

АНТИКОНВУЛСИВНИ И НЕВРОПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ НА РОСУВАСТАТИН В ПИЛОКАРПИН-ИНДУЦИРАН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ЕПИЛЕПСИЯ

Е. Харитов, Е. Ангелеска и Н. Бояджиева

Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София

ANTICONVULSIVE AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ROSUVASTATIN IN PILOCARPINE-INDUCED EXPERIMENTAL MODEL OF EPILEPSY

E. Haritov, E. Angeleska and N. Boyadjieva

Department of Pharmacology and Toxicology, MF, MU – Sofia

Резюме. Епилепсията е хронично неврологично заболяване, засягащо 50 млн. души в световен мащаб. Съвременните антиепилептични лекарства осигуряват контрол на гърчовете при 70% от пациентите. При 30% от болните се установява липса на ефект от лечението. През последните 10 години се появиха научни данни, доказващи ролята на невровъзпалението в хода на епилепсията. Установено бе и че освен холестерол-понижаващ ефект статините притежават невропротективен ефект. Целта на проучването е допълнително анализирани антиконвулсивните ефекти на росувастатина и изясняване на наличието на антиинфламаторни свойства в неонатален пилокарпинов модел на епилепсия. За постигане на тази цел бяха използвани 5 групи неонатални плъхове, с 5 животни в група ($n = 5$): контролна група; пилокарпинова група; росувастатин (10 mg/kg, per os) плюс пилокарпин; росувастатин (20 mg/kg, per os) плюс пилокарпин; росувастатин (40 mg/kg, per os) плюс пилокарпин. Росувастатинът беше прилаган per os със сонда в течение на 7 дни, до деня на прилагане на пилокарпина. Епилептичната активност беше наблюдавана в течение на 3 h след прилагането на пилокарпина. През този период бяха отчитани степените на гърчовете по скалата на Рейсин, както и времето до появата и броя на т.нар. *wet dog shakes*. Пилокарпинът индуцира поява на гърчове след прилагането му. В групите с предварително третиране с росувастатин се установи дозозависимо потискане на епилептичната активност, както и появата и броя на WDS, в сравнение с контролната група животни. Данните, получени в това изследване, показват, че росувастатинът редуцира епилептичната активност, което дава основание за прилагането му като допълнителна терапия при лечението на епилепсията. Механизмът на това действие би могъл да се свърже с установените антиинфламаторни ефекти на статините. Това предположение изисква бъдещи изследвания.

Ключови думи: епилепсия, росувастатин, антиконвулсивни и невропротективни ефекти, експериментален модел

Адрес за кореспонденция: Е. Харитов, Катедра по фармакология и токсикология, МФ, Медицински университет, ул. "Здраве" 2, 1431 София

Summary. Epilepsy is a chronic neurological disorder which affects 50 million people worldwide. The current antiepileptic drugs provide seizure control in 70% of patients. Uncontrolled seizures are found in 30% of adult epilepsy patients. In the last decade emerging evidence supports the role of inflammation in epilepsy. Apart from its cholesterol lowering properties, have been shown that statins exert neuroprotective effect. The objective of our study was to further analyze capacity of rosuvastatin to prevent seizures and to elucidate whether this drug exert anti-inflammatory effect, after neonatal pilocarpine-induced status epilepticus. For these purposes, five groups of rats, of 5 animals each were employed: saline (control), pilocarpine (PILO), pilocarpine plus rosuvastatin (10 mg/kg, per os, for 7 days), pilocarpine plus rosuvastatin (20 mg/kg, per os, for 7 days), pilocarpine plus rosuvastatin (40 mg/kg, per os, for 7 days). Rosuvastatin was administered for 7 days prior to application of pilocarpine. Seizure activity was monitored for 2h. after induction of seizures with pilocarpine. The severity of seizures was evaluated using Racine scale. The onset and number of wet dog shakes (WDS) also was scored. Pilocarpine

induced tonic-clonic seizure after its administration. Rosuvastatin in dose-dependent fashion reduces seizure scores, onset and number of WDS, as compared to that of control group. Conclusion: Our data suggest that rosuvastatin may reduce epileptiform activity and could be used as add-on therapy for epilepsy. The mechanism of this, can be attributed to its anti-inflammatory effects. This assumption needs further investigations.

Key words: epilepsy, rosuvastatin, anticonvulsive and neuroprotective effects, experimental model

Address for correspondence: E. Haritov, Department of Pharmacology and Toxicology, MF, MU, 2 Zdrave St. Bg – 1431 Sofia

ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсията е едно от най-честите неврологични заболявания, засягащо 50 млн. души в световен мащаб [25]. Тя се характеризира с рекурентни спонтанни пароксизмални епизоди на мозъчна дисфункция и голям брой клинични прояви. Въпреки наличието на повече от 20 медикамента за лечение на епилепсия, 30% от пациентите са с неадекватен контрол над гърчовете. При част от тези пациенти се развиват както когнитивен дефицит, така и съпътстващи невропсихиатрични заболявания. Явна е необходимостта от разработване на нови стратегии за лечение на заболяването, които да имат ефекти не само върху гърчовата активност, но и върху клиничния ход на епилепсията.

Клинични и експериментални данни дават неоспорими доказателства, че мозъчното възпаление в резултат на епилептичната активност е ключов фактор в процеса на епилептогенезата. В експериментални модели на епилепсия с фармакологични средства или електростимулация на хипокампуса се установяват белези за активация на микроглията и астроцитите, както и повишена експресия и нива на проинфламаторни цитокини, TNF-alpha и IL-1-beta [21]. Участието на цитокините в патогенезата на епилепсията се подкрепя и от установените повишени нива на mRNA за проинфламаторни цитокини в мозъчната кора при гризачи [24]. Макар че е доказана връзката на невровъзпалението с появата на невронална апоптоза, глиална пролиферация и гърчове, ролята на мозъчното възпаление в патогенезата на епилепсията не е напълно изяснена.

Експерименталните модели на гърчове и епилепсия са от важно значение за разкриване на базовите механизми, лежащи в основата на епилепсията, и за разработване на нови терапевтични стратегии [23]. Един от най-рано и често използваните модели за предизвикване на експериментални гърчове е системното прилагане на пилокарпин при гризачи. Пилокарпинът е холинергичен агонист, при чието прилагане предизвиканата епилептична активност наподобява до голяма степен

status epilepticus и комплексните парциални гърчове при човек [12].

Статините са 3-хидрокси-3-метилглутарил коензим А (HMG-CoA) редуктазни инхибитори. Тези ензими катализират превръщането на HMG-CoA в L-mevalonate. В резултат на това се инхибират важни биологични процеси в клетката [26]. Тяхната роля в понижаването на серумния холестерол и превенцията на сърдечно-съдови заболявания е добре известна. В последните години нараства интересът към употребата им за лечение на невродегенеративни заболявания, като болест на Алцхаймер, инсулт, мултипла склероза. Интригуващи са фармакоепидемиологични изследвания, показващи, че прилагането на статини намалява риска от хоспитализация при епилепсия [11]. Все повече научни факти показват наличие на противовъзпалителни свойства на статините. Това дава възможност те да бъдат използвани при лечение на заболявания като епилепсията, при които се предполага, че невровъзпалението е важен фактор в патогенезата.

Предвид изложените факти, целта на изследването бе да се проучат ефектите на различни дози росувастатин върху степени на епилептогенна активност в пилокарпинов модел на епилепсия при плъхове.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Фармакологични средства

1) Росувастатин (КРКА, Словения) – прилаган в дози от 10, 20, 40 mg/kg, per os със сонда, разтворен в нормален 0,9% физиологичен разтвор.

2) Пилокарпинов хидрохлорид (Alcon, България) – 2% 10 ml – прилаган в доза 400 mg/kg, i.p.

Животни

Използвани бяха 25 мъжки полове зрели плъха, порода Wistar, получени от Централния вивариум. Първоначално животните бяха разделени в групи по 4 в клетки, за аклиматизация за една седмица при стандартни лабораторни условия и с достъп до

храна и вода ad libitum. Преди експеримента животните бяха разделени чрез случаен подбор в 5 групи по 5 в група (n = 5).

Индукцията на гърчовете беше осъществена между 9:00 и 12:00 h с цел намаляване влиянието на циркадния ритъм върху гърчовата чувствителност.

Експериментален дизайн

За провеждане на експеримента животните бяха разделени чрез случаен подбор в 5 групи по 5 в група (n = 5) и третирани, както следва:

– **Група 1 (контролна):** Животните бяха третирани за период от 7 дни с 0,9% физиологичен разтвор, i.p.-контролна група.

– **Група 2 (контролна):** Животните бяха третирани i.p. с разтвор на пилокарпин 2% 10 ml – 400 mg/kg.

– **Група 3 (опитна):** Животните бяха третирани за период от 7 дни per os със сонда с росувастатин в доза 10 mg/kg. На 7-ия ден беше приложен пилокарпин i.p. 2% 10 ml – 400 mg/kg.

– **Група 4 (опитна):** Животните бяха третирани за период от 7 дни per os със сонда с росувастатин в доза 20 mg/kg. На 7-ия ден беше приложен пилокарпин, i.p., 2% 10 ml – 400 mg/kg.

– **Група 5 (опитна):** Животните бяха третирани за период от 7 дни per os със сонда с росувастатин в доза 40 mg/kg. На 7-ия ден беше приложен пилокарпин i.p., 2% 10 ml – 400 mg/kg.

Метод за оценка степента и тежестта на епилептична активност – скала на Рейсин и wet dog shakes (WDS)

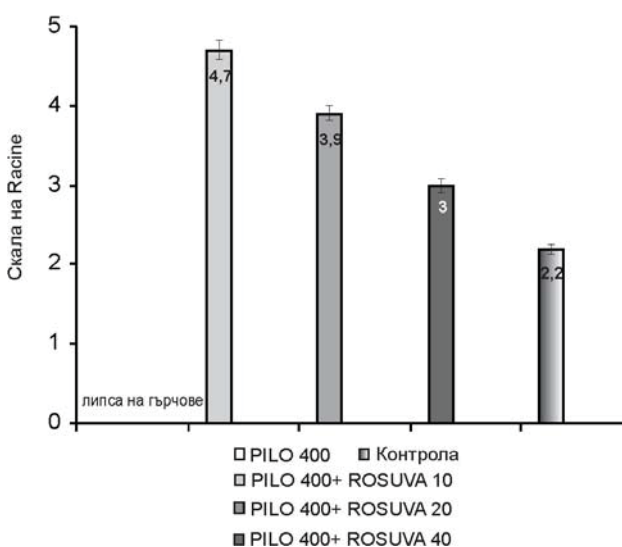
Веднага след инжектирането на пилокарпина животните бяха поставени в плексигласови клетки и наблюдавани 3 h за оценка на гърчовете. По време на този период конвулсивната активност бе отчитана по скалата на Рейсин: 0 – неподвижност, настръхване на козината, възбуда и ускорено дишане; 1 – орофациални движения и саливация; 2 – клонус на главата и очите; 3 – клонус на торса и WDS; 4 – бързи изправяния на задните лапи; 5 – изправяния със загуба на равновесие и падания, съпроводени с неконтролирани подскоци.

Отчетени бяха също началото на появата и броят на WDS за период от 2 h след прилагането на пилокарпин. WDS са характерен белег на гърчовете при експериментални модели на епилепсия.

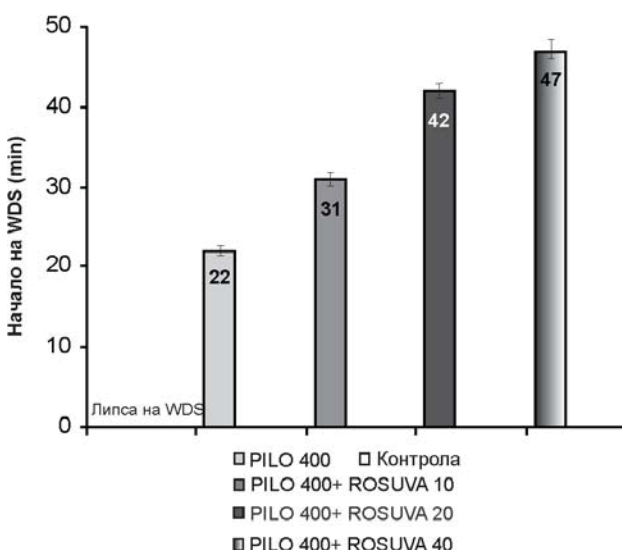
За всеки показател бяха определени средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка (\pm SEM). Сравняването на резултатите между групите беше извършено с помощта one-way analysis of variance. Бяха приложени post hoc тест и Student-Newman-Keuls тест. Стойностите на P < 0,05 се разглеждат като сигнификантни.

РЕЗУЛТАТИ

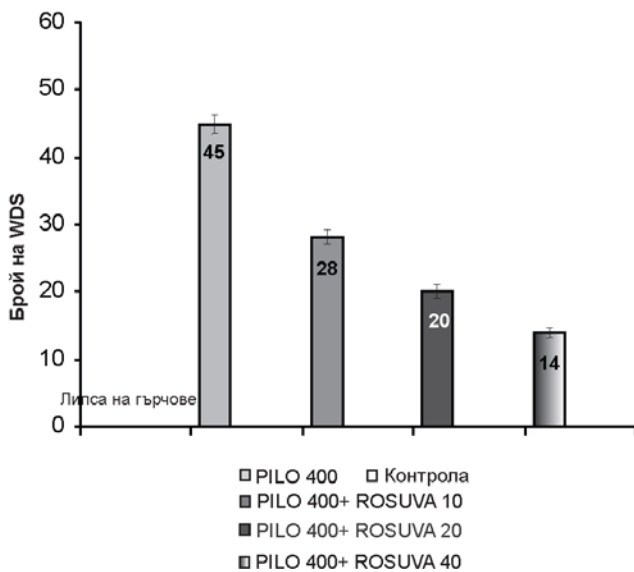
Данните от проучването показват сигнификантно повишение на епилептичната активност при всички животни в групата със самостоятелно прилагане на пилокарпин, оценявано по скалата на Рейсин (III-IV степен) и началото и броя на WDS. Животните показаха билатерален клонус на торса (III степен) със или без изправяния на задните лапи (IV степен), както и загуба на постурален контрол (V степен).



Фиг. 1. Ефекти на покачващи се дози росувастатин върху степените на епилептична активност. Резултатите са средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка (\pm SEM). Всяка група се състои от 5 животни (n = 5)



Фиг. 2. Ефекти на покачващи се дози росувастатин върху началото на поява на WDS. Резултатите са средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка (\pm SEM). Всяка група се състои от 5 животни (n = 5)



Фиг. 3. Ефекти на покачващи се дози росувастатин върху броя на поява на WDS. Резултатите са средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка (\pm SEM). Всяка група се състои от 5 животни ($n = 5$)

В групите на животните с последователно прилагане на покачващи се дози росувастатин плюс

пилокарпин данните показват различно по сила потискане на епилептичната активност по скалата на Рейсин (фиг. 1). Статистически значими са промените между групата, третирана с росувастатин и контролната група ($P < 0.001$). Те са в зависимост от прилаганата доза росувастатин в 7-дневния период преди индукцията на гърчовете с пилокарпин. Сравнени са ефектите на различните дози на росувастатин върху гърчовата активност. Освен това са отчетени началото на поява на WDS (фиг. 2), както и броят на WDS (фиг. 3). И при тези изследвания бяха определени статистически значими промени между групите, третирани с росувастатин и контролните животни. Бяха намерени и статистически значими промени и с групата, третирана само с пилокарпин ($P < 0.05$). Данните показаха отново сигнификантно намаление в тези два параметъра, в корелация с нарастващата доза на росувастатин. Освен горните показатели на епилептогенната активност бяха отчетени и още няколко параметъра на гърчова активност при отделните групи опитни животни (табл. 1). Отново се отчете сигнификантно понижаване на изброените показатели спрямо групата, третирана само с пилокарпин (PILO 400).

Таблица 1. Ефект на предварително третиране с росувастатин върху латентността и леталитета на пилокарпин-индуцирани гърчове при плъхове

Групи	Параметри	Време до поява на гърч (min)	Процент на животни с гърчове	Процент на преживяемост	Брой животни/група
PILO 400		35.00 \pm 0.70	90%	30%	5
PILO 400 + ROSUVA 10		78.00 \pm 0.80	70%	75%	5
PILO 400 + ROSUVA 20		95.00 \pm 1.10	45%	50%	5
PILO 400 + ROSUVA 40		122.00 \pm 1.03	30%	90%	5

ОБСЪЖДАНЕ

Механизмите на антиконвулсивно действие на конвенционалните и нововъведените антиепилептични средства се различават в голяма степен. Основни таргети са йонните канали, ГАМК, глутаматния метаболитизъм [22]. През последните години се провеждат проучвания с нови лекарства и субстанции, които чрез своя невропротективен ефект могат да оказват антиконвулсивен ефект. В настоящото изследване се оценяват антиепилептичните ефекти на един от представителите на статините – росувастатин.

Статините са конкуритивни инхибитори на HMG-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 [26, 29]. Установява се, че статините имат NMDA-антагонистични ефекти, което би могло да обясни антиепилептичните и невропротективните им свойства [27].

Нашите проучвания показаха потискане на гърчовете при плъхове, обект на пилокарпинов модел на епилепсия след предварително третиране с покачващи се дози росувастатин. Пилокарпин-индуцираният status epilepticus [13, 17, 28] води до мозъчна увреда и развитие на епилепсия при опитните животни. Този модел е утвърден за изследване на епилептогенезата. Интраперитонеалното инжектиране на пилокарпин довежда до сигнификантно увеличение на броя на животните с тонико-клонични гърчове, както и значително увеличение на смъртността им. Тези данни съвпадат с данните на Jore и сътр. [2], които доказват, че пилокарпин в доза 400 mg/kg, интраперитонеално води до status epilepticus при 83% от животните. Cui и сътр. [3] доказват, че с покачване на дозата на пилокарпин от 350-400 mg/kg се покачва и смъртността при животните.

Антиконвулсивните ефекти на статините в нашето изследване биха могли да бъдат дискутирани в няколко направления. Доказано е, че тези лекарства активират различни невропротективни сигнални пътища. В изследвания на Zasso и сътр. [8] се ус-

тановява, че статините превръщат миши първични кортикални неврони в по-резистентни на възбудни стимули по холестерол-зависим механизъм. Тези ефекти на статините се свързват със способността им да блокират HMG-CoA редуктазата [15], което се подкрепя и от факта, че този ефект на статините се премахва след прибавяне на мевалонат и холестерол към клетъчните култури [8]. От друга страна, *in vivo* експерименти демонстрират, че лечението със статини усилва неврогенезата и синаптогенезата, без да променя серумните нива на холестерола, след мозъчна травма [16, 19, 20, 22].

Друга хипотеза, обясняваща антиконвулсивните ефекти на росувастин в това изследване, би могла да се свърже с антиинфламаторните ефекти на статините. Предполага се, че тези ефекти са определящ фактор за невропротективните и свързаните с тях антиконвулсивни ефекти на статините. В поредица изследвания [2, 15, 20] се установява, че статините инхибират инфламаторните клетъчни каскади и генната експресия на проинфламаторни цитокини чрез инхибиция на изопренилацията на малки GTP-ази (Ras и Rhoa). Подобни инхибиторни ефекти на статините върху продукцията на проинфламаторни цитокини се установяват и при експериментален каинатен модел на епилепсия. Епилепсията при човека е свързана с рекурентни гърчове и невровъзпаление [13, 17, 23, 28]. Тъй като този вид хронично възпаление в ЦНС се свързва и с прогресивна невродегенерация [1], ще бъде интересно дали прилагането на статини би имало терапевтичен ефект, ако се приемат в периода след появата на първите гърчове в живота. Необходими са бъдещи проучвания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данните, представени в изследването, показват по недвусмислен начин, че прилагани в оптимални дози статините проявяват антиконвулсивни ефекти и разкриват терапевтични таргети за разработване на нови антиепилептични лекарства. Предмет на бъдещи проучвания е изясняването на механизма на антиепилептичните ефекти на статините.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Acharya MM, Hattiangady B, Shetty AK. Progress in Neuroprotective Strategies for Preventing Epilepsy. *Prog Neurobiol*; 2008 84, (4): 363-404.
2. Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *Faseb J* 1992;6:3338-3344.
3. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375-403.
4. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000;23:580-587.
5. Bittigau P, Ikonomidou C. Glutamate in neurologic diseases. *J Child Neurol* 1997;12:471-485.
6. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* 1995;16:33-37.
7. Chen C, Mireles RJ, Campbell SD et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCG2, and OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 2005;33(4):537-46.
8. Chen J, Zhang ZG, Li Y et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 2003;53(6):743-51.
9. Curia G, Longo D, Biagini G et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*; 2008 172(2-4): 143-157.
10. Diaz-Villoslada P, Oksenberg JR. Chronic inflammatory diseases of the nervous system. *Curr Opin Neurol* 1998;11:235-240.
11. Etmnan M, Samii A, Brophy JM. Statin use and risk of epilepsy: a nested case-control study. *Neurology* 2010;75:1496-1500.
12. Ginsberg HN. Effects of statins on triglyceride metabolism. *Am J Cardiol* 1998;81(4A):32B-5B.
13. Järvelä JT, Lopez-Picon FR, Plysjuk A et al. Temporal profiles of age-dependent changes in cytokine mRNA expression and glial cell activation after status epilepticus in postnatal rat hippocampus. *J Neuroinflamm*; 2011;8: 29.
14. Jope RS, Morrisett RA, Snead OC. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol*; 1986;91: 471-480.
15. Lu D, Mahmood A, Goussev A 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.
16. Lu D, Qu C, Goussev A et al. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24(7):1132-46.
17. Marchi N, Fan Q, Ghosh C et al. Antagonism of Peripheral Inflammation Reduces the Severity of Status Epilepticus. *Neurobiol Dis*; 2009;33(2): 171-181.
18. McTaggart F, Buckett L, Davidson R et al. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol* 2001;87(5A):28B-32B.
19. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 1997;100:2671-2679.
20. Pannu R, Christie DK, Barbosa E et al. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem* 2007;101:182-200.
21. Pedroni SM, Gonzalez JM, Wade J, et al. Complement inhibition and statins prevent fetal brain cortical abnormalities in a mouse model of preterm birth. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(1): 107-15.
22. Prasad R, Giri S, Nath N et al. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *J Neurochem* 2005;94:204-214.
23. Reddy DS, Kuruba R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci*; 2013;14(9): 18284-18318.
24. Rodríguez-Yáñez M, Agulla J, Rodríguez-González R, et al. Statins and stroke. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008; 2(3): 157-66.
25. Strine TW, Kobau R, Chapman DP et al. Psychological distress, comorbidities, and health behaviors among U. S. adults with seizures: results from the 2002 National Health Interview Survey. *Epilepsia* 2005 46: 1133-1139.
26. Treiman DM. Therapy of status epilepticus in adults and children. *Curr Opin Neurol*. 2001;14:203-210.
27. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, elect roencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983;9:315-335.
28. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*; 2011 7: 31-40.
29. 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.
30. Zacco A, Togo J, Spence K et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 2003;23(35):11104-11.