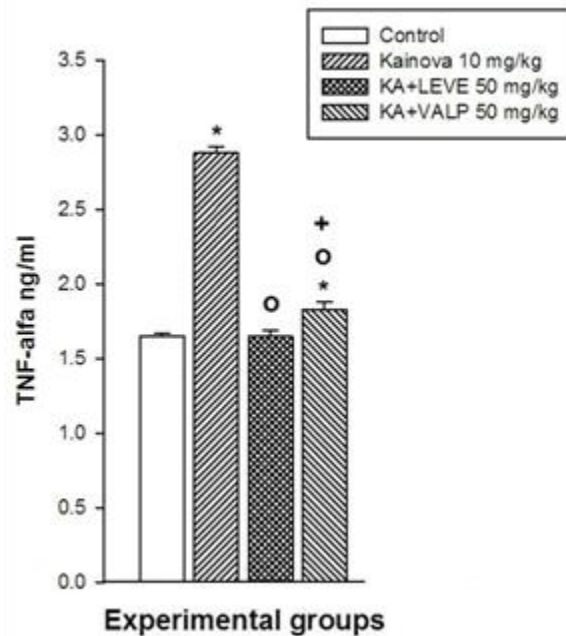
Експерименталните групи се третираха 10 дни с съответните субстанции. На десетия ден, 2 h след последната доза на LEV и VPA животните бяха инжектирани i.p. с каинова киселина 10 mg/kg, i.p.

Животните бяха наблюдавани 3 h за оценка тежестта на гърчовете по 5 степенната скала на Рейсин. Тази скала приема 5 степени на епилптогенна активност. 1-ва-фациален клонус, 2-ра-поклащане на главата и wet dog shakes, 3-та унилатерален клонус на торса с лордоза, 4-та-изправяне на задните лапи, 5-та-билатерален клонус на торса с изправяния, подскоци и загуба на баланс с падане.

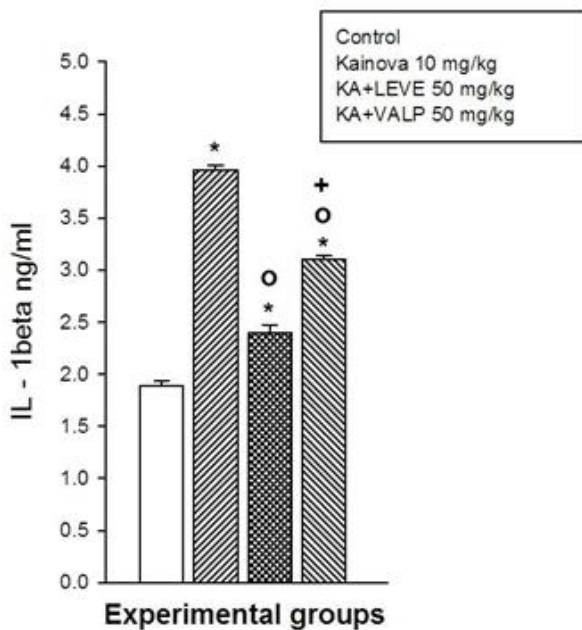
След 72h. за определяне нивата на плазмените проинфламаторни цитокини, животните бяха декапитирани. Нивата на TNF-alfa и IL-1beta в плазмата се определиха по метод ELISA.

Резултати

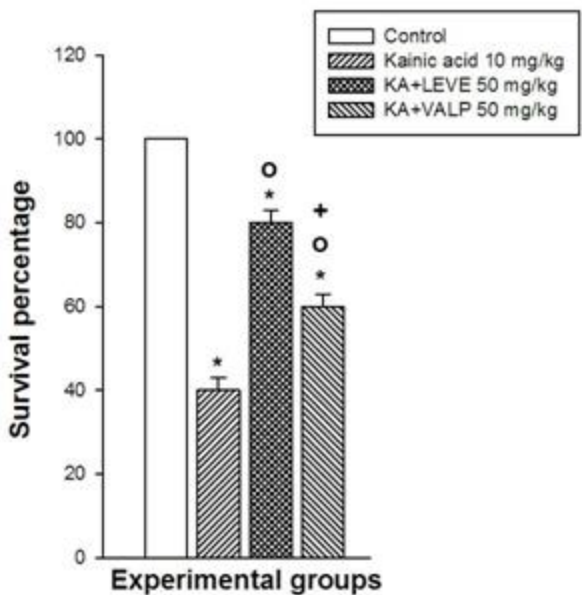
Резултатите са представени на 3 фигури(4, 5, 6) и 1 таблица.



Фигура 4. Ефект на леветирацетам и на валпроева киселина върху плазмени концентрации на TNF-alfa на 20-дневни мъжки плъхчета с експериментална епилепсия. Данните са представени като средна стойност±SEM.*p<0.01 спрямо контролната група; o p<0.01 спрямо kainova 10mg/kg; + p<0.05 спрямо KA+LEVE 50mg/kg.



Фигура 5. Ефект на леветирацетам и на валпроева киселина върху плазмени концентрации на Interleukin-1beta на 20-дневни мъжки плъхчета с експериментална епилепсия. Данните са представени като средна стойност±SEM.* $p < 0.01$ спрямо контролната група; o $p < 0.01$ спрямо kainova 10mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо KA+LEVE 50mg/kg.



Фигура 6. Ефект на леветирацетам и на валпроева киселина върху процента на преживяемост на 20-дневни мъжки плъхчета при каинат-индуцирана

експериментална епилепсия. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. . * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо kainova 10mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо KA+LEVE 50mg/kg.

Табл. 2. Обобщени резултати за епилептогенна активност на каинова киселина и ефекти на леветирацетам и валпроева киселина на полово незрели плъхове.

	C-group (n=6)	KA-group (n=6)	LK-group (n=6)	VK group (n=6)
Grade 0	5	0	0	0
Grade 1	0	0	1	3
Grade 2	0	0	3	2
Grade 3	0	1	1	1
Grade 4	0	2	0	0
Grade 5	0	2	0	0

От резултатите могат да се направят следните изводи за двата изследвани параметъра:

1. Оценка степента и тежестта на гърчовете.

В първата група не се наблюдаваха признаци на епилептична активност. Във втората група животни третирани с каинова киселина се отчете закономерно най-висока степен на гърчова активност, с най-висока нива по скалата на Racine (Табл. 2).

В третата и четвъртата експериментални групи с Levetiracetam и Valproic acid, съответно се наблюдаваха различни нива на епилептична активност (Табл. 2), като и двете фармакологични средства намаляват статистически сигнификантно, спрямо позитивната контрола, степента на гърчова активност ($p < 0.05$). От друга страна се отбелязаха и статистически разлики и между двете експериментални групи, като животните третирани с levetiracetam демонстрират статистически значима разлика спрямо тези третирани с Valproic acid ($P < 0.05$). Резултатите за процента на преживяемост показаха сходни резултати.

2. Определяне нива на проинфламаторни цитокини в плазма.

Нивата на TNF- α и IL-1 β са статически значимо увеличени в групата с каинова киселина в сравнение с контролната група ($p < 0.01$). Експерименталните групи с LEV и VPA имат статистически по-ниски стойности в нивата на двата цитокина. Нивата на двата цитокина в групата с LEV (**Фиг. 4** и **Фиг. 5**), са понижени статистически сигнификантно при сравнение с групата с Valproic acid ($p < 0.05$).

Дискусия

Получените резултати демонстрират, че КА стимулира епилептогенна активност при полово незрели мъжки плъхове и повишава нивата на проинфламаторните цитокини. Тези данни корелират с публикувани изследвания в литературата, които утвърждават моделът на епилепсия с КА, като адекватен за изследване на епилепсията. В допълнение този модел се приема и за изследвания върху неонатална епилепсия.

До момента не са въведени антиепилептични средства, които да повлияват механизмите на епилептогенеза. В настоящето изследване леветирацетам и валпроева киселина бяха прилагани с цел да се тества хипотезата, че антиепилептичната активност на двата медикамента е свързана и с влиянието им върху проинфламаторните цитокини. Получените резултати с LEV и VPA са новост в механизмите на антиепилептична активност на двете фармакологични средства, която е свързана с повлияване на проинфламаторни цитокини в мозък на неонатални плъхове с епилепсия. В настоящето проучване, LEV намалява сигнификантно нивата на TNF- α и IL-1 β ($p < 0.05$). Ефекта на LEV е по-подчертан по отношение на IL-1 β . Установява се статистически значима разлика в сравнение с групата животни третирани с VPA ($p < 0.05$). Резултатите подкрепят хипотезата, че гърчовете в ранния постнатален период водят до повишена експресия на медиаторите на възпалението, които повишават невроналната възбудимост. Редица изследвания показват, че мозъчните проинфламаторни цитокини имат ключова роля в генерирането и подържането на епилептогенна активност (9, 16). Научни факти показват, че IL-1 β има важна роля в появата на невронална клетъчна смърт вследствие на травматични, исхемични или индуцирани от гърчове мозъчни увреди (2, 15). IL-1 β подтиска глутаматния re-uptake от астроцитите, което довежда до повишена екстрацелуларна концентрация на глутамат и усилване на гърчовата активност (4). Тези факти показват, че понижението на IL-1 β от LEV, получено в нашите експерименти, може да има антиепилептогенен ефект и чрез въздействие върху астроглиалната функция.

Ние допускаме, че един потенциален механизъм, чрез който гърчовете в ранна възраст способстват процеса на епилептогенеза е чрез активация на мозъчната микроглията, което от своя страна води до невровъзпаление, повишени

нива на TNF-alpha и IL-1beta и невронална хипервъзбудимост. Може да се допусне, че невровъзпалението отключва механизми на епилептогенеза от момента на първия гърч до момента в който се проявяват рекурентни гърчове. Невровъзпалението има важна роля в този латентен период. Период когато бяха прилагани LEV и VPA. Посоченият факт дава основание да се дискутира новост и за двете лекарствени средства, свързана с неонатална епилепсия и тяхната роля да потиснат провъзпалителни цитокини и развиващото се прогресивно невровъзпаление в резултат на първоначалното увреждащо събитие.

В заключение, гърчовете в ранния период от живота усилват активацията на глията и водят до повишено отделяне на проинфламаторни цитокини. Предполага се, че това отключва хода на епилептогенеза. От момента на първичното увреждащо събитие, до появата на спонтанни рекурентни гърчове в по-късни етапи от живота има латентен период. Ние допускаме, че леветирацетам, приложен в този критичен период може да окаже антиепилептогенен и болест-модифициращ ефект. Резултатите от настоящето изследване подкрепят ролята на невровъзпалението в патогенезата на епилепсията и очертават нова терапевтична стратегия в фармакотерапията на епилепсията в детска възраст.

4.2. Проучване на антиепилептогенните ефекти на кетогенната диета при неонатален пилокарпинов модел на епилепсия.

Резистентната на лекарствено лечение епилепсия остава сериозен медицински проблем. Въпреки големия брой антиепилептични лекарства при 30% от пациентите има неефективен контрол на гърчовете. Нисковъгледхидратната или кетогенна диета (КД) се използва като средство за лечение на фармакорезистентна епилепсия при деца и в някои случаи напълно премахва необходимостта от прилагане на лекарства. Въпреки големия интерес в изучаване механизмите на антиепилептично действие на КД, тя все още остава загадка. Няма данни в литературата относно ефектите на КД върху невровъзпалението и нивата на проинфламаторните цитокини при различна продължителност на прилагане на диетата. Цел на изследването е определяне на ефектите на КД, при различна продължителност на прилагане, върху тежестта на гърчовете при пилокарпинов модел на епилепсия.

Експериментален дизайн

Опитите бяха извършени върху 4 групи полово незрели мъжки плъхове (възраст 21 дни), с начално тегло 40-60 грама. Животните бяха донесени на 9 постнатален ден (P9) и бяха заедно с майките до 16 постнатален ден (P16). След отбиването им те бяха поставени в индивидуални клетки със свободен достъп до нормалната лабораторна диета и вода.

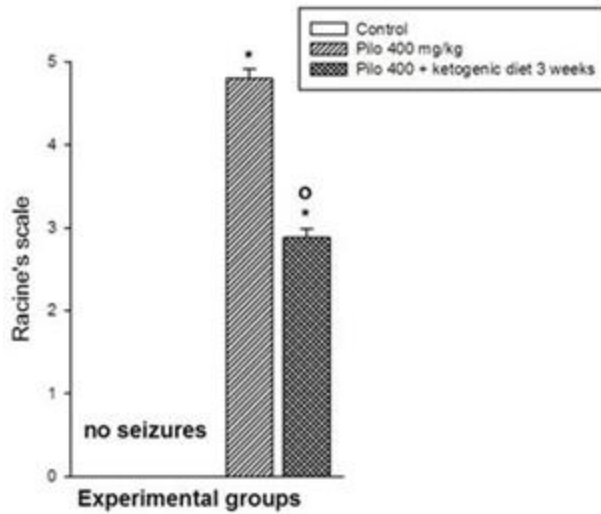
На следващия етап всички животни бяха подложени на гладуване в течение на 8 h., преди започване на експеримента с нормална или кетогенната диети. Използвани бяха два хранителни продукта – стандартна диета и фармацевтичния кетогенен продукт – Ketogen (Briogen, България) – със съдържание на мазнини към въглехидрати 4:1.

Животните бяха разделени по 6 (n=6) в група и третирани както следва:

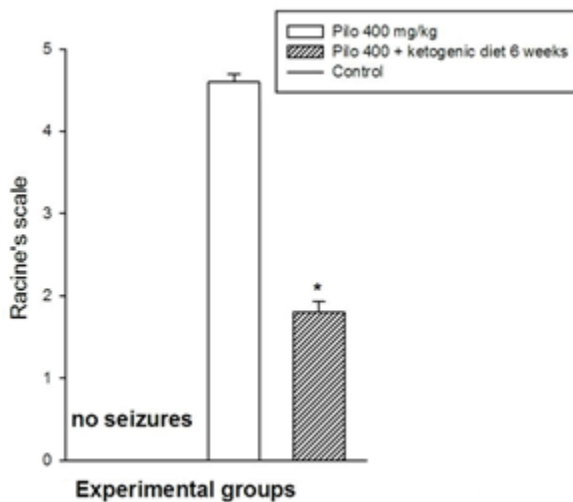
- 1) Първа група: **контролна** – ежедневен достъп до стандартната диета (пелети) за гризачи и вода ad libitum.
- 2) Втора група-**позитивна контрола**. Ежедневен достъп до стандартна диета (пелети) за гризачи и вода ad libitum. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид, i.p. (400 мг/кг).
- 3) Трета група: **експериментална** – Ежедневен достъп до кетогенна диета, в продължение на **3 седмици**, и вода ad libitum. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид, i.p. (400 мг/кг).
- 4) Четвърта група: **експериментална** – ежедневен достъп до кетогенна диета, в продължение на **6 седмици**, и вода ad libitum. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид, i.p. (400 мг/кг).
- 5) Пета група: **експериментална** – ежедневен достъп до кетогенна диета, в продължение на **9 седмици**, и вода ad libitum. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид, i.p. (400 мг/кг).

След прилагането на диетите в посочените период, всяка от изследваните групи бяха третирани i.p. Pilocarpine hydrochloride – 400 mg/kg. 30 мин. преди прилагането на пилокарпина, животните бяха третирани с Scopolamine (1 mg/kg, s.c), с цел подтискане на периферните холинергични ефекти на пилокарпина.

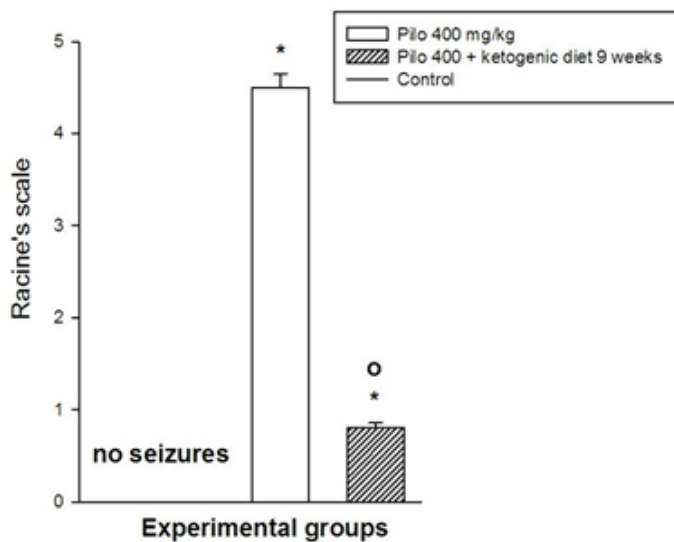
Резултатите за епилептогенна активност са представени на 4 фигури (**7, 8, 9, 10**):



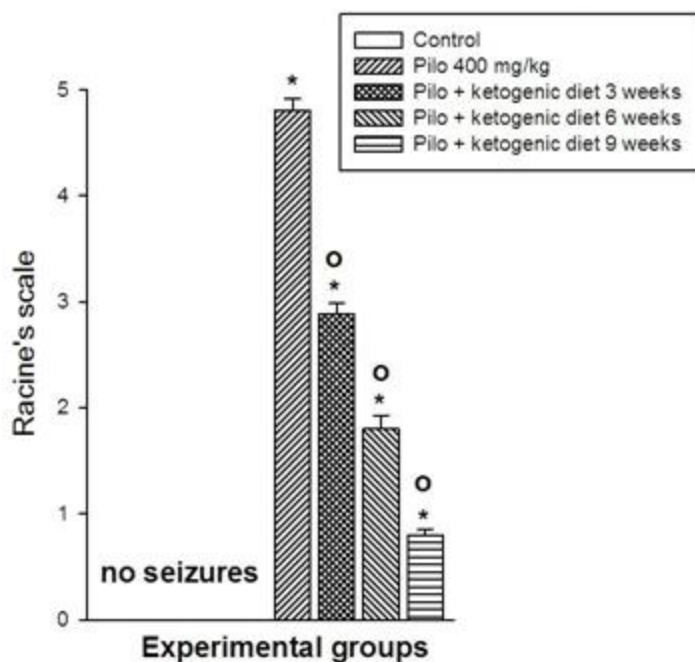
Фигура 7. Епилептогенни ефекти на Pilosarpine след триседмично прилагане на кетогенна диета. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $o < 0.05$ спрямо позитивната контролна група PILO 400mg/kg.



Фигура 8. Епилептогенни ефекти на Pilosarpine след шестседмично прилагане на кетогенна диета. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $o < 0.05$ спрямо позитивната контролна група PILO 400mg/kg.



Фигура 9. Епилептогенни ефекти на *Pilocarpine* след деветседмично прилагане на кетогенна диета. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $o < 0.05$ спрямо позитивната контролна група PILO 400mg/kg.



Фигура 10. Сравнение на антиконвулсивните ефекти на кетогенната диета по скалата на Racine, след 3, 6 и 9 седмично приемане при половозрели мъжки

плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. * $p < 0.05$ спрямо негативната контролната група; $o < 0.05$ спрямо позитивната контролна група PLO 400mg/kg.

Оценка степента и тежестта на гърчовете:

1. В първата, контролна група не се отчете епилептична активност.
2. Във втората, третата и четвъртата експериментални групи се наблюдава прогресивно намаляване на тежестта на гърчовете, съответно от 2,8 до 0,9 по използваната скала на Racine.

Резултати

Резултатите, представени на трите фигури показват ефект на кетогенната диета в динамика върху епилептогенната активност на пилокарпин. Отчита се време/ефект зависимост на кетогенната диета, като най-значим е инхибиращия ефект на диетата след 9 седмици приложение на неонатални плъхове върху гърчовете, предизвикани с пилокарпин (**Фиг. 7, 8, 9, 10**).

Дискусия

Кетогенната диета е нефармакологично средство, прилагано успешно в терапията на голям брой заболявания, включително тези на ЦНС. Нейните ефекти се дискутират в няколко направления и въпреки съобщените в литературния анализ факти за антиепилептично действие на кетонни тела, оскъдни до липсващи са данните за ефекта на кетогенната диета върху невровъзпаление при неонатална епилепсия. В нашите експерименти отчитаме потискане на епилептогенната активност, което може да се дължи, както на промени в нивото на АТФ, така и на повлияване K-atp клетъчни канали свързани с утилизация на глюкоза. Независимо от многобройните теории механизма на КД остава неизяснен.

Експериментални и клинични наблюдения показват, че повишените плазмени нива на кетони и понижените на глюкоза са индикатори за ефективността на КД. В нашето изследване обаче, установихме, че въпреки увеличените нива на кетонни тела и намалените на глюкоза на 3-тата седмица от прилагане на диетата, антиепилептичният ефект на тази група животни не е така изразен както в групите с 6 и 9-седмично прилагане. Тези резултати ни дават основание да предполагаваме, че променените нива на кетони и глюкоза не са надежден маркер за антиконвулсивния ефект на КД.

Нашите данни показват, че в допълнение към антиконвулсивния си ефект, КД редуцира сигнификантно и показателите на невровъзпалението при експерименталните животни. Това ни дава основание да предполагаме, че антиинфламаторния ефект на кетогенната диета е най-важния фактор обясняващ антиконвулсивните, а вероятно и антиепилептогенните ефекти на диетата. Има различни възможности обясняващи това. Първо, кетонния метаболизъм намалява продукцията на свободни радикали (11, 16), за които е известно, че спомагат за възпалението. От друга страна аденозина, който се образува при прилагане на диетата, чрез взаимодействие с A1 и A2 рецептори супресира възпалението в много тъкани (12, 25). Полиненаситените мастни киселини в КД активират PPAR, а това довежда до инхибиране на транскрипционните фактори NF- κ B и AP-1, които са и транскрипционни фактори за много проинфламаторни цитокини. Освен този факт, общото ограничение в приема на протеини при прилагане на КД има антиинфламаторен ефект (7, 9). Калорийната рестрикция има също антиинфламаторни ефекти (13).

Високото процентно съдържание на мазнини в кетогенната диета довежда до активиране на нуклеарния рецептор PPAR. Тези нуклеарни рецептори се свързват с дълговерижните полиненаситени мастни киселини, което довежда до засилване на липидния метаболизъм. В експериментални животни с knockout за гена на PPAR-рецептора довежда до стимулиране на инфламаторните реакции (6), докато PPAR-агонистите редуцират експериментално индуцираното възпаление (15). Този ефект е съпроводен подтисната транскрипция гени за проинфламаторни цитокини, като гените за TNF- α и IL-1 β . Ефекти, които се стимулират след прилагане на КД. Описаните ефекти подкрепят тезата, че КД с своето високомастно съдържание притежава антиинфламаторни свойства.

Изложените факти и резултатите от настоящето проучване ни дават основание да предположиме, че един от основните механизми на КД се свързва с антиинфламаторното и действие, което от своя страна е в основата на антиконвулсивните а вероятно и антиепилептогенни ефекти на диетата.

Обобщавайки може да заключим, че КД оказва терапевтичния си ефект след 6 до 9 седмици. Нашата хипотеза е, че този период е необходим за дълбоки промени в транскрипцията на гени за много проинфламаторни цитокини.

Изследванията в раздел с нефармакологични средства – кетогенна диета, са нови в проучванията на неонаталната епилепсия и очертават съвременна стратегия за лечение на епилептични гърчове при новородени и деца.

4.3. Проучване влиянието на розувастатин върху епилептогенната активност и невровъзпалението при пилокарпинов експериментален модел на епилепсия на мъжки полово незрели плъхове.

Статините са утвърдени лекарства за лечение на хиперлипидемии. Има данни, че те повлияват метаболизма на мозъчните клетки. Целта на настоящото проучване е да се изследва в експеримент ефекта на розувастатин върху епилептогенната активност на пилокарпин и невровъзпаление в мозък на мъжки полово незрели плъхове.

Експериментален дизайн

Опитните животни на възраст 20 дни бяха разделени в 4 групи по 6 животни в група (n=6):

1-ва **контролна** – еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид, i.p. (400 мг/кг).

2-ра група–**експериментална 1** с Розувастатин (10 мг/кг). Животните бяха третирани през устата през сонда в продължение на 7 дни преди инжектиране с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг).

3-та–**експериментална 2** с Розувастатин (20 мг/кг). Животните бяха третирани през устата през сонда в продължение на 7 дни преди инжектиране с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг).

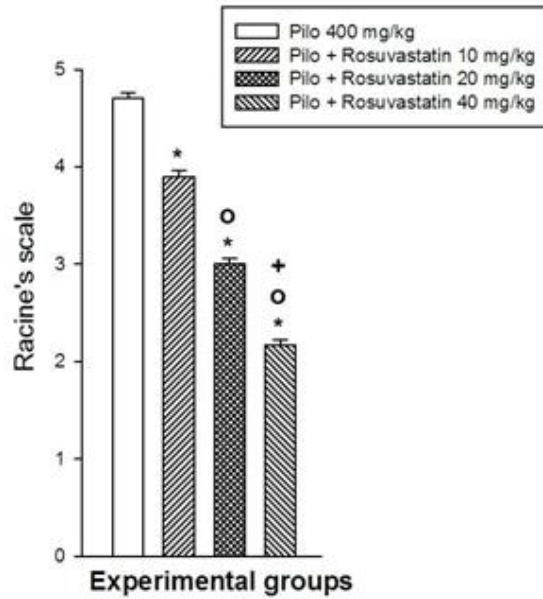
4-та–**експериментална 3** с Розувастатин (40 мг/кг). Животните бяха третирани през устата през сонда в продължение на 7 дни преди инжектиране с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг).

На седмия ден животните от двете групи бяха третирани с пилокарпин (400мг/кг, i.p.). Отчетени бяха показателите:

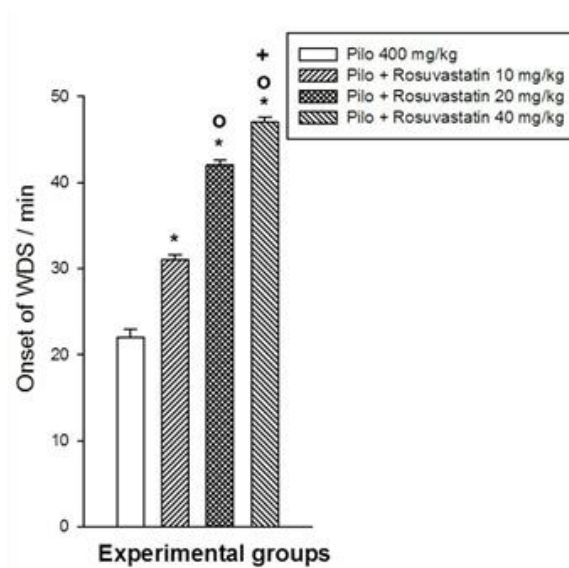
- степен и тежест на гърчове по скалата на Racine.
- времето до поява на първите WDS.
- броя на WDS.
- латентност до поява на първите гърчове.
- процента на преживяемост.

Резултати

Резултатите са представени на 4 фигури (11, 12, 13, 14) и таблица 3.

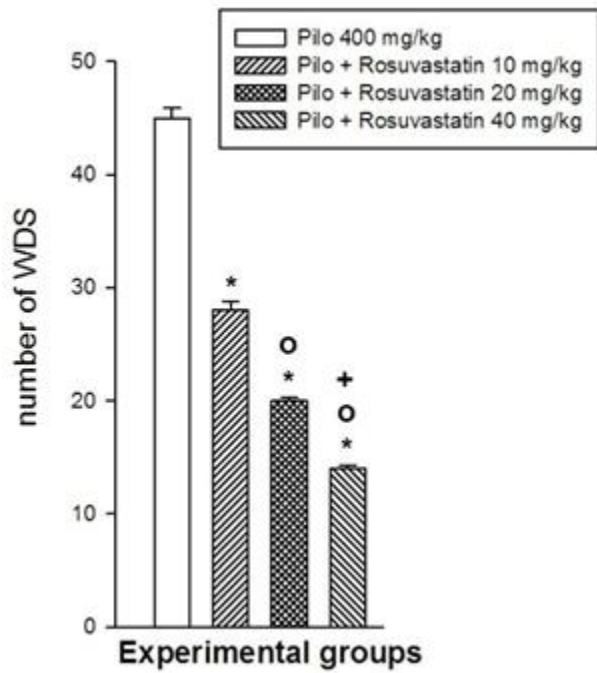


Фигура 11. Ефект на 7-дневно прилагане на Розувастатин върху степента на епилептична активност, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.

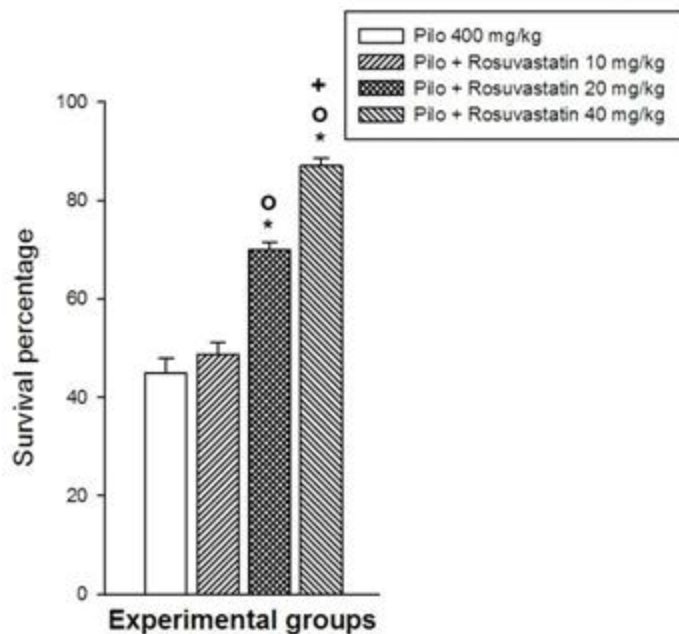


Фигура 12. Ефект на 7-дневно прилагане на Розувастатин върху началото на поява на “wet dog shake”, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово

незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. . * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.



Фигура 13. Ефект на 7-дневно прилагане на Розувастатин върху броя на “wet dog shake”, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. . * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.



Фигура 14. Ефект на 7-дневно прилагане на Розувастатин върху процента на преживяемост, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.

Резултати

Резултатите от изследването показаха антиепилептична активност на розувастатин в няколко параметра отчитащи гърчова активност. След прилагане, лекарството понижава статистически сигнификантно, до 3-та степен скората по скалата на Racine (фиг.11). Намалени са значимо, както броя, така и началото на поява на т.нар. „wet dog shakes” (фиг. 12, 13). Този тип движения са характерни за бозайниците, но те се получават и при фармакологични въздействия, както в настоящия експеримент. В скалата на Racine те се появяват в 1-вата степен, заедно с фациалните автоматизми. Друг показател за епилептична активност, който бе изследван бе латентност до появата на първия гърч. Бе установено, че розувастатин удължава статистически значимо ($p < 0.05$) и доза/зависимо и този параметър. По отношение на показателя процент на преживяемост бе установено, че в експерименталната група животни третирани с най-ниската доза розувастатин, 10 мг/ кг не се установява статистически значима разлика в този показател, спрямо контролната група ($p > 0.05$). В групите третирани с 20 мг/кг и 40 мг/кг се доказаха

статистически значима степен на увеличение в процента на преживелите животни. Най-сигнификантен е ефекта в групата животни с най-висока доза статин.

Дискусия

Статините са утвърдени средства за понижаване на серумния холестерол и превенция на сърдечно съдови заболявания. Голям брой научни факти доказват ефекта на статините в терапията на невродегенеративни болести и мозъчни травми.

Статините са конкуритивни инхибитори на HMG-CoA редуктазата, която е скоростлимитиращ ензим в синтеза на холестерола и изопреноидите. Изследвания свързват тези механизъм на статините с инхибиращия им ефект върху функциите на NMDA-рецепторите и свързания с това антиепилептичен ефект (26, 29). Установява се, че статините имат NMDA-антагонистични ефекти, което би могло да даде обяснение за антиепилептичните и невропротективните им свойства (27).

Получените в експеримента резултати показват, че те имат ефект и при епилепсия. Това може да се дискутира в няколко направления: Първо, доказано е, че тези лекарства активират различни невропротективни сигнални пътища. В изследвания на Zacco et al.(8) се установява, статините превръщат миши първични кортикални неврони в по-резистентни на възбудни стимули по холестерол-зависим механизъм. Тези ефекти на статините се свързват с способността им да блокират HMG-CoA редуктазата (15). Второ, антиконвулсивния им ефект би могло да се свърже с техните противовъзпалителни свойства. Предполага се, че тези ефекти са определящ фактор за невропротективните и свързаните с тях антиконвулсивни ефекти на статините. Трето, освен с ефекти върху невровъзпаление, антиепилептичния ефект на розувастатин би могъл да се свърже и с влияние върху AMPA-рецепторите и евентуална дестабилизация на богатите с холестерол мембрани в структурата на AMPA-рецепторите.

Данните от изследването подкрепят възможността за използване на розувастатин като невропротективно средство, забавящо прогресията на епилептогенезата и като нова терапевтична стратегия при заболяването.

4.4. Проучване влиянието на винпоцетин при пилокарпинов експериментален модел на епилепсия на мъжки полове незрели плъхове.

Vinprocetine е ноотропен лекарствен продукт от растителен произход, внедрен и прилаган широко в клиничната практиката. Той притежава благоприятни ефекти върху редица неврологични и мозъчносъдови заболявания. Съвременни научни факти показват, че на клетъчно ниво това фармакологично средство

повлиява системата на цАМФ чрез инхибиция на фосфодиестераза 1 (PDE1). Посоченият механизъм стимулира проучвания нови средства, модулиращи клетъчната система на цАМФ. Vinprocetin е също така и мощен блокер на волтаж-зависимите натриеви канали. По този начин той подтиска интрацелуларното покачване на Na⁺ и Ca²⁺ йони, както и глутаматната екзоцитоза в хипокампалните неврони.

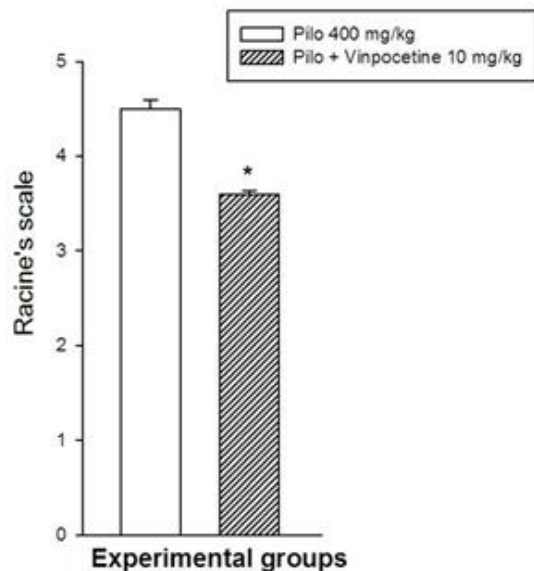
Разработването на средства подтискащи патогенезта на епилепсията е от ключово значение. Освен посочените по-горе механизми в действието на Vinprocetin, се предполагат и действие върху невровъзпалението и влияния по този начин върху патогенетичния ход на болеста.

Цел на настоящото проучване е да се определят ефектите на vinprocetin върху епилептогенната активност на пилокарпин и невровъзпалението в мозък на мъжки полово незрели плъхове

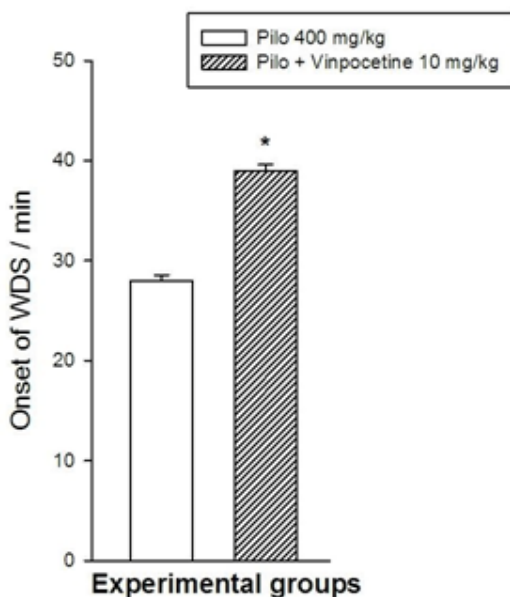
Експериментален дизайн

Опитите бяха извършени върху **2 групи** мъжки новородени плъхчета на възраст 21 дни, по 6 животни в група (n=6), които бяха третирани per os с разтвор на Vinprocetin 20 мг/кг в продължение на 7 дни. Контролните животни бяха третирани с физиологичен разтвор за 7 дни. На 7 ден и двете групи животни бяха инжектирани еднократно с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг) 30 мин. след приложение на скополамин. За период от 2h. се отчитаха епилептогенната активност на животните по скалата на Racine, както и начало и брой на WDS.

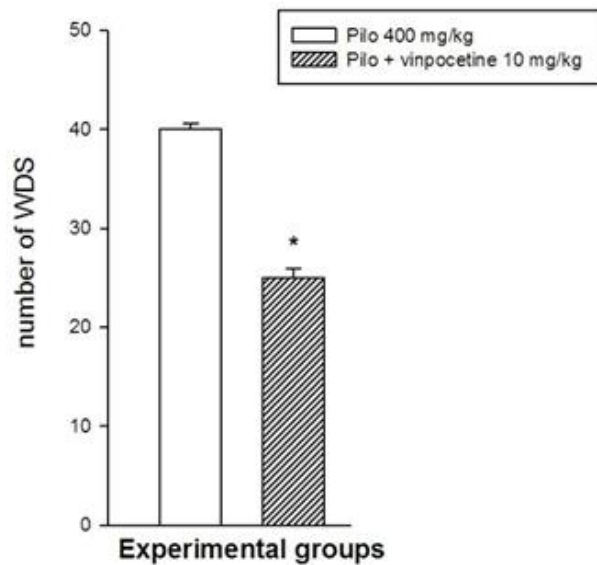
Резултатите са представени на 4 фигури (**15, 16, 17, 18**).



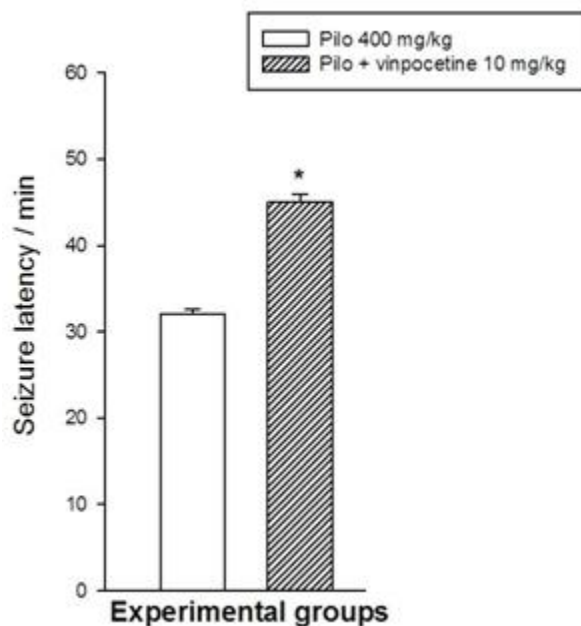
Фигура 15. Ефект на 7-дневно прилагане на Винпоцетин върху степента на епилептична активност, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.



Фигура 16. Ефект на 7-дневно прилагане на Винпоцетин върху началото на поява на “wet dog shake”, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.



Фигура 17. Ефект на 7-дневно прилагане на Винпоцетин върху броя на “wet dog shake”, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.



Фигура 18. Ефект на 7-дневно прилагане на Винпоцетин върху латентността на гърчовете, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки

плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. * $p<0.05$ спрямо контролната група.

Резултати

В изследването бяха получени резултати показващи, че vinprocetine понижава статистически сигнификантно параметрите за гърчова активност–степени по скалата на Racine, брой и начало на поява на “wet dog shakes”, както и удължаване латентността на първия гърч ($p<0.05$).

Дискусия

Vinprocetine е широко прилагано средство с вазодилатативно и ноотропно действие. Ефекта му се свързва обикновено с блокиране на волтаж-зависимите Na-канални, както и с инхибиране на PDE1. Vinprocetine е създаден, чрез модификация в структурата на алкалоида винкамин, получен от растението *Vinca minor*. Той е широко използван за превенция на мозъчно-съдови заболявания и когнитивни нарушения.

В последното десетилетие в патогенезата на епилепсията се дискутира и ролята на имунитета и невровъзпалението. Експериментира се прилагане на антиинфламаторни средства с цел повлияване патогенезата на тези заболявания. Дълготрайното прилагане на глюкокортикоостероиди или инхибитори на COX се свързва обаче с много странични ефекти. В проучвания на Jeon et al. (2) се установява, че vinprocetine, познат с високия си профил на безопасност и минимални странични ефекти, притежава и мощни противовъзпалителни свойства. В проучвания (2) се доказва, че vinprocetine редуцира транскрипцията на NF- κ B. Този транскрипционен фактор е ключов в синтеза на про-инфламаторни цитокини, като TNF- α и IL-1 β . В допълнение RT-PCR анализ показва, че vinprocetine редуцира също TNF- α индуцираната експресия на mRNA за IL-1 β . Поради факта, че посочените проинфламаторни цитокини усилват невроналната възбудимост, може да се предполага, че получените в нашия експеримент ефекти на vinprocetine върху гърчовете, могат да се свържат с описаните антиинфламаторни ефекти на лекарството.

По отношение на молекулярните механизми в антиинфламаторните ефекти на vinprocetine, се очертават няколко обяснения. Първо, проучванията показват, че фосфодиестеразите, чрез регулация на цАМФ и цГМФ регулират възпалителните отговори. Инхибиращото действие на vinprocetine върху фосфодиестераза 1 се свързва с антиинфламаторните му ефекти. Повлиявайки системата на цАМФ, vinprocetine инхибира NF- κ B-зависимите инфламаторни отговори. Второ, в

последните години се установява, че подтискането на NF-kB-сигнализацията не е свързана с инхибирането на фосфодиестераза 1 (18). По-скоро инхибиращото действие на vinpocetine върху ИКК-киназата повлиява активността на NF-kB и по този начин транскрипцията на проинфламаторните цитокини TNF-alfa и IL-1beta. Както беше описано по-горе, доказано е, че те усилват невроналната възбудимост и появата на гърчове.

Получените в експеримента резултати доказват изразени антиепилептични ефекти на vinpocetine. Научните доказателства, че невровъзпалението е водещо в епилептогенезата, дават основание да предположиме, че антиконвулсивните ефекти на vinpocetine са свързани с неговите антиинфламаторни свойства. Това е основа за бъдещи проучвания, за изясняване доколко изброените по-горе механизми имат водещо значение за антиепилептичната му активност. Може да се приеме, че vinpocetine може да се прилага заедно с конвенционалните антиепилептични лекарства с цел потенциране на ефектите им и влияние върху епилептогенезата.

4.5. Синергични ефекти на доксициклини и целекоксиб при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия на плъхове.

Съвременните изследвания в областта на епилепсията все повече се насочват към противовъзпалителни и имуносупресивни лекарства за лечение и превенция на епилепсията. Доказва се, че някои антибиотици, като доксициклин освен антибактериални свойства притежава и имуномодулиращи ефекти. От друга страна е установено, че COX-2 регулира възбудимостта на клетъчните мембрани в хипокампуса, което подсказва ролята и в генерирането на гърчове. Цел на настоящето проучване е изследване на самостоятелното и комбинирано прилагане на доксициклин и целекоксиб върху епилептогенната активност и нивата на проинфламаторни цитокини в серум на половно незрели плъхове при пилокарпинов модел на епилепсия.

Експериментален дизайн

Опитите бяха извършени върху 4 групи половно незрели мъжки плъхове (възраст 20 дни) с начално тегло 30-50грама. Животните бяха разделени в 4 групи по 6 в група (n=6):

1) Първа група-**позитивна контрола**. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг).

2) Втора група-експериментална 1. Третиране в продължение на 7 дни перорално с сонда с доксициклин (20 мг/кг). На 7 ден, 30 мин. след последната апликация на доксициклин, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

3) Трета група-експериментална 2. Третиране в продължение на 7 дни перорално с сонда с целекоксиб (10 мг/кг). На 7 ден, 30 мин. след последната апликация на доксициклин животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

4) Четвърта група-експериментална 3. Третиране в продължение на 7 дни перорално последователно със сонда с доксициклин (10 мг/кг) и целекоксиб (20 мг/кг). На 7 ден, 30 мин. след последната апликация на двете лекарства, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

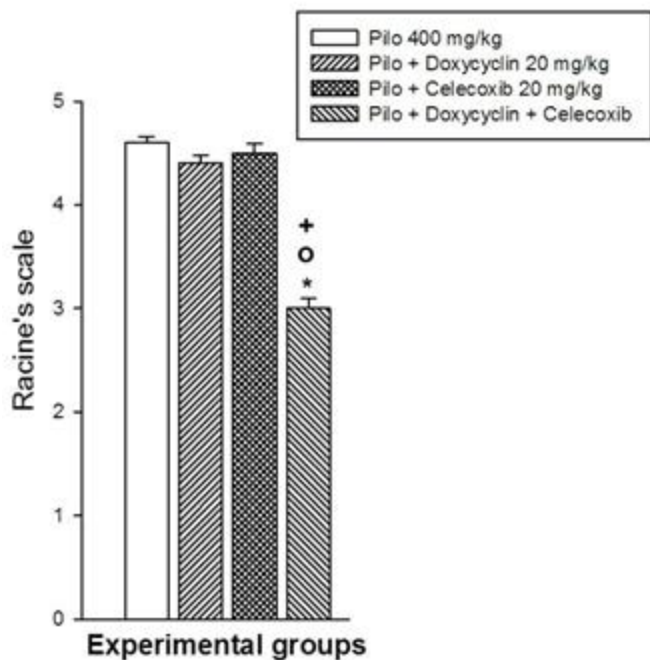
След 72h. за определяне нивата на плазмените проинфламаторни цитокини, животните бяха декапитирани. Незабавно беше взета кръв. Нивата на TNF-alfa и IL-1beta в плазмата се определиха по метод ELISA.

Резултати

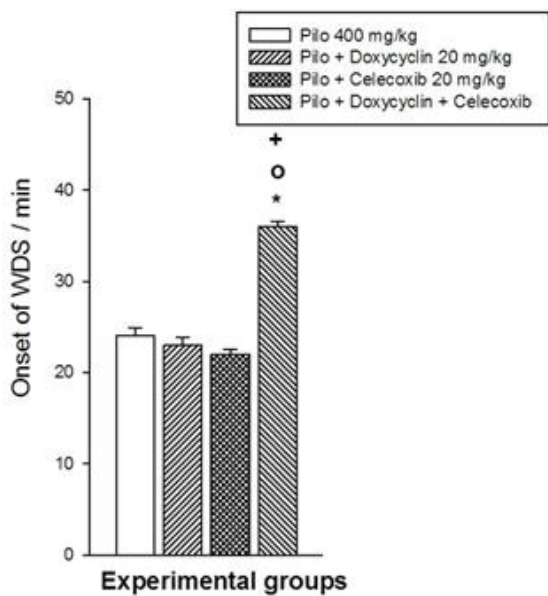
За период от 3h. бяха проследени показатели за епилептогенна активност по скалата на Racine, като и началото на поява на WDS. Бяха отчетени следните резултати:

В групата с прилагане само на пилокарпин (позитивна контролна група) се отчете закономерно висока степен на епилептична активност. В експериментална група 1, с прилагане на доксициклин се отчете инсигнификантно намаление на епилептогенната активност в сравнение позитивната контрола ($P > 0.05$). В експериментална група 2 с прилагане на целекоксиб също беше отчетено инсигнификантно намаление на епилептичната активност в сравнение с позитивната контрола ($p > 0.05$). Разликите между група 1 и група 2 бяха инсигнификантни ($p > 0.05$). В експериментална група 3, комбинирано прилагане на доксициклин и целекоксиб беше отчетено статистически сигнификантно намаление на скората по скалата на Рейсин, при сравнение с позитивната контролна група ($p < 0.05$).

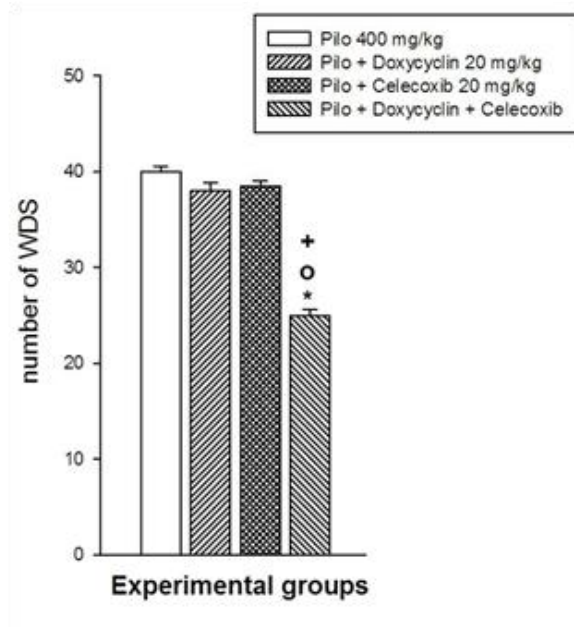
Резултатите за представени на 4 фигури (19, 20, 21, 22) и 1 таблица.



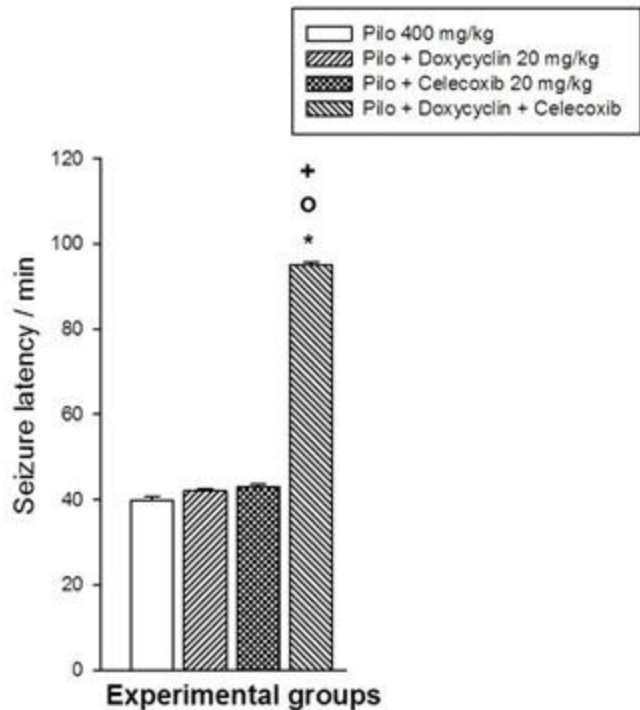
Фигура 19. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Доксициклин и Целекоксиб върху степента на епилептична активност, при пилокарпинов модел на епилепсия на половно незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. .* p <0.05 спрямо контролната група; o p <0.05 спрямо PULO 400+ Дохусуcline 20mg/kg; + p <0.05 спрямо PULO + Celecoxib 20mg/kg.



Фигура 20. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Доксициклин и Целекоксиб върху началото на поява на WDS, при пилокарпинов модел на епилепсия на полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо PILO 400+ Doxycycline 20mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо PILO + Celecoxib 20mg/kg.



Фигура 21. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Доксициклин и Целекоксиб върху броя на WDS, при пилокарпинов модел на епилепсия на полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо PILO 400+ Doxycycline 20mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо PILO + Celecoxib 20mg/kg.



Фигура 22. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Доксициклин и Целекоксиб върху латентността на гърчовете, при пилокарпинов модел на епилепсия на полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; o $p < 0.05$ спрямо Pilo 400+ Doxycycline 20mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо Pilo + Celecoxib 20mg/kg.

Табл. 3. Резултати от определяне влиянието на доксициклин, целекоксиб или комбинацията от доксициклин+целекоксиб върху повишените от пилокарпин концентрации на IL-1 beta в кръв на експериментални животни. IL-1 beta е определян с помощта на ELISA IL-1 beta за плъхове на BioVendor. Измерванията са представени като (OD). Статистически са обработени и представени като mean \pm S.E.M. Сравнението между групите е направено с помощта на one-way analysis of variance (ANOVA). Представени са в таблица 3. Представено е и нивото на статистическите значимости между групите (P). Брой на животни в група = 6.

Група	ELISA IL-1 beta (OD)	Показател „P” за статистическа значимост
1. Контролна с пилокарпин	0.057 + 0.006	
2. Опитна-пилокарпин и доксициклин	0.0484 + 0.008	Няма статистическа значимост
3. Опитна-пилокарпин и целекоксиб	0.0439 + 0.009	P<0.01 в сравнение с контролна група #1
4. Опитна-пилокарпин и комбинация от доксициклин+целекоксиб	0.0335 + 0.003	P< 0.001 в сравнение с група # 1 P<0.001 в сравнение с група #2 P<0.001 в сравнение с група #3

Заклучение: Резултатите от изследванията върху IL-1 beta показват ефекта от самостоятелното прилагане на целекоксиб и доксициклин, както и най-сигнификантното инхибиращо влияние на комбинацията от доксициклин + целекоксиб върху повишените плазмени нива на IL-1 beta. Допускаме потенциране на действието на целекоксиб от доксициклин, върху нивата на проинфламаторни цитокини и възпалителните механизми на епилепсията.

Дискусия

Една от съвременните цели в терапията на епилепсията е насочена не само към контрол над гърчовата активност, но и към повлияване на епилептогенезата.

Контрола над гърчовата активност е фокусиран основно върху супресия на епилептичната активност, когато вече епилепсията е проявена. АЕЛ до голяма степен подобряват живота на пациентите, но въвеждането на средства които подтискат патогенетичния ход на епилепсията и подобряват прогнозата е все още въпрос на бъдещи проучвания. Голям брой АЕЛ са изпитвани в клинични и предклинични изпитания с цел доказване на антиепилептогенните им качества, но до момента няма регистриран медикамент с подобни качества.

Голям брой научни факти показват, връзката между имунната система и епилепсията. Предполага се, че патогенезата на епилепсията е свързан с нарушение на имунната система в ЦНС и съпътстващо невровъзпаление.

Настоящото изследване е първото, което проучва ефекта от комбинираното прилагане на два медикамента с антиинфламаторни свойства. Ние прилягаме

лекарства, които повлияват два различни инфламаторни пътища, цел да установим дали в резултат на епилептогенна активност се активират многобройни молекулярни пътища свързани с невровъзпалението. Клинично важното послание от нашето изследване е, че макар да съществуват доказателства, че в резултат на гърчовата активност се активират многобройни инфламаторни пътища, само специфична комбинация от лекарства може да окаже терапевтичен ефект. Освен това, дадена антиинфламаторна комбинация би могла да се прилагала в ограничен период от време, за разлика от дълготрайната апликация на АЕЛ, за които са характерни сериозни нежелани ефекти.

4.6. Сравнително проучване ефектите на ибупрофен и целекоксиб върху епилептогенната активност при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия на плъхове.

С разкриването ролята на невровъзпалението, като ключов фактор в патогенезата на епилепсията, се установява, че епилептичната активност активира голям брой проинфламаторни сигнални пътища. В последните години активно се дискутира ролята на СОХ в епилептогенезата и генерирането на гърчове. Двете изоформи на СОХ-СОХ-1 и СОХ-2 са основен таргет на голям брой НСПВС. СОХ-2 е преобладаващата изоформа, експресирана в мозъка (Takemiya et al., 2007). Въпреки фактите подкрепящи ролята на СОХ невроналната възбудимост, не е напълно изяснено, коя от двете изоформи има по-важно значение в патогенезата на епилепсията. Цел на настоящето проучване е сравняване ефектите на селективния СОХ-2 инхибитор, целекоксиб и неселективния СОХ-1/СОХ-2 инхибитор, ибупрофен върху параметри на епилептогенна активност и нива на проинфламаторни цитокини в серум на плъхове. Използван бе експериментален пилокарпинов модел на епилепсия. Опитите бяха извършени върху половонезрели мъжки плъхове, разделени на 5 групи, всяка съдържаща 6 животни в група.

Експериментален дизайн

Опитите бяха извършени върху 5 групи полово незрели мъжки плъхове (възраст 21 дни) с начално тегло 40-60 грама. Животните бяха разделени в 5 групи по 6 в група (n=6):

- 1) Първа група-**негативна контрола** без епилепсия. Третиране в продължение на 10 дни с физиологичен разтвор, i.p. в обем 0,1 мл/100г. тегло.
- 2) Втора група-**позитивна контрола**. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг).

3) Трета група-експериментална **1**. Третиране в продължение на 10 дни перорално с сонда с ибупрофен (20 мг/кг). На 10 ден, 30 мин. след последната апликация на ибупрофен, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

4) Четвърта група-експериментална **2**. Третиране в продължение на 10 дни перорално с сонда с ибурофен (40 мг/кг). На 10 ден, 30 мин. след последната апликация на ибупрофен животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

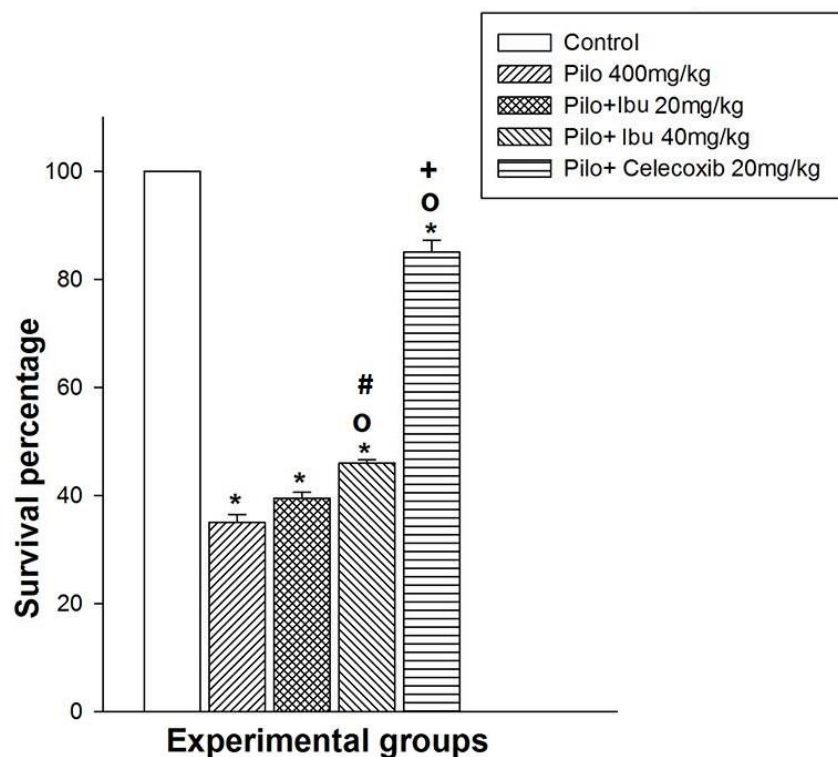
5) Пета група-експериментална **3**. Третиране в продължение на 10 дни перорално последователно със сонда с целекоксиб (20 мг/кг). На 10 ден, 30 мин. след последната апликация на целекоксиб, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

Резултати

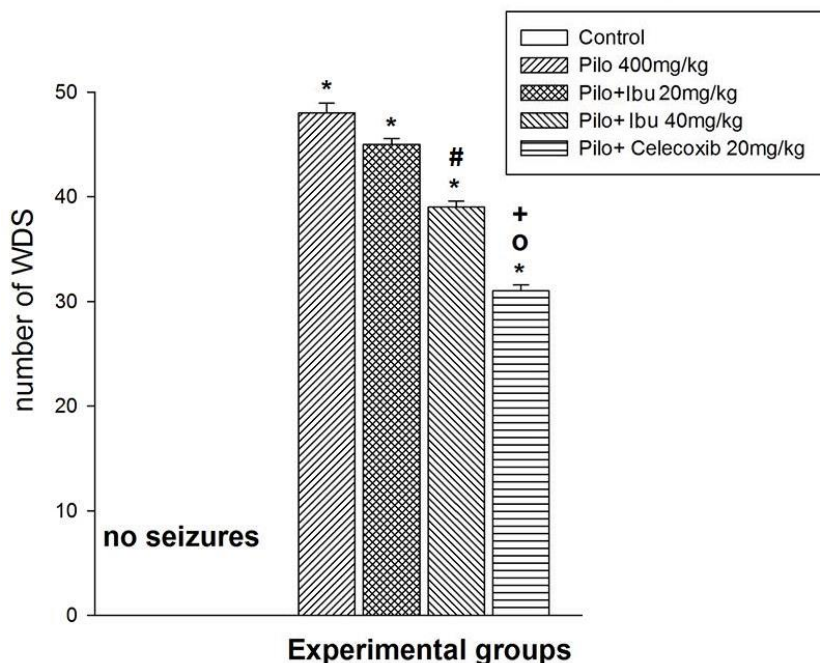
За период от 3h. след прилагането на пилокарпин бяха отчитани показатели за епилептогенна активност: степени на гърчова активност по скалата на Racine, брой на WDS и процент на преживяемост. Бяха отчетени следните резултати:

В групата с прилагане само на пилокарпин (позитивна контролна група) се отчете закономерно най-висока висока степен на епилептична активност-статистически значима спрямо негативната контролна група ($p < 0.05$). В експериментална група 1, с прилагане на ибупрофен (20мг/кг) се отчете инсигнификантно намаление на епилептогенната активност в сравнение позитивната контрола ($P > 0.05$). В експериментална група 2 с прилагане на ибупрофен (40мг/кг) също беше отчетено намаляване на епилептогенната активност, но без достигане на статистически сигнификантни стойности в сравнение с позитивната контрола ($p > 0.05$). От друга страна беше установена статистически значима разлика между експериментални група 1 и група 2 ($p < 0.05$). В експериментална група 3, прилагането на целекоксиб (20мг/кг) беше отчетено статистически сигнификантно намаление на скората по скалата на Рейсин, броя на WDS и процента на преживяемост при сравнение с позитивната контролна група ($p < 0.05$). Освен това, резултатите в тази група показаха и статистически сигнификантна разлика и спрямо експериментални групи 1 и 2 ($p < 0.05$).

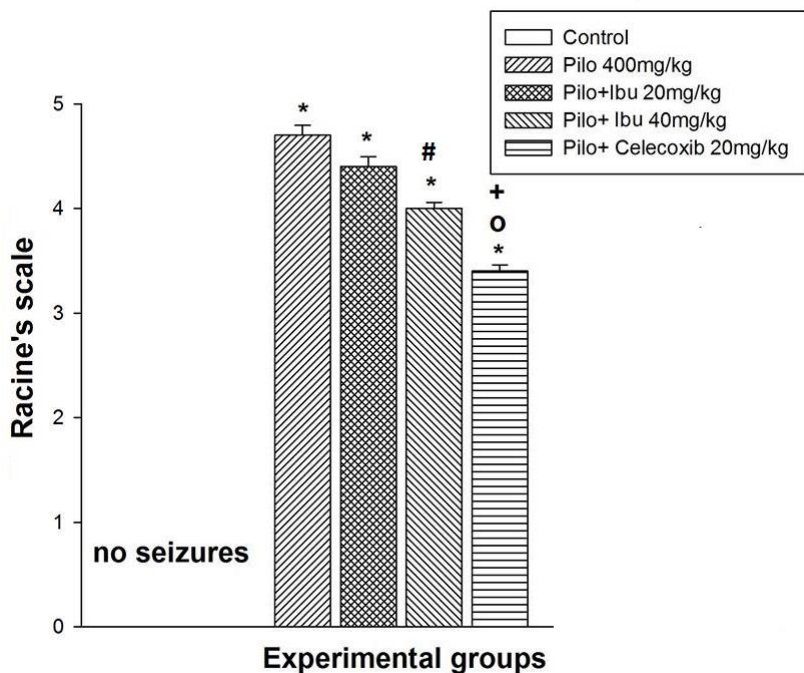
Резултатите са представени на 3 фигури: (**23, 24, 25**).



Фиг. 23. Ефект на 7-дневно прилагане на ибупрофен (20 и 40 mg/kg) и Celecoxib (20mg/kg) върху степента на епилептична активност, при пилокарпинов модел на епилепсия на половно незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо негативната контролна група; \circ $p < 0.05$ спрямо Pilo 400 mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо Pilo+ Ibu 40mg/kg; # $p < 0.05$ спрямо Pilo+Ibu 20mg/kg.



Фиг. 24. Ефект на 7-дневно прилагане на ибупрофен (20 и 40 mg/kg) и Celecoxib (20mg/kg) върху броя на WDS, при пилокарпинов модел на епилепсия на половозрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. * $p < 0.05$ спрямо негативната контролна група; o $p < 0.05$ спрямо Pilo 400 mg/kg; + $p < 0.05$ спрямо Pilo+ Ibu 40mg/kg; # $p < 0.05$ спрямо Pilo+Ibu 20mg/kg.



Фиг. 25. Ефект на 7-дневно прилагане на ибупрофен (20 и 40 mg/kg) и Celecoxib (20mg/kg) процента на преживяемост, при пилокарпинов модел на епилепсия на

полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност \pm SEM. * $p<0.05$ спрямо негативната контролна група; $o p<0.05$ спрямо PULO 400 mg/kg; + $p<0.05$ спрямо Pilo+ Ibu 40mg/kg; # $p<0.05$ спрямо Pilo+Ibu 20mg/kg.

Дискусия

Въпреки широко разпространеното схващане, разглеждащо мозъка като зона лишена от имунни функции, в последните години се натрупват данни демонстриращи, че мозъчното възпаление, също познато като невровъзпаление е присъща черта на много хронични неврологични заболявания. Едно от тях е епилепсията. Един от молекулярните пътища активиран в резултат на епилептогенната активност е COX-каскадата.

Индукцията на COX-2 е по-характерна при гърчове произхождащи от предния мозък (Dhir et al., 2008). Сравнявайки ролята на COX-1 и COX-2, се установява, че първата има главна роля в невровъзпалението свързано по-скоро с невродегенеративни заболявания, докато COX-2, основно локализирана в пирамидалните неврони, увеличава PG-синтеза в отговор на увреждания, които директно засягат невроните, като исхемия и хипервъзбудимост.

В ЦНС, COX-2 се експресира в глутаматергичните неврони, особено в хипокампуса и церебралния кортекс. Това са зони с основно значение при започването на епилептогенна активност (Choi et al., 2009). Доказано е, че COX-2 регулира клетъчната мембранна възбудимост и дълготрайната синаптична пластичност в хипокампа, факт показващ ключовата роля на COX-2 в конвулсивните състояния. Въпреки тези данни, противоречиви са резултатите за ролята на COX-2 в генезата и поддържането на конвулсивните състояния. В някои експерименти се доказват по-скоро проконвулсивна роля на COX-2 (Kim et al., 2008).

Ролята на COX-1 в епилептогенния процес не е напълно изяснена. Ако приемем, невровъзпалението като ключова черта на епилепсията, то COX-1 има участие в този процес, тъй като се доказва, че генетичната аблация или фармакологичното инхибиране на COX-1 потискат невровъзпалението и невроналната клетъчна смърт.

Настоящото проучване е насочено към изясняване на ролята на двете изоформи на COX в епилептогенния процес. Въпреки наличието на данни за участие на COX в патогенезата на епилепсията, не е напълно изяснено коя от двете изоформи има по-важна роля в този процес. Данните от нашето проучване в което се сравняват ефектите на несективен (ибупрофен) и селективен (целекоксиб) COX-

инхибитори, показват, че целекоксиб притежава отчетливи антиконвулсивни ефекти и превъзхожда в това отношение ибупрофена прилаган и в по-ниска доза (20мг/кг), както и в по-висока (40мг/кг). Ибупрофен понижава степента на епилептична активност инсигнификантно, като в по-високата приложена доза (40 мг/кг) ефектите са по изразени, но не достигат статическа сигнификантност спрямо контролната група само с пилокарпин. Тези резултати показват, че вероятно СОХ-2 има определяща роля в ефектите върху невроналната възбудимост. Предполагаемите механизми в които СОХ-2 участва и по този начин влияе на епилетогенната активност са няколко.

СОХ-2 участва в инфламаторните отговори, невроналната смърт и хипервъзбудимост, както и в астроцитната активация в резултат на епилептогенна активност (Shimada et al., 2014). Експресията на СОХ-2, която катализира продукцията на проинфламаторни простагландини, е индуцирана в мозъка в вследствие на различни увреждания и по този начин допринася за невровъзпалението, което е ключов компонент на епилептогенезата (Kawaguchi et al., 2005).

Изложените дотук факти показват, че участието на СОХ-2 като ключов компонент на невровъзпалението, както и ролята и в невроналната възбудимост са в основата и на наблюдаваните в настоящия експеримент ефекти. Доказано е, че в CNS, СОХ-2 е експресирана основно в глутаматергичните неврони особено в хипокампуса и кората на мозъка, зони свързани пряко с началото на гърчовете (Choi and Kon, 2008). В тези зони СОХ-2 е свързана с глиалната активация от простагландините, което води до невровъзпаление, подържано и от освобождаването на цитокини. Резултат от това са повишените нива на TNF-alfa и IL-1beta, които усилват податливостта към гърчове.

Данните от нашето изследване дават основание да заключиме, че прилагането на СОХ-2 инхибитори самостоятелно или съвместно с други АЕЛ би имал подтискащи ефекти, както върху появата на гърчове, така и върху процеса на епилептогенеза. Вземайки в предвид сериозните нежелани ефекти на СОХ-инхибиторите, алтернативен подход е прилагане на селективни антагонисти на простагландиновите рецептори, с които би се избегнал риска от нежелани реакции. Модулаторите на простагландиновите рецептори, ще бъдат полезни и за изясняване ролята на СОХ-2 в мозъчните имунни отговори и невровъзпалението, а следователно и за значението на СОХ-2 в патогенезата на епилепсията.

5. Изводи

1. Каиновата киселина активира епилептична активност и повишава нивата на провъзпалителни цитокини TNF-alfa и IL-1beta в хипокампус при полово незрели плъхове.

2. Леветирацетам и валпроева киселина намаляват увеличените нива на провъзпалителни цитокини в хипокампус на половонезрели плъхове, третирани с каинова киселина. Леветирацетам има и по-значими ефекти върху епилептичната активност и TNF-alfa.

3. Кетогенната диета има отчетлив антиконвулсивен ефект, когато се прилага продължително време на полово незрели мъжки плъхове. Антиконвулсивният ефект на кетогенната диета след 9 седмично прилагане е най-значим и определя бъдещи изследвания върху механизми на невронална активност.

4. Розувастатин подтиска епилептичната активност в неонатален пилокарпинов модел на плъхове.

5. Винпоцетин намалява степента на гърчова активност, както и увеличава латентния период до поява на първия гърч. Подобно на розувастатин, макар и в по-малка степен, той подтиска “wet dog shakes” на полово-незрели плъхове.

6. Доксициклин и целекоксиб показват синергичен антиконвулсивен ефект върху показателите за тежест на гърчовете по скалата на Racine, WDS и латентност на първия гърч. Комбинацията от доксициклин и целекоксиб намалява най-изразено плазмените нива на IL-1beta, след приложението на пилокарпин.

7. Селективният COX-2 инхибитор целекоксиб има по-изразени антиконвулсивни и протовъзпалителни ефекти от неселективния COX-2/COX-1 инхибитор, ибупрофен. Това показва по-важната роля на COX-2 в патогенезата на епилепсията и възможността за прилагането на селективни COX-2 инхибитори в комплексното лечение на епилепсията.

6. Научни приноси

I. Теоретични

1. За първи път се установяват ефекти на леветирацетам и валпроева киселина върху нива на провъзпалителни цитокини у полово незрели плъхове. Това дава основание да се предположи, че прилагани в т.нар. латентен период на

епилептогенезата, двете лекарства могат да окажат болест-модифициращо действие върху механизми на епилепсия.

2. За първи път се документира, че прилагана експериментално, кетогенната диета има различно изразен терапевтичен ефект, който зависи от продължителността на прилагане на диетата. Това дава основание за бъдещи изследвания върху механизми на епилептогенеза.

3. За първи път се установяват антиепилептични ефекти на розувастатин, при полово незрели плъхове. Резултатите дават основание да се допусне, че лекарството би имало и антиепилептогенен ефект в детска възраст.

4. За първи път се документира антиепилептичен ефект на винпоцетин в ранна възраст. Резултатите дават основание да се допусне, че винпоцетин може да подобри клиничния ход на епилепсията.

5. Документират се нови механизми във фармакодинамиката на целекосиб и ибупрофен, свързани с влияние върху епилепсията.

II. Практически

1. Моделите на епилепсия с каинова киселина и пилокарпинов хидрохлорид са адаптирани за целите на фармакологични изследвания.

2. Нови ефекти, свързани с антиепилептичната активност и клиничното приложение на розувастатин, винпоцетин, доксициклин, целекосиб и ибупрофен са представени чрез научните изследвания.

7. Списък на публикации свързани с дисертацията

- 1. Харитов, Е., Е. Ангелеска, Н. Бояджиева (2015).** Антиконвулсивни и невропротективни ефекти на розувастатин при пилокарпин-индуциран експериментален модел на епилепсия. Български медицински журнал, 1: 51-55.
- 2. Харитов, Е., Е. Ангелеска, Н. Бояджиева (2015).** Роля на имунитета и невровъзпалението в патогенезата на епилепсията. Български медицински журнал, 1: 28-33.

3. **Evgeni Haritov**, Elena Angeleska, Spas Kerimov, Prof. Nadka Boyadjieva (2015). Effect of long term application of ketogenic diet in pilocarpine-induced model of epilepsy. *Praemedicus since 1925*, Vol. 31, 16-20.
4. **Evgeni Haritov**, Elena Angeleska, Prof. Nadka Boyadjieva (2015). Comparative investigation of neonatal effects of levetiracetam and valproic acid on the behavioral changes and levels of pro-inflammatory cytokines in neonatal kainat model of epilepsy. *Bulgarian medicine*.
5. **Evgeni Haritov**. (2015). Synergic effects of doxycycline and celecoxib in a pilocarpine model of experimental epilepsy in rats. *Comptes rendus de l'academie bulgare des Sciences* (под печат). IF 0.284.
6. **Харитов, Е.**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева (2014). Метаболитни механизми в антиконвулсивните ефектите на кетогенната диета; роля на глюкозната рестрикция, биоенергетиката и ПНМК. *Лекарска практика*, 4: 18-24
7. **Харитов, Е.**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева.(2014). Лекарственорезистентна епилепсия. *Лекарска практика*, 3, 2: 13-19
8. **Харитов, Е.**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева.(2014). Кетогенна диета и епилепсия: роля на кетонните тела в повлияване на невроналната възбудимост. *Обща медицина*, 2: 34-40 .
9. **Харитов, Е.**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева. (2014). Роля на IL-1R/TLR сигнализацията в епилептогенезата и лечението на епилепсията. *Лекарска практика*, 6: 3-11.
10. **Харитов, Е.**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева. (2014). Роля на IL-beta в механизми на епилепсията и възможности за фармакологичното му повлияване. *Българска неврология*, Том 15, 2: 176-180.

8. Списък на участия в конгреси и конференции свързани с дисертацията

1. **Evgeni Haritov** and Nadka Boyadjieva. Comparative study on effects of epileptogenic substances kainic acid, ethanol and LPS on brain macroglia and cytokines. Юбилейна научна конференция с международно участие, „ 30 години висше медицинско образование в Стара Загора” 2012. Постерна презентация.
2. П. Гатева, С. Георгиева, **Е. Харитов**, Н. Бояджиева. Епигенетика на епилепсията. Конкурс на МНД “Асклепий” за научно творчество на студенти, докторанти и

млади учени. Медицински Университет-Пловдив. Сборник научни съобщения от конкурсна сесия, **2013**г. Постерна презентация.

3. **Е. Харитов**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева. Неврофармакология на кетогенната диета. Работна среща в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН - „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания” .07.04.**2014**. Орална презентация.
4. **Е. Харитов**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева.. Animal models of epilepsy and implication for disease-modifying effect of levetiracetam in kainite model of epilepsy in adult rats Работна среща в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН - „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания” .07.04.**2014**. Постерна презентация.
5. **Е. Харитов**, Е. Ангелеска. Comparative study on neonatal effects of levetiracetam, valproic acid and diazepam on behavioral changes and brain cytokines in neonatal kainat model of epilepsy 13-th International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 8-11.05. **2014**. Постерна презентация. .
6. **Е. Харитов**, Н. Бояджиева. Ketogenic diet and epilepsy. X-ти международен симпозиум по проблемите на затлъстяването и съпътстващите го заболявания сателитен на XXI-ия Европейски конгрес по затлъстяване 1-3 юни **2014** г. Албена. Орална презентация.
7. **Е. Харитов**, Е. Ангелеска, Н. Бояджиева. Effects of Ketogenic diet on metabolism. X-ти международен симпозиум по проблемите на затлъстяването и съпътстващите го заболявания сателитен на XXI-ия Европейски конгрес по затлъстяване 1-3 юни **2014** г. Албена. Постерна презентация.
8. **Evgeni Haritov** and Nadka Boyadjieva. Ketogenic diet: influence on brain excitability and epilepsy Национален Конгрес по Фармакология, Плевен-17-19.10.**2014**. Орална презентация.
9. **Е. Haritov**, Spas Kerimov, Petar Angelov. Inhibition of proinflammatory cytokines in neonatal experimental epilepsy by Levetiracetam VI International scientific conference-science for health, **2015**, 14-18 April 2015; Moscow, Russia. Poster presentation. Abstract book, p.8.
10. **Е. Харитов**, Е. Ангелеска, П. Ангелов. Синергични ефекти на доксициклини и целекоксиб при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия на плъхове 14-th International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 8-11.05. **2015**. Постерна презентация.

11. **Е. Харитов**, Е. Ангелеска, А. Кокиантонис. Антиконвулсивни ефекти на розувастатин при пилокарпин-индуциран експериментален модел на епилепсия. 14-th International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 8-11.05. **2015**. Постерна презентация.
12. **Е. Харитов**, Н. Бояджиева. Кетогенната диета-неврометаболитен подход в лечението на епилепсията Юбилейна научна конференция по фармакология и клинична фармакология за млади учени, 05-07 Юни, **2015**, Цигов чарк. Орална презентация.

9. Участия в проекти свързани с дисертацията

1. **Проект № 57, 2012** от Грант 2012 на СМН на МУ-София на тема: “ Неонатални ефекти на levetiracetam и valproic acid при експериментална епилепсия: влияние върху невронална апоптоза и плазмени цитокини“, спечелен от Н. Бояджиева, съизпълнител **Е. Харитов**.
2. **Проект №70, 2013** от Грант 2013 на СМН на МУ-София на тема: “Експериментални изследвания върху ролята на IL-1 beta и на IL-1R/TLR4 провъзпалителен комплекс в механизмите на неонатална епилепсия и ефектите на Levetiracetam”, спечелен от Н. Бояджиева, съизпълнител **Е. Харитов**.
3. **Проект 26-Д, 2015** от конкурса на МУ-София за финансиране на научни проекти на докторанти на тема: „Изследване ефекта на SSRI върху невровъзпаление в експериментален модел на неонатална епилепсия“, спечелен от **Е. Харитов**.

10. Награди свързани с дисертационния труд

1. Първо място за постерна презентация в „VI International scientific conference-science for health“. Moscow, Russia; 14-18 April., **2015**. Abstract book, p.8.
2. Първо място за постерна презентация в „14-th International Congress of Medical Sciences“, Sofia, Bulgaria; 8-11 May., **2015**.

Summary

Epilepsy is a neurological disorder with clinical manifestation of persistent seizures, affecting 50 million of the world population. Pharmacotherapy is considered to be the conventional approach in antiepileptic therapy. However, existent AED's provide mediocre seizure control in 70% of epileptic patients. Drug-resistant epilepsy (DRE) patients present with uncontrolled seizures in 1/3 of epileptic cases.

In the last 10 years mounting body of evidence provided proofs for involvement of neuroinflammation in the pathogenesis of epilepsy. Experimental data support clinical observations for activation of proinflammatory pathways in epilepsy. Chronic neuroinflammation decreases seizure threshold and in this way increases neuronal excitability. Although the participation of inflammation in the course of epilepsy is hypothetical, scientific evidence reveals the possibility of blocking neuroinflammation to halt the progression of the disease. It is not entirely clarified whether pharmacological and non-pharmacological interventions could influence epileptogenesis.

The aim of the present PhD thesis is to investigate antiepileptogenic and anti-inflammatory effects of several well established drugs and ketogenic diet in kainate and pilocarpine-induced experimental model of epilepsy.

Recent studies of epilepsy investigate anti-inflammatory effects of some antiepileptic drugs with the assumption that these effects have greater importance compared to their pure neuronal effects. In experiment 1 we have compared anti-inflammatory and anticonvulsive effects of levetiracetam and valproic acid and mutual relation between those effects.

Non-pharmacological approaches in the treatment of epilepsy gained popularity in the last two decades. One of them is the application of ketogenic diet. Proofs about anti-inflammatory effects of ketogenic diet are scarce. Also it is not clear which is the most effective duration period of administration of the diet. In experiment 2 we have assessed anticonvulsive effects of 3, 6, 9 week of ketogenic diet administration.

Statins are well-known cholesterol-lowering drugs. Exist data about their anti-inflammatory effects, but there are no convincing results about the antiepileptogenic effect of these drugs. In experiment 3 we have evaluated rosuvastatin in this aspect.

Vinpocetine is a widely used drug in the neurology. Accumulating data in the last decade revealed its anti-inflammatory properties. Effects of this drug on epileptogenic activity are not clarified. In experiment 4 we have shown evidences, indicating that vinpocetin could be used as an adjunct in the antiepileptic management.

The role of cyclooxygenase (COX) in the pathogenesis of epilepsy has been revealed recently. In experiment 5 we hypothesized that not only one, but multiple proinflammatory pathways are activated after initial epileptogenic event. We have compared single and combined application of celecoxib and doxycycline on the epileptogenic activity and the levels of IL-1beta. Only the combination of these drugs resulted in attenuation of increased levels of proinflammatory cytokines evaluated by ELISA.

In the last experiment 6 we investigated the antiepileptogenic effects of selective COX-2 inhibitor (celecoxib) and non-selective COX inhibitor (ibuprofen) on seizure activity in a pilocarpine model of epilepsy. Our results indicated that celecoxib possess more pronounced antiseizure effects and this underlines the importance of COX-2 in seizure generation.

In conclusion, we can summarize, that the data presented in the current PhD has shown the importance of neuroinflammation in the pathogenesis of epilepsy. Despite progress in clarifying the role of the immune response in the course of epilepsy, an effective therapy directed to impaired immunity in the brains of epileptic patients still does not exist. Our results suggest that some antiepileptic drugs and drugs from other pharmacological groups could be used as an adjunct to conventional antiepileptic drugs. The results in this PhD outline a new therapeutic strategy in the treatment of epilepsy, which affects not only the symptoms, but the pathogenesis of the disease.