ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане

на образователната и научната степен

„ДОКТОР“

СПЕЦИАЛНОСТ: Фармакология

(вкл. Фармакокинетика и Химиотерапия)

Д-р ЕВГЕНИЙ ЮРИЕВ ХАРИТОВ

Научен ръководител

проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.

СОФИЯ 2015

Медицински университет-София

Медицински факултет

Катедра по фармакология и токсикология

==========

д-р Евгений Юриев Харитов

Фармакологични изследвания върху механизми на невровъзпаление при епилепсия

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователната и научната степен

„Доктор“

СПЕЦИАЛНОСТ: Фармакология

(вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)

Научен ръководител: Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.

София • 2015

Съдържание:

Въведение……7

1. Литературен обзор

Глава 1

Експериментални и клинични аспекти на епилепсията

1. Епилепсия……...…..10

1.1. Дефиниция…….……....10

1.2. Класификация на гърчовете и типове епилепсия.....10

1.3. Епилепсия на темпоралния лоб (TLE) и концепция за епилептогенеза.....11

1.4. Експериментални модели на епилепсия - експериментален модел на status epilepticus (SE), каинатен модел, пилокарпинов модел**……...… 12**

1.5. Епилепсия в развиващият се мозък…….…...15

1.6. Лечение на епилепсията…….....16

1.7. Епилептогенеза.....18

ГЛАВА 2

Роля на глията, невровъзпалението и цитокините в механизми на епилепсията

2.1. Въведение……...…..19

2.2. Глиоза и инфаламторен отговор – роля на микроглията в невроинфламаторния отговор……**……21**

2.3. Проинфламаторни цитокини и епилепсия…….,22

2.4. Роля на IL-1beta в механизми на епилепсията и възможности за фармакологичното му повлияване……23

2.5. Роля на IL-1R/TLR сигнализацията в епилептогенезата и лечението на епилепсията…….. 31

ГЛАВА 3

Кетогенна диета – нефармакогенна интервенция при експериментална епилепсия

3.1. Въведение……..…..39

3.2. Роля на кетонните тела в механзмите на епилепсията……40

3.3. Роля на глюкозната рестрикция и ПНМК в антиконвулсивните ефекти на кетогенната диета…….. 48

3.4. Заключение……..... 55

2. Цел и задачи…….....…56

3. Материал и методи……..….57

3.1. Експериментални животни…….....**57**

3.2. Фармакологични средства……..**58**

3.3. Експериментални методи……**59**

3.4. ELISA методи…….....**60**

3.5. Клинико-лабораторни методи- за глюкоза и beta-хидроксибутират.....**60**

3.6. Статистически методи……**60**

4. Резултати от собствени изследвания с дискусия

4.1. Сравнителни проучвания на ефекти на леветирацетам и валпроева киселина върху степента и тежеста на гърчовете и нивата на проинфламаторни цитокини в неонатален каинатен модел на епилепсия…….....61

4.2. Проучване на антиепилептогенните ефекти на кетогенната диета в неонатален пилокарпнов модел на епилепсия……65

4.3. Проучване влиянието на статини върху епилептогенната активност и невровъзпалението при пилокарпин експериментален модел на епилепсия на мъжки полово незрели плъхове…….....69

4.4. Проучване влиянието на винпоцетин върху експериментален модел на епилепсия и невровъзпаление в мозък на мъжки полово незрели плъхове……..72

4.5. Синергични ефекти на доксициклин и целекоксиб при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия на плъхове……..75

4.6. Сравнително проучване на ефектите на ибупрофен и целекоксиб върху епилептогенната активност и показатели на невровъзпаление при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия……80

5. Дискусия…….....83

6. Изводи……...97

7. Приноси…….....98

8. Списък на публикации и съобщения свързани с дисертацията……99

9. Литература……..103

Използвани съкращения

АЕЛ	**Антиепилептични лекарства**
АТФ	**Аденозин-трифосфат**
ГАМК	**Гама-аминомаслена киселина**
2-ДГ	**2-деокси-Д-глюкоза**
КД	**Кетогенна диета**
КТ	**Кетонни тела**
НСПВС	**Нестероидни противовъзпалителни средства**
ПНМК	**Полиненаситени мастни киселини**
ФДФ	**Фруктозо-1,6-дифосфат**
ХЕБ	**Хемато-енцефална бариера**
ЦНС	**Централна нервна система**
AMPA	**Йонотропен рецептор**
COX	**Циклооксигеназа**
DAMP	**Damage associated molecular pattern**
ELISA	**Enzyme-linked immunosorbent assay**
GLUT	**Glutamate transporter**
HMGB 1	**High-mobility group box 1**
ICE	**Interleukin-1β- converting enzyme**
IL-1beta	**Interleukin-1beta**
LEV	**Levetiracetam**
MAPK	**Mitogen-activated protein kinases**
NF-kB	**Nuclear factor-kappaB**
NMDA	**N-Methyl-D-aspartate**
PAMP	**Pathogen-associated molecular pattern**
PDE	**Phosphodiesterase**
PPAR	**Peroxisome proliferator-activated receptors**
SE	**Status epilepticus**
TLE	**Temporal lobe epilepsy**
TLR	**Toll-like receptors**
TNF	**Tumor necrosis factor**
VPA	**Valproic acid**
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. Тъй като се приема, че епилептогенната активност е проява на неконтролирана невронална хипервъзбудимост в мозъка, по-голямата част от съществуващите АЕЛ въздействат върху невронални структури, като йонни канали, ГАМК и глутаматергични рецептори.

Изследванията на епилепсията, които проучват единствено невронални механизми в патогенезата на заболяването не могат да дадат обяснение на въпроси свързани с много по-сложните механизми на епилептогенезата. Това е процес при който в резултат на едно патогенно увреждащо събитие, обикновено в ранна възраст, се отключва поредица от промени в мозъка на клетъчно, субклетъчно и молекулярно ниво. След различен по продължителност латентен период мозъка се превръща в епилептичен с предиспозиция за поява на спонтанни рекурентни гърчове. Голям брой клинични и преклинични изследвания показват, че епилептогенезата е свързана, както с невронални структури, така и с неневронални клетъчни елементи, като глиални клетки, мозъчни съдове и проникващи в мозъка левкоцити от периферията.

Въпреки, че в литературата е описана ролята на невровъзпалението в механизма на епилепсията, не е изянено 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.

Нарушената глиална функция се очертава като ключов компонент в механизмите на епилептогенеза, ролята на неневронални клетки в този процес и участието на невровъзпалението. Хронично активираните микроглия и астроцити, вероятно формират епилептични локуси в мозъка. Механизмите по които глията участва в процеса на епилептогенеза включват усилена невронална възбудимост и подържане на невровъзпаление. Въпреки научните представи, че мозъка е зона лишена от имунни функции поради наличие на ХЕБ и липса на лимфен дренаж, проучвания в последните години показват ключовата роля на имунните отговори в мозъка в инициирането и подържане на епилептичната активност. Хроничното невровъзпаление

снижава гърчовия праг, което от своя страна усилва невроналната възбудимост. Това се осъществява чрез модификация на невроналните канали, промени в невротрансмитерното освобождаване и регулация на пермеабилитета на ХЕБ .

Съществуващите АЕЛ имат само симптоматичен ефект върху гърчовете и не повлияват изграждащата се предиспозиция към спонтанни рекурентни гърчове в хода на епилептогенезата. Това показва необходимост от разработване на нови терапевтични стратегии, повлияващи самия ход на епилепсията, и въздействащи върху механизми в основата на заболяването а не само върху симптомите. Съвременните изследвания на епилепсията все повече проучват антиинфламаторните ефекти на АЕЛ с презумцията, че те имат по-голямо значение за терапевтичните им ефекти в сравнение с чисто невроналните им въздействия. В настоящето изследване ние сравняваме антиепилептичните и антиинфламаторни ефекти на леветирацетам и валпроева киселина и взаимната връзка между тези два ефекта.

Статините са утвърдени холестерол-понижаващи лекарства. Доказани са и техните антиинфламаторни ефекти. В литературата няма убедителни доказателства за техни въздействия върху епилептогенната активност и нивата на проинфламаторните цитокини. Настоящият труд изследва техните предполагаеми ефекти в този аспект.

Нефармакологичните методи за лечение на епилепсия се налагат все повече в клиничната практика. Един от тях е прилагането на кетогенна диета (КД). В литаратурата има задълбочени опити за разкриване на механизма й, но липсващи до оскъдни са доказателствата за антиинфламаторните й ефекти, както и за продължителността на прилагането й с цел достигане на максимален терапевтичен ефект.

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. 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 (COX). Възможностите чрез съвместно прилагане на два медикамента с различен механизъм на подтискане на невровъзпалението не са добре проучени. Ние насочваме вниманието към комбинация от COX-2 инхибитора целекоксиб и

тетрациклиновия антибиотик доксициклин, като сравняваме техните ефекти върху гърчовата активност и показателите за невровъзпаление.

Ролята на COX процесите на епилептогенеза и невровъзпаление се дискутират в литературата, но няма достатъчно научни доказателства, кой от двата типа циклооксигеназа (COX-1 или COX-2) имат по-важна роля в хода на епилепсията. Настоящето изследване проучва този въпрос, сравнявайки ефектите на селективен и неселективен COX-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. Активираният 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. Настоящето проучване дава доказателства за нови свойства на някои утвърдени лекарства, 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 самия патогенетичен механизъм на заболяването.

ГЛАВА 1

Експериментални и клинични аспекти на епилепсията

1. Епилепсия

1.1. Дефиниция

Епилепсията е второто по честота след инсулта неврологично заболяване, засягащо 1% от населението в световен мащаб (69). Според Международната лига за борба с епилепсията това е преходна и повтаряща се абнормена или синхронизирана невронална активност на мозъка, водеща до поява на спонтанни гърчове (52). Освен с този тип гърчове тя се характеризира с невробиологични, когнитивни и психосоциални последици за пациентите. В дефиницията на епилепсията се изисква наличие на поне два епилептични припадъка.

Въпреки лечението с модерни антиепилептични лекарства, 25-50% от пациентите продължават да имат гърчове след диагностицирането им. Рекурентните гърчове, от своя страна, довеждат до упадък на когнитивните функции с прогресивен характер (145).

Епилепсията обикновено се класифицира по 5 различни критерия. Те включват гърчова феноменология, видове гърчове, епилептичен синдром, етиология и възможни нарушения, причинени от епилепсията (Международна лига за борба с епилепсията).

Епилепсията засяга приблизително 50 млн. човека в световен мащаб и често е свързана с депресия, било по директен физиологичен механизъм, било чрез вторични ефекти от рестрикциите в живота, страха от поява на гърчове, интелектуалния упадък и ниска самооценка (208).

1.2. Класификация на гърчовете и типове епилепсия

Обичайно гърчовете се класифицират като парциални или генерализирани (ILAE, 1981). Първият тип засяга обикновено едната мозъчна хемисфера, докато при генерализираните типове е налично билатерално разпространение на абнормената невронална активност.

Класификацията на епилепсиите и епилептичните синдроми се базира на клинични признаци в комбинация на с EEG и образни изследвания. В последните

години в резултат на прогреса в технологиите се ревизира концепцията, терминологията и подходите за класифициране на епилепсията и типове гърчове. Комисията по класификация и терминология към ILAE е направила предложение за включване на този напредък в класификацията на епилепсията (17).

1.3. Епилепсия на темпоралния лоб (TLE) и концепция за епилептогенеза

Обичайно отнасяна към лимбичната епилепсия, TLE е най-честата симптоматична форма на епилепсия (51). Тя представлява 30-35% от всички епилепсии и е най-честата форма на рефрактерна симптоматична епилепсия (177). Въпреки дебатите относно механизмите в основата на TLE, се смята, че лимбични структури, като хипокамп, амигдала и темпорален неокортекс имат ключова роля. Една от причините за това е факта, че хирургическото отстраняване на тези структури премахва гърчовете в 80% от случаите (53). Хистологичните изследвания на тъканите, получени хирургически от пациенти с фармакорезистентна епилепсия показват промени, които предполагат наличие на хипервъзбудимост.

Типични промени, които се описват при TLE са невронална загуба (107), глиоза, синаптична пластичност (32), неврогенеза (137), възпаление (199), молекулярна реорганизация на клетъчните мембрани и екстрацелуларния матрикс (139).

Хипокампалната склероза е най-честата лезия наблюдавана при пациенти с TLE, и се среща при 60-70% от случаите, насочени за хирургична оценка (107). Хипокампалната склероза, често е резултат от предхождащ status epilepticus, комплицирани фебрилни конвулсии, енцефалит или исхемичен инсулт (54). Гърчовете от своя страна също могат да причинят или аггравират хипокампалната склероза (180).

Има няколко факта показващи, че хипокампалната склероза има важна роля за TLE. Първо, от епилептичната хирургия е видно, че на-добър контрол (80%) се постига когато бъде отстранена голяма част от хипокампа (125). Второ, внимателния анализ на пробите взети при хирургическа интервенция показват наличие на хипокампална склероза. И трето, началото на типичните интракраниални EEG промени в началото на гърчовете корелират с наличие на хипокампална склероза.

Обикновено гърчовете започват с аура, последвана от други симптоми от лимбичната система, като повдигане, емоционални промени (страх) и понякога олфакторни и густаторни халюцинации (211).

Процесът на епилептогенеза е илюстриран на **Фиг. 1:**



Фиг. 1. Концепция за епилептогенеза

1.4. Експериментални модели на епилепсия

1.4.1. Общ преглед

Животинските модели на епилепсия и гърчове имат фундаментална роля за разкриването на физиологичните и поведенческите промени свързани с епилепсията при човека и са в основата на разработването на антиепилептични терапевтични стратегии и АЕЛ.

Приемат се 6 критерия, по които се оценява стойноста на експерименталните модели (165): 1. Подобен електрофизиологичен профил на човешкия. 2. Подобна етиология – напр. човешката патология, в основата, на която има генетична предиспозиция, трябва да бъде моделирана генетично. 3. Животинските модели трябва да се доближават най-близко до възраста на поява на първите гърчове при човека. 4. Животинските модели трябва да повтарят същите патологични промени наблюдавани при човека. 5. Животинските модели трябва да отговарят по подобен на човека начин. 6. Поведенческите характеристики трябва да наподобяват тези при човека.

Експерименталните модели in vivo, се разделят от една страна на модели на различни типове гърчове, а от друга – на модели на епилепсия (165). Епилепсията е многолико заболяване, което може да бъде моделирано по различни начини, в зависимост от целта на изследването. Например, в някои случаи е необходимо моделиране на хронично състояние, а в други се налага предизвикване на остри гърчове. Освен това гърчовете могат да се предизвикват с хемоконвулсанти или с

електрическа стимулация. Тези фармакологично или електрически предизвикани модели се доближават по-близо до човешката патология, като наподобяват началното епилептогенно събитие.

Експерименталните модели, освен това могат да бъдат изоморфни, ако наподобяват епилепсията, но не и нейната етиология. От друга страна те могат да бъдат предиктивни ако не наподобяват болеста при човека, но дават възможност да се предскаже типа епилепсия.

При острите епилептични модели, гърчовете се предизвикват със специфични стимули (химически, еликтрически, аудиогенни). Тези модели се използват най-широко началните предклинични тестове на нови субстанции с антипилптична активност. Два от най-често използваните остри модела са максималния електрошоков модел (MES) и пентилентетразоловия модел (PTZ). MES-модела разкрива субстанции с активност срещу генерализирани гърчове, докато PTZ-модела е предиктивен за изпитвани субстанции с активност срещу неконвулсивни абсанси или миоклонични пристъпи.

Хроничните епилептични модели се доближават най-близо до човешката патология при които се появяват спонтанни и рекурентни гърчове.

1.4.2. Експериментален модел на status epilepticus (SE)

SE-модела е може би най-добре характеризирания хроничен модел, демонстриращ появата на спонтанни рекурентни гърчове. В този модел SE предизвиква увреждания на животните, които отключват процес на епилептогенеза подобно на преципитиращото събитие в човешката патология. Това води до поява на спонтанни рекурентни гърчове в по-късни етапи от живота на екпериментални животни, както и у човека. Освен поява на спонтанни гърчове, този модел показва типични хистопатологични и биохимични промени, които съвсем близко наподобяват патологията при TLE.

Всички пост-SE модели имат като обща черта 3 главни стадия: 1) Начален епизод на SE; 2) Период на епилептогенеза, латентен стадий, свободен от гърчове; 3) стадий на спонтанни рекурентни гърчове.

Едни от най-често използваните фармакологични агенти за предизвикване на SE са **каиновата киселина** и **пилокарпин.**

1.4.3. Каинатен модел

Каиновта киселина е аналог на L-glutamate и агонист на йонотропни не-NMDA глутаматни AMPA и KA рецептори. Обикновено се прилага интраперитонеално, подкожно, интравенозно и интрахипокампално, което предизвиква продължителна невронална деполяризация, status epilepticus, продължаващ няколко часа. Рецепторите на каиновата киселина са в хипокампуса, с по-голяма гъстота в CA3 зоната, амигдалата и енториналния кортекс. Точно тези зони са най-силно засегнати след прилагането на каинова киселина, което дава възможност за използване на каиновата киселина като подходяща за изследване на парциални гърчове с вторична генерализация (50). Индуцираните с каинова киселина SE, също така наподобява някои от невропатологичните черти на TLE при човека. Те включват невронална загуба в CA1 и CA3 зоните на хипокампуса. Невронална некроза е наблюдавана в пириформения и олфакторния кортекс, амигдала и таламуса (15).

1.4.4. Пилокарпинов модел

Пилокарпинът е мускаринов рецепторен агонист. Системното прилагане на пилокарпин при плъхове води до поява на гърчове (55). Това се свързва с активация на мускаринови Ach рецептори в хипокампус, стриатум и кортекс. Необходимите дози за предизвикване на SE са 300-400mg/kg. Тези високи дози предизвикват периферни холинергични ефекти, които се отстраняват с предварително третиране с мускаринов антагоност (scopolamine methylbromide-1mg/kg, s.c.).

Поведенческите реакции след прилагането на Pilocarpine включват фациални автомтизми, саливация, пилороерекция и поведенчески автоматизми (31). След прилагането на Pilocarpine гърчовете прогресират в течение на 90 мин., след което се супресират с Diazepam за намаляване на смъртността. Първите спонтанни гърчове се появяват между 2-75 ден след прилагането на Pilocarpine (132). Някои от невропатологичните промени са подобни на тази след прилагане на каинова киселина. Установено е, че за разлика от каинатния модел, промените са по-изразени в неокортекса, отколкото в хипокапмпуса.

1.5. Епилепсия в развиващият се мозък

Установена е по-честа поява на гърчове в развиващия се мозък в сравнение с зрелия, което се обясява с дисбаланс, с преобладаване на възбудните процеси над инхибиторните по време на мозъчната матурация (77). Така например GABA е основен инхибиторен невромедиатор в мозъка при възрастни, но има деполяризиращо действие по време на ранното невронално развитие, преди узряването на K/CL ко-транспортера. От друга страна е доказано, че незрелия мозък е по-устойчив на увреди, предизвикани от гърчове под форма на невронална дегенерация, сравнено с мозъка при възрастни (12). Чувствителноста към невронална дегенерация предизвикана от гърчове или status epilepticus зависи от възраста и степента на узряване. Тя зависи от типа гърч и вида използван експериментален модел, но като общо правило, не се наблюдава клетъчна смърт в резултат на гърчове в хипокампуса, амигдала и темпоралните кортикални зони при животни, по-млади от 2 седмици (37). По-сериозни увреждания се наблюдават в мозъка на плъхове над 2-седмична възраст (79).

В допълнение към възможноста за невронална клетъчна смърт, увреждащия ефект на status epilepticus в ранните етапи на живот се изявява с повишен риск от развитие на спонтанни рекурентни гърчове или развитие на TLE в по-късните етапи от живота (94), както и когнитивни нарушения, като паметови проблеми и проблеми с пространствено ориентиране (113). Подобни процеси се наблюдават и при хора: макар болшинството от децата с епилепсия да са в добро общо състояние, те имат забавено развитие, затруднение в обучението, поведенчески и психосоциални проблеми (78).

Антиепилептичните лекарства (АЕЛ) трябва да се прилагат постоянно за превенция на гърчовете. В незрелия мозък е научно доказано, че АЕЛ тригерират апоптична невродегенерация, която вероятно е причина за наблюдаваните странични ефекти, като когнитивни нарушения и микроцефалия. Phenytoin и Valproic acid могат да доведат до апоптотична невронална смърт при P7-P8 плъхове в плазмени концентрации, при които подтискат гърчове у възрастни (90). Нещо повече, установено е, че невротоксичността на АЕЛ е възрастово обусловена и молекулярния механизъм за това се предполага, че е свързан с нарушения на невротрофин-медиираната сигнализация в мозъка. При хората периода на синаптогенеза обхваща времето от последните 3 месеца на бременността до третата година на живота. Известно е, че Phenytoin и Valproic acid се използват в тази възраст. Установено е, че комбинирането на няколко АЕЛ е има по-силно увреждащо влияние върху незрелия

мозък, отколкото използването на едно лекарство според експериментални данни. Например, комбинираното прилагане на Carbamazepine и Phenytoin, значимо екзацербира фенитоин-индуцираната апоптоза при P7-P8 плъхове, докато самостоятелното прилагане на Topiramate не води до увреда. Прилаган заедно с Phenytoin той усилва Phenytoin-индуцираната невродегенерация. Експериментални данни показват, че Gabapentin увеличава невроналната преживяемост и подтиска гърчовете в експериментален модел на исхемия, в който дясната обща артерия се лигира на P12 плъхове и незабавно след това животните са третирани i.p. с Gabapentin (188). Тези експериментални данни показват, че новите АЕЛ могат, поне когато се използват като монотерапия, да имат полезни ефекти върху мозъчните увреждания при развиващи се животни.

1.6. Лечение на епилепсията

Появата на първия гърч във всяка възраст не винаги показва наличие на епилепсия и необходимост от антиепилептични лекарства (АЕЛ). Епилептичната симптоматика може да е симптоматична и са необходими диагностични мероприятия за изключване на епилепсия. По време на човешкия живот, поне един епилептичен гърч може да се появи, включително фебрилни конвулсии, приблизително в 8% от здравата популация. В 1% процент от тях има вероятност да се развие епилпесия.

Познанията за комплексните процеси в основата на индивидуалните гърчове или епилептогенезата са ограничени (50). Това води до третиране на симптомите на епилепсията, а не на причините за епилепсията. Лекарствените продукти, които повишават прага на гърчовете имат сериозни странични ефекти и водят до афективни и когнитивни проблеми (122). Състояния, които са добре контролирани фармакологично стават рефракторни на лечение, независимо от ефективните терапевтични програми.

След потвърждаване на диагнозата, е необходимо започване на АЕЛ и при болшинство от пациентите независимо от постигнатия успех, лечението продължава няколко години. При поне 1/3 от фармакорезистентните пациенти, гърчовете се появяват отново, независимо от използване на повече от едно АЕЛ. Независимо от фармакорезистентноста, това не предполага, че няма да се постигне адекватен контрол на гърчовете с прилагане на допълнителни лекарства (97). Въпреки въвеждането на т.нар. нова генерация АЕЛ, това не позволи постигане на решителен напредък в терапията на епилепсията.

Успехът при старата и новата генерация лекарствени продукти е еднакъв и се постига добър контрол върху гърчовете в 70% от пациентите. Някои нови лекарства са в клинични изпитания или са въведени, като Brivaracetam (USB), Carisbamide (Johnson and Johnson), Retigabine (Valeant pharmaceuticall and GSK), Valrocemide (Tera/Acorda).

Въпреки наличието на голям брой АЕЛ, между 30-40% от пациентите продължават да имат гърчове, които се контролират неадекватно фармакологично (100).

Решението в тези случаи е **епилептична хирургия** с резекция на епилептичната зона. За да бъде приложена тя изисква не само анамнеза за резистентна епилепсия, но също за фокална и ограничена зона на лезия и много нисък риск от неврохирургически и когнитивни увреждания. След прилагането си хирургията дава резултат в 90%. При изследване на хирургично в сравнение с фармакологично лечение е установено, че след една година 64% от оперираните пациенти и само 8% от третираните с лекарства са със свободни от гърчове (208).

При пациенти рефрактерни на терапия или, при които не може да се приложи хирургично решение, добра алтернатива е т.нар. **Vagal Nerve Stimulation (VNS).** Тя се състои в регуларни слаби електрически импулси към мозъка чрез n.vagus. Тези импулси се прилагат чрез устройство, имплантирано подкожно в гръдния кош, свързано с шийния n.vagus. Механизмът не е изяснен, но се постига значимо редуциране на честотата, интензитета и продължителността на гърчовете, особено когато е съчетано с фармакотерапия.

Друга алтернатива пред пациентите с фармакорезистентна епилепсия са диетични подходи и специално прилагане на **кетогенната диета**. Тя е много по-ефективна при деца с фармакорезистентна епилепсия (за детайли виж по-нататък в изложението). Тя се състои в приемане на високомастна и нисковъглехидратна храна. При тези условия черния дроб превръща мастните киселини в кетонни тела, които преминавайки в мозъка заместват глюкозата като основен енергиен източник на енергия. Повишените нива на кетони в кръвта (кетоза) водят до редуциране честотата на гърчовете при децата. Въпреки, че страничните ефекти на диетата са по-леки в сравнение с фармакотерапията при дълго прилагане на диетата са възможни поява на бъбречна калкулоза, повишени нива на холестерол, дехидратация, костни фрактури, забавено развитие и растеж, които налагат внимателен медицински контрол. Макар, че

механизма на кетогенната диета не е напълно изяснен с нея се постига ефект в 90% от пациентите (130).

1.7. Епилептогенеза

1.7.1. Концепция за епилептогенеза

Терминът епилептогенеза е въведен с цел да опише процес, при който различни видове мозъчни увреждания (напр. мозъчни травми, инсулт, инфекции, фебрилни гърчове, status epilepticus) отключват каскада от биохимични и патологични процеси, които в крайна сметка водят до поява на спонтанни рекурентни гърчове. Периодът, необходим за тези трайни мозъчни трансформации варира от седмици до години. Епилепетогенезата е комплексен патофизиологичен процес, в който мозъка става до такава степен хипервъзбудим, че започва да показва спонтанна гърчова активност.

Началното преципитиращо събитие е последвано от т.нар. ”латентен период”, в който не се проявява гърчова активност. В този период се развиват споменатите промени в мозъка, които довеждат до спонтанни гърчове. Последната фаза се обозначава като „хронична”. В този период епилептичната активност продължава да прогресира. Наблюдавано е, че пациенти, повлияващи се успешно в ранната хронична фаза, в по-късен етап развиват фармакорезистентност. Това се свързва с недобре проучените процеси на епилептогенеза. Молекулярните пътища на този патологичен процес са в процес на изясняване. Експериментални данни предполагат, че следните процеси имат роля в епилептиогенезата: клетъчна пролиферация, възпаление и имунен отговор, глиоза, оксидативен стрес и апоптоза.

1.7.2. Изучаване на епилептогенезата

Епилептогенезата е динамичен процес. Ключов въпрос в този аспект е как може да се изучава този процес с цел да се въведе метод за терапевтична интервенция в този период на невронална реорганизация. Тъкани от хипокамп на пациенти с фармакорезистентна епилепсия дават големи възможности за изучаване молекулярните промени в този процес. В този метод обаче има ограничения, тъй като сравняването на тези хирургически получени проби, трябва да се сравняват с проби от хипокампуси пост-мортем. Освен това, разкриването на процеса на епилептогенеза в даден етап не може да се реализира на тъкани, които са били подложени на гърчове с години. С цел

преодоляване на тези недостатъци могат да се използват модели на епилелепсия. Съществуват различни модели за предизвикване на началното преципитиращо събитие. Най-често се използва предизвикване на дълготрайни гърчове или status epilepticus (118). Тази фаза се последва закономерно от латентния период и в по-късен етап и от появата на спонтанни рекурентни гърчове.

В експерименталния неонатален модел прилаган в тази дисертация се използва каинова киселина за предизвикване на епилепсия. Преципитиращото събитие е на 20 постнатален ден. Тази възраст е съпоставима с възраста при човека между ранна детска възраст и възраста около пубертета (70). Това инициращо събитие се последва от период, свободен от гърчове и поява на по-късен етап на спонтанни рекурентни гърчове. Тъй като този модел има много сходни молекулярни и клинични черти с TLE, той е много подходящ за изследване на епилептогенезата лонгитудинално (106). Идеален метод за изучавне на епилептогенезата е използване на сравнителна стратегия между животинските модели и TLE. Един недостатък при сравнителното проучване е този, че инициращото събитие при TLE, не винаги включва status epilepticus. В този смисъл даже фебрилните гърчове, само в 5% прогресират до status epilepticus (39).

Процесът на епилептогенеза, както бе споменато по-горе, включва различни патологични процеси на реорганизация на епилептичния мозък.

В следващите раздели ще се спрем на някои от тях, като по-голямо внимание ще се обърне на невровъзпалението и ролята на глията, като медиатори и субстрат на невроналната увреда при еплепсия.

ГЛАВА 2

Роля на глията, невровъзпалението и цитокините в механизми на епилепсията

2.1. Въведение

Имунната система в мозъчната тъкан се различава от „класическата" в периферните тъкани. Това се свързва с липсата на лимфна система, наличието на ХЕБ, което ограничава целуларния и молекулярен трафик в ЦНС, както и ограничава броя на

клетките които могат да експресират MHC-комплекса и да осъществяват антигенна презентация. Поради тези причини мозъка дълго се е разглеждал като зона лишена от имунна активност. Тази концепция търпи промени в последните години. Доказано е, че имунната система, макар и по различни механизми е представена и в мозъка и има роля в мозъчното развитие, невропластичноста и даже невротрансмисията (126). Възпалителни процеси се свързват и с редица неврологични заболявания в ЦНС, като болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, мултипленна склероза (112).

Научни факти в последното десетилетие показват връзка между активацията на инфламаторните пътища и невродегенеративните заболявания, включително епилепсията. Установено е, че възпалителната реакциия в мозъка се появява не само при епилепсии с възпалителна генеза, но и при епилепсия на темпоралния лоб или туберозната склероза, което подсказва, че възпалението е общ патогенетичен фактор, спомагащ появата на спонтанни гърчове и невронална клетъчна смърт. Увеличени маркери на възпаление са открити в плазма и цереброспинална течност на пациенти с клонично-тонични гърчове, както и от мозъчна тъкан получена от пациенти подложени на хирургично лечение при фармакорезистентна епилепсия.

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 epilepsticus (121). 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 epilepsticus и са съчетани с реактивна глиоза. Фактът, че прилагането на нестероиднии антиинфламаторни средстава, 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 пропагация (201). В многобройни изследвания са доказани повишени нива на проинфламаторните цитокини IL-1beta и TNF-alfa.

От друга страна, обратно, се доказва, че тези проинфламаторни цитокини довеждат до повишена невронална хипервъзбудимост и гърчове, с увеличена вероятност за поява на спонтанни рекурентни гърчове (200).

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

2.2. Глиоза и инфаламаторен отговор

2.2.1. Общ преглед

Голям брой научни доказателства показват сигнификантни промени в различни клетки в ЦНС. Макар, че повечето начални изследвания са фокусирани върху невроналните клетки и тяхната дисфункция, в последните две десетилетия вниманието се пренасочва към неневронални клетки. Ролята на глиалните клетки се изследва не само като допринасяща за невроналните промени при гърчове, но също така и генерирането на самите гърчове.

Продукцията на цитокини се осъществява от глиалните клетки след активацията им. При епилепсията на темпоралния лоб, имунохистохимичният анализ показва изразена IL-1beta имунореактивност в острата фаза след staus epilepticus в микроглията и астроцитите. В хроничната или епилептогенна фаза преобладава астроцитна активация и освобождаване на цитокини. Активацията на глиалните клетки, известна като реактивна глиоза, се тригерира от първоначално преципитиращо мозъчната увреда събитие. Глиозата не само спомага да се освобождават проинфламаторни цитокини, но е и причина за промените в морфологичните и функционалните черти на въвлечените клетки.

2.2.2. Роля на микроглията в невроинфламаторния отговор

Микроглията произлиза от имунни клетъчни линии (41) и са специализирани макрофаги, които изпълняват имунни функции в ЦНС, като изграждат първата линия на защита на вродения имунен отговор. Те имат роля във почти всички описани патологии в ЦНС. При физиологични условия микроглията е представена в т.нар. „ resting state” и се характеризира с малко клетъчно тяло и финно разклонени израстъци (68). Независимо от този им вид микроглиалните клетки са активни и осигуряват подходяща среда за функциониране на невроните и тяхното биохимично обкръжение.

Смята се, че това се осъществява чрез техните подвижни и разклонени израстъци (68). След някои патологични процеси, които нарушават функционалната и структурна цялост на ЦНС, като епилептични гърчове например, микроглията претърпява структурни и функционални промени (59). Активираната микроглия се характеризира с издължено клетъчно тяло и изтънени и по-разклонени клетъчни израстъци. Установено е, че в този си вид микроглията мигрира към увредените зони, за което способстват отделяни стимули от дегенериралите неврони. В допълнение на факта, че микроглията притежава рецептори за такъв вид стимули, се установява, че самата микроглия също освобождава голям брой сигнални молекули, като проинфламаторни цитокини и растежни фактори (67). Отговорът на микроглията е разнопосочен и може да бъде, както невропротективен, така и да довежда до клетъчна смърт, в зависимост от типа на активацията и тежестта на увредата на ЦНС.

Активация на микроглията се установява и след индуцирани с каинова киселина гърчове в развиващ се хипокамп (P15, P21) при плъхове, както и в хипокампални клетъчни култури (36). В този вид експерименти се установява поява на активирана микроглия и хиперекспресия на микроглиални маркери, като Iba1-протеина (180).

2.3. Проинфламаторни цитокини и епилепсия

Цитокините са разтворими полипептиди, които медиират клетъчната сигнализация на възпалението и се секретират в ЦНС от макроглията и астроцитите. Ролята на цитокините първоначално се е разглеждала само като модулираща възпалението в патологични условия. Научни факти в последите години доказват конститутивна експресия на различни цитокини и техните рецептори, което подсказва, че те допринасят за нормални физиологични функции в ЦНС (112).

Широка гама от различни мозъчни увреждания тригерират усилена транскрипция на цитокини и техните рецептори. Такиви увреди включват травматична мозъчна увреда, патогени и епилептогенна активност. Установява се, че гърчовете довеждат до бърз инфламаторен отговор в глиалните клетки, който се състои в увеличени нива на прототипни цитикини, като IL-1beta и TNF-alfa и IL-6. IL-1-рецепторите се експресират в по-голяма степен в невроните (153). Между тези цитокини, дълготрайното увеличено ниво на IL-1beta предполага ключовата му роля в развитието на епилепсията.

В следващата част на изложението ще бъде описано по-задълбочено ролята на IL-1beta в патогенезата на епилепсията и възможностите за повлияването му.

2.4. Роля на IL-1beta в механизми на епилепсията и възможности за фармакологичното му повлияване

Близо една трета от пациентите с епилепсия са рефрактерни на съществуващите лекарства (28). Това налага необходимоста от търсене на лекарствени средства с болест-модифициращи свойства (22). В този аспект се търсят нови механизми за обяснение на болеста, както и за по-ефективна терапия.

Научни факти от експериментален и клиничен опит в последното десетилетие, показват по неоспорим начин, че мозъчното възпаление е характерен феномен на хипервъзбудимата мозъчна тъкаан 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 латентния период, който предшества появата на рекурентни гърчове. Тези факти дават основание за изграждане на хипотезата, че невровъзпалението има роля не само за процеса на генераране на гърчове, а също и за процеса на епилептогенеза.

Повишените нива на цитокини са отличителен белег в процеса на невровъзпаление.

Хипотезата, че мозъчното възпаление има роля в механизмите на епилепсията се подкрепя от редица автори. Известно е, че мозъчните цитокини участват в мозъчното възпаление, но тяхната роля в патогенезата на епилепсията не е добре изяснена (155). Един от водещите про-възпалетелни цитокини е IL1-beta и неговата роля при епилепсия се изучава интензивно през последните години.

2.4.1. IL-1 и неговите рецептори

В последните години, в механизмите на епилепсията се изучават някои инфламаторни молекули, включително и с експерименти за тяхното повлияване (20). Специален интерес предизвикват IL-1beta, TNF-alfa, HMBG1, и т.нар. Toll-like рецепторите. Особено внимание се обръща на ролята на IL-1Receptor(R)/Toll-like receptor (TLR) сигналните трансдукционни пътища, като водеща в процеса на мозъчното възпаление и ролята му в епилептогенезата. Ендогенни лиганди за тези две

молекули са съответно IL-1beta и рецептора му IL-1R тип 1, и т.нар. High mobility group box 1 и неговия рецептор TLR4.

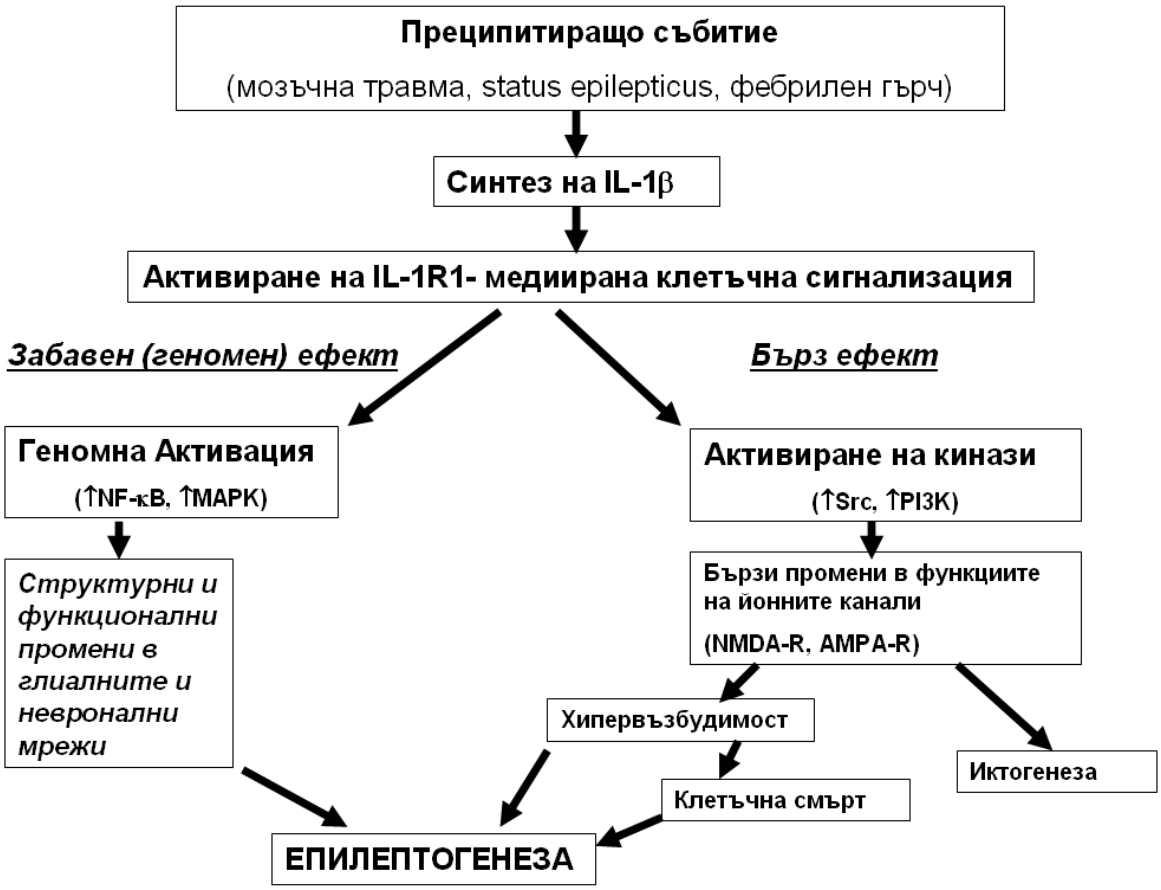
IL-1R/TLR сигналния механизъм има роля в рекурентните гърчове (174, 200, 201).

Основен източник за синтезата на тези провъзпалителни медиатори, както споменахме по-горе, са активираната микроглия, астроцитите и невроните. IL-1beta е индуциран в активираните астроцити и микроглия, а неговият функционален рецептор е IL-1R1, който се експресира както в невроните така и в астроцитите след проконвулсивни въздействия или по време на рекурентни гърчове (157, 159, 160)

IL-1beta има многобройни функции в ЦНС. Някои от тях са свързани с механизми на епилептогенезата. Ролята на IL-1beta в тези процеси е изследвана, както при пациенти, така и на животински модели. Резултатите показват повишена експресия на IL-1beta след гърчове. Екзогенно въведения IL-1beta има проконвулсивно действие. Взети заедно тези факти дават основание да се допусне роля на този цитокин при епилепсия.

Фиг.2 обобщава предполагаемото про-епилептогенно действие на IL-1beta, медиирано чрез неговия IL-1R1 рецептор. Тези процеси се развиват по време на епилептогенезата. Два са предполагаемите интраневронални ефекти на IL-1beta в тези механизми:

1) Класически транскрипционен вътреклетъчен механизъм, включваща митоген-активируемата протеин киназа (MAPK) и NF-kB зависими пътища. Те водят до повишена експресия на гени, които са свързани с епилептогенеза (неврогенеза, невронален растеж, ангиогенеза, астроцитна дисфункция).
2) Втори нетранскрипционен сигнален механизъм, включващ киназни системи (напр. Src kinase). Този трансдукционен път води до повишена невронална възбудимост в рамките на 30 мин чрез фосфорилиране на волтаж-зависимите и рецептор-оперирващите канали. Всичко това повишава възбудимоста на невроните и снижава гърчовия праг.



Фиг.2. 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. Фактът, 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 транскрипциона 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 проводимоста на йонни канали, медиирано чрез въздействие върху кинази като Src-kinase и PI3K.

Повишени нива на IL-1beta се установяват в период на 30 мин.от началото на гърчовете и това е време, през което вълната на възпалението се разпространява до ендотелните клетки на кръвно-мозъчната бариера. В този процес са включени и групи

от неврони, които са в зоната на генериране и разпространение на гърчовете (4). Продукцията на IL-1beta в ендотела на микросъдовете и периваскуларните астроцити допринасят за увреждането на кръвно-мозъчната бариера. Този процес се развива едновременно с възпалението в експерименталните и човешки епилептични тъкани (38, 95, 120, 140).

Действието на IL-1beta се осъществява по рецепторен механизъм чрез въздействие върху IL-1R1. Установена е повишена експресия на IL-1beta, IL-1R1, както и на неговия естествен антагонист IL-1beta receptor antagonist (IL-1RA) в неврони и астроцити в епилептичните тъкани (13). И трите молекули са свръхекспресирани в мозъци на плъхове след химически или електрически индуцирани гърчове (210), като нивата на IL-1beta остават повишени 60 дни след експериментален status epilepticus. В допълнение към тяхната свръхекспресия в резултат на гърчове, IL-1beta и IL-1RA могат също да модулират податливостта към гърчове. Когато IL-1beta се приложи директно в CNS, е отчетено активиране на гърчовете, предизвикани с каинова киселина и бикукулин (153). Установено е също снижаване на гърчовия праг в модели с фебрилни гърчове. Обратно, IL-1RA има антиконвулсивни качества след интрацеребрално въвеждане в опити с трансгенетични мишки, които свръхекспресират този протеин в астроцити (146). Също така IL-1R knock-out мишки са по-малко податливи на експериментално индуцирани фебрилни гърчове и конвулсивния ефект на bicuculline (181). Клетките, продуциращи IL-1beta също експресират подобни рецептори, показващи участието едновременно на автокринни и паракринни механизми.

Установено е че IL-1beta има роля в нормалните когнитивни процеси (120). Източник на IL-1beta в този случай е микроглията (121). В експерименти с генетична аблация на IL-1beta и IL-1 рецептор тип 1 е доказано изразено нарушаване в когнитивните функции и нормалния процес на запаметяване. Свръхекспресията на IL-1beta намалява способността за запаметяване. Ролята на цитокините, като IL1beta в мозъчните функции е разнопосочна. От една страна при нормални физиологични условия IL-1beta подържа неврогенезата, докато в епилептичния мозък този цитокин подтиска неврогенезата и функцията на новосформирани нервни клетки (200).

По отношение на проконвулсивния ефект на IL1-beta, както споменахме, се смята, че той се реализира чрез активирането на IL-1 рецептор 1 (IL-1R1). Установено е, че това се последва от активиране на невронална сфингомилелиназа и Src-киназа (**Фиг.3**). Тази киназа фосфорилира NR2B-субединицата на NMDA рецептори. Стабилизирания в тази си форма NMDA-рецептор увеличава NMDA-медиирания

калциев инфлукс в невроналните клетки. Всичко това довежда до усилване на глутаматергичната невротрансмисия и съответно на ексцитотоксичноста.

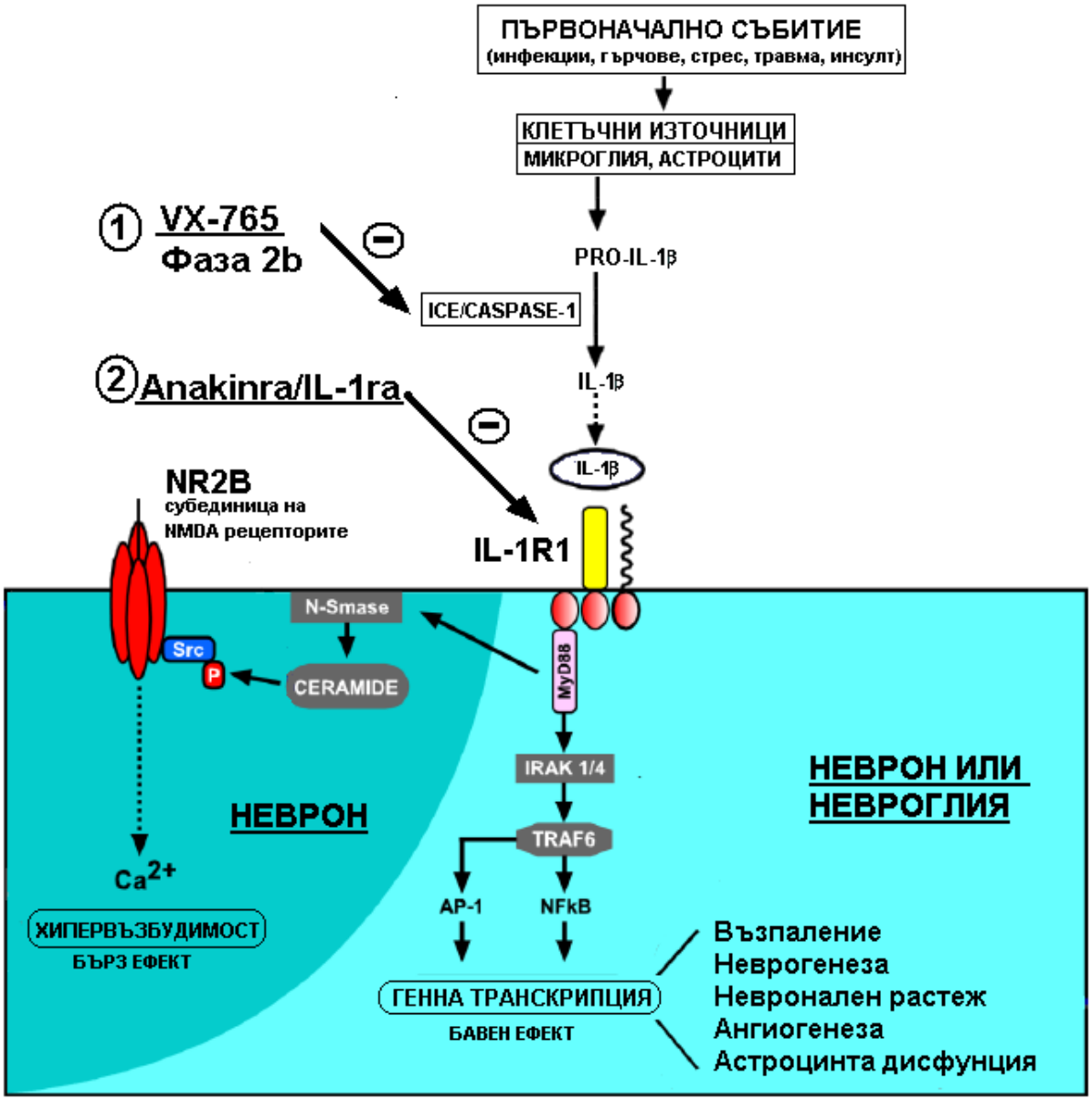
Друг вероятен ефект на IL-1beta се свързва с редукция на глутаматния up-take и повишено освобождаване на глутамат от глиалните клетки. Допуска се, че това е свързано с увеличена продукция на TNF-alfa.

2.4.2. Повлияване на мозъчното възпаление-терапевтична стратегия при епилепсия

Клинични факти, които показват, че повлияването на мозъчното възпаление при епилепсията са ограничени. През последните години нараства броя на научни доказателства, които подкрепят ролята на възпалението в генерирането на гърчовете и в епилептогенезата. Противовъзпалителните агенти се разглеждат като кандидати за нов клас антиепилептични лекарствени продукти. Съединения, показващи обещаващи резултати чрез влияние върху мозъчното възпаление са инхибиторите на интерлевкин конвертиращия ензим (ICE)/caspase 1 и IL-1R антагнисти. ICE/caspase-1 е протеаза, която катализира превръщането на неактивния прекурсор pro-IL-1beta в активнив IL-1beta (196).

Съществуват доказателства за повишени нива на IL-1beta и IL-1R1, както и ICE/caspase-1 активация (120) в хирургически резектирани епилептогенни тъкани на фармакорезизстентни пациенти с епилепсия на темпоралния лоб (171, 198,).Фактите показват активизация на IL-1beta/IL-1R1 комплекса, както в клинични условия, така и при експериментални модели.

Натрупани са много доказателства за антиконвулсивния ефект на посоченото по горе вещество, VX-765 (специфичен инхибитор на ICE/caspase1) след системното му приложение, както модел на остри гърчове при мишки, така и в хронични гърчове (19, 149, 151, 153) (**Фиг.3**).



Фиг 3. IL-1beta трансдукционна сигнализация и място на действие на VX-765 и Anakinra. Проконвулсивното влияние (инфекция, status epilepticus, травма, стрес) води до активация на глията и секретиране на проинламаторни цитокини като IL-1beta. Сигналната активация в невроните, както е описано на фигурата, води до **бързо** повишаване на NMDA-рецепторната Ca^{2+}-проводимост, чрез ceramide/Src-медиирано фосфорилиране на NR2B-субединицата. Това води до невронална хипервъзбудимост. Освен този бърз нетранскрипционен ефект съществува и **бавен,** който е свързан с активиране на транскрипционни фактори имащи значение за молекулярни клетъчни промени в механизми на епилептогенезата. VX-765 е специфичен ICE/caspase-1 инхибитор. Anakinra е IL-1beta рецепторен антагонист.

Интерлевкин конвертиращият ензим (ICE/caspase1) е ензим, отговорен за синтезата на IL-1beta. Този ензим се активира при интрацелуларни йонни промени в глията и невроните по време на хипервъзбудимост, или след стимулацията на P2X7 рецепторите от ATF. Тези условия съществуват в мозъчните тъкани по време на гърчове. Блокадата на ICE/caspase1 чрез използване на нейни селективни инхибитори като Pralnacasan или VX-765 редуцират до 50% острите рекурентни гърчове, индуцирани с каинова киселина при мишки и плъхове.

VX-765, който представлява нов клас от специфични ICE/caspase-1 инхибитори е pro-drug с подобрена орална бионаличност, който е преминал в клинични изпитания за лечение на инфламаторни и автоимунни състояния (154). Доказано е, че VX-765 блокира освобождаването на IL-1beta индуцирано при активацията на ICE/caspase-1 от проинфламаторни стимули. Антиконвулсивния ефект на този клас лекарства (pralnacasan и VX-765) не се проявява при мишки с дефект в гена за ICE/caspase-1. Тези факти, взети заедно с доказателствата, че ICE/caspase-1 knock-out мишки са нечувствителни на предизвикани с каинова киселина гърчове (197) подкрепят ключовата роля на ICE/caspase-1 активацията в механизмите на епилепсията.

Клинични изпитания във фаза 2 са в напреднал стадиий, на оценка за VX-765 при лечението на лекарствено-резистентни форми на парциална епилепсия.

В заключение може да се каже, че VX-765 има мощен антиконвулсивен ефект при остри и хронични гърчове на мишки, които са резистентни на конвеционалните антиепилептични лекарства. Нови перспективи за клиничната употреба на селективните ICE/caspase-1 инхибитори се базират на изследванията с VX-765. Остри и хронични модели на гърчове са сензитивни на противовъзпалителни средства, като антагонистите на toll-like receptor (121). Това е полезно при фармакологичните опити за подтискане на мозъчното възпаление и постигане на контрол над гърчовете.

Друг подход в блокирането на IL-1beta сигнализацията е блокирането на неговия IL-1 рецептор чрез Anakinra (**Фиг.3).** Това е човешки конкурентен рецепторен антагонист получен чрез рекомбинантна технология. До момента лекарството се използва за 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. Установено е, че астроцитна хиперекспресия на IL-1 рецепторния антагонист редуцира склонността към гърчове, предизвикани с бикукулин и каинова киселина.

2.4.3. Заключение с изводи от анализа на литературата

Изследвания потвърждават хипотезата, свързваща вродения имунен отговор в мозъка и последващото възпаление с епилепсия. Потвърдено е, че в резултат на гърчовете се активират многобройни проинфламаторни механизми в мозъка. Оформя се порочен кръг, в който гърчовете предизвикват мозъчно възпаление, а възпалението гърчове. Активирането на вродения имунитет и инфламаторни пътища е несъмнено. Установено е, че активираната по този начин глия показва повишена експресия на важни цитокини, един от които е IL-1beta. Той е свързан с епилептогенезата чрез действието си върху гърчовия праг, невродегенерацията, синаптичната пластичност и регулация на пермеабилитета на ХЕБ. На тази база е документирано, че антиконвулсивния ефект на средства, блокиращи IL-1R/ TLR механизми се изследва задълбочено. Бъдещи изследвания са необходими за допълнително изясняване на някои въпроси като:

1. Дали мозъчното възпаление е причина или последица от гърчовете? Или и двете?
2. Дали възпалението отключва гърчовете и епилепсията? При какви обстоятелства и как?
3. Кои клетки са включени в мозъчното възпаление-неврони/глия или периферни имунни клетки?
4. Дали астроцитната и микроглиалната активация и съпътстващото освобождаване на цитокини е свързано с процесите на епилептогенеза?
5. Дали да очакваме развитието на ново направление на специфична противовъзпалителна терапия при лекарствено резистентна епилепсия? Средства не само със симптоматично действие, но и с болест-модифициращ ефект могат ли да са ефективни?

Ролята на IL-1beta в механизмите на епилепсията е несъмнен. Фармакологични изследвания, при който се инхибира ендогенната продукция на IL-1beta и/или неговата клетъчна сигнализация са в ход с клиничните изпитания на VX-765. Съединението е във фаза 2B на клинични изпитания, като е показало безопасност и добро толериране от пациенти с лекарствена разистентност към други антиепилептични средства.

Разглеждайки ролята на цитокините и тяхната роля в механизмите на епилепсията, от голямо значение е изясняването на сигналните трансдукционни пътища въвлечени в епилептогенните ефекти на IL-1beta. Като ключов молекулярен път медииращ ефектите

на IL-1beta, както и на други сигнални молекули се разглежда IL-1R/ TLR. TLR-рецепторите имат основно значение за активирането на вродения имунитет и в следващия раздел ще бъде разгледана по-обстойно ролята им в процесите на епилептогенезата.

2.5. Роля на IL-1R/TLR сигнализацията в патогенезата и лечението на епилепсията

2.5.1. Въведение

От въвеждането на първото средство за лечение на епилепсията, калиевия бромид преди век и половина (99) до сега, когато са въведени новата генерация антиепилептични лекарства, контрол върху гърчовете се постига в около 70% процента от пациентите. 1/3 от възрастните пациенти с епилепсия се смятат за фармакорезистентни (98). По тази причина интересът към изясняване причините за резистентноста е от ключово значение. Нещо повече, много от антиепилептичните лекарства са свързани със сериозни странични ефекти, като психологически и когнитивни проблеми, риск от суицидни тенденции (5), фатална хепатотоксичност (172). Едно от основните предизвикателства пред съвременната антиепилептична терапия е откриване на алтернативни антиконвулсивни подходи.

Със значителния прогрес в имунологията, имунитетът и възпалението се разглеждат като ключови елементи в патобиологията на епилепсията. Освен при епилепсия, вроденият имунитет има значение за широк кръг заболявания (**Фиг.4**).

Една от главните насоки в разработването на нови антиепилептични средства е това те да имат действие върху прогресията на болеста, а не само върху симптомите. Търсенето на нови таргети в този контекст е фокусирано към мозъчното възпаление, тъй като е доказано, че този феномен е интегрална част от увредената хипервъзбудима мозъчна тъкан, която генерира рекурентните гърчове. Натрупани са голям брой преклинични и клинични доказателства за оформянето на порочен кръг с положителна обратна връзка между мозъчното възпаление и епилептогенезата. Рекурентните гърчове и мозъчните увреди водят до up-regulation на проинфламаторни цитокини и активира имунните отговори, които усилват невроналната хипервъзбудимост и податливост към гърчове.

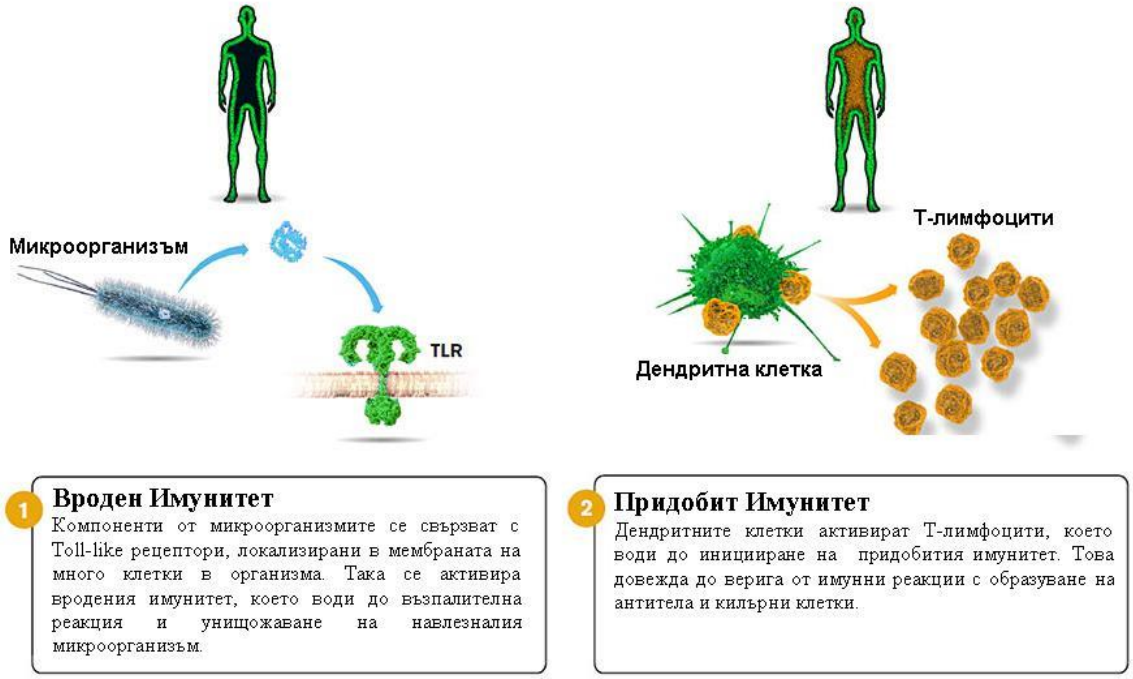


Фиг 4.. Роля на вродения имунитет за различни типове патология.

2.5.2. Имунитет и TLR рецептори. Ефекти свързани с епилепсия.

Налични научни доказателства в последните години доказват, че вроденият и придобитият имунитет са активирани в мозъка в резултат на отговори към патогени, собствени антигени или клетъчни увреждания с различна етиология (8).

Традиционно имунната система се разделя на две части – вродена и придобита. (**Фиг. 5**):

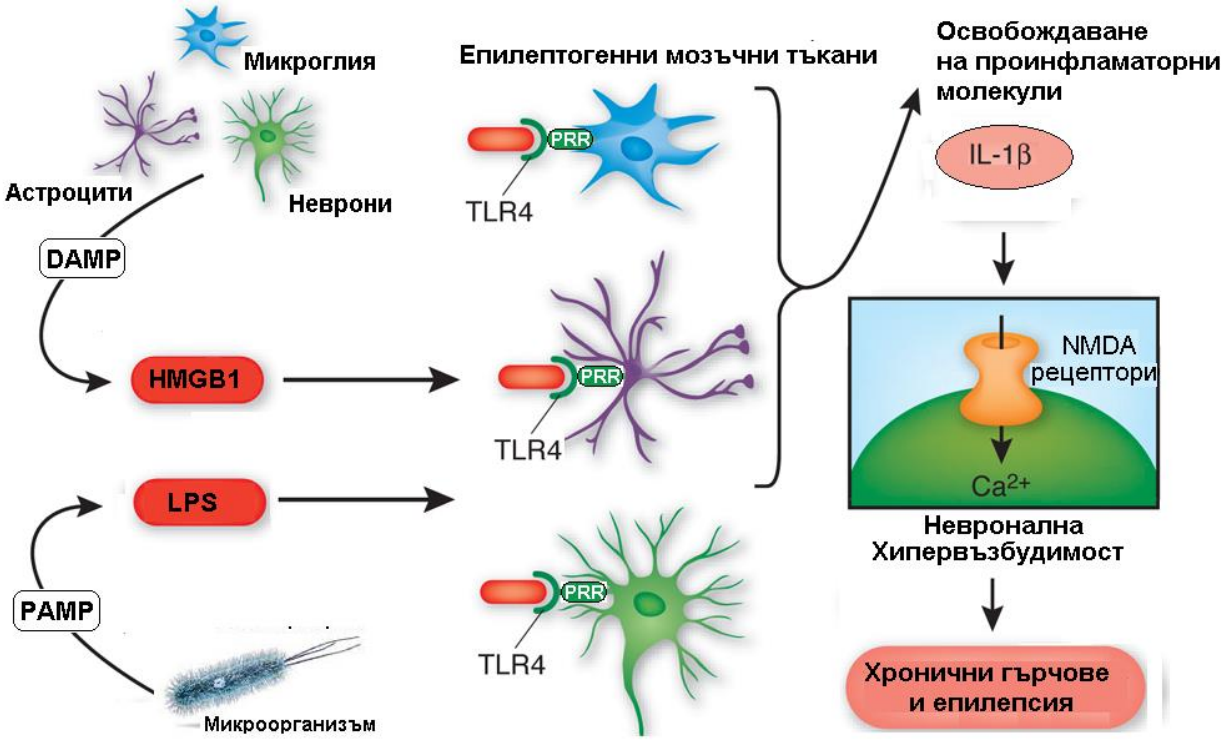


Фиг.5. Вроден и придобит имунитет. Свързването на Toll-like рецепторите със структури от микробиален произход довежда до активиране на вродения имунитет и

възпалителна реакция. Освен това, Toll-like рецепторите активират дендритните клетки за комункацията им с Т-лимфоцитите, което стимулира придобития имунитет.

TLR-рецепторите разпознават и се свързват с общи (високо консервативни) структури в мембраната на патогенни, така и ендогенни молекули, наречени „опасни сигнали", които се отделят от увредени или стресирани клетки (120). Тези общи по структура компоненти от патогенен произход са т.нар. pathogen associated molecular pattern или PAMP.

Освен тези структури TLR-рецепторите разпознават и т.нар. damage associated molecular pattern (DAMP), т.е. описаните по-горе елементи от непатогенен произход, или „опасни сигнали" (**Фиг. 6**). Към тях спада и HMGB1, който се отделя от увредени нервни клетки в резултат на гърчове. Тези два компонента, съответно от патогенен и непатогенен произход (PAMP и DAMP) се разпознават от TLR4-рецепторите, разположени на повърхността на антиген-презентиращите клетки. TLR4 спадат към фамилията на т.нар. Pattern-Recognition Receptors (PRRs), поради факта, че разпознават тези общи структури от патогенен и непатогенен произход. Описаното по-горе PAMP/PRR взаимодействие е в основата на активирането на вродения имунен отговор. С развитието на имунологията е описан и PRR-сигналния трансдукционен път, който трансдуцира сигнала интрацелуларно след активиране на TLR4-рецепторите. TLR сигнализацията включва привличането на цитоплазмени адапторни протеини (напр. MyD88) и последваща активация на протеинни каскадни реакции, водещи до активиране на нуклеарния транскрипционен фактор NF-kB (**Фиг. 3**). Той има основна роля в транскрипцията на гени с важна роля за възпалението. В последните години вниманието е привлечено от този сигнален път и ролята му за епилепсията (120). *Обобщавайки може да се каже, че TLR-рецепторите се активират от PAMP и DAMP, и чрез сигналните си пътища поддържат хронично възпаление в епилептогенните тъкани (***Фиг.6***). Това възпаление от своя страна повишава възбудимоста на невроните и предразполага към гърчове. Оформя се порочен кръг, в който гърчовете предизвикват възпаление, а възпалението от своя страна- гърчове.*



Фиг. 6. PAMP и DAMP-молекули и ролята им в епилептигенезата. Свързването на молекули от патогенен (PAMP) и непатогенен (DAMP) произход с TLR4-рецепторите довежда до освобождаване на проинфламаторни субстанции (IL-1beta), които активират NMDA-рецепторите. Това води до невронална хипервъзбудимост и епилептогенеза.

Доказано е, че инфламаторните отговори в ЦНС могат да бъдат индуцирани и при липса на инфекциозна етиология, като при мозъчен инсулт, травми на мозъка и някой невродегенеративни болести. Експерименталните данни показват, че гърчовата активност per se индуцира мозъчно възпаление, а също така, и че рекурентните гърчове подържат хронично възпаление. При всички тези състояния се отчита значимо повишена активност на микроглията и астроцитите и съответната хиперекспресия на TLR-рецепторите. Отчита се и привличането на периферни имунни клетки (127).

Прието е, че вроденият имунитет има ключова роля в отговора към патогенни и непатогенни причинители.

Имунните функции, в които Toll-like рецепторите имат основно значение включват:

- Координиране на бързите тъканно специфични и глобални отговори на вродената имунна система към патогените. Това се осъществява чрез продукцията на цитокини и хемокини (TNF, интерферони, IL-1, IL-2 IL-6, Il-8, Il-12);

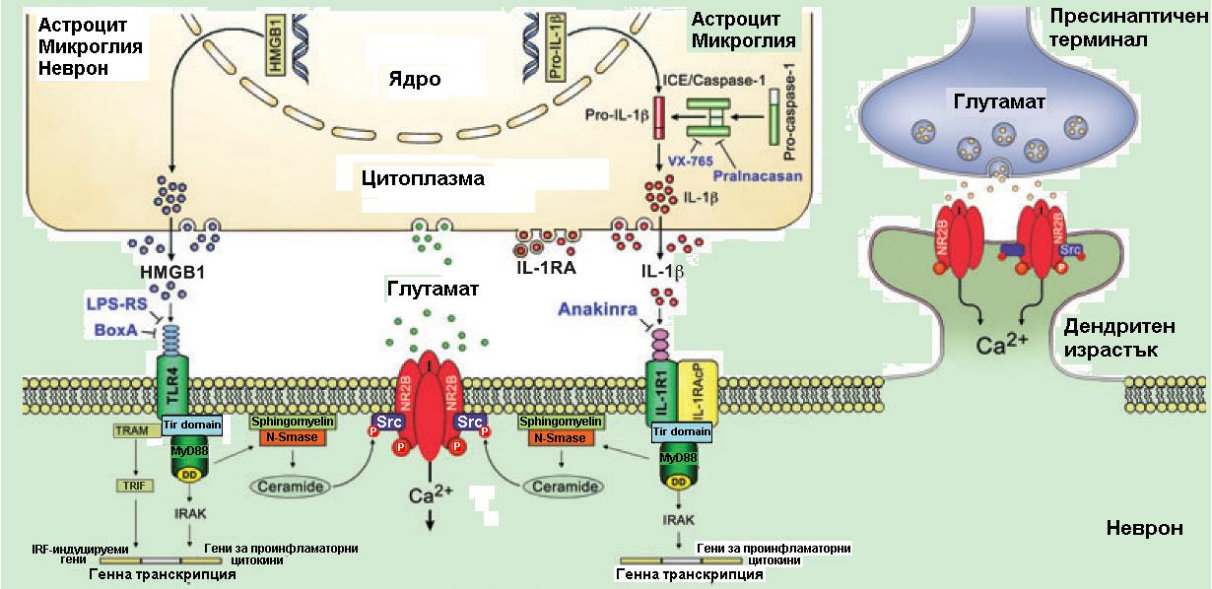
- Преход от вроден към придобит имунитет. В допълнение към ролята му във вродените имунни отговори, TLRs имат съществени функции за придобития имунитет чрез активиране на антиген презентиращите клетки. Стимулираната от TLR цитокинова сигнална каскада довежда до серия от клетъчни взаимодействия, които предизвикват два важни крайни ефекта – активация на Т-клетъчната диференциация и матурация на дендритните клетки.

Макар цитокините и свързаните с тях сигнални пътища да се разглеждат като интегрална част от вродения и придобит имунитет в периферните тъкани, сега е доказано, че същите инфламаторни молекули имат неконвенционални невромодулиращи функции в ЦНС. Действайки директно или индиректно върху невроните и променяйки техния праг на възбудимост, те имат съществена роля в епилептогенезата.

IL-1/TLR сигналният път е с основно значение за тъканното възпаление, тъй като е активатор на придобития имунитет. Това е първата имунна система, която е индуцирана при тъканна увреда или след действието на широка гама биологични нокси (като гърчове, травми, инфекции, стрес, инсулт). Експресията и функцията на IL-1R/TLR сигнализацията е първоначално описана в лимфоидните тъкани. По късно е установено, че същата сигнална система, както бе споменато по-горе, функционира и в мозъка, където има различни физиологични ефекти.

2.5.3. Молекулярни механизми в проконвулсивния ефект на IL-1R/TLR рецепторния комплекс

Активирането на IL-1R/ TLR сигнализацията променя невроналната възбудимост по два механизма: 1.) Бърз нетранскрипционен механизъм и 2.) Бавен ефект, свързан с транскрипционна активация на гени под контрола на NF-kB и AP-1 (**Фиг. 7**).



Фиг. 7. IL-1R/TLR-сигнализация при епилепсия. Проконвулсивни събития в ЦНС (като локално увреждане или гърчове) или периферно 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-медиирано 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.

1) *Бързият ефект* е свързан с потенциране на NMDA-медиирания Ca^{2+} инфлукс. Това се реализира чрез фосфорилиране на NMDA рецепторната 2B субединица, посредством Src-киназа и сфингомиелинкиназа медиирано действие. Тъй като ceramide-активируемата Src система е главния модулатор на йонната канална активност, влиянието върху нея по описания механизъм усилва нервната възбудимст и има проконвулсивен ефект. Инхибирането на тази система (чрез действие върху цитозолния адапторен белтък MyD88, важен за биосинтезата на ceramide, или на нивото на Src активноста) би подтиснало инфламационно-медиираната хипервъзбудимост.

Прилагането на сфингомиелиназни, Src антагонисти, или ifenprodil, който е блокер на NR2B субединицата на NMDA рецепторите, инхибира проконвулсивното

действие на HMGB1 и IL-1beta. *Обобщавайки може да направим извода, че усилената NMDA функция е ключовият механизъм, чрез който ендогенните активатори на IL-1R1 и TLR4 способстват за поява на гърчовете.* Това е в съзвучие с ключовата роля на NMDA рецепторите в генерирането на гърчовете.

2) *Бавен, дълготраен ефект*. Активизацията на IL-1R1/ TLR4 сигнализацията може да доведе също и транскрипционни промени, които да усилят мозъчното възпаление чрез NF-kB зависимата транскрипция на инфламаторни гени. Това довежда до хронично понижаване на гърчовия праг чрез индукция в експресията на гени, въвлечени в неврогенеза, клетъчна смърт, синаптична молекулярна реорганизация и пластичност. Тези процеси протичат в процеса на епилептогенеза, след инициалното преципитиращо събитие и се смятат за спомагащи трансформирането на нормалната мозъчна тъкан в гърчово-генерираща (146).

Между дълготрайните ефекти, които вероятно са засегнати от мозъчното възпаление и в частност от HMGB1 е транскрипционното активиране на ендотелните клетки и периваскуларните астроцити. Това довежда до увреждане на ХЕБ (11). Ролята на променения пермеабилитет на ХЕБ в епилептогенезата се свързва с факта в резултат на екстравазация на серумния албумин в мозъчния паренхим се активира TGF-beta медиираната генна програма в астроцитите. Това довежда до down-regulation на Kir4.1 K-канали и глутаматните транспортери. В резултат на това се нарушава йонното буфериране и увеличени екстрацелуларни нива на глутамата, което усилва хроничната невронална хипервъзбудимост.

Ако отново се върнем на експерименталните модели с LPS, се приема една интересна хипотеза за взаимовръзката на LPS и HMGB1. Вероятен сценарий е, че LPS (PAMP) наподобява на ендогенно освобождаваните „опасни сигнали", към които принадлежи HMGB1. Както бе обсъдено по-горе тип т.нар. danger associated molecular pattern (DAMP) се освобождава от стресирани или увредени неврони. Такиви условия се създават при гърчова активност. След освобождаването си от невроните, този протеин взаимодейства с TLR4 и предизвиква гърчове, които от своя страна водят до нова вълна на HMGB1-освобождаване от активираната микроглия и астроцити, водещи до цикъл с положителна обратна връзка, в който гърчовете предизвикват възпаление, а възпалението – гърчове.

От описаните дотук молекулярни механизми може да се даде положителен отговор на въпросите: Предизвикват ли гърчовете мозъчно възпаление? И обратно-предизвиква ли мозъчното възпаление гърчове? Това потвърждава хипотезата за

оформяне на порочен кръг с положителна обратна връзка между епилептиформената активност и мозъчното възпаление.

Идентификацията на IL-1R/TLR сигнализацията като важен фактор за острите и дълготрайните промени в мозъчната възбудимост и гърчовете разкрива възможноста инфламаторните отговори на вродения имунитет към микробни патогени (PAMP) или към ендогенни сигнали (DAMP) да имат едни и същи молекулярни таргети. Това би дало обяснение за причинната връзка между инфекциите на ЦНС или мозъчните увреждания и епилепсията.

Установената роля на IL-1R/TLR сигнализацията в патогенезата на епилепсията дава възможност чрез фармакологична инхибиция на тази сигнализация да се повлияват фармакорезистентни форми на заболяването. Някой от лекарствата, които могат да се използват в този аспект са в клинични изпитания за лечението на сепсис и инфламаторни заболявания, поради важната роля на IL-1R/TLR системата за този вид заболявания. Средства като ICE/caspase 1 инхибитор VX-765 и Anakinra (IL-1Ra) се изпитват в клинични условия (**Фиг. 3**). Възлагат се надежди и за използване на TLR4-антагонисти и HMGB1-антагонисти. Тези средства имат потенциал за редуциране на имунните и възпалителните отговори в епилептогенните зони и по този начин да подтиснат невроналната хипервъзбудимост.

2.5.4. Заключение

Изследванията в последните години показват, че мозъка е имунологично активен. Мозъчният вроден имунен отговор към различни увреди се осъществява основно от микроглия и астоцити. Доказано е, че проинфламаторните медиатори в епилептогенните пътища активират някои неконвенционални интрацелуларни пътища. NF-kB-медиираната генна транскрипция, описана при периферното възпаление, е активирана и в мозъка в резултат на рекурентните гърчове. С напредъка на имунологията беше установена активация на IL-1R/TLR сигнализацията в резултат на гърчова активност. Медиирания от този сигнален път проконвулсивен ефект се реализира от екзогенни нокси (PAMP), както и от ендогенни субстанции (DAMP). Голямо значение във втория случай се отдава на нуклеарния протеин HMGB1.

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 патогентични механизми в епилептогенезата. Този нов подход в лечението на епилепсията дава надежди за повлияване на фармакорезистентни форми на заболяването.

ГЛАВА 3

Кетогенна диета и механизми на епилепсия

3.1. Въведение

В началото на XX век медицинската наука приема гладуването като ефективен метод за контролиране на гърчовете. Механизмът, който се предполага, че стои в основата на наблюдавания ефект, се свързва с намаляване на „интестиналната интоксикация", която се разглежда като основна причина за епилепсията.

Малко по-късно, през 20-те години на 20 век се оформя научното становище, че наблюдаваният лечебен ефект от гладуването се дължи на метаболитните промени, които настъпват в резултат на гладуването. Тази иновативна хипотеза довежда до изработването на такъв вид диета, която да наподобява ефекта от гладуването. Диетата богата на мазнини и бедна на въглехидрати и протеини, е наречена кетогенна диета поради факта, че довежда до повишаване на кетонните тела.

Кетозата, т.е. повишението на трите „кетонни тела" – beta-хидроксибутират, ацетоацетат и ацетон, е централна в метаболитните промени в резултат на прилагане на диетата. По време на гладуване (или прилагане на кетогенна диета) кетонните тела се превръщат в основен енергиен източник на енергия за мозъка.

Мозъка на младите индивиди (особено в първите 2 години) е с много по-голям капацитет за поемане и утилизация на кетонните тела. Кетозата се оказва особено важна за преживяването на младия организъм и за еволюцията на мозъка,

Кетогенната диета (КД) се прилага, както като средство за изследване механизмите на епилепсията, така и като терапевтична алтернатива. Основна идея при прилагането и е, чрез установяване на физиологичните промени в резултат на прилагането на диетата, да се вникне във фундаментални молекулярни механизми в основата на иктогенезата. От наблюденията, че при пациенти, които имат задоволителен контрол над гърчовете се наблюдава възстановяванне на епилептичната

активност, при прекъсване на диетата, може да се направи заключението, че глюкозната рестрикция и кетонемията е в основа на иктогенезата.

Въпреки въвеждането ѝ преди близо 100 години, механизмът на кетогеннта диета остава загадка.

От направените многобройни изследвания се оформят две основни тенденции за обясняване на механизма ѝ.

- **Първата насока е свързване на антиконвусивният ѝ ефект с повишениете нива на кетони. Търсят се доказателства за техния ефект върху хипервъзбудимостта на мозъчните неврони.**

- **Втората основна хипотеза се свързва не само с повишените нива на кетони, а с понижаването на глюкозата и нейните ефекти върху невроналната възбудимост.**

В следващите два раздела ще се разгледат именно тези две тенденции в усилието за обясяване механизма, по който кетогенната диета оказва терапевтичния си ефект.

3.2. Роля на кетонните тела в механизмите на кетогенната диета

Използването на диета в лечението на епилепсията не е нова идея. Тя е едно от най-старите съществуващи средства. През 20-те и 30-те години на миналия век единствените антиепилептични лекарствени средства са фенобарбитал и бромиди. През 1921 г. в Майо Клиник (Рочестер, Минесота) за първи път е приложена кетогенна диета за лечение на деца с фармакорезистентна епелепсия (209). Този нов тип лечение ограничава сериозно приема на въглехидрати, протеини, калории и протеини, а увеличава приема на масти до 90% от калорийния прием. КД е била създадена, за да имитира терапевтичния ефект от гладуването, използван преди векове за лечение на епилепсия.

Установява се, че КД повлиява успешно гърчовете в случаите на рефрактерна на лечение детска епилепсия. Защо се налага изучаването на механизма ѝ? Първо, КД е ефективна, но малко е направено да бъде по-леко приемана от пациентите. Второ, КД

има потенциални сериозни странични ефекти и може да причини сериозни метаболитни нарушения; това може да бъде избегнато ако се познава по-добре механизма на действието й. Трето, по-доброто познаване на механизмите на КД ще спомогне за разбиране на метаболитните и физиологичните основи на мозъчна функция, както при нормални условия, така и при патологични състояния, каквито са гърчовете. Колкото по-добре се изясни как КД подтиска гърчовете, подтиска и подобрява когнитивния дефицит, толкова повече тя ще бъде рационален избор за пациентите.

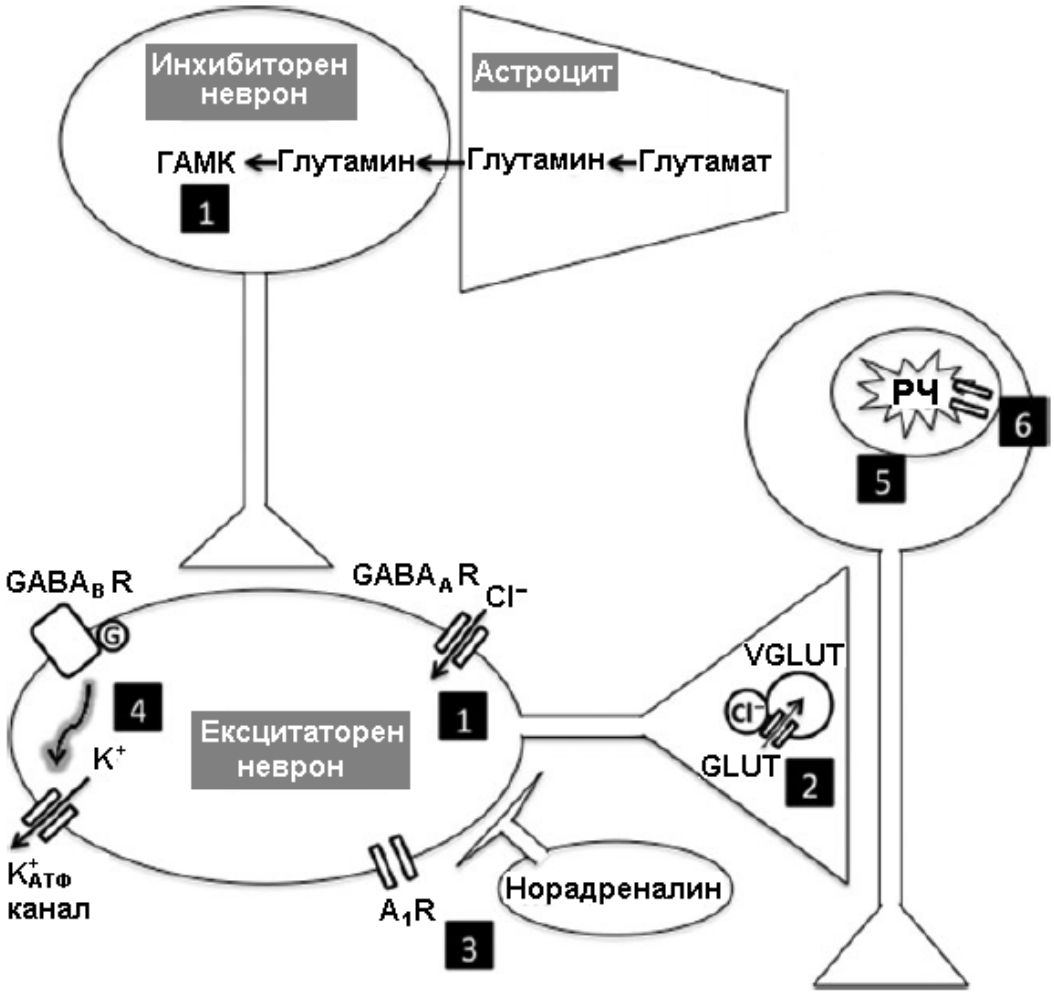
Известно е, че съвременните антиепилептични лекарства имат поне 6 важни механизма на действие. Основни таргети са йонни канали и транспортери, локализирани в плазматичната мембрана. *Фундаментален въпрос относно механизма на КД е дали той е свързан с този вид структури, имащи връзка с невроналната възбудимост.*

След въвеждането си КД е много популярна, но с появата на Phenytoin през 1936 г., тя остава на заден план, и то само като средство на краен избор при деца с тежка епилепсия. През 1994 г. със създаването на Charlie Foundation от родителите на дете лекувано с КД тя отново привлича вниманието в САЩ, а по-късно и в света. Понастоящем има 4 варианта на диетата – класическа КД, диета с триглицериди с средна дължина на веригите, диетата на Аткинсън и диетата с нисък гликемичен индекс.

Праисторически документи от Средните векове а също така от Библейски времена показват, че КД е била прилагана под форма на гладуване или с т.нар. „водна диета". Използването на „храната като лекарство" е атрактивна идея и са направени много усилия за установяването на ефекта й върху метаболизма. Класическата кетогенна диета се състои в приемането на мазнини към въглехидрати в съотношение 4:1 (141). Приемането на въглехидрати е под 50 гр/ден. Драстичното намаление на въглехидратите води до редуциране на глюкозната утилизация. Вместо това черният дроб използва мастните киселини за продукция на кетонни ни тела (beta-hydroxybutyrate-BHB, и ацетоацетат-ACA), които осигуряват клетъчния метаболизъм вместо глюкоза. Известно е, че голяма част от продуцираната енергия в организма се използва за покриване енергийните нужди на мозъка. По време на кетогенна диета, КТ заместват глюкозата като енергиен източник за мозъка (136). Стига се до състояние на кетоза.

3.2.1. Кетонни тела

Двете главни насоки, в които са фокусирани изследванията на кетогенната диета са КТ и метаболитните промени свързани намалената глюкозна оксидация. По-ранни изследвания за ефекта на кетогенната диета свързват развитието на кетоза с повлияване на гърчовете (56, 89, 110). В животински модели степента на кетоза не корелира със степента на ефикасност на кетогенната диета. При експерименти върху хора има корелация между повишените нива на кетонни тела и противогърчов ефект (60, 194). Много съвременни изследвания показват връзка между КТ и невроналната възбудимост.



Фиг.8. Механизми на антиепилептично 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 А1-рецептори. Повишената норадреналинова активност има антиконвулсивен ефект. (**4**) Хиперполяризация на неврона посредством отваряне на Катф-канали-ефект свързван 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.

3.2.2 Влияние върху глутаматното складиране.

Дълго подържана хипотеза е, че КТ могат да действат директно като фармакологични агенти, но техния таргет е оставал неизяснен. Съвременни изследвания показват, че складирането на глутамат в синапсните везикули чрез глутаматния транспортер (VGLUT2) се инхибира от КТ (87). VGLUT2 е отговорен за запълването на пресинаптичните везикули по Cl- зависим механизъм (**Фиг. 8**). Използвайки протеолипозоми, като in vitro модел, е доказано, че Cl- е алостеричен активатор на VGLUT и се инхибира компетитивно от КТ (по-изразено от ацетоацетат в сравненение с ВНВ) (186). Използваните в експериментите концентрации на АСА са 10мМ, които са много по-високи от тези при деца на кетогенна диета (0,3мМ). Тези данни показават необходимост от изясняване на клиничната значимост на експериментално получените резултати.

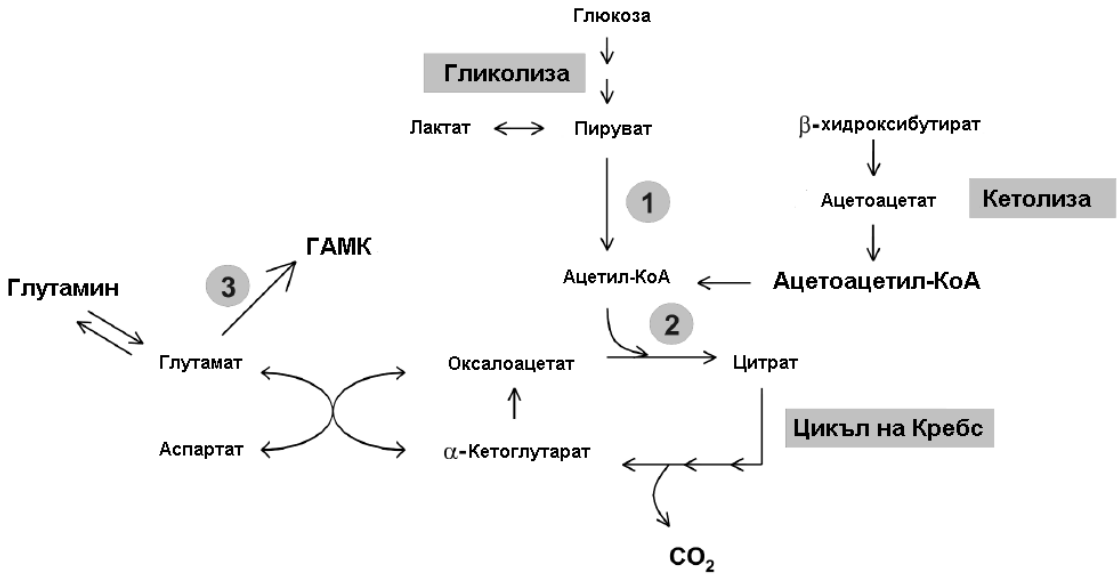
Горните факти показват, че ацетоацетата редуцира ексцитаторната глутаматергична синапсна трансмисия в хипокампални неврони. Блокирането на глутаматната сигнализация от ацетоацетат предполага редуциране на невроналната възбудимост. В експериментални модели е установено, че невроналната хипервъзбудимост индуцирана на плъхове чрез инфузия на 4-аминопиридин (блокер на калиевите канали и проконвулсант) се редуцира при директна инфузия на ацетоацетат в мозъка (87).

Редуцирането на глутаматното освобождаване от ацетоацетат е обещаващ механизъм, обясняващ как диетата редуцира гърчовете. Изследвания на хипокампални клетъчни култури, които са били изложени на хронично въздействие на ВНВ не са показали адекватна протекция от фармакологично индуцирани гърчове (163). Освен това, ацетоацетата бързо се разгражда до ацетон или се конвертира във ВНВ. Това показва, че са нвеобходими допълнителни изследвания за доказване ефекта на ацетоацетат върху глутаматната сигнализация и GLUT2.

3.2.3. Влияние върху ГАМК

Друга хипотеза относно механизма на КД е свързана със засилване на ГАМК-медиираната невронална инхибиция. ГАМК-сигнализацията остава ключов таргет в изследванията за механизма на КД, тъй като в модели на епилепсия при плъхове чрез ГАМК –антагониости е доказан изразен отговор към КД (192). Ролята на ГАМК-сигнализацията в действието на КТ е много дебатирана. Клинични изследвания на пациенти на кетогенна диета чрез магнитнорезонансна спектроскопия (207) са показали повишени нива на ГАМК в цереброспинална течниост.

ГАМК се синтезира от цикъла на Кребс от междинния метаболит алфа-кетоглутарат, който чрез глутамат се превръща в ГАМК под действието на глутамат декарбоксилаза (**Фиг. 9**). Известно е, че аспартата блокира глутамат декарбоксилазата. Поради това намаляването на аспартата теоретично би повишило нивата на глутамат. В опити с култивирани астроцити е било доказано, че третирането им с АСА или ВНВ за 1h. води до понижени нива на аспартат (224). Подобни промени са наблюдавани и в преден мозък и церебелум на плъхове. Тези данни са показват, че в кетонния мозък има повишена конверсия на глутамат в глутамин. Глутамина се поема от невроните и се превръща в ГАМК (по изразено от аспартат) и това довежда до невронална инхибиция. Един нерешен въпрос е защо епилепсия предизвикана с ГАМК антагонисти (пентилентетразол) у мишки не показва същите нива на гърчова протекция, както у плъхове подложени на КД.



Фиг.9. Метаболитни взаимовръзки в мозъчния метаболизъм на глутамат, кетонни тела и глюкоза. В състояние на кетоза кетонните тела са основен

енергиен източник за енергийните нужди на мозъка. Променлива фракция от пируват (**1**) се превръща в ацетил-КоА посредством пируват дехидрогеназа. За разлика от това всичките продуцирани кетонни тела генерират ацетил-КоА, който се включва в цикъла на Кребс чрез цитратсинтетаза (**2**). Този метаболитен етап включва използване на оксалацетат, който от своя страна е необходим за трансаминирането на глутамат в аспартат. В резултат на това по-малко оксалацетат е наличен като субстрат за аспартат-аминотрансферазата, която куплира глутамт-аспартатното превръщане с метаболизма на глюкозата в цикъла на Кребс. **По-малко глутамат се превръща в аспартат и по този начин повече глутамат се превръща в ГАМК (3) чрез глутамат декарбоксилаза (GAD). Нивата на ГАМК се повишават.**

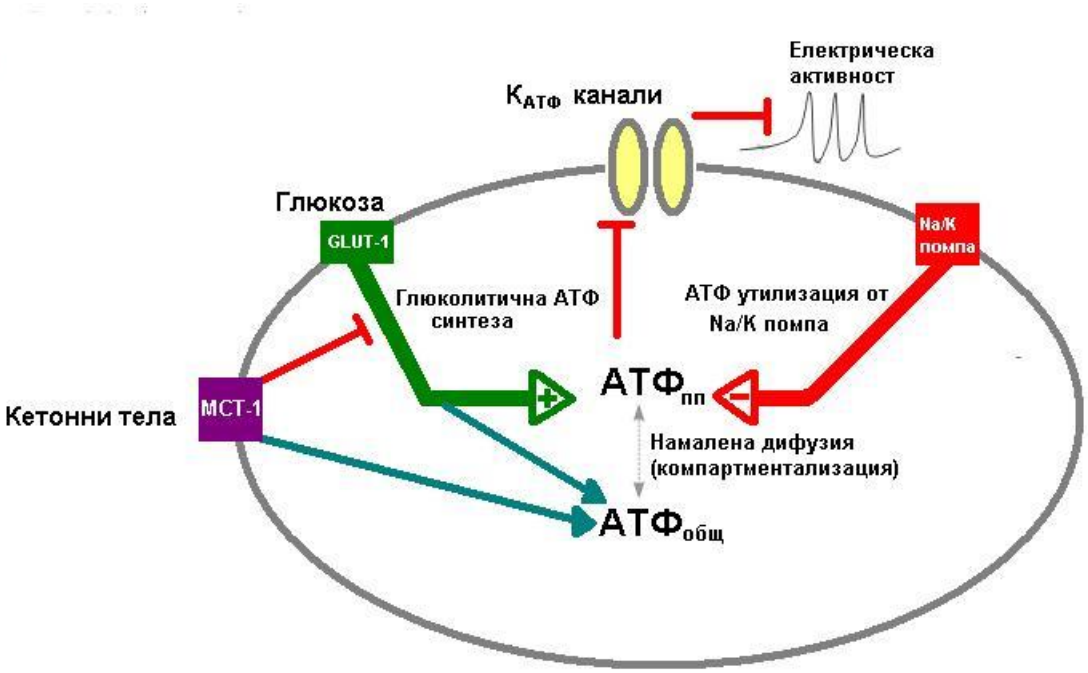
На неврохимично ниво е доказано, че при кетоза промяната в мозъчния метаболизъм на аминикиселините довежда до понижаване на аспартата в сравнение с глутамат (прекурсор на ГАМК) и промяна в равновесието на аспартат аминотрансферазната рекция (**Фиг. 9**) (220, 221, 222). Адаптацията в метаболизма на екцитаторната аминокиселина глутамат (т.е. намаляване конверията на глутамат в аспартат) може да бъде предположено по увеличеното декарбоксилиране на глутамат в ГАМК, тъй като повече глутамат ще е наличен за синтеза на ГАМК и глутамин. Увеличените по този начин нива на ГАМК се предполага, че ще подтиснат епилептиформената активност.

3.2.4. $K_{АТФ}$-канали

Друг механизъм, чрез който КТ проявяват антиконвулсивен ефект и е обект на научен интерес е директно действие върху невроналния мембранен потенциал. Катф-каналите имат особено функционално значение поради тяхната тясна връзка с клетъчния метаболизъм (активират се при ниски нива на аденозин три фосфат-АТФ) и хиперполяризиращия им ефект. При този вид калиеви канали, чувствителни на АТФ-$K_{АТФ,}$ се проявява добре познат механизъм на куплиране между метаболизъм и електрична възбудимост. Те имат ключова роля в регулацията на инсулиновата секреция от панкрасните бета клетки. Между храненията активноста на тези канали подържат мембранния потенциал на бета-клетките в негативни стойности. При поемане на богата на въглехидрати диета, последващото увеличение

на АТФ води до затваряне на тези канали, което довежда до деполяризация и увеличена секреция на инсулин.

Макар общото ниво на АТФ по време на кетогенна диета да е увеличено, оксидативният метаболизъм на КТ води до редуциране на мозъчната глюкозна утилизация (**Фиг. 10**). Смята се, че АТФ продукцията от гликолизата има главно значение за контролирането на процесите в плазмената мембрана, едни от които са регулиране активноста на Катф-каналите и снабдяване с АТФ на АТФ-зависимите NA^+/K^+-помпи (114). Предложена е хипотезата, че в резултат на метаболизма на КТ се редуцира гликолитичната АТФ продукция. Това води до отваряне на Катф-каналите, хиперполяризация и понижена електрическа възбудимост на централните неврони.



Фиг. 10. Ефекти на кетонните тела върху нивата на АТФ и активноста на Катф-каналите. Кетоновите тела се транспортират в централните неврони посредством монокарбоксилов транспортер (MCT-1). Те подтискат гликолитичната АТФ синтеза. Това понижава постпрандиалните нива на АТФ (АТФпп). От друга страна нивата на АТФ са понижени поради активното му участие в обезпечаване на Na^+/K^+ помпа по време на гърчове. Понижените нива на АТФ водят до отваряне на Катф-каналите и хиперполяризация на невроните с подтискане електрическата им

възбудимост. *Основна хипотеза е, че кетонните тела или други метабилитни манипулации променат глюкозния метаболизъм към други пътища за АТФ продукция. Променената продукция на АТФ води до отваряне на Катф-каналите. Във физиологични условия те са инхибирани от АТФ.*

Ефекта на КТ върху акционния потенциал се супресира при прилагане на блокери на Катф-каналите или на мишки с knockout на Катф-субединиците. Тези данни показват активация на Катф-каналите от КТ, но точния механизъм не е изяснен. По-ранни изследвания са показали, че КД води до увеличение на АТФ, което би затворило Катф-каналите и е противоречие с гореописаното (114). Съвременни изследвания показват обаче, че в зони близки до Катф-каналите, концентрациите на АТФ са по ниски, което довежда до отваряне на тези канали и подтискане електричната активност (респ.гърчовата активност).

Обяснението за това се търси в т.нар. АТФ-компартментализация – т.е. метаболизма на КТ води до редуцирането на гликолизата и съответно продуцирания по този начин АТФ. От друга страна снабдяването на Na^+/K^+- помпа с АТФ, също понижава нивата му в зоните близки до Катф-каналите (което ги отваря и активира, т.е. понижава невроналната активност). *Обобщавайки, може да се каже, че според описаната по-горе Катф-гликолитична хипотеза, основен ефект на КТ е да подтиска гликолизата – това довежда до понижени нива на АТФ в зоните в близост до Катф-каналите и последващото им отваряне и подтискане на гърчовите разряди.*

3.2.5. Роля на аденозина в антиконвулсивните ефекти на КД

Известно е, че аденозиновата сигнализация чрез А1 рецепторите редуцира невроналната възбудимост. В тази връзка повишените нива на аденозин в мозъка се свързват с единия от предполагаемите механизми в действието на кетогенната диета (124). При оценка на електрофизиологични ефекти на редуцирана глюкоза върху неврони (състояние характерно при прилагане на кетогенна диета), при нормални или повишени нива на АТФ и особено важно без добавяне на кетонни тела се установяват важни ефекти. Глюкозната рестрикция води освобождаване на АТФ през паннексин хемиканали. Увеличения екстрацелуларен АТФ се разгражда от ендонуклеотидази до аденозин, което води до активиране на аденозинови рецептори. Аденозиновите рецептори са куплирани с отваряне на плазмалемни

Катф-канали, а това както бе дискутирано по-горе намалява невроналната възбудимост. Това изследване е доказало нов механизъм на метаболитна регулация включваща паннексин канали, аденозинови рецептори и Катф-канали (114).

Обобщавайки, може да се заключи, че има важни доказателства, свързаващи повишените нива на аденозин вследствие на КД и противогърчовия и ефект.

3.3. Роля на глюкозната рестрикция и ПНМК в антиконвулсивните ефекти на кетогенната диета

3.3.1. Въведение

Независимо, че се прилага в течение на близо 100 години, механизма на КД все още остава ненапълно разгадан. Логично е да се предположи, че кетозата, която е резултат от приема на кетогенни храни има ключова роля в антиепилептичния ефект на КД. Изследвания в клинични експериментални условия показват, че кетозата е задължително условие, но не и достатъчно за ефективността на КД.

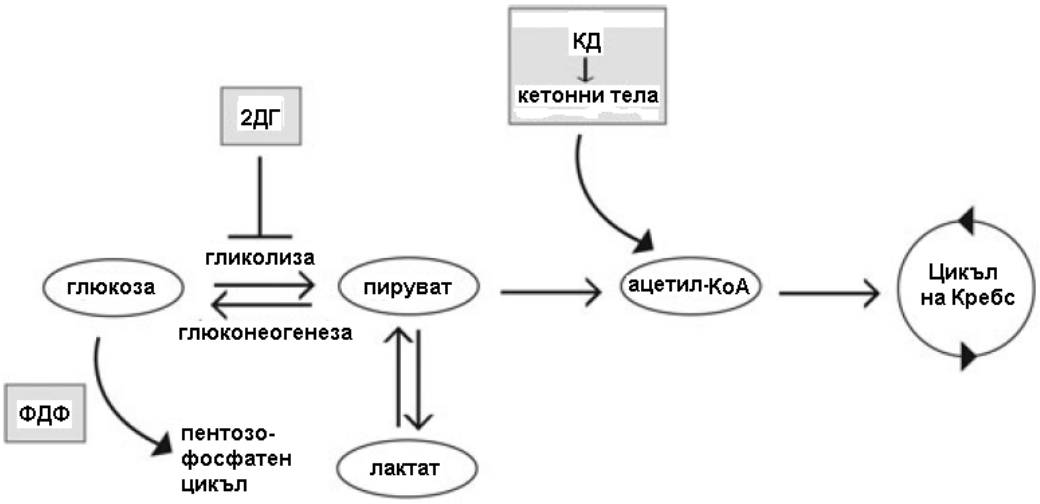
Прилагането на КД при деца довежда до промяна на основния енергиен източник за мозъка. При физиологични условия това е глюкозата, докато при КД такава роля имат кетонните тела. Липсата на глюкоза по време на гладуване или КД довежда до използване на мастните киселини като основен енергиен източник. Мастните киселини се окисляват в черния дроб до кетони (бета-хидроксибутират, ацетоацетат, ацетон). Тъй като черния дроб не притежава ензими, които разграждат КТ, те циркулират в кръвта и се пренасят до тъканите, където стават основен източник на енергия (мозък, мускули). В мозъка КТ се разграждат и навлизат в цикъла на Кребс. Това довежда до стимулиране дейността на дихателната транспортна верига в митохондриите и последваща продукция на АТФ.

Ролята на КТ в подтискане на невроналната хипервъзбудимост е несъмнена. *Нивата на КТ невинаги корелират с нивото на контрол над гърчовте. Вместо това намаленият метаболизъм на глюкозата предполага, че има по-важна роля за антиепилепшичния ефект на КД.* Това се доказва от факта, че антиепилептичния ефект на КД може да бъде лесно супресиран чрез инфузия на глюкоза (25). При хора приемането на бонбон или интравенозна инфузия на глюкоза е почти незабавен –

гърчовата активност може да се поднови в течение на часове. Тези наблюдения предполагат бърз физиологичен механизъм в антиконвулсивния ефект на КД.

Докато част от изследванията за механизма на КД подчертават ролята на кетозата като предполагаем фактор за протекция на гърчове, други изследвания са фокусирани върху глюкозната рестрикция като ключов елемент (186). В допълнение към кетозата като ключов елемент на КД е ясно, че с развитието на кетоза е друг незабавен метаболитен ефект от КД и калорийната рестрикция е и редукция на кръвната глюкоза. Важен въпрос е дали калорийната рестрикция просто ограничава субстрата за глюконеогенеза или води до метаболитни адаптации, които подтискат невроналната хипервъзбудимост? Предположено е, че калорийната рестрикция подтиска продукцията на енергия от гликолиза, което от своя страна ограничава способноста на невроните да подържат високо ниво на синаптична активност, необходимо по време на гърчове.

Доказано е също, че нови варианти на КД, които не довеждат до изразена кетоза, също са ефективни при деца с фармакорезистентна епилепсия (143). *Взети заедно горните факти подсказват, че редуцираните нива на глюкоза са може би по-важни в механизма на КД, отколкото ефектите на самите кетонни тела* ***(Фиг 11)***.



Фиг.11. Метаболизъм на глюкозата и точки на метаболитни интервенции, повлияващи невроналната възбудимост и гърчовата активност. 1) Глюкозата може

да бъде отклонена към пентозо-фосфатния цикъл, чрез фруктозо-1,6-дифосфат (ФДФ). Това променя нивата на глутатиона, което има антиконвулсивен ефект. **2)** 2-деокси-2-глюкоза (2ДГ) инхибира гликолизата, като блокира ензима фосфоглюкозо-изомераза. Това предотвратява конверсията на глюкозо-6-фосфат във фруктозо-6-фосфат. 2ДГ има изразен антиконвулсивен ефект. **3)** Кетогенната диета, чрез кетонните тела заобикаля гликолизата и доставя ацетил-КоА за цикъла на кребс. Кетонните тела имат противогърчов ефект. **4)** Анаплерозни субстанции, като трихептаноин, отстраняват дефицита в цикъла на Кребс, в резултат на гърчовете и имат противогърчов ефект.

Използването на КТ като основен енергиен източник и заобикалянето на гликолизата поражда хипотезата, че самата инхибиция на гликолизата има гърчовопротектиращ ефект.

В последните години с въвеждането на директни генетични манипулации на метаболизма се даде възможност за вникване в това как намалената глюкозна утилизация подтиска гърчовете.

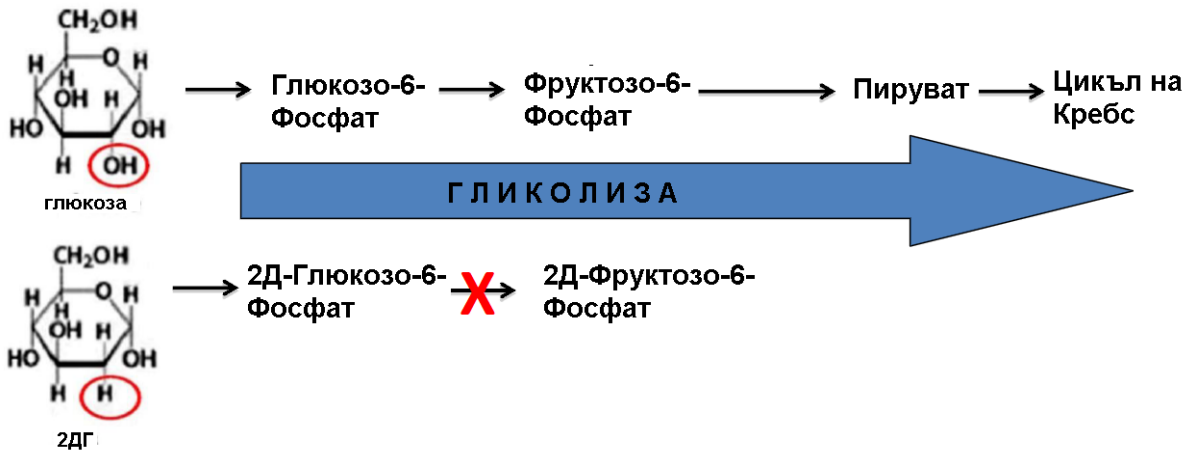
Цел на настоящия обзор е обобщаване на научни факти, които потвърждават ролята на глюкозната рестрикция в механизмите на КД. По-нататък в обзора се дискутира ролята на лептин, биоенергетиката и ПНМК в механизма на КД.

Експерименти, които доказват ролята на понижените нива на глюкоза в механизмите на КД са групирани в няколко насоки:

3.3.2. Антиепилептична активност на 2-деокси-д-глюкоза (2ДГ)

Съвременни експерименти с 2ДГ подкрепят хипотезата за ролята на глюкозната рестрикция в механизмите на КД.

2ДГ е глюкозен аналог, който се различава от глюкозата по заместване на кислороден атом в 2-позиция. 2ДГ не може да се метаболизира и по този начин инхибира гликолизата чрез блокиране на гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза. Блокира се превръщането на глюкозо-6-фосфат до фруктозо-6-фосфат (**Фиг.12**). **Това води до подтискане на гликолизата.**



Фиг. 12. Схема на подтискане на гликолизата от 2-деокси глюкоза (2ДГ). 2ДГ е глюкозен аналог, който не може да се метаболизира и инхибира гликолизата, чрез блокиране на ензима фосфоглюкозо-изомераза. Това инхибира превръщането на 2Д-глюкозо-6-фосфата в 2Д-фруктозо-6 фосфат и се инхибира гликолизата. 2ДГ е мощен антиконвулсант в експериментални модели.

2ДГ е показала мощен антиконвулсивен ефект в in vivo експериментални модели на гърчове, включващи kindling-модела, аудиогенни гърчове, както и in vitro модели чрез повишени нива на екстрацелуларния K^+, бикукулин, 4-аминопиридин.

Антиконвулсивният ефект на 2ДГ е изследван в остри и хронични експерименти.

- Острият антиепилептичен ефект на 2ДГ в пристъпния и междупристъпния период показва директно действие на мембранно и синаптично ниво, но по механизъм, изключващ промени в генната експресия. Острия ефект на 2ДГ се свързва с бързи метаболитни или електрофизиологични последици от инхибирането на гликолизата. Те довеждат до редукция на невроналната синхронизация, характерна за епилепсията. Предполагат се ефекти върху системния липиден метаболизъм, митохондриалната функция и фосфорилираното състояние на GABAa-рецептора. Доказано е подтискане ендогенното фосфорилиране на GABAa-рецептора (което го прави неактивен) от гликолитичния ензим глицералалдехид-3-фосфат дехидрогеназа(102, 103). Всичко това довежда до усилване на GABA-ергичната трансмисия.
- Хроничният антиепилептичен ефект на 2ДГ, от друга страна се свързва с молекулярна регулация на транскрипцията на гена за BDNF и неговия рецептор Trkb.

Подтискането на експресията на BDNF и trkB е необходима за прогресия на kindling-модела на епилепсия. Доказано е, че 2ДГ супресира стимулираната от гърчовете експресия на BDNF и trkB. Тя се медиира от транскрипционния репресор neuron restrictive silencing factor (NRSF) и неговия NADH-чувствителен ко-репресор carboxyl-terminal binding protein (CtBP). NRSF и CtBP взаимодействат с промоторите на BDNF и trkB. По време на епилептиформевна активност, когато продукцията на глюкоза е увеличена, NADH причинява дисоцииране на CtBP от NRSF. Това намалява транскрипционната репресия и довежда до повишена експресия на BDNF и trkB.

При прилагане на 2ДГ, нивата на NADH се понижават поради инхибираната гликолиза. В резултат на това NRSF-CtBP комплекса репресира BDNF и trkB и това подтиска епилептиформената активност.

Хроничният и острият антиепилептичен потенциал на 2ДГ, съчетан с подходящ профил на безопасност прави 2ДГ кандидат за клинични изпитания и дава възможност да бъде използван като антиепилептогенно средство.

3.3.3. Фруктозо-1,6-дифосфат. Анаплероза.

Хипотезата за ключовата роля на променения глюкозен метаболизъм в ефекта на КД се подкрепя и от експерименти с фруктозо-1,6-дифосфат (ФДП). Отклоняването на глюкозата към пентозо-фосфатния цикъл води до образуване на ФДП (**Фиг.11**), който е показал изразен антиепилептичен ефект в експериментални модели на гърчове на плъхове с каинова киселина, пилокарпин, пентилентетразол и kindling-модел (44, 109). В тези експерименти е доказано, че антиконвулсивния ефект на ФДП превъзхожда КД, 2ДГ и валпроевата киселина. Механизма, по който ФДП оказава антиконвулсивен ефект не е напълно изяснен, но се предполага, че този субстрат има антиоксидантен ефект, тъй като NADH образуван чрез пентозо-фосфатния цикъл редуцира глутатиона (179).

Друг предполагаем механизъм, свързващ промяната на метаболизма и КД се свързва с т.нар. “анаплероза”. Изследвания показват, че рекурентните гърчове предизвикват дефицит на междинни продукти в цикъла на Кребс (алфа-кетоглутарат, оксалоацетат). Изказано е предположението, че компенсирането на този дефицит (чрез т.нар. анаплероза) може да подтисне генерирането на гърчове. В подкрепа на тази хипотеза са експериментите с трихептаноин, който е субстрат на анаплероза (212). При експерименти с мишки на диета с трихептаноин е демонстрирано забавено развитие на

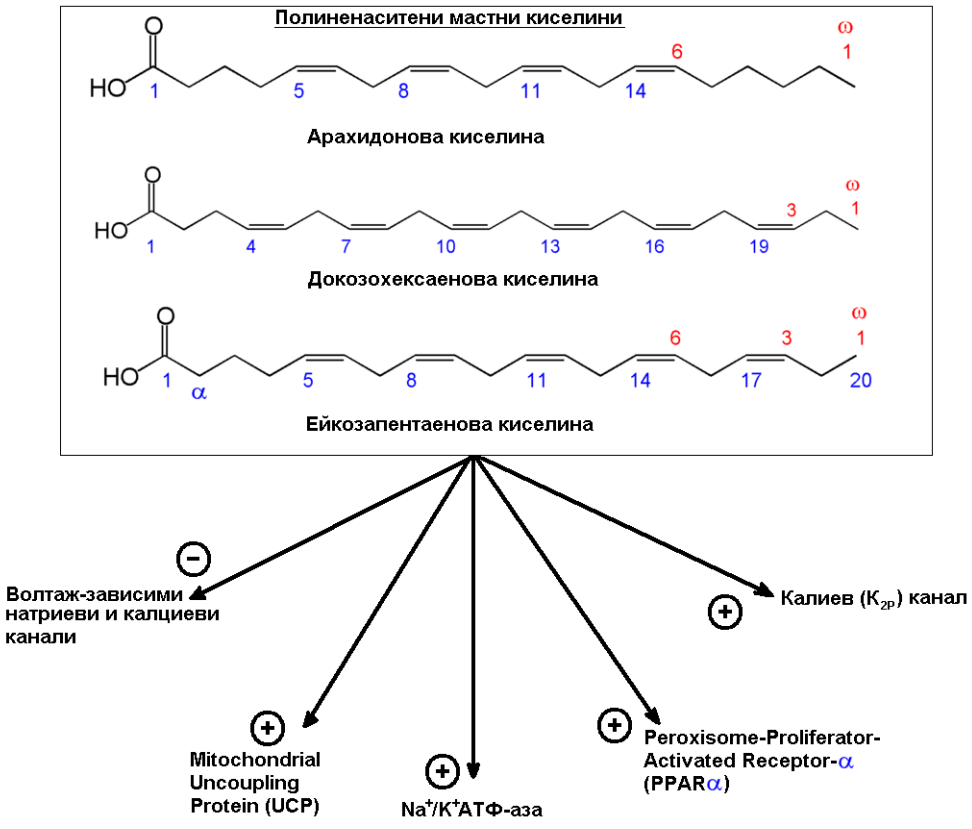
kindling-гърчове и повишен праг на пентилентетразолови гърчове. Тези данни подкрепят хипотезата за антиконвулсивния ефект на анаплерозата.

Анаплерозата е нов подход, който доказва ролята на потенциалните метаболитни модификации, които биха имали антиепилептичен ефект.

Разгледани заедно експериментите с КД, 2ДГ, ФДП, анаплероза подсказват, че промените в активноста на различни метаболитни пътища имат потенциала да бъдат използвани като нови стратегии за лечение на епилепсията.

3.3.4. Роля на полиненаситени мастни киселини

Полиненаситените мастни киселини (ПНМК) като декозахексаноевата киселина и арахидоновата киселина имат изразено действие върху сърдечно-съдовата система. Известно е, че те инхибират волтаж-зависимите натриеви канали (214) и L-тип калциеви канали **(Фиг. 13)**. Подобни ефекти са наблюдавани и в нервните тъкани. Изследвания върху ПНМК показват, че те имат връзка с периоди на подобряване или влошаване от гърчовете. Доказано е, че ПНМК редуцират честотата и интензитета на гърчовете.



Фиг. 13. Потенциални механизми в антиепилептичното действие на ПНМК. 1) Директно, ПНМК могат да: а) инхибират волтаж-зависими натриеви и калциеви

канали, б) активират липид-сензитивните K2p калиеви канали, в) повишат активноста на Na/K-АТФ-аза. Тези механизми ограничават невроналната възбудимост и подтискат гърчовата активност. **2) Индиректно,** ПНМК могат да: а) индуцират експресията на UCP в митохондриите и така да намалят продукцията на реактивни оксигенни частици, б) активират PPAR-alfa и така да стимулират транскрипцията на много метаболитни гени, което повишава енергийните резерви, стабилизира синаптичната функция и ограничава хипервъзбудимоста.

3.3.4.1. Директни ефекти на ПНМК върху невроналната възбудиомост

ПНМК инхибират директно невроналната възбудимост и гърчовата активност по няколко начина:

1) Те подтискат директно йонната канална активност чрез блокиране на волтаж-зависимите натриеви и калциеви канали. Това се доказва от повишената устойчивост към невронална активност след прилагане на бикукулин или пентилентетразол.
2) Заедно с кетонните тела, ПНМК активират липид-чувствителните K2P калиевите канали (193).
3) Установена е повишена активност на Na/K-помпа.

И трите по-горе изброени механизма показват, че повишените нива на ПНМК след КД спомагат за директно намаляване на невроналната хипервъзбудимост (182).

3.3.4.2. Транскрипционни ефекти на ПНМК

Освен директно подтискане на невроналната активност ПНМК регулират транскрипцията на много гени в мозъка чрез взаимодействие с транскрипционния фактор PPAR-alfa. Посредством PPAR-alfa ПНМК индуцират активността на митохондриалния протеин UCP.

UCP-протеините са свързани с регулация на невроналната възбудимост и преживяемост. Те са разположени във вътрешната митохондриална мембрана и позволяват изтичане на протони от интермембранното пространство към митохондриалния матрикс. Това довежда до редуциране протон-движещата сила и се дисоцира електронния транспорт от АТФ продукцията (43). По този начин се редуцира и синтеза нареактивни кислородни частици (ROS). Хроничната хиперекспресия на UCP увеличава нивата на АТФ чрез усилена митохондриална биогенеза. *КД, усилвайки експресията на UCP, стимулира митохондриалната биогенеза и нивата на АТФ.*

Гърчовете от своя страна увеличават нивата на ROS и митохондриалната дисфункция, което довежда до невронална хиперфункция и невронални увреждания (104). Данните, че кетонните тела също намаляват генерирането на ROS подкрепят хипотезата, че КД-свързаната хиперекспресия на UCP има важна роля за редукция на ROS и невропротективен ефект.

Установено е, че ПНМК допълнително регулират експресията на много гени свързани с метаболизма. Това се свързва с взаимодействие на ПНМК с PPAR. Установено е, че КД индуцира up-regulation на много метаболитно свързани гени свързани с оксидативния метаболизъм (133). В подкрепа на това е установената стимулиция на митохондриална биогенеза и броя на митохондриите. Нивата на енергийни метаболити са увеличени след прилагане на КД.

В заключение се доказва, че КД увеличава енергийната оксидативна енергийна продукция чрез активиране на транскрипционни, транслационнни и биохимични механизми едновременно.

Митохондриалната дисфункция е характерен белег в зоните на епилептиформена активност. В някои експериментални модели на гърчове е установена понижена активност на митохондриални ензими, свързани с оксидативната фосфорилация, а също и дефицит на комплекс 1 от респираторната дихателна верига.

Обобщавайки може да се заключи, че КД и ПНМК довеждат до усилване на оксидативното фосфорилиране и енергийните резерви, което компенсира енергийния дефицит в епилептогенните огнища. По този начин невроните стават по-резистентни на невроналната хиперактивност по време на гърчове. Предполага се, че ПНМК спомагат до голяма степен за антиконвулсивния ефект на КД.

3.4. Заключение

Двете основни научни хипотези за механизма на КД са свързани с кетонните тела и с глюкозната рестрикция. Нивата на кетонните тела в кръвта не винаги корелират добре с контрол върху гърчовете. Редуцирането на глюкозната утилизация се предполага, че има по-голямо значение. Съвременни изследвания показват, пониженатa глюкозна оксидация при BAD-мутантни мишки повишава активноста на Катф-каналите, което осигурява резистентност към гърчове. Инхибицията на гликолизата чрез 2DG експериментални модели също има противогърчов ефект, което се свързва с повлияване на BDNF.

Влиянието върху биоенергетичния баланс в организма е важен механизъм на КД. Предполага се, че увеличените енергийни резерви в резултат на КД са един от важните фактори в антиконвулсивния ефект на КД.

ПНМК довеждат до усилване на оксидативното фосфорилиране и енергийните резерви и правят невроните по-резистентни на хипервъзбудимост по време на гърчове.

Факта, че с промяна на диетата е възможен толкова дълбок терапевтичен ефект, подчертава необходимост от изясняване механизмите на КД. Несъмнено бъдещи изследвания ще дадат възможност за вникване в това как диетата повлиява мозъчните функции и ще даде научна основа за разработване на нови терапевтични стратегии за лечение на епилепсията.

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 посочената цел бяха определени следните задачи:

1. Да се създадат експериментални модели на епилепсия на плъхове и се направи оценка на степента и тежеста на гърчовете.

2. Да се изследва влиянието на фармакологични средства (леветирацетам, валпроева киселина) върху неонатален каинатен експериментален модел 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 полово незрели плъхове.

4. Изследване влиянието на кетогенна диета върху степен и тежест на гърчове в експериментален пилокарпинов модели на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове.

5. Да се проучи влиянието на статини върху експериментален модел на епилепсия и се определят степен и тежест на гърчовете и преживяемост при мъжки полово незрели плъхове.

6. Да се проучи влиянието на vinpocetine върху експериментален модел на епилепсия, като се отчитат степен и тежест на гърчовете, преживяемост, концентрации на TNF-alfa и IL-1beta в хипокампус, на мъжки полово незрели плъхове.

7. Да се проучи самостоятелното и комбинирано влияние на doxycycline и celecoxib при експериментален пилокарпинов модел на епилепсия, като се отчетат тежеста на гъчовете, wet dog shakes (WDS), концентрациии на TNF-alfa и IL-1beta плазма и хипокампус на мъжки полово незрели плъхове.

8. Да се проучи сравнително влиянието на неселективен COX-инхибитор (ibuprofen) и селективен COX-2 инхибитор (celecoxib) върху показатели за епилептогенна активност и нива на провъзпалителните цитокини-TNF-alfa и IL-1beta в плазма и хипокампус на плъх, 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 Универсиетет).

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 между 4-7. Подробностите са посочени в съответните части на раздел резултати.

При отглеждането на животните се спазваше циркадния ритъм (12 ч. светло/ 12 ч. тъмно), стандартните изисквания за температура от 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). Достъпът до вода на всички животни беше ad libitum.

На съответен етап от експериментите животните бяха декапитирани, след предварително евтаназия с летална доза кетамин (150 mg/kg, i.p.). Бяха отделени мозъци и кръв за определяне нивата на проинфламаторните цитокини TNF-alpha и IL-1beta, в зависимост от експеримента.

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 специална храна на Biogen с високо съдържание на мазнини и ниско на въглехидрати и протеини-**кетогенна диета** (**Табл.2**). Храната беше прилагана ad libitum, след разтваряне в хладка вода през устата, 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 мг/кг), след разтваряне с физиологичен разтвор.

Таблица 1. Състав на кетогенна диета

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

3.3. Експериментални методи

3.3.1 Експериментални модели на епилепсия

Каинатен модел – животните бяха инжектирани с каинова киселина (10 mg/kg, i.p.). Дозата в първия експеримент беше съобразена с ниската възраст на плъховете (20 дни). Появата и степента на тежеста 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 тежеста 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 със загуба на баланс.

Пилокарпинов модел – животните бяха инжектирани подкожно (s.c.) с Scopolamine (1mg/kg) за редуциране на периферните холиномиметични ефекти на

пилокарина. 30 мин. по-късно беше предизвикана гърчова активност с интраперитонелано приложение на Pilocarpine (350 mg/kg). Процесът на поява, развитие и тежестта на гърчовете бе проследен визуално и беше определян 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 с 0,9% NaCl, вместо пилокарпин.

3.4. ELISA методи

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

Използван беше подвид на ELISA метода-Сандвич-ELISA. Този метод се базира на реакция 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 свързава 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 екдпериментални животни, спрямо стандартна крива, изработена при същите условия, както експерименталните проби.

3.5. Клинико-лабораторни методи: за глюкоза.

3.5.1 Глюкозата в кръвта на плъховете се определяше от опашката чрез глюкометър (One Touch Ultra Easy LifeScane Europe). Капка кръв се накапва на лентичка и резултата се отчита след 5 s.

.

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 ± средна грешка (m±SEM); статистически значима разлика между групите се приема при $p<0.05$; n е броят на животните в група. Използвана е дескриптивна статистика и Student T-test.

4. Резултати от собствени изследвания с дискусия

4.1. Сравнителни проучвания на ефекти на леветирацетам и валпроева киселина върху степента и тежеста на гърчовете и нивата на про-инфламаторни цитокини при неонатален каинатен модел на епилепсия

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

Експериментален дизайн

Използван беше модел на неонатална епилепсия с прилагане на каинова киселина и отчитане продължителноста и тежеста на гърчовете по скалата на Рейсин, както и последващо определяне плазмените нива на проинфлматорни цитокини – TNF-alfa и IL-1beta в плазма. Същият 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 (n=6).

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** с Levetiracetam (50mg/kg, i.p.)

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

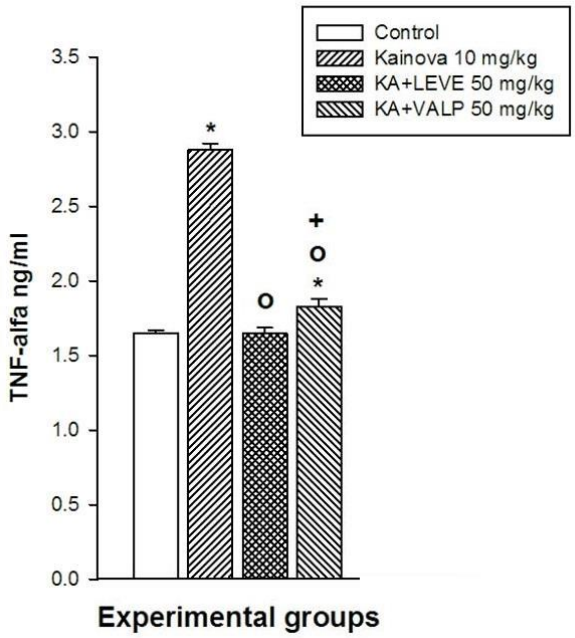
Експерименталните групи се третираха 10 дни със съответните субстанции. На десетия ден, 2h след последната доза на LEV и VPA животните бяха инжектирани i.p. с каинова киселина 10 mg/kg, i.p.

Животните бяха наблюдавани 3 h за оценка тежеста на гърчовете по 5 степенната скала на Racine. 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-изправане на задните лапи, 5-та-билатерален клонус на торса с изправяния, подскоци и загуба на баланс с падане.

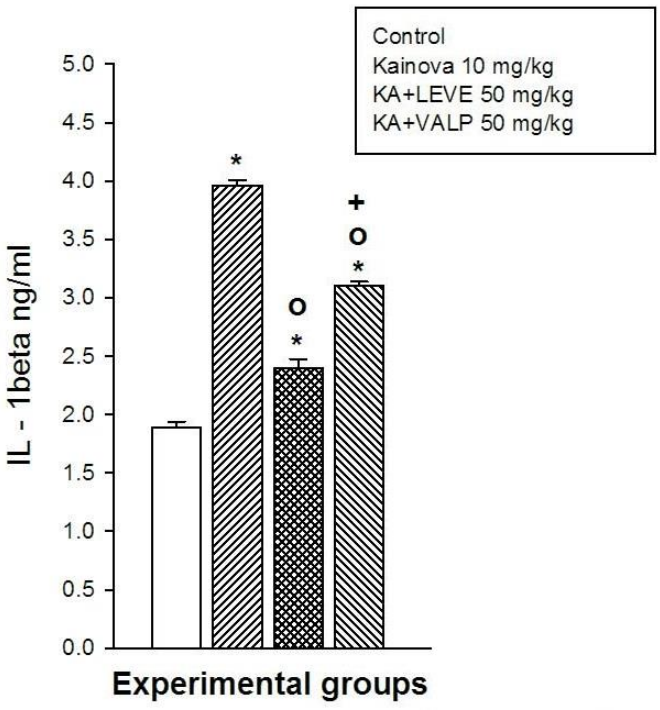
За определяне нивата на плазмените проинфламаторни цитокини, животните бяха декапитирани. Нивата на TNF-alfa и IL-1beta в плазмата се определиха чрез ELISA-метод.

Резултати

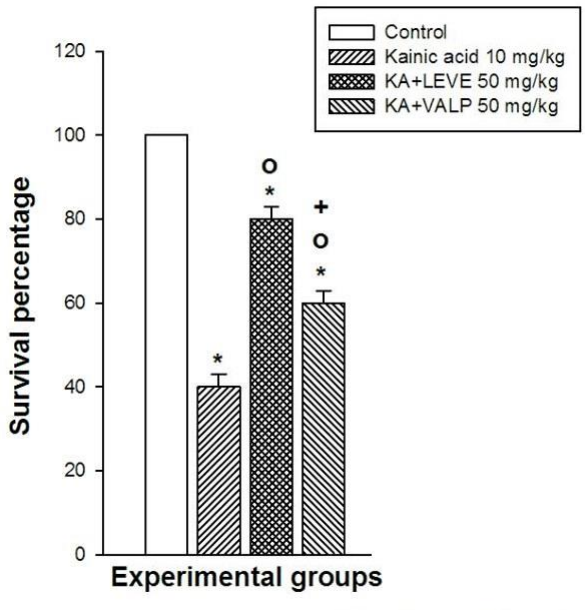
Резултатите са представени на 3 фигури (**14-16**) и **1 таблица**.



Фигура 14. 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 15. 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 16. Ефект на леветирацетам и на валпроева киселина върху процента на преживяемост на 20-дневни мъжки плъхчета с каинат-индуцирана експериментална епилепсия. Данните са представени като средна стойност±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	KA-group	DK-group	LK-group	VK group
Grade 0	**5**	**0**	**3**	**0**	**0**
Grade 1	**0**	**0**	**2**	**1**	**3**
Grade 2	**0**	**0**	**0**	**3**	**2**
Grade 3	**0**	**1**	**0**	**1**	**1**
Grade 4	**0**	**2**	**0**	**0**	**0**
Grade 5	**0**	**2**	**0**	**0**	**0**

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

1. Оценка степента и тежеста на гърчовете.

В първата (контролна) група животни не се наблюдаваха признаци на епилептогенна 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 ($P<0.05$). Данните за процента на преживяемост показаха подобна корелация.

2. Определяне нива на проинфламаторни цитокини в плазма.

Нивата на TNF-alfa и IL-1beta са статически значимо увеличени в групата с каинова киселина в сравнение с контролнта група ($p<0.01$). Експерименталните групи с LEV и VPA имат стистически по-ниски стойности в нивата на двата цитокина. Нивата на двата цитокина в групата с LEV (**Фиг. 14 и Фиг. 15**), са понижени статистически сигнификантно при сравнение с групата с Valproic acid ($p<0.05$).

4.2. Проучване на антиепилептогенните ефекти на кетогенната диета в неонатален пилокарпнов модел на епилепсия.

Нисковъглехидратната или т.нар. кетогенна диета (КД) се използва като средство за лечение на фармакорезистентна епилепсия при деца и в някои случаи напълно премахва необходимоста от прилагане на лекарства. Въпреки големият интерес в изучаване на механизмите на антиепилептично действие на КД, тя все още остава загадка. **Няма данни в литературата относно ефектите на КД върху невровъзпалението и нивата на про-инфламаторните цитокини при различна продължителност на прилагане на диетата.** Цел на изследването е определяне на

ефектите на КД, при различна продължителност на прилагане, върху тежеста на гърчовете при пилокарпинов модел на епилепсия и нивата на TNF-alpha и IL-1beta в 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 отглеждани 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.

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

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

1) Първа група: **контролна** – ежедневен достъп до стандартната храна (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).

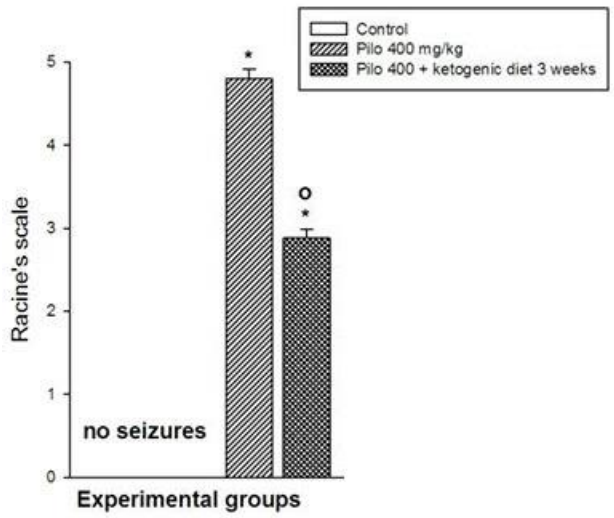
4) Четвърта група: **експериментална** – ежеденевен достъп до кетогенна диета, в продължение на 6 седмици, и вода ad libitum. Еднократно третиране с пилокарпинов хидрохлорид, i.p. (400 мг/кг).

5) Пета група: **експериментална** – ежеденевен 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 беше третирана i.p. Pilocarpine hydrochloride – 400 mg/kg. 30 мин. преди инжектиране

на пилокарпина, животните бяха инжектирани с Scoplamine (1 mg/kg, s.c), с цел подтискане на периферните холинергични ефекти на пилокарпина.

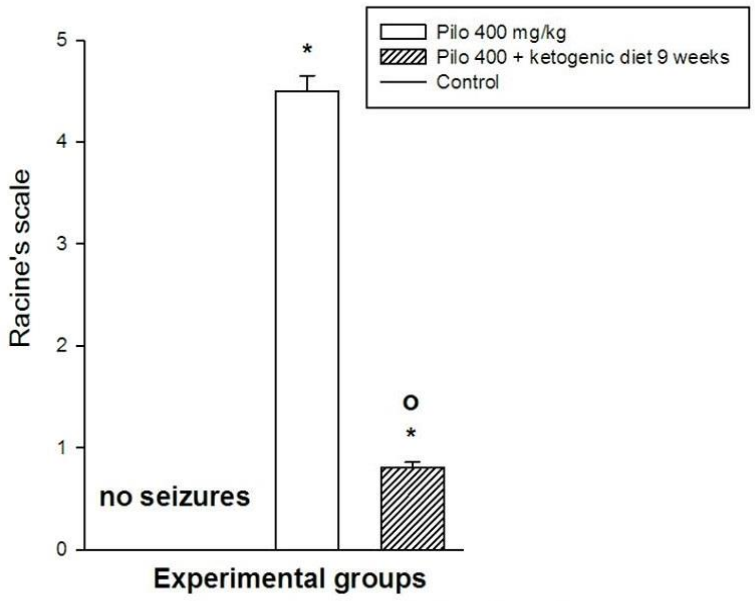
Резултатите за епилептогенна активност са представени на 4 фигури (17-20):



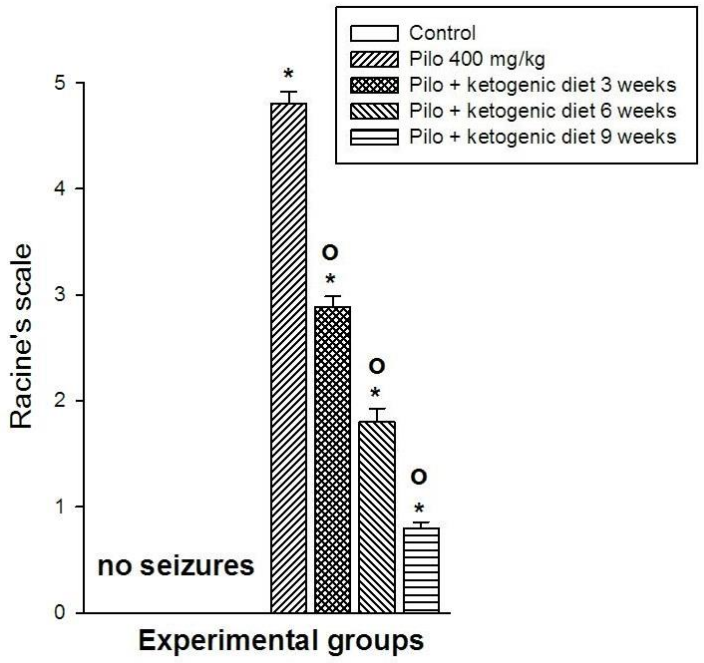
Фигура 17. Епилептогенни ефекти на Pilocarpine след триседмично прилагане на кетогенна диета. Данните са представени като средна стойност±SEM. *p<0.05 спрямо контролната група; o<0.05 спрямо позитивната контролна група PILO 400mg/kg.



Фигура 18. Епилептогенни ефекти на Pilocarpine 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 19. 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 20. Сравнение на антиконвулсивните ефекти на кетогенната диета по скалата на Racine, след 3, 6 и 9 седмично приемане при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. *p<0.05 спрямо

негативната контролната група; o<0.05 спрямо позитивната контролна група PILO 400mg/kg.

Оценка степента и тежеста 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 тежеста на гърчовте, съответно от 2,8 до 0,9 по използваната скала на Racine.

Резултати

Резултатите, представени на четирите фигури показват ефекта на кетогенната диета в динамика върху епилептогенната активност на пилокарпин. Отчита се време/ефект зависимост на кетогенната диета, като най-значим е инхибиращият ефект на диетата след 9 седмици приложение на неонатални плъхове върху гърчовете, предизвикани с пилокарпин (**Фиг. 17, 18, 19, 20**).

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

Статините са утвърдени лекарства за лечение на хиперлипидемии. Има данни, че те повлияват и метаболизма на мозъчните клетки. Цел 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–**екпериментална 1** с Росувастатин (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 Росувастатин (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 Росувастатин (40 мг/кг). Животните бяха третирани през устата през сонда в продължение на 7 дни преди инжектиране с пилокарпинов хидрохлорид (400 мг/кг).

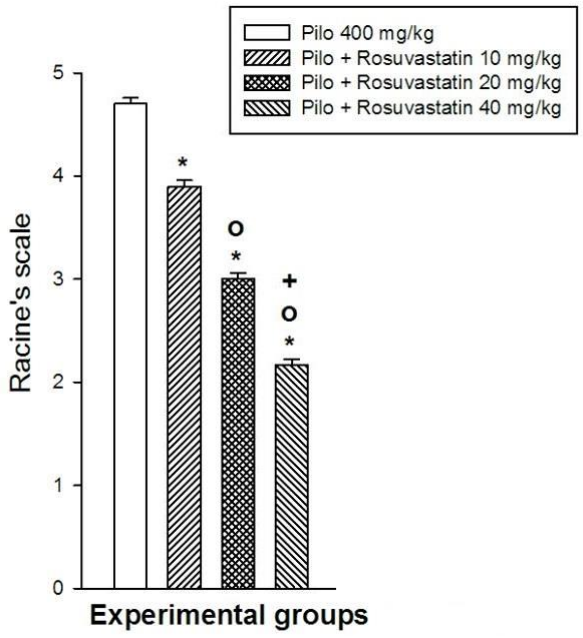
На седмия ден животните от двете групи бяха третирани с пилокарпин (400мг/кг, i.p.). Отчетени бяха показателите:

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

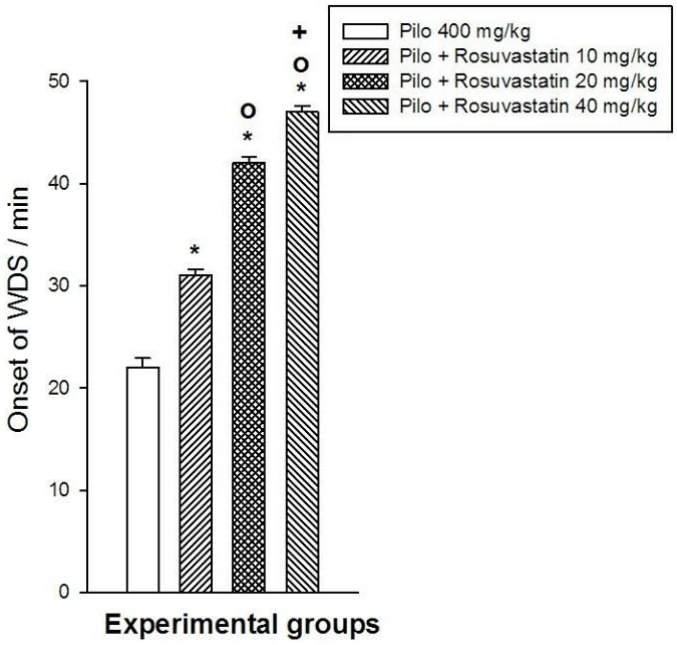
На 3-ия ден, 72 часа след прилагането на пилокарпин, животните бяха декапитирани, беше взета кръв и мозъци за определяне на маркери на невровъзпаление (TNF-alpha и IL-1beta) чрез метода ELISA .

Резултати

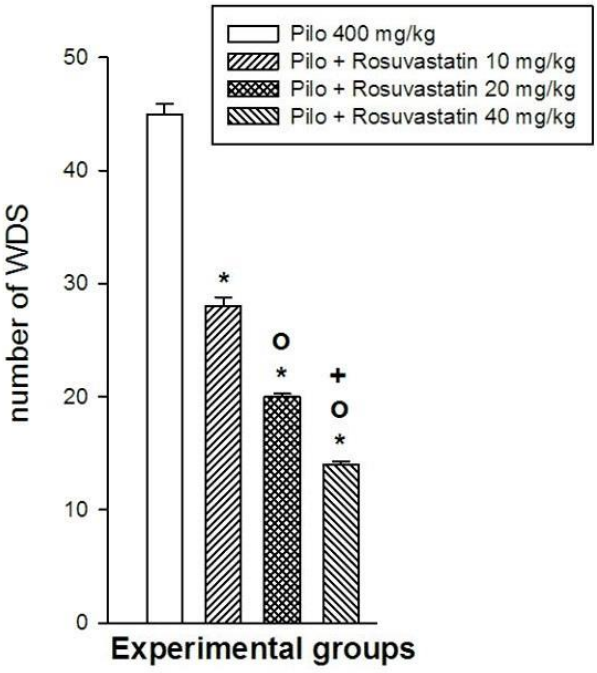
Резултатите са представени на 4 фигури (**21-24**) и **таблица 3**.



Фигура 21. Ефект на 7-дневно прилагане на Rosuvastatin 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; o p<0.05 спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + p<0.05 спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.

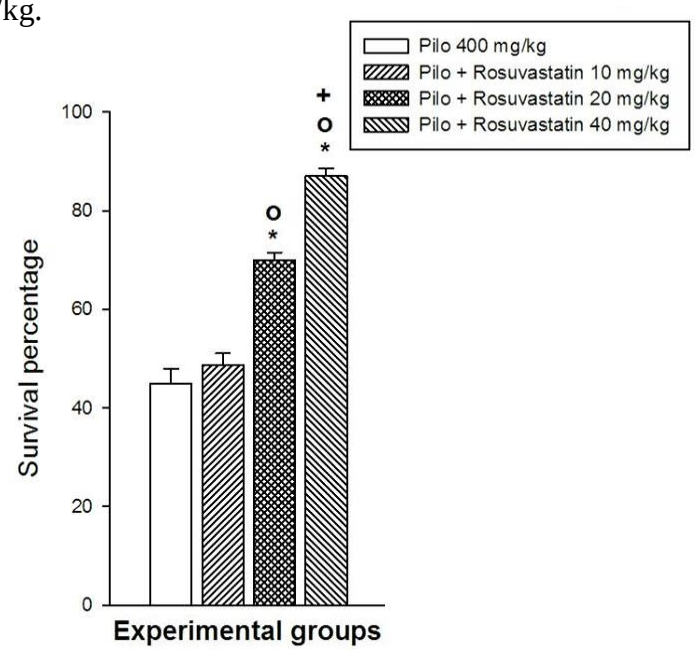


Фигура 22. Ефект на 7-дневно прилагане на Rosuvastatin върху началото на поява на "wet dog shake", в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. .*p<0.05 спрямо контролната група; o p<0.05 спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + p<0.05 спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.



Фигура 23. Ефект на 7-дневно прилагане на Rosuvastatin 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; o p<0.05 спрямо PILO 400+ Rosuva 10mg/kg; + p<0.05 спрямо PILO + Rosuva 20mg/kg.



Фигура 24. Ефект на 7-дневно прилагане на Rosuvastatin върху латентността на гърчовете, в пилокарпинов модел на епилепсия при полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±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.

Резултатите от изследването показаха антиепилептична активност на розувасатин в няколко параметъра отчитащи гърчова активност. След прилагане, лекарството понижава статистически сигнификантно, до 3-та степен, епилептичната активност по скалата на Racine (**Фиг. 21**). Намалени са значимо, както броя, така и началото на поява на т.нар. „wet dog shakes" **(Фиг. 22, 23)**. 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 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. В групите третирани с 20 мг/кг и 40 мг/кг се доказа статистически значима степен на увеличение в процента на

преживелите животни. Най-значим е ефекта в групата животни третирани с най-висока доза статин.

4.4. Проучване влиянието на винпоцетин върху експериментален модел на епилепсия и невровъзпаление в мозък на мъжки полово незрели плъхове.

Винпоцетин е ноотропен лекарствен продукт от растителен произход, внедрен и прилаган широко в клиничната практиката. Той притежава благоприятни ефекти върху редица неврологични и мозъчно-съдови 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 на нови средства, модулиращи клетъчната система на цАМФ. Vinpocetin е също така и мощен блокер на волтаж-зависимите натриеви канали. По този начин той подтиска интрацелуларното покачване на Na^{+} и Ca^{2+} йони, както и глутаматната екзоцитоза в хипокампалните неврони.

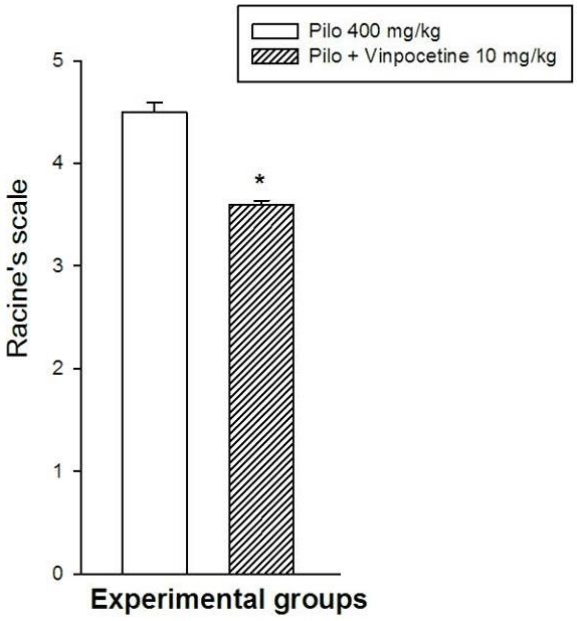
Разработването на средства подтискащи патогенезата на епилепсията е от ключово значение. Освен посочените по-горе механизми в действието на Vinpocetin, се предполагат и действие върху невровъпалението и влияния по този начин върху хода на болеста.

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

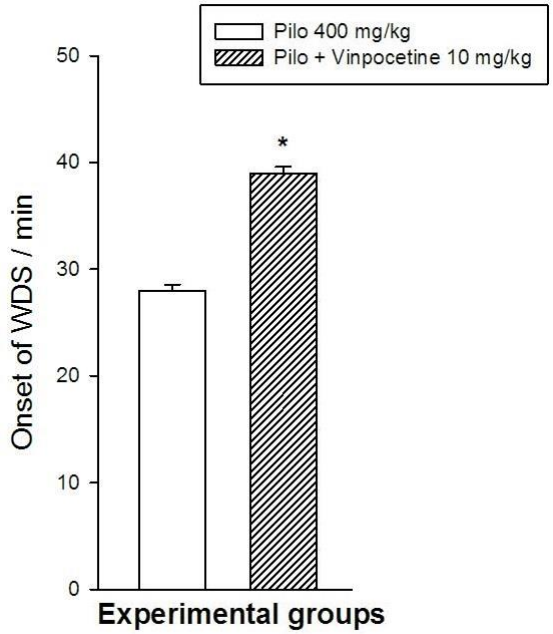
Експериментален дизайн

Опитите бяха извършени върху **2 групи** мъжки плъхчета на възраст 21 дни, по 6 животни в група (n=6) които бяха третирани чрез сонда с разтвор на винпоцетин 20 мг/кг в продължение на 7 дни. Контролните животни бяха третирани с физиологичен разтвор за същия период. На 7-ият 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 началото и броят на WDS.

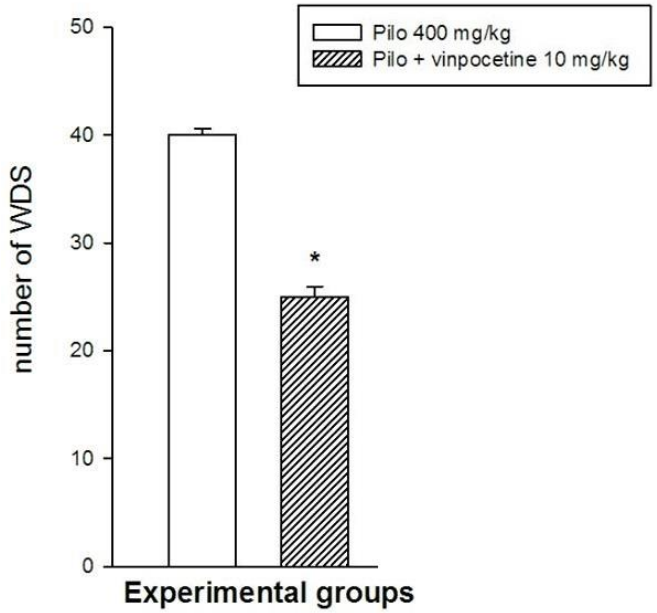
Резултатите са представени на фигури **25- 28.**



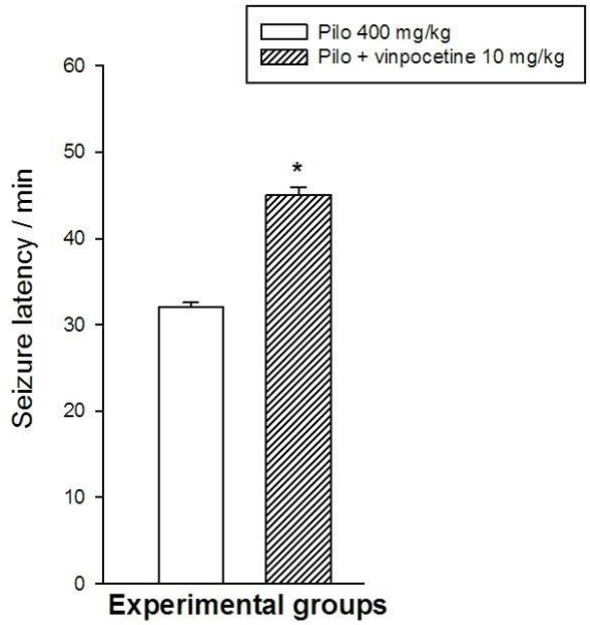
Фигура 25. Ефект на 7-дневно прилагане на Vinpocetine върху степента на епилептична активност, в пилокарпинов модел на епилепсия при половонезрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. *p<0.05 спрямо контролната група.



Фигура 26. Ефект на 7-дневно прилагане на Vinpocetine върху началото на поява на "wet dog shake", в пилокарпинов модел на епилепсия при половонезрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. *p<0.05 спрямо контролната група.



Фигура 27. Ефект на 7-дневно прилагане на Vinpocetine върху броя на "wet dog shake", в пилокарпинов модел на епилепсия при половонезрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. *p<0.05 спрямо контролната група.



Фигура 28. Ефект на 7-дневно прилагане на Vinpocetine върху латентноста на гърчовете, в пилокарпинов модел на епилепсия при половонезрели мъжки

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

Резултати

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

4.5. Синергични ефекти на доксициклин 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 възбудимоста 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 проинфлматорни цитокини в серум и хипокампус на половонезрели плъхове при пилокарпинов модел на епилепсия.

Експериментален дизайн

Опитите бяха извършени върху 5 групи полово незрели мъжки плъхове (възраст 20 дни) с начално тегло 30-50грама. Животните бяха разделени в 5 групи по 6 в група (n=6):

1) Първа група-**негативна контрола** без епилепсия. Третиране в продължение на 7 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 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.).

4) Четвърта група-**експериментална 2**. Третиране в продължение на 7 дни перорално със сонда с целекоксиб (20 мг/кг). На 7 ден, 30 мин. след последната аплокация на доксициклин животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

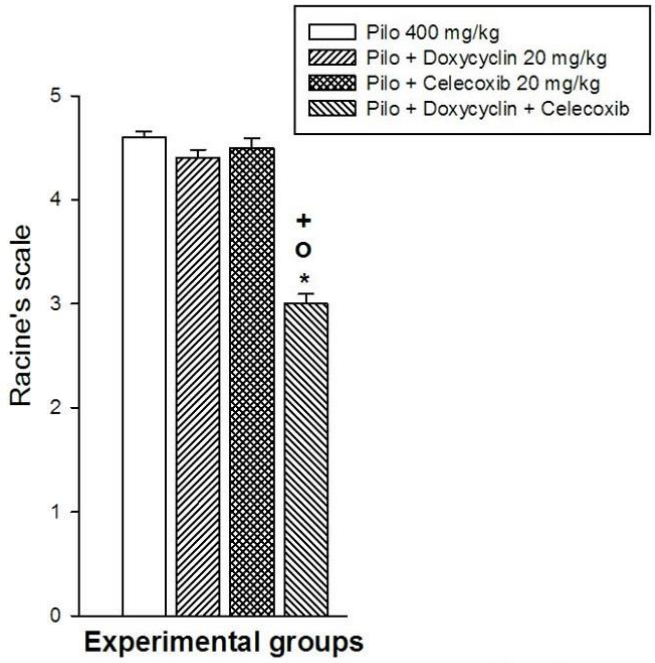
5) Пета група-**експериментална 3**. Третиране в продължение на 7 дни перорално последователно със сонда с доксициклин (20 мг/кг) и целекоксиб (20 мг/кг). На 7 ден, 30 мин. след последната апликация на двете лекарства, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

Резултати

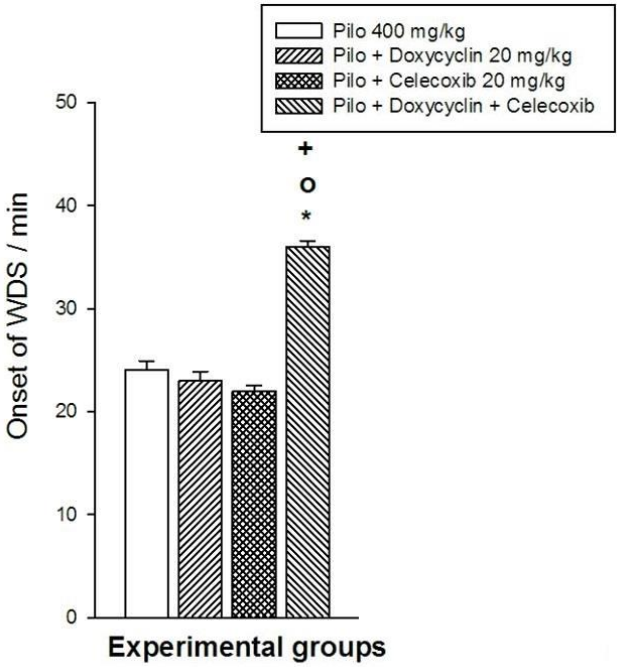
За период от 3h бяха проследявани показателите за епилептогенна активност по скалата на Racine, както и началото на поява на WDS и латентността на появата на гърчовете. Бяха отчетени следните резултати:

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 несигнификантно намаление на епилептогенната активност в сравнение позитивната контрола ($P>0.05$). В експериментална група 2 с прилагане на целекосиб също беше отчетено несигнификантно намаление на епилептичната активност в сравнение с позитивната контрола ($p>0.05$). Разликите между група 1 и група 2 бяха несигнификантни ($p>0.05$). В експериментална група 3, комбинирано прилагане на доксициклин и целекоксиб беше отчетено статистически значимо намаление на скора по скалата на Racine, началото и броя на WDS и латентността на гърчовете, в сравнение с позитивната контролна група ($p<0.05$).

Резултатите за представени на 4 фигури (**29-32**) и **Таблица 3.**

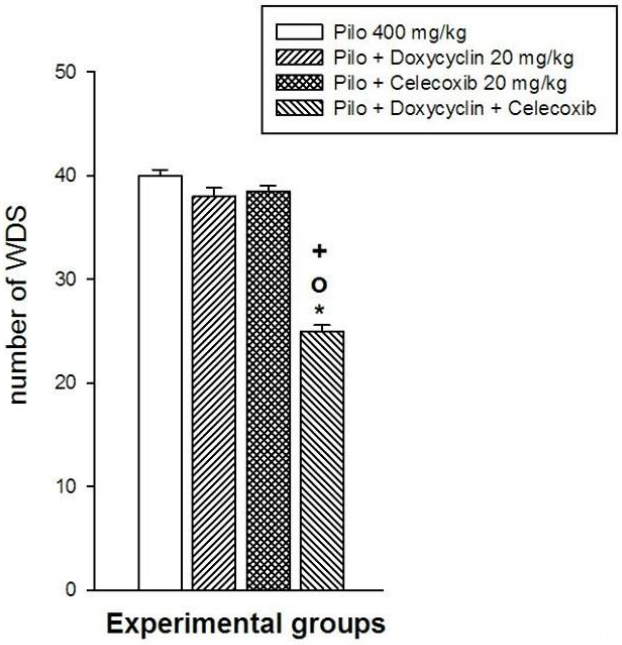


Фигура 29. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Doxycycline и Celecoxib върху степента на епилептична активност, при пилокарпинов модел на епилепсия на полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени като средна стойност±SEM. .*p<0.05 спрямо контролната група; o p<0.05 спрямо PILO 400+ Doxycycline 20mg/kg; + p<0.05 спрямо PILO + Celecoxib 20mg/kg**.**

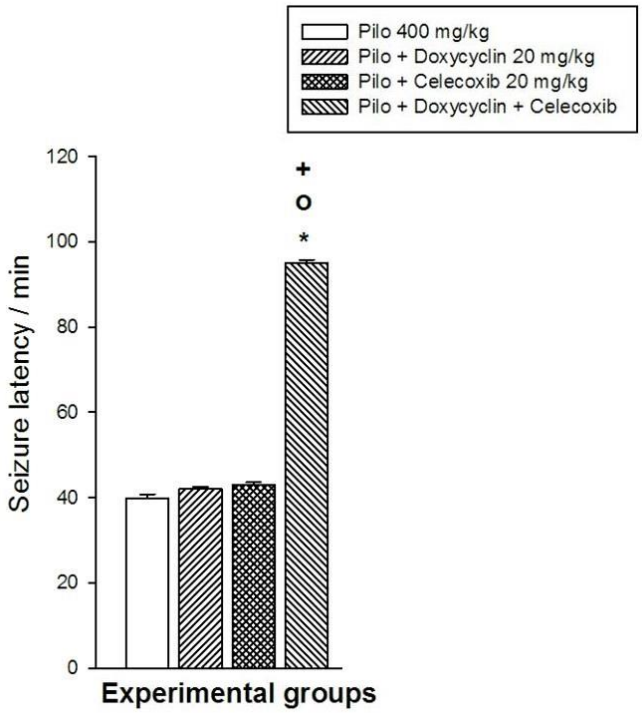


Фигура 30. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Doxycycline и Celecoxib върху началото на поява на WDS, при пилокарпинов модел на епилепсия на полово незрели мъжки плъхове. Данните са представени

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 31. **Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Doxycycline и Celecoxib 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 32. Ефект на 7-дневно самостоятелно и комбинирано прилагане на Doxycycline и Celecoxib върху латентността на гърчовете, 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.

Таблица 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. IL1-beta е определян сс помощта на ELISA IL-1 beta за плъхове на BioVendor. Измерванията са представени като (OD). Статистически са обработени и представени като mean ± S.E.M. Сравнението между групите е направено с помощта на one-way analysis of variance (ANOVA). Представени са в таблицата и статистическите значимости между групите (P). Брой на животни в група = 6.

Табл. 3.

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

Заключение: Резултатите от изследванията върху IL-1 beta показват ефекта от самостоятелното и комбинирано прилагане на целекоксиб и доксициклин. Самостоятелното прилагане на двете лекарства не води до статистически значими резултати. Сигнификантно е само инхибиращото 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.

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

С разкриване 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 COX в епилептогенезата и генерирането на гърчове. Двете изоформи на COX – COX-1 и COX-2 са основен таргет на голям брой НСПВС. COX-2 е предоминиращата изоформа, експресирана в мозъка (Takemiya et al., 2007). Въпреки фактите подкрепящи ролята на COX в 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 COX-2 инхибитор целекоксиб и неселктивния COX-1/COX-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 40-60грама. 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 със сонда с ибупрофен (20 мг/кг). На 7 ден, 30 мин. след последната апликация на ибупрофеен, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

4) Четвърта група-**експериментална 2**. Третиране в продължение на 10 дни перорално със сонда с ибурофен (40 мг/кг). На 7 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 7 ден, 30 мин. след последната апликация на целекоксиб, животните бяха инжектирани с пилокарпин (400 мг/кг, i.p.).

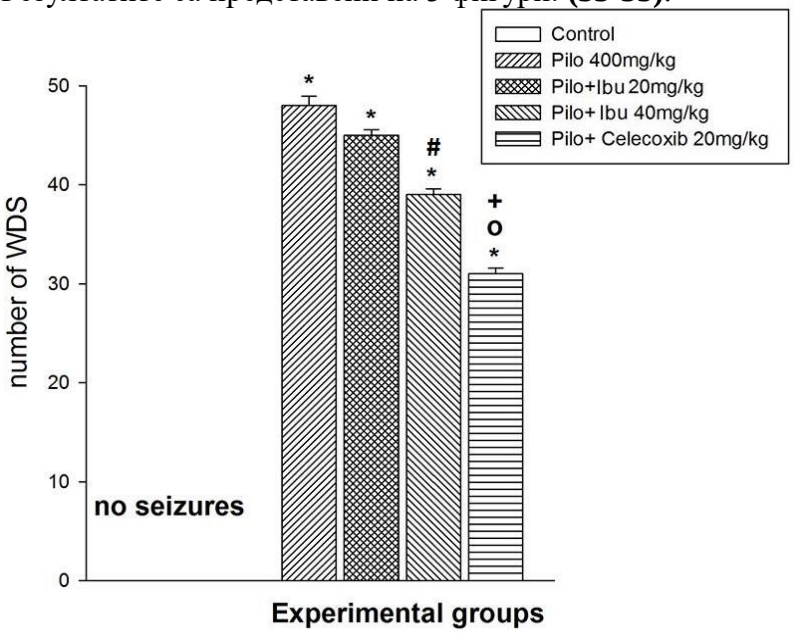
На 3-тия ден, 72 след прилагането на пилокарпин, животните бяха декапитирани и беше взета кръв за определяне на маркери на невровъзпаление (TNF-aplpha и IL-1β) чрез ELISA.

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) не се отчете статистически сигнификантно 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 скора по скалата на Racine, броя на WDS и увеличение на процента на преживяемост при сравнение с позитивната контролна група ($p<0.05$). Освен това, резултатите в тази група показаха и статистически значима разлика и спрямо екпериментални групи 1 и 2 ($p<0.05$).

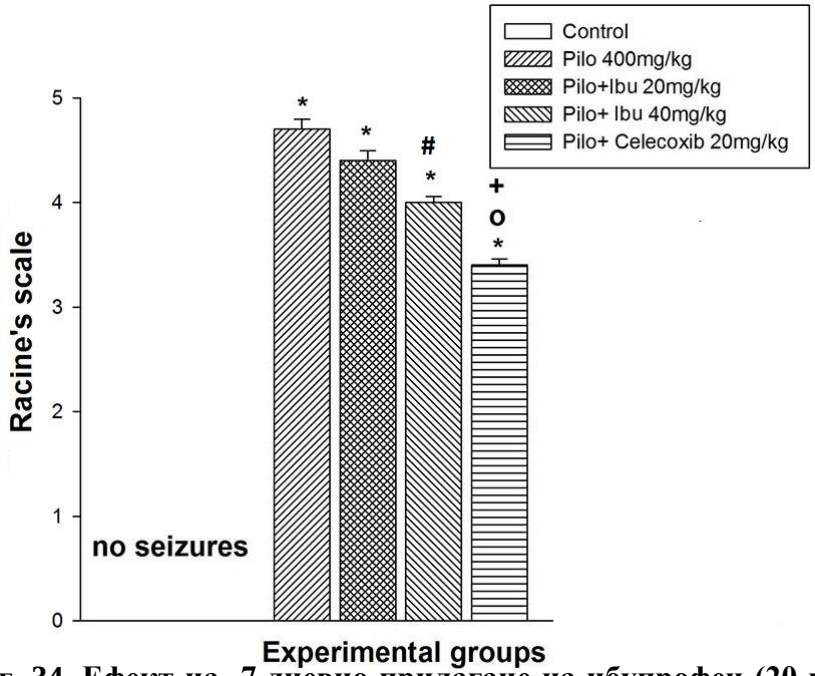
Резултатите са представени на 3 фигури: **(33-35)**.



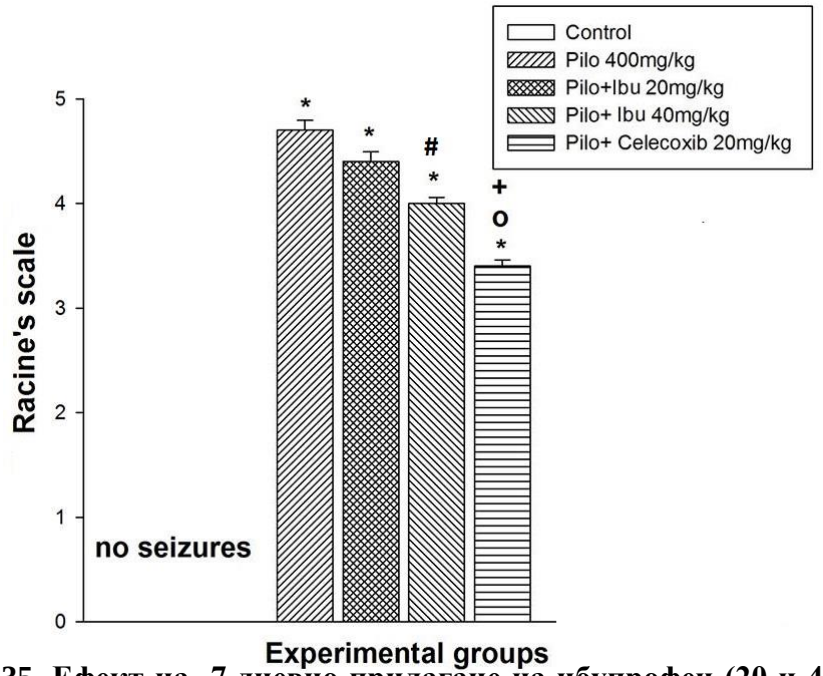
Фиг. 33. Ефект на 7-дневно прилагане на ибупрофен (20 и 40 mg/kg) и Celecoxib (20mg/kg) върху броя на WDS, при пилокарпинов модел на епилепсия на полово



незрели 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. 34. 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±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. 35. 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 полово незрели 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.

5. Дискусия

Методологични аспекти

Основна цел при индуциране на SE в експериментални модели на епилепсия при животни е да се наподобява максимално епилепсията при човека. Разликата е, че при експерименталните модели гърчовете се предизвикват с различни артифициални методи и субстанции, докато при човек епилептичната активност е проява на спонтанен патологичен процес. Въпреки тези разлики, от животинските модели може да се получи важна информация и да се направят заключения и за епилепсията при човека.

В настоящето проучване, ние прилагахме два утвърдени експериментални модела на епилепсия: с каинова киселина и пилокарпин.

Каинатният модел на епилепсия се прилага вече 3 десетилетия (15). Общи черти между него и епилепсията при хора е това, че и двата вида гърчове започват и остават ограничени в лимбичната система, както и подобните черти на невронална некроза и склероза в засегнатите зони на лимбичната система. Такава зона са пирамидалните хипокампални клетки (28). Отличителен белег на епилепсията са спонтанните рекурентни гърчове. При възрастни животни, индуцираните с каинова киселина гърчове са последвани от 4-8-седмичен период без епилептична активност, след който се появяват и първите спонтанни гърчове. В този свободен от гърчове период епилептогенезата се разгръща, и честотата на спонтанните гърчове нараства прогресивно (70).

Развиващия се мозък се различава значително в сравнение с мозъка при зрели животни. При използване на полово незрели животни трябва да се вземат впредвид някои особености, които могат да повлияят резултатите. Например стресът предизвикан от отделянето от майките може да доведе до по-изразена невронална

дегенерация и когнитивни нарушения при незрели животни (77). По тази причина, както контролните, така и експерименталните животни трябва да бъдат отделени от майките за еднакви периоди от време, както бе осъществено в нашия експеримент. Друг важен детайл е, че чувствителността към конвулсантите, влияещи на рецепторите за аминокиселини намалява с възрастта. При незрели животни се прилагат по-ниски дози, за да се снижи смъртността. Един подход в този аспект е прилагане на конвулсанта в най-ниска доза. В нашия експеримент с леветирацетам и валпроева киселина ние използвахме доза 5mg/kg, i.p., която се различава съществено от дозата при възрастно животни. При този подход има вероятност част от животните да не развият гърчове. Друга възможност е да се прилага висока доза, но гърчовете да бъдат терминирани с паралдехид или диазепам (94).

Пилокарпиновият модел е втория модел който използвахме в част от изследванията от настоящето проучване. Той спада към т.нар. изоморфни модели (т.е. наподобяващи напълно епилепсията) и е описан за първи път през 1983г. в изследвания на Turski et al (191).

При този модел прилагането на пилокарпин на плъхове, индуцира status epilepticus, характеризиращ се с тонично-клонични генерализирани гърчове, последван от латентен период без гърчове. В по-късен етап (2-4 седмици) настъпва хронична фаза с поява на спонтанни рекурентни гърчове.

Дозата на алкалоида, която предизвиква гърчове, и която е прилагана в нашето изследване е 300-400 mg/kg. Отчетената смъртност при тази доза в изследванията е 30-40%. Тя съвпада с отчетената в опитите на Cavalheiro et al., 1992. Това ниво може да бъде редуцирано с блокиране на гърчовете с диазепам. Нашите данни показаха, че 3h. след началото на гърчовете, животните проявяваха откъслечни и самоограничаващи се генерализирани гърчове с продължителност по-малко от 1min, в продължение на 1-3 дни.

Съществуват няколко предположения за конвулсивните ефекти на пилокарпина:

Първо, пилокарпина е агонист на М1-мускариновите рецептори в ЦНС, което довежда до промени на Ca^{2+} и K^{+}-йонен поток (162). Повишената интрацелуларна концентрация на Ca^{2+}, води до освобождаване на глутамат от пресинаптичните терминали, което провокира епилептогенна активност. Веднъж индуцирани, гърчовете се подържат от активация на глутаматергичните NMDA-рецептори.

Второ, някои съвременни изследвания показват, че активацията на холинергичните неврони, не е единствения тригериращ гърчовете фактор. Marchi и

сътр. (101) доказват, че пилокарпина индуцира ранна локализирана увреда на ХЕБ в региони с висока чувствителност на холинергични агонисти. Предполага се, че това довежда до проникване на албумин и К-йони в ЦНС, които улесняват гърчовете.

Трето, изследвания в последните години установяват активация на периферната имунна система, след прилагане на пилокарпин. В нашето изследване доказахме повишени нива на IL-1beta в серума на експерименталните животни. Известно е, че високите концентрации на проинфламаторни цитокини водят до резки промени във възбудимоста на инхибиторните и екцитаторните неврони (38). Нашите резултати с прилагане на лекарства, за които е известно, че понижават концентрациите на проинфламаторни цитокини доказват, че вероятно повишените IL-1beta и TNF-alpha в периферните тъкани в резултат на гърча са с важна роля в патогенезата на епилепсията.

Обща дискусия

Дискусия върху проучване с леветирацетам и валпроева киселина

Ролята на невровъзпалението в процеса на епилептогенезата се дискутира активно и търсенето на антипилептични средства не само със симптоматично, но и с болестмодифициращ ефект е от ключово значение. Първото изследване в настоящия труд 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, в каинат-индуциран модел на епилепсия.

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

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-alpha и IL-1beta ($p<0.05$). Ефекта на LEV е по-подчертан по отношение на IL-1beta. Установява се и статистически значима разлика в сравнение с групата животни третирани с VAL ($p<0.05$). 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. Други научни факти показват, че IL-1beta има важна роля в появата на невронална клетъчна смърт вследствие на травматични, исхемични или индуцирани от гърчове мозъчни увреди (152). IL-1beta подтиска глутаматния re-uptake от астроцитите, което довежда до повишена екстрацелуларна концентрация на глутамат и усилване на гърчовата активност. Тези факти показват, че понижението на IL-1beta от LEV, получено в нашите експерименти, може да има антиепилептогенен ефект и чрез въздействие върху астроглиалната функция.

В поредица експерименти се доказва, че IL-1beta усилва активността на NMDA-рецепторите, чрез IL-1R- медиирана активация на Src-киназната активност и последващо фосфорилиране на NR2A/B субединицата на рецептора (200). Това довежда до увеличена интрацелуларна концентрация на Ca^{2+}, поради промени в активността на NMDA-рецептора. Освен това IL-1beta удължава гърчовете по NMDA-зависим начин. Установява се, че рецепторите на IL-1beta и NMDA-рецепторите са колокализирани върху дендритите на хипокампалните неврони, създаващо взаимодействия между възбудимост и невровъзпаление (19).

Ние допускаме, че един потенциален механизъм, чрез който гърчовете в ранна възраст способстват процеса на епилептогенеза, е чрез активация на мозъчната микроглия, 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 рекурнтни 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. Получените експериментални резултати очертават и подкрепят една нова стратегия при лечението на епилепсията в детска възраст.

Глията е основен източник на продукция и секреция на проинфламаторни цитокини. Данните от представеното изследване подкрепят факта, че активираният глиален отговор след първоначалното увреждащо събитие (status epilepticus) има водеща роля в механизмите на детските гърчове и отключването процеса на епилептогенеза. Намалените нива на епилептогенна активност от LEV, съчетани с понижени нива на проинфламаторни цитокини показват, че терапевтични интервенции със средства като LEV, които влияят на патогенетичния субстрат на епилепсията са по-ефективна стратегия в сравнение с конвенционалните АЕЛ.

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 антиепилетогенен и болест-модифициращ ефект. Резултатите от настоящето изследване подкрепят ролята на невровъзпалението в патогенезата на епилепсията и очертават нова терапевтична стратегия в антиепилетичната терапия.

Дискусия върху проучване с кетогенна диета

Фармакорезостентната епилепсия остава сериозен медицински проблем. Въпреки големия брой антиепилептични лекарства при 30% от пациентите има неефективен контрол на гърчовете. Нисковъглехидратната или кетогенна диета (КД) се използва като средство за лечение на фармакорезистентна епилепсия при деца и в някои случаи напълно премахва необходимоста 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 про-инфламаторните цитокини при различна продължителност на прилагане на диетата. Цел на изследването е определяне на

ефектите на КД, при различна продължителност на прилагане, върху тежеста на гърчовете при пилокарпинов модел на епилепсия и нивата на TNF-alpha и IL-1beta в пилокарпинов модел на епилепсия.

КД 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 роля на кетогенната диета в невровъзпаление при неонатална епилепсия. В нашите експерименти отчитаме потискане на епилептогенната активност, което може да се дължи, като на промени в нивото на АТФ, така и с повлияване K^+-атф-клетъчни канали свързани с утилизация на глюкоза. Независимо от многобройните теории механизма на КД остава неизяснен.

При нормални физиологични условия, мозъка доставя основното количество енергия от глюкозата. При отсъствие на въглехидрати, както при прилагане на КД или при гладуване, нивата на глюкозата спадат и мозъчните клетки разчитат на кетонните тела като основен енергиен източник. Подчертаното повишение на кетонните тела, като β-хидроксибутират, в плазмата при прилагане на КД и повишеното съотношение мазнини:въглехидрати, водят до изразен антиконвулсивен ефект (27). Експериментални и клинични наблюдения показват, че повишените плазмени нива на кетони и понижените на глюкоза са индикатори за ефективността на КД. В нашето изследване установихме, че въпреки увеличените нива на кетонни тела и намалените на глюкоза на 3-тата седмица от прилагане на диетата, антиепилетичния ефект на тази група животни не е така изразен, както в групите с 6 и 9-седмично прилагане. Тези резултати ни дават основание да предполагаме, че променените нива на кетони и глюкоза не са надежден маркер за антиконвулсивния ефект на КД.

Съществуват многобройни теории обясняващи механизма на терапевтичния ефект на КД, но неизяснения ключов клетъчен механизъм на този ефект пречи на усилията за разработване на фармакотерапия действаща по този неразгадан механизъм.

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 преполагаме, че антиинфламаторния ефект на кетогенната диета е най-важния фактор обясняващ антиконвулсивните, а вероятно и антиепилептогенните ефекти на диетата. Кетонният метаболизъм намалява продукцията на свободни радикали (90), за които е известно, че

спомагат за възпалението. От друга страна аденозина, който се образува при прилагане на диетата, чрез взаимодействие с А1 и А2 рецептори супресира възпалението в много тъкани (190). Полиненаситените мастни киселини в КД активират PPAR, а това довежда до инхибиране на транскрипционните фактори NF-kB 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 (213). Калорийната рестрикция има също антиинфламаторни ефекти.

Високото процентно съдържание на мазнини в кетогенната диета довежда до активиране на нуклеарния рецептор PPAR. Тези нуклерани 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, докато PPAR-агонистите редуцират експериментално индуцираното възпаление (167). Този ефект е съпроводен с подтисната транскрипция на гени за проинфламаторни цитокини, като гените за TNF-alfa и IL-1beta.

Изложените факти и резултатите от настоящето проучване ни дават основание да предположим, че един от основните механизми на КД се свързва с антинфламаторното й 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 за много проинфламаторни цитокини.

Необходим е по-голям клиничен и експериментален опит с КД и невровъзпалението, особено по отношение дълготрайните ползи от прилагането й. Ключов въпрос е кой от горните механизми е най-важен за супресивното действие на КД върху възпалението. Взаимовръзката между КД, кетоза, хипергликемия и антиинфламаторни ефекти е от основна важност. Прилагането на КД в „латентния период“ на епилептогенезата вероятно оказва болест-модифициращ ефект върху клиничния ход на епилепсията.

.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.

Дискусия върху проучване с розувастатин

Статините са утвърдени лекарства за лечение на хиперлипидемии и превенция на сърдечно-съдови заболявания. Има данни, че те повлияват метаболизма на мозъчните клетки. Научни факти в последните години доказват ефекта на статините в терапията на невродегенеративни болести и мозъчни травми. Целта на настоящото проучване е да се изследва в експеримент ефектът на розувастатин върху епилептогенната активност на пилокарпин и невровъзпаление в мозък на мъжки полово незрели плъхове.

Статините са компетитивни инхибитори наHMG-CoA редуктазата, която е скорост-лимитиращ ензим в синтеза на холестерола и изопреноидите. Изследвания свързват този механизъм на статините с инхибиращия им ефект върху функциите на NMDA-рецепторите и свързания с това антиепилептичен ефект (204). Установява се, че статините имат NMDA-антагонистични ефекти, което би могло да даде обяснение за антиепилептичните и невропротективните им свойства.

Получените в експеримента резултати показват, че розувастатин има ефект и при епилепсия. Посоченото може да се дискутира в няколко направления: Първо, доказано е, че тези лекарства активират различни невропротективни сигнални пътища. В изследвания на Zacco et al. (225) се установява, че статините превръщат миши първични кортикални неврони по-резистентни на възбудни стимули по холестерол-зависим менанизъм. Тези ефекти на статините се свързват със способността им да блокират HMG-CoA редуктазата. Второ, антиконвулсивният им ефект би може 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, антипепилептичния ефект на Росувастатин би могъл да се свърже и с влияние върху AMPA рецепторите и евентуална дестабилизация на богатите с холестерол мембрани в стрктурата на AMPA-рецепторите.

Данните от изследването подкрепят възможноста за използване на розувастатин като невропротективно средство, забавящо прогресията на епилпептогенезата и нова терапевтична стратегия.

Дискусия върху проучване с винпоцетин

Vinpocetine е широко прилагано средство с вазодилататативно и ноотропно действие. Ефектът му се свързва обикновено с блокиране на волтаж-зависимите Na^+-канали, както и с инхибиране на PDE1. Vinpocetine 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. Лекарството е церебрален вазодилататор и действа като стимулатор на мозъчния метаболизъм, чрез увеличаване усвояването на кислород и глюкоза от кръвния ток, както и чрез стимулиране на невроналната АТФ-продукция.

В последното десетилетие в патогенезата на епилепсията се дискутира и ролята на имунитета и невровъзпалението. При много неврологични заболявания, като атеросклероза, латерална амиотрофична склероза, болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, също се установява активиране на инфламаторни процеси в ЦНС. Експериментира се прилагане на антиинфламаторни средства с цел повлияване патогенезата на тези заболявания. Дълготрайното прилагане на глюкокортикокостероиди или инхибитори на COX се свързва обаче с много странични ефекти. В проучвания на Jeon et al. (85) се установява, че vinpocetine, познат с високия си профил на безопасност и минимални странични ефекти, притежава и мощни противовъзпалителни свойства. Доказва се, че vinpocetine редуцира транскрипцията на NF-kB. Този транскрипционен фактор е ключов в синтеза на про-инфламаторни цитокини, като TNF-alfa и IL-1beta. В допълнение RT-PCR анализ показва, че vinpocetine редуцира също TNF-alfa индуцираната експресия на mRNA за IL-1beta. Поради факта, че посочените проинфламаторни цитокини усилват невроналната възбудимост, може да се предполага, че получените в нашия експеримент ефекти на vinpocetine върху гърчовете, могат да се свържат с описаните антиинфламаторни ефекти на лекарството.

По отношение на молекулярните механизми в антиинфламаторните ефекти на винпоцетин, се очертават няколко обяснения. Първо, проучвания показват, че фосфодиестеразите, чрез регулация на цАМФ и цГМФ регулират възпалителните отговори. Инхибиращото действие на vinpocetine върху фосфодиестераза 1 се свързва с антинфламаторните му ефекти. Повлиявайки системата на цАМФ, vinpocetine инхибира NF-kB-зависимите инфламаторни отговори. Второ, в последните години се установява, че подтискането на NF-kB-сигнализацията не е свързана с инхибирането на фосфодиестераза 1 (10). По-скоро инхибиращото действие на vinpocetine върху

IKK-киназата повлиява активността на NF-kB и по този начин транскрипцията на проинфламаторните цитокини TNF-alfa и IL-1beta. Както беше описано по-горе, е доказано, че те усилват невроналната възбудимост и появата на гърчове.

Получените в експеримента резултати показват изразени антипилептични ефекти на vinpocetine. Научните доказателства, че невровъзпалението е водещо в епилептогенезата, дават основание да предположим, 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 антиепилптичнта му активност. Може да се приеме, че vinpocetine може да се прилага заедно с конвенционалните антипилептични лекарства с цел потенциране на ефектите им и влияние върху епилептогенезата.

Дискусия върху проучване с доксициклин и целекоксиб

Съвременна насока в изследванията на епилепсията е търсене на средства не само контролиращи гърчовата активност, но и повлияващи епилептогенезата.

Контролът 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 проучвания с цел доказване на антиепилептогенните им качества, но до момента няма регистриран медикамент с подобни качества.

Липсата на успех от продължително прилагане на АЕЛ в периода след предизвикване на status epilepticus при експериментални животни с цел подтискане на епилептогенезата, насочва изследванията към други молекулярни таргети. Вместо повлияване на проводимоста в йонните канали, проучванията са насочени към молекулярни пътища, които имат връзка с невровъзпалението. Някои изследвания показват (88), че инхибитора на COX-2, целекоксиб има ефекти върху епилептогенезата при експериментален модел на епилепсия. От друга страна, подобни изследвания, но с парекоксиб показват, че лекарството е невропротективно, но не и антиепилептогенно (148) при пилокарпинов модел на епилепсия.

Данните от настоящето проучване са в унисон с предходни изследвания доказващи, че инхибицията на простагландиновата синтеза редуцират началото и

латентноста на гърчовете в експериментален модел на епилепсия (134). Изследване от последните години доказва, че простагландиновия рецептор EP2 има ключова роля в невровъзпалението и невродегенерацията. EP2-рецепторните антагонисти са таргет за нова терапевтична стратегия при епилепсия (86).

Антиконвулсивните ефекти на доксициклин и други тетрациклини не са добре проучени. Тетрациклините имат многобройни ефекти върху ЦНС. Първо, установено е, че миноциклина е мощен инхибитор на металопротеиназа-9 (MMP-9), която има важна роля в медииране на тъканната увреда при исхемичен инсулт (116). Второ, доказва се, че той е и инхибитор на микроглиалната активация и други инфламаторни отговори (218). Трето, установено е, тетрациклините са инхибитори на poly-ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1), която е свързана с клетъчната некроза и изчерпване на клетъчните енергийни депа (2). Посочените дотук научни факти показват, че доксициклина и другите тетрациклини вероятно могат да подтискат гърчовете чрез своите антиинфламаторни свойства. От друга страна бързите антиконвулсивни ефекти на доксициклина наблюдавани в нашият експеримент показват, че неговите ефекти върху невроналната възбудимост са свързани не само с невровъзпалението.

Настоящето изследване е първото, което проучва ефекта от комбинираното прилагане на два медикамента с антиинфламаторни свойства. Ние прилагахме лекарства, които повлияват два различни инфламаторни пътища, цел да установиме дали в резултат на епилептогенна активност се активират многобройни молекулярни пътища свързани с невровъзпалението. Клинично важните послания от нашето проучване са няколко: 1) Макар, че съществуват доказателства, че в резултат на гърчовата активност се активират многобройни инфламаторни пътища, само специфична комбинация от лекарства може да окаже терапевтичен ефект. 2) Дадена антиинфламаторна кобминация би могла да се прилагала в ограничен период от време, за разлика от дълготрайната апликация на АЕЛ, за които са характерни сериозни нежелани ефекти. Необходими са бъдещи проучвания, които да оптимизират дозовите режими и продължителността на прилагане на комбинациите от антиинфламаторни лекарства. Освен това са необходими проучвания, които да проследят дали такъв тип терапия би имала терапевтичен ефект и при свързаните с епилепсията коморбидни състояния. Някои от тях имат по-сериозни ефекти върху качеството на живот на пациентите, от самите епилетични пристъпи.

В заключение, настоящето проучване дава доказателства за значението от повлияване на различни инфламаторни молекулярни пътища, като рационален

терапевтичен подход за повлияване на епилептогенезата. Доксициклин и целекоксиб действат синергично в подтискане на гърчовете и невровъзпалението. Ние допускаме, че тази лекарствена комбинация е обещаваща терапевтична алтернатива в лечението на епилепсията.

Дискусия върху проучване с ибупрофен и целекоксиб

Въпреки наличието на изследвания, които показват, че мозъка е 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, за която се предполага, че невровъзпалението в резултат на епилептогенната активност има ключова роля в патогенезата на заболяването. Подобно на екстраневроналното възпаление, при мозъчното възпаление се активират голям брой инфламаторни молекулярни пътища, които имат, както проинфламаторни, така и антиинфламаторни действия. Един от активираните в резултат на епилептогенната активност е COX-каскадата. Прието е, че COX има главна роля в отключването и подържането на инфламаторните отговори, чрез простаноидните продукти, PGE2, PGD2, PGF2α. COX-2 е изоензим отговорен за простагландиновата продукция при условия на остро възпаление, докато COX-1 е свързана подържане на нормалните хомеостатични функции на организма. COX-2 е бързо индуцирана в мозъчните неврони в отговор на увреди или ексцесивна невронална активност, както по време на гърчове (169).

Индукцията на COX-2 е по-характерна при гърчове произхождащи от предния мозък (42). 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 (34). 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 научните сведенията за ролята на COX-2 в генезата и подържането на конвусивните състояния. В някой експерименти се доказват по-скоро проконвулсивна роля на COX-2 (80).

Ролята на COX-1 в епилетогенния процес не е напълно изяснена. Ако приемем, невровъзпалението като ключова характеристика на епилепсията, то COX-1 има участие в този процес, на основата на фармакологичното инхибиране на COX-1 и подтискане на невровъзпалението и невроналната клетъчна смърт.

Настоящото проучване е насочено към изясняване на ролята на двете изоформи на COX в епилептогенния процес. Въпреки наличните научни доказателства 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 изследване 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, както в по-ниска доза (20мг/кг), така и в по-висока (40мг/кг). Ибупрофен понижава степента на епилептична активност, като при доза 40 мг/кг ефектите са по-изразени, но не достигат статистическа значимост спрямо контролната група третирана само с пилокарпин. Тези резултати показват, че вероятно COX-2 има определяща роля в ефектите върху невроналната възбудимост. Предполагаемите механизми в които COX-2 участва, и по този начин влияе на епилетогенната активност са няколко.

COX-2 участва в инфламаторните отговори, невроналната смърт и хипервъзбудимост, както и в астроцитната активация в резултат на епилептогенна активност (96). Експресията на COX-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 (173).

Простагландините в мозъка на бозайниците са въвлечени директно или индиректно в невроналната активност. Активацията на PGE2 рецепторите води до бърза up-regulation на IL-6 и IL-1beta в активираната в резултат на гърчовете микроглия (1). Установява се, че концентрацията на простагландините са увеличени в цереброспиналната течност при пациенти с епилепсия. Приемайки, че PGE2 има възбуждащи ефекти в мозъка, прилагането на COX-инхибитори се очертава като нова стратегия за невропротективно и антиепилептогенно лечение в клиничната практика.

Изложените дотук факти показват, че участието на COX-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, COX-2 е експресирана основно в глутаматергичните неврони особено в хипокампуса и

кората на мозъка, зони свързани пряко с началото на гърчовете (216). В тези зони COX-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.

Обобщавайки, COX-2 има важна роля в мозъчната възбудимост. Тя е въвлечена в генерирането на гърчове и епилептогенезата. Освен описаната роля на COX-2 в невровъзпалението, се предполагат и други индиректни механизми в ролята на този ензим в невроналната възбудимост. Така например намаляването на нивата на простагландините е свързано с акумулация на арахидонова киселина, за която има сведения, че инхибира калциевите канали от Т-тип (29). Този ефект се свързва с подтискане на абсансните форми на епилепсия.

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

6. 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 половонезрели мъжки плъхове. Антиконвулсивният ефект на

кетогенната диета след 9 седмично прилагане е най-значим и определя бъдещи изследвания върху механизми на невронална активност.

3. Розувастатин подтиска епилептичната активност в неонатален пилокарпинов модел на плъхове. Розувастатин подтиска “wet dog shakes” на полово-незрели плъхове.

4. 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.

5. 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 подтиска повишените от пилокарпин нива на IL-1beta при полово-незрели плъхове.

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

7. Научни приноси

I.Теоретични

1. За първи път се установяват ефекти на леветирацетам и валпроева киселина върху нива на провъзпалителни цитокини у половонезрели плъхове. Това дава основание да се предположи, че прилагани в т.нар.латентен период на епилептогенезата, двете лекарства могат да окажат болестмодифициращо действие върху механизми на епилепсия.

.

2. За първи път се документира, че прилагана експериментално, кетогенната диета има различно изразен терапевтичен ефект, който зависи от продължителноста 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 половонезрели 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 епилепсия.

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 комбинацията на доксициклин и целекоксиб, розувастатин, винпоцетин и ибупрофен. Иновативен подход в антиепилептичната терапия с прилагане на средства повлияващи не само гърчовете, но също така и патогенетичния ход на заболяването.

8. Списък на публикации, съобщения и участия в проекти свързани с дисертацията.

7.1. Публикации в научни списания

1. **Харитов, Е**., Е. Ангелеска, Н. Бояджиева (2015). Антиконвулсивни и невропротективни ефекти на росувастатин при пилокарпин-индуциран експриментален 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, 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 neaonatal kainat model of epilepsy. Bulgarian medicine.

5. **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.

6. **Харитов, Е**., Е. Ангелеска, Н. Бояджиева.(2014). Лекарственорезистентна епилепсия. Лекарска практика, 3, 2: 13-19.

7. **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.

8. **Харитов, Е**., Е. Ангелеска, Н. Бояджиева. (2014). Роля на IL-1R/TLR сигнализацията в епилептогенезата и лечението на епилепсията. Лекарска практика, 6: 3-11.

9. **Харитов, Е**., Е. Ангелеска, Н. Бояджиева. (2014). Роля на IL-beta в механизми наепилепсията и възможности за фармакологичното му повлияване. Българска неврология, Том 15, 2: 176-180.

7. 2. Списък на участия в конгреси и конференции

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, 2013г. 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. Efects 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. **E. 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-невrометаболитен подход в лечението на епилепсията Юбилейна научна конференция по фармакология и клинична фармакология за млади учени, 05-07 Юни, 2015, Цигов чарк. Орална презентация.

7.3. 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 25-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**.

9. Литература

1. Akula K.K, Dhir A, Kulkarni SK. (2008) Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. Epilepsy Res. 78:60–70.
2. Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:9685–90.
3. Anderson, C.M. and Swanson, R.A (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia, ; 32, 1–14
4. Antonucci F, Di Garbo A, Novelli E, et al. (2008). Botulinum neurotoxin E (BoNT/E) reduces CA1 neuron loss and granule cell dispersion, with no effects on chronic seizures, in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Exp Neurol ; 210:388–401.
5. Arana, A., Wentworth, C.E., Ayuso-Mateos, J.L., Arellano, F.M. Suicide-Related (2010). Events in Patients Treated with Antiepileptic Drugs. N. Engl. J. Med., 363(6), 542-551.
6. Araque, A. et al. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci.; 22, 208–215
7. Auvin S, et al. (2009). Inflammation in rat pups subjected to short hyperthermic seizures enhances brain long-term excitability. Epilepsy Res.; 86:124–130.
8. Auvin S, Mazarati A, Shin D, Sankar R. (2010). Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. Neurobiol. Dis.; 40:303–310.
9. Azevedo, F.A. et al. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. J. Comp. Neurol,. 513, 532–541.
10. Bagoly E, Fehér G, Szapáry L. The role of vinpocetine in the treatment of cerebrovascular diseases based in human studies. Orv Hetil. 2007;148:1353–1358.
11. Banks WA, Erickson MA (2010). The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. Neurobiol. Dis.; 37:26–32.
12. Baram TZ, Eghbal-Ahmadi M, Bender RA (2002). Is neuronal death required for seizure-induced epileptogenesis in the immature brain? Prog Brain Res 135:365-375.

13. Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S et al. (2007). Interleukin- 1 systeminCNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. Ann NY Acad Sci ;1113:173–7.
14. Bedner P, Steinhäuser C. (2013). Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. Neurochem Int ; 63: 682 – 7.
15. Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy, Neuroscience, vol. 14, no. 2, pp. 375-403.
16. Benedetti, B. et al. (2011). Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex. J. Physiol. ; 589, 1159–1172
17. Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P. & Scheffer, I.E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009, Epilepsia, vol. 51, no. 4, pp. 676-685.
18. Bergles, D.E. and Jahr, C.E.(1997). Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. Neuron ; 19, 1297–1308
19. Bernardino, L., Ferreira, R., Cristovao, A.J., Sales, F., Malva, J.O., (2005). Inflammation and neurogenesis in temporal lobe epilepsy. Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 4, 349-360.
20. Binder, D.K. and Steinha¨ user, C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. Glia, 2006; 54, 358–368.
21. Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC et al. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. N Engl J Med 2009; 360: 1960 – 70.
22. Boer K, Jansen F, Nellist M, et al. Inflammatory processes in cortical tubers and subependymal giant cell tumors of tuberous sclerosis complex. Epilepsy Res 2008; 78:7–21.
23. Boison, D. Adenosine dysfunction in epilepsy. Glia, 2012; 60, 1234–1243
24. Bordey A, Sontheimer H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. Epilepsy Res 1998; 32: 286 – 303.
25. Bough K. J. and Rho J. M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. Epilepsia 2007; 48, 43–58.
26. Bough KJ, Yao SG, Eagles DA. Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. Epilepsy Res. 2000; 38 :15–25.

27. Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM. Caloric restriction and ketogenicdiet diminish neuronal excitability in rat dentategyrus in vivo. Epilepsia, 2003; 44: 752–760.
28. Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. Neuroscience 1999; 89:717–729.
29. Brandt C, Bethmann K, Gastens AM, Loscher W. (2006). The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis. 24:202–211
30. Bttigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzietko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C (2002). Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A 99:15089-15094.
31. Cavalheiro, E.A., Naffah-Mazzacoratti, M.G., Mello, L.E. & Leite, J.P. (2006), " The pilocarpine model of seizures" in Models of Seizure and Epilepsy, eds. A. Pitkänen, P.A. Schwartzkroin & S.L. Moshe, Elsevier Academic Press, London, pp. 433.
32. Cavazos JE, Cross DJ. (2006). The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy & Behavior 8(3):483-93.
33. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER et al. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. Neuron, 1991; 6: 983 – 92.
34. Chen C, Magee JC, Bazan NG. (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. J Neurophysiol 87:2851–2857.
35. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. Ann Neurol 2003;53(6):743–51.
36. Cho IH, Hong J, Suh EC, Kim JH, Lee H, Lee JE, Lee S, Kim CH, Kim DW, Jo EK, Lee KE, Karin M, Lee SJ (2008). Role of microglial IKKbeta in kainic acid-induced hippocampal neuronal cell death. Brain 131:3019-3033.
37. Cilio MR, Sogawa Y, Cha BH, Liu X, Huang LT, Holmes GL (2003). Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. Epilepsia 44:518-528.

38. Crespel A, Coubes P, Rousset MC, et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. Brain Res 2002 ; 952:159–169.
39. Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S., & Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J.Neurosci.Methods.
40. Danbolt NC. Glutamate uptake. Prog Neurobiol, 2001; 65: 1 – 105
41. Del-Rio Hortega, P (1932) in Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System (Penfield, W., ed.), 481 – 534.
42. Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. (2007) Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylenetetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. Seizure,16:691–697
43. Diano S, Matthews RT, Patrylo P, Yang L, Beal MF, Barnstable CJ, Horvath TL. Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. Endocrinology. 2003; 144:5014–5021
44. Ding Y, Wang S, Zhang M, Guo Y, Yang Y, Weng S, Wu J, Qiu X, Ding M. Fructose-1,6-diphosphate inhibits seizure acquisition in fast hippocampal kindling. Neurosci Lett.2010; 477:33–36.
45. Djukic B, Casper KB, Philpot BD et al. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. J Neurosci, 2007; 27: 11354 – 65.
46. Eddy AA. Protein restriction reduces transforming growth factor-beta and interstitial fibrosis in nephrotic syndrome. Am J Physiol Renal Physiol 1994; 266: 884–893.
47. Edwards, J.R. and Gibson, W.G. A model for Ca2+ waves in networks of glial cells incorporating both intercellular and extracellular communication pathways. J. Theor. Biol, 2010; 263, 45–58
48. Eid, T. et al. Roles of glutamine synthetase. Inhibition in epilepsy. Neurochem. Res. 2012; 37, 2339–2350
49. Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. Neuroscience 158, 1021-1029
50. Engel Jr, J. (2008). Progress in epilepsy: Reducing the treatment gap and the promise of biomarkers. Curr. Opinions in Neurol. 21(2), 150 – 154.
51. Engel, J, (1996b), Introduction to temporal lobe epilepsy, Epilepsy research, vol. 26, no. 1, pp. 141-150.
52. Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. & Engel, J.,Jr (2005), "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International

League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)", Epilepsia, vol. 46, no. 4, pp. 470-472.

53. Foldvary N, Nashold B, Mascha E, Thompson EA, Lee N, McNamara JO, Lewis DV, Luther JS, Friedman AH, Radtke RA. (2000). Seizure outcome after temporal lobectomy for temporal lobe epilepsy: A Kaplan-Meier survival analysis. Neurology 54(3):630-4.
54. French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. (1993). Characteristics of Medial Temporal-Lobe Epilepsy - .1. Results of History and Physical-Examination. Annals of Neurology 34(6):774-80.
55. Fujikawa, D.G. (2003). Neuronal death in mesial temporal sclerosis: separating morphology from mechanism, Epilepsia, vol. 44, no. 12, pp. 1607-1615
56. Fukao T, Lopa schuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism on the fringe of lipid biochemistry. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2004; 70: 243–251.
57. Galic MA, et al. Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats. J. Neurosci., 2008; 28:6904–6913.
58. Geyelin HR. Fasting as a method for treating epilepsy. Med Rec. 1921; 99, 1037–1039.
59. Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. Cell Death Differ 14:1324-1335.
60. Gilbert D, et al. The ketogenic diet: seizure control correlates better with serum betahydroxybutyrate than with urine ketones. J. Child Neurol. 2000; 15: 787–790.
61. Giorgi F, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: Fromthe bench to the bedside. Neurosci Biobehav Rev 2004; 28:507–524.
62. Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C & Gage, F.H (2010). Mechanisms underlying Inflammation in Neurodegeneration. Cell 140, 918 – 934.
63. Greene AE, Todorova MT, McGowan R, Seyfried TN. Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic el mice by reducing blood glucose. Epilepsia 2001; 42:1371–1378.
64. Greenwood, R.S. Adverse Effects of Antiepileptic Drugs. Epilepsia, 2000, 41(Suppl s2) S42-S52.
65. Guelpa G, Marie A. La lutte contre l'epilepsie par la desintoxication et par la reducation alimentaire. Revue de Therapie Medico- Chirurgicale 1911; 78: 8–13.

66. Haberle, J. et al., Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. Mol. Genet. Metab, 2011;.103, 89–91
67. Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40:140-15
68. Hanisch UK, Kettenmann H (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10:1387-1394.
69. Hauser, W.A. (1997). In incidenece and prevalence. In (eds) Jr J. Engel and T.A. Pedley, Epilepsy: A comprehensive textbook. Lipincott-Raven, Philadelphia, pp 47-57.
70. Haut, S. R., Veliskova, J., & Moshe, S. L. (2004). Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. Lancet Neurol. 3, 608-617.
71. Henneberger, C. et al. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. Nature, 2010; 463, 232–236
72. Henshall DC, Clark RS, Adelson PD, Chen M, Watkins SC, Simon RP. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. Neurology 2000; 55: 250–257.
73. Heuser K, Eid T, Lauritzen F et al. Loss of perivascular Kir4.1 potassium channels in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. J Neuropathol Exp Neurol 2012; 71: 814 – 25.
74. Higashi K, Fujita A, Inanobe A et al. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. Am J Physiol. Cell Physiol, 2001; 281; C922-31.
75. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 294:827–832.
76. Hinterkeuser S, Schröder W, Hager G et al. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. Eur J Neurosci. 2000; 12: 2087 – 96.
77. Holmes GL, Ben-Ari Y (2001). The neurobiology and consequences of epilepsy in the developing brain. Pediatr Res 49:320-325.
78. Holmes GL, Lenck-Santini PP (2006). Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. Epilepsy Behav 8:504-515.
79. Holopainen IE (2005). Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. Neurochem Res 30:1521-1528.

80. Holtman L, van Vliet EA, Edelbroek PM, Aronica E, Gorter JA. (2010). Cox-2 inhibition can lead to adverse effects in a rat model for temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res 91:49–56.
81. Huttenlocher PR. Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. Pediatr Res. 1976; 10:536–540.
82. HuttunenHJ, Rauvala H. Amphoterin asanextracellular regulator of cell motility: from discovery to disease. J InternMed., 2004; 255:351–66.
83. ICE／caspase 1 inhibitors and IL-1beta receptor antagonists as potential therapeutics in epilepsy. Curr Opin Investig Drugs, 2010;11: 43–50.
84. International League Against Epilepsy. ELAE commission report.
85. Jeon K-I, et al. Vinpocetine inhibits NF-κB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:9795–9800.
86. Jiang, J. Y. Quan, T. Ganesh, W.A. Pouliot and R. Dangeledine, 2013. Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus delayed mortality and brain inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3: 110:3591-3596.
87. Juge N, et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. Neuron. 2010; 68:99– 211.
88. Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK:Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. Neurobiol Dis 2006, 23: 237–246.
89. Keith H. Factors influencing experimentally produced convulsions. Arch. Neurol. Psychiatry. 1933; 29:148–154.
90. Kim DY, Davis LM, Sullivan PG, Maalouf M, Simeone TA, et al. Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons. J Neurochem 2007; 101: 1316–1326
91. Kim J, Kondratyev A, Gale K (2007a). Antiepileptic drug-induced neuronal cell death in the immature brain: effects of carbamazepine, topiramate, and levetiracetam as monotherapy versus polytherapy. J Pharmacol Exp Ther 323:165-73.
92. Kovacs Z, et al. Facilitation of spike–wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. Neuroscience, 2006; 140:731–742.
93. Krebs HA. The regulation of the release of ketone bodies by the liver. Adv Enzyme Regul 1966; 4: 339–354

94. Kubova H, Mares P, Suchomelova L, Brozek G, Druga R, Pitkänen A (2004). Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. Eur J Neurosci 19:3255-3265.
95. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin- 1 beta converting enzyme. Science 1995; 267:2000–2003.
96. Kunz T, Oliw EH. (2001b). The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. Eur J Neurosci. 13:569–575
97. Kwan P and Brodie MJ. (2000). Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on? Seizure, 9: 464-8.
98. Kwan, P., Brodie, M.J. Early identification of refractory epilepsy. N. Engl. J. Med., 2000, 342(5), 314-319.
99. Kwan, P., Sander, J.W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr., 2004, 75(10), 1376-1381..
100. Kwan, P., Schachter, S.C., Brodie, M.J. Drug-resistant epilepsy. N. Engl. J. Med., 2011, 365(10), 919-926.
101. L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, elect roencephalographic and neuropathological study. Behav Brain Res 1983;9:315-335.
102. Laschet J, Kurcewicz I, Minier F, Trottier S, Khallou-Laschet J, Louvel J, Gigout S, Turak B, Biraben A, Scarabin J, Devaux B, Chauvel P, Pumain R. Dysfunction of GABAA receptor glycolysisdependent modulation in human partial epilepsy. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:3472–3477.
103. Laschet J, Minier F, Kurcewicz I, Bureau M, Trottier S, Jeanneteau F, Griffon N, Samyn B. Van Beeumen J, Louvel J, Sokoloff P, Pumain R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. J Neurosci. 2004; 24:7614–7622.
104. Layton ME, Pazdernik TL. Reactive oxidant species in piriform cortex extracellular fluid during seizures induced by systemic kainic acid in rats. Journal of Molecular Neuroscience. 1999; 13:63–68.
105. Lee, P., Engel, J. Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia, 2005, 46(4), 470-472.

106. Leroy, C., Pierre, K., Simpson, I. A., Pellerin, L., Vannucci, S. J., & Nehlig, A. (2011). Temporal changes in mRNA expression of the brain nutrient transporters in the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. Neurobiol.Dis. 5: 31-45

107. Lewis DV. (2005). Loosing neurons: Selective vulnerability and mesial temporal sclerosis. Epilepsia 46:39-44.

108. Li T. et al. Adenosine dysfunction in astrogliosis: cause for seizure generation? Neuron Glia Biol.2007; 3, 353–366

109. Lian X, Khan F, Stringer J. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats. J Neurosci. 2007; 27:12007–12011.

110. Likhodii S, et al. Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. Ann. Neurol. 2003; 54:219–226.

111. Lu D, Mahmood A, Goussev A, Schallert T, Qu C, Zhang ZG, et al. Atorvastatin reduction of intravascular thrombosis, increase in cerebral microvascular patency and integrity, and enhancement of spatial learning in rats subjected to traumatic brain injury. J Neurosurg 2004;101(5):813–21.

112. Lucas, S. M., Rothwell, N. J., & Gibson, R. M. (2006). The role of inflammation in

113. Lynch M, Sayin U, Bownds J, Janumpalli S, Sutula T (2000). Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. Eur J Neurosci 12: 2252-2264.

114. Ma W., Berg J. and Yellen G. Ketogenic diet metabolites reduces firing in central neurons by opening K(ATP) channels. J. Neurosci. 2007; 27: 3618–3625.

115. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. Neuroscience 2007; 145: 256–264.

116. Machado LS, Kozak A, Ergul A, Hess DC, Borlongan CV, Fagan SC. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. BMC Neurosci. 2006;7:56

117. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 8:741-752.

118. Majores, M., Schoch, S., Lie, A., & Becker, A. J. (2007). Molecular neuropathology

119. Marcon J, Gagliardi B, Balosso S et al. Age-dependent vascular changes induced by status epilepticus in rat forebrain: implications for epileptogenesis.NeurobiolDis2009; 34:121–32.

120. Maroso M, Balosso S, Ravizza T et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targetedto reduce seizures.NatMed2010;16:413–419.
121. Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Iori, V., Wright, C.I., French, J., Vezzani, A., 2011. Interleukin-1beta biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice. Neurotherapeutics 8, 304e315.
122. Martin, R.C., Kuzniecky, R., Ho, S., Hetherington, H., Pan, J., Sinclair, K., Gilliam, F & Faught, E (1999). Cognitive effects of topiramate, gabapentin, and lamotrigine in healthy young adults. Neurol. 52(2), 321 – 327.
123. Masino S, et al. A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A1 receptors. J. Clin. Investig. 2011; 121:2679–2762.
124. Masino S, Geiger J. Are purines mediators of the anticonvulsant/neuroprotective effects of ketogenic diets? Trends Neurosci. 2008; 31:273–281.
125. Mathern, G.W., Pretorius, J.K. & Babb, T.L. (1995). Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures", Journal of neurosurgery, vol. 82, no. 2, pp. 220-227.
126. Molina-Holgado, E. & Molina-Holgado, F. (2010). Mending the broken brain:
127. Mouihate A, et al. Early life activation of toll-like receptor 4 reprograms neural anti-inflammatory pathways. J. Neurosci., 2010, 30:7975–7983
128. Musa-Veloso K., Likhodii S. S., Rarama E. et al. Breath acetone predicts plasma ketone bodies in children with epilepsy on a ketogenic diet. Nutrition 2006; 22, 1–8.
129. Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. Neuroscience 2004; 129: 905 –13.
130. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH. (2008). The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. Lancet Neurol; 7: 500-6.
131. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. J Neurosci 1997; 17: 171 – 80
132. Nissinen, J. (2006). Characterization of a rate model of human temporal lobe epilepsy, Kuopio University.

133. Noh HS, Lee HP, Kim DW, Kang SS, Cho GJ, Rho JM, Choi WS. A cdna microarray analysis of gene expression profiles in rat hippocampus following a ketogenic diet. Brain Research. Molecular Brain Research. 2004; 129:80–87.

134. Oliveira, M.S., A.F. Furian, L.M. Ramblo, R.M. Ribeiroa and L.F.F. et al. 2008. Modulation of pentilentetrazole-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. Neuroscience, 152: 1110-1118.

135. Koler Z. et al. (2001). Opin Neurol. 4 ;14: 203-210.

136. Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill Jr GF. Brain metabolism during fasting. J Clin Invest 1967; 46: 1589–1595.

137. Parent JM. (2002). The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. Epilepsy Res 50(1-2):179-89.

138. Pelvig, D.P. et al. Neocortical glial cell numbers in human brains. Neurobiol. Aging, 2008; 29, 1754–1762.

139. Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JR, Amado D, Nader HB, Cavalheiro EA, Leite JP, Naffah-Mazzacoratti MG. (2002). Extracellular matrix components are altered in the hippocampus, cortex, and cerebrospinal fluid of patients with mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 43 Suppl 5:159-61.

140. Perucca E, French J, Bialer M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. Lancet Neurol2007; 6:793–804.

141. Peterman M. The ketogenic diet in epilepsy. J. Am. Med. Assoc. 1925; 84:1979–1983

142. Peterman, M.G. Therapy of epilepsy in children. Am. J. Psychiat., 1936, 92, 1433 - 1438.

143. Pfeifer H, Thiele E. Low-glycemic-index treatment: a liberalized ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy. Neurology. 2005; 65:1810–1812.

144. Phillis J, Wu P. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. Prog. Neurobiol. 1981; 16:187–239.

145. Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. LancetNeurol2002; 1:173–81.

146. PitkanenA.Therapeuticapproaches to epileptogenesis – hope on thehorizon.Epilepsia2010; 51(Suppl 3): 2–17.

147. Plata-Salama´n CR, Ilyin SE, Turrin NP, Gayle D, FlynnMC, Romanovitch AE, et al. Kindling modulates the IL-1beta system, TNFalpha, TGF-beta1 and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. Brain Res Mol Brain Res 2000;75:248–58.

148. Polascheck N, Bankstahl M, Löscher W: The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Exp Neurol 2010, 224: 219–233.
149. Randle JC, Harding MW, Ku G, Schonharting M, Kurrle R. ICE/ Caspase-1 inhibitors as novel anti-inflammatory drugs. Expert Opin Investig Drugs 2001;10:1207–1209.
150. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat. Rev. Immunol., 2003; 3:569–581.
151. Ravizza T, Balosso S, Aronica E, Vezzani A. In: Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perpsectives. Rho JM, editor. Ch. 4. Boca Raton: CRC Press; 2010. pp. 45–59.
152. Ravizza T, Balosso S, Vezzani A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. Neurosci Lett. 2011; 497: 223–230.
153. Ravizza T, Boer K, Redeker S et al. The IL-1beta system in epilepsy- associated malformations of cortical development. Neurobiol Dis2006; 24:128–43.
154. Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence fromexperimental models and human temporal lobe epilepsy.NeurobiolDis2008;29:142–60.
155. Ravizza T, Noe F, Zardoni D, Vaghi V, Sifringer M, Vezzani A. InterleukinConvertingEnzyme inhibitionimpairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. NeurobiolDis2008; 31:327–33.
156. Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Veliskova J, Moshe SL, De Simoni MG,Vezzani A (2005). Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. Epilepsia 46 Suppl 5:113-117.
157. Ravizza T,Vezzani A. Status epilepticus induces time-dependent neuronalandastrocytic expressionof interleukin-1 receptor type I intherat limbic system.Neuroscience2006;137:301–8.
158. Rho J, et al. Acetoacetate, acetone, and dibenzylamine (a contaminant in l-(+)-betahydroxybutyrate) exhibit direct anticonvulsant actions in vivo. Epilepsia. 2002; 43:358–361.
159. Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience 2002; 112:101–111.

160. Rigau V, Morin M, Rousset MC et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. Brain2007; 130:1942–56.
161. Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH (2002). Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. Brain Res Dev Brain Res 139:227-236.
162. Rodrigues MC, Rossetti F, Foresti ML, Arisi GM, Furtado MA, Dal-Cól ML, Bertti P, Fernandes A, Santos FL, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of convulsive seizures. Epilepsy Behav. 2005; 6(3): 328-336.
163. Samoilova M, et al. Chronic in vitro ketosis is neuroprotective but not anticonvulsant. J. Neurochem. 2010; 113:826–861.
164. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annual Review of Nutrition. 2005; 25:317–340.
165. Sarkisian, M.R (2001) Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. Epilepsy Behav. 2(3), 201 – 216.
166. Scholl UI, Choi M, Liu T et al. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 5842 – 7.
167. Schwartzkroin PA. Mechanisms underlying the antiepileptic efficacy of the ketogenic diet. Epilepsy Res.1999; 37: 171–180.
168. Seifert, G. et al. (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. Nat. Rev. Neurosci, 2006;. 7, 194–206.
169. Serrano GE, Lelutiu N, Rojas A, Cochi S, Shaw R, Makinson CD, Wang D, FitzGerald GA, Dingledine R. (2011) Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. J Neurosci 31:14850–14860
170. Shapiro LA, Wang L, Ribak CE (2008). Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpineinduced seizures in rats. Epilepsia 49 Suppl 2:33-41.
171. Shlosberg D, BeniflaM, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. NatRevNeurol2010; 6:393–403.
172. Shorvon, S.D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 1909-1958. Epilepsia, 2009, 50(Suppl 3): 69-92.

173. Silakova JM, Hewett JA, Hewett SJ. (2004) Naproxen reduces excitotoxic neurodegeneration in vivo with an extended therapeutic window. J Pharmacol Exp Ther. 309:1060–1066
174. Singh G, Prabhakar S, Modi M. Central nervous system infectionsandepilepsy. Epilepsia2008;49(Suppl 6): 1.
175. Somera-Molina KC, Robin B, Somera CA, Anderson C, Stine C, Koh S, Behanna HA, Van Eldik LJ, Watterson DM, Wainwright MS (2007). Glial activation links early-life seizures and long-term neurologic dysfunction: evidence using a small molecule inhibitor of proinflammatory cytokine upregulation. Epilepsia 48:1785-1800.
176. Sontheimer H. Voltage-dependent ion channels in glial cells. Glia 1994; 11: 156 – 72.
177. Spencer SS. (2002). When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? The Lancet Neurology 1(6):375-82.
178. Stack JH, Beaumont K, Larsen PD, et al. IL-converting enzyme/ caspase-1 inhibitor VX-765 blocks the hypersensitive response to an inflammatory stimulus in monocytes from familial cold autoinflammatory syndrome patients. J Immunol 2005;175: 2630–2634.
179. Stringer J, Xu K. Possible mechanisms for the anticonvulsant activity of fructose-1,6-diphosphate. Epilepsia. 2008; 49(Suppl 8):101–103.
180. Sutula TP, Hagen J, Pitkanen A. (2003). Do epileptic seizures damage the brain? Curr Opin Neurol 16(2):189-95.
181. Suzuki F, Heinrich C, Boehrer A, et al. Glutamate receptor antagonists and benzodiazepine inhibit the progression of granule cell dispersion in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 2005; 46:193–202.
182. Taha AY, Ryan MA, Cunnane SC. Despite transient ketosis, the classic high-fat ketogenic diet induces marked changes in fatty acid metabolism in rats. Metabolism. 2005; 54:1127–1132.
183. Thavendiranathan P, Chow C, Cunnane S, McIntyre Burnham W. The effect of the 'classic' ketogenic diet on animal seizure models. Brain Res. 2003; 959: 206–213
184. Theis M, Giaume C. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. Brain Res 2012; 1487: 88 – 98
185. Theis M, Söhl G, Eiberger J et al. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. Trends Neurosci 2005; 28: 188 – 95.
186. Thio L, et al. Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. Neurology. 2000; 54:325–331.

187. Tian, G-F. et al. An astrocytic basis of epilepsy. Nat. Med, 2005;. 11, 973–981
188. Traa BS, Mulholland JD, Kadam SD, Johnston MV, Comi AM (2008). Gabapentin neuroprotection and seizure suppression in immature mouse brain ischemia. Pediatr Res 64:81-85.
189. Treiman DM. Therapy of status epilepticus in adults and children.Curr
190. Tsutsui S, Schnermann J, Noorbakhsh F, Henry S. et al. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflamma-tion and demyelination in a model of multiple sclerosis. J Neurosci 2004; 24: 1521–1529.
191. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z. Exp Neurol. 1983; 6: 56-67.
192. Uhlemann E. R. and Neims A. H. Anticonvulsant properties of the ketogenic diet in mice. JPET 1972; 180: 231–238.
193. Vamecq J, Vallee L, Lesage F, Gressens P, Stables JP. Antiepileptic popular ketogenic diet: emerging twists in an ancient story. Progress in Neurobiology 2005; 75:1 28.
194. Van Delft R, et al. Blood beta-hydroxybutyrate correlates better with seizure reduction due to ketogenic diet than do ketones in the urine. Seizure. 2010; 19:36–39.
195. Van Noort JM, Bsibsi M. Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. Prog Brain Res 2009; 175: 139 – 48.
196. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. Brain Behav Immun. 2008;22:797–803.
197. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy.Nat Rev Neurol 2011; 7:31–40.
198. Vezzani A, Moneta D, Conti M et al. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression inmice. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97:11534–9.
199. Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG. (2002). Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. Epilepsia 43(Suppl 5):30-5.
200. Vezzani, A. et al. (2011) The role of inflammation in epilepsy. Nat. Rev. Neurol. 7, 31–40
201. Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011b). The role of inflammation in epilepsy. Nat.Rev.Neurol. 7, 31-40.

202. Vezzani A., Conti M., DeLuigi A. et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. J Neurosci1999;19: 5054–65.
203. Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. J Neurosci., 2003; 23:8692–700
204. Wang Q, Zengin A, Deng C, et al. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: the association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. Exper Neurol. 2009; 216: 132-8.
205. Wang X, Lou N, Xu Q et al. Astrocytic Ca2+ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. Nat. Neurosci 2006; 9: 816 – 23.
206. Wang Z. J., Bergqvist C., Hunter J. V., Jin D., Wang D. J., Wehrli S. And Zimmerman R. A. In vivo measurement of brain metabolites using two-dimensional double-quantum MR spectroscopy–exploratio of GABA levels in a ketogenic diet. Magn. Reson. Med. 2003; 49, 615–619.
207. Wang, Y. et al. The development of recurrent seizures after continuous intrahippocampal infusion of methionine sulfoximine in rats: a video-intracranial electroencephalographic study. Exp. Neurol, 2009;. 220, 293–302.
208. Wiebe S et al. (2000). A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. N Engl J Med. , 2: 311-8.
209. Wilder RM. The effect of ketonemia on the course of epilepsy. Mayo Clin Bull 1921; 2:307-8
210. Williamson, L.L., Sholar, P.W., Mistry, R.S., Smith, S.H., Bilbo, S.D., 2011. Microglia and memory: modulation by early-life infection. J. Neurosci. 31, 15511-15521.
211. Williamson, P.D. & Engel, J.J. (1997), "Complex partial seizures" in Epilepsy: a comprehensive textbook, eds. J.J. Engel & T.A. Pedley, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 557.
212. Willis S, Stoll J, Sweetman L, Borges K. Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models. Neurobiol Dis. 2010; 40:565–572.
213. Winyard PG, Blake DR, Evans CH. Free Radicals and Inflammation. 1999 ; 4: 132-140.

214. Xiao Y, Li X. Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. Brain Research 1999; 846:112–121

215. Yan Q, Jobe P, Dailey J. Noradrenergic mechanisms for the anticonvulsant effects of desipramineand yohimbine in genetically epilepsy-prone rats: Studies with microdialysis. Brain Res 1993; 610:24–31.

216. Yang H, Chen C. (2008) Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. Curr Pharm Des. 14:1443–1451

217. Yang T, Zhou D, Stefan H. (2010). Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression? J Neurol Sci. vol. 15, no. 296, pp. 1-6.

218. Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia potentiates damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. Stroke. 2006; 37:1087–93.

219. Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesisY. Brain Behav. Immun. 25, 181-213.

220. Yudkoff M, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I. Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. Epilepsia 2008; 49(Suppl 8):73–75.

221. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Lazarow A, Luhovyy B, Wehrli S, Nissim I. Response of brain amino acid metabolism to ketosis. Neurochem Int 2005; 47:119–128.

222. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. Brain amino acid metabolism and ketosis. J Neurosci Res 2001; 66:272–281.

223. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. Ketogenic diet, amino acid metabolism, and seizure control. J Neurosci Res 2001; 66:931–940.

224. Yudkoff M., Daikhin Y., Nissim I. and Grunstein R. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. J. Neurochem 1997; 69: 682–692.

225. Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. J Neurosci 2003;23(35):11104–11.