

ЕЛЕКТРИЧНІ ПОДРАЗНЕННЯ КОРИ МОЗОЧКА ВИКЛИКАЮТЬ БІЛЬШ ВИРАЗНИЙ ПРОТИСУДОМНИЙ ЕФЕКТ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ТИРОЗИНКІНАЗИ

Одеський національний медичний університет

Встановлено роль тирозинкінази у формуванні електро-стимуляційного кіндлінгу [9; 12]. Застосування інгібіторів тирозинкінази типу В запобігає формуванню кіндлінгового епілептичного синдрому [1; 4]. Тим же часом, активація тирозинкінази В однократним введенням нейтрофічного фактора мозку (BDNF) має своїм наслідком посилення судомних проявів, а хронічне застосування BDNF супроводжується протисудомною дією [12]. Так, у дослідженні [5] постійний характер підвищення вмісту BDNF досягався шляхом генетичної модифікації клітин та їх трансплантації в зону епілептогенезу. Встановлено значне пригнічення каїнат-провокованих умов при застосуванні BDNF, що спостерігалось на 7-му добу використання епілептогену. Застосування інгібіторів тирозинкінази В визнається перспективним підходом щодо лікування резистентних форм епілепсії [9; 12].

З другого боку, стимуляційні впливи факторами фізичної природи, які мають своїм наслідком розвиток протиепілептичного ефекту, викликають активацію BDNF-тирозинкіназного сигнального шляху [3; 10; 11]. До останнього часу не вивчали ефективність застосування електричних стимуляцій (ЕС) структур мозку за умови застосування інгібіторів тирозинкінази В.

Мета дослідження — вивчення впливу ЕС старої кори мозочка на судомну активність, викликану у щурів з пентилентетразол (ПТЗ)-індукованим кіндлінгом на тлі застосування інгібітора тирозинкінази В акситинібу [8].

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведене на 60 щурах лінії Вістар масою 250–300 г, яких утримували за умов віварію Одеського національного медичного університету при 12-годинній зміні світла та темряви, постійній температурі 23 °С. Усі дослідження було виконано відповідно до вимог GLP і комісії з біоетики ОНМедУ (протокол від 10 жовтня 2008 р. № 84).

Хірургічні втручання — імплантацію електродів — виконували під анестезією, яку здійснювали введенням кетаміну (100,0 мг/кг, в/очер, «Фармак», Україна). При цьому біполярні стимульовальні ніхромові електроди діаметром 0,15 мм та міжелектродною відстанню 0,25–0,30 мм розміщували в старій корі мозочка за координатами: AP=-14,0 від брегми або -5,5 від лямбди; H=2,0; L=0,1 [7]. Реєструвальні електроди імплантували у вентральні відділи гіпокампа (AP=-4,3; L=4,5; H=8,0), а також фронтальну кору (AP=1,7; L=2,0; H=1,0) обох гемісфер за координатами атласу. Індиферент-

ний електрод закріплювали в носових кістках. Електроди фіксували до поверхні черепа за допомогою швидкотверднучої стоматологічної пластмаси типу «Норакрил». Після 10–14 післяопераційних днів щурів використовували в спостереженні — відтворенні кіндлінгу та вивченні ефектів лікувальних чинників.

Кіндлінг моделювали шляхом щодобових однократних введень ПТЗ (30,0 мг/кг, в/очер, Sigma-Aldrich, США) протягом 21 доби [2; 6]. Тварин спостерігали протягом 30 хв з моменту застосування епілептогену. Виразність судом оцінювали за тривалістю латентного періоду виникнення перших судом, а також за шестибальною шкалою тяжкості судом [2; 6]. До спостереження включали тварин, які демонстрували виникнення генералізованих клоніко-тонічних судом у відповідь на три останні введення ПТЗ.

Експериментальних тварин розподілили на такі групи:

— кіндлінгові щури хибно-стимульовані та з пероральним введенням фізіологічного розчину NaCl протягом 10 днів з моменту останнього кіндлінгового застосування ПТЗ — 10 тварин (група контролю);

— група із застосуванням електричних подразнень (ЕП) — 5 сеансів (8 щурів) і 20 сеансів (8 щурів);

— група із введеннями акситинібу — 5,0 мг/кг (9 щурів) та

10,0 мг/кг (8 щурів) протягом 10 діб;

— група із введенням акситинібу (5,0 мг/кг) та ЕП (5 сеансів) — 9 щурів;

— група із введенням акситинібу (10,0 мг/кг) та ЕП (5 сеансів) — 8 щурів.

Акситиніб (“Sigma Aldrich”, США) застосовували дозами 5,0 та 10,0 мг/кг, перорально щодоби протягом 10 діб, починаючи через 24 год з моменту завершення формування кіндлінгу. Через 60 хв після 10-го застосування акситинібу вводили тестову дозу ПТЗ (“Sigma Aldrich”, США). Групі контролю (хибнооперовані щури) за аналогічних умов вводили 0,9 % фізіологічний розчин NaCl.

Електричні подразнення здійснювали за допомогою електростимулятора універсального ЕСУ-2 частотою 100 Гц, тривалістю імпульсу 0,25 мс та силою електричного струму 50–100 мкА. Тривалість окремого сеансу ЕП становила 4,5–5,0 с. При цьому інтенсивність ЕП бу-

ла на 20 % меншою від такої, яка викликала поведінкові реакції у щурів. Здійснювали ЕП кожні 3,5–4,0 хв і через 15 хв після останньої ЕП вводили тестову дозу ПТЗ. Місцеположення електродів контролювали гістологічно після евтаназії, яку здійснювали шляхом введення надмірної дози (100,0 мг/кг, в/очер) нембуталу. В усіх випадках йшлося про їх розташування в межах VI часточки кори мозочка.

Електричну активність структур мозку реєстрували за допомогою комп’ютерного електроенцефалографа “DX-5000” (Харків, Україна) при частоті опитування 256 Гц і записували на жорсткий диск для подальшої обробки.

Статистичний аналіз здійснювали із застосуванням методу ANOVA та тесту Newman–Keuls для оцінки латентного періоду виникнення судом. Тяжкість судом оцінювали за допомогою критерію U Mann–Withney. Для оцінки кількості тварин із судомними нападами використо-

ували критерій з порівняння двох пропорцій.

Результати дослідження та їх обговорення

Отримані результати засвідчили, що на тлі застосування акситинібу дозою 10,0 мг/кг латентний період перших судом перевищував відповідний показник у групі контролю на 28,2 % ($p < 0,05$), а на тлі застосування акситинібу меншою дозою подібне перевищення становило 14,1 % ($p > 0,05$). Латентний період перших судом на тлі попередніх 5 та 20 сеансів ЕП мозочка зростав на 5,4 та 20,0 % ($p > 0,05$). При поєднаному застосуванні акситинібу (5,0 мг/кг) та ЕП (5 сеансів) тривалість латентного періоду судом була на 35,0 % більшою, ніж у щурів групи контролю ($p < 0,05$), а також перевищувала відповідні показники в групах із застосуванням акситинібу (5,0 мг/кг) на 24,3 % ($p < 0,05$) та ЕП (5 сеансів) на 31,3 % ($p < 0,05$; рис. 1, а).

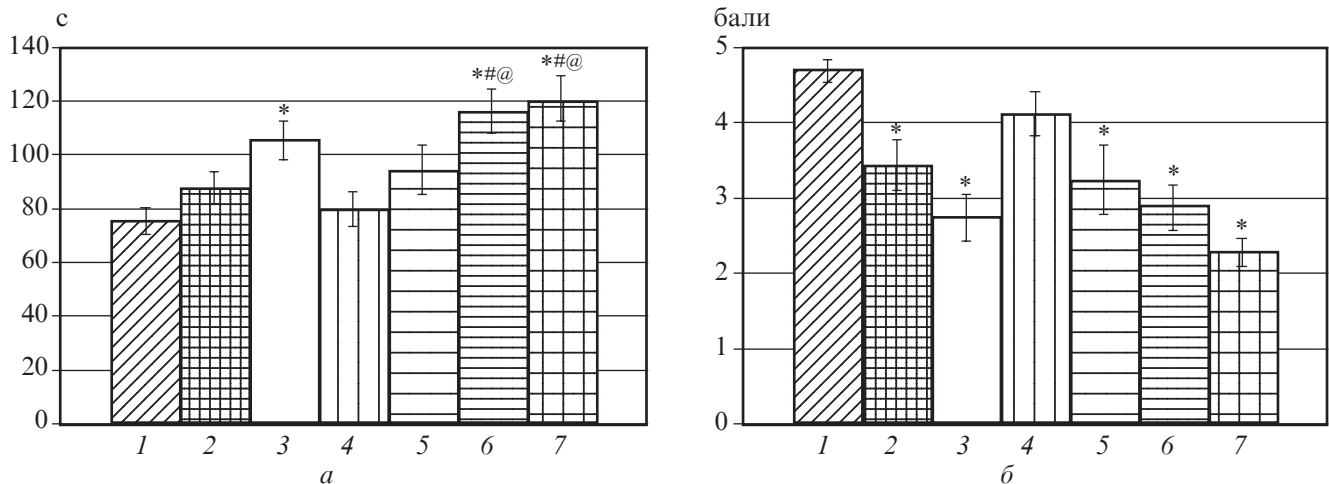


Рис. 1. Вплив акситинібу та електричного подразнення мозочка на показники латентного періоду (а) та тяжкість (б) кіндлінгових судом, викликаних введеннями пентилентетразолу щурам: за віссю абсцис — групи спостереження (1 — контроль; 2 — АКБ (5,0 мг/кг); 3 — АКБ (10,0 мг/кг); 4 — 5 ЕП; 5 — 20 ЕП; 6 — АКБ (5,0 мг/кг) + 5 ЕП; 7 — АКБ (10,0 мг/кг) + 5 ЕП); за віссю ординат — досліджувані показники; АКБ — акситиніб; ЕП — електричне подразнення; * — $p < 0,05$ порівняно до показника в групі контролю; # — $p < 0,05$ порівняно до показника в групі щурів із застосуванням акситинібу дозою 5,0 мг/кг; @ — $p < 0,05$ порівняно до показника в групі щурів із п’ятьма послідовними сеансами ЕП (для оцінки ЛП застосовано метод ANOVA та тест Newman–Keuls; для оцінки тяжкості судом — тест Kruskal–Wallis).

Тяжкість кіндлінгових судом на тлі застосування акситинібу в обох досліджуваних дозах (5,0 та 10,0 мг/кг) зменшувалася, порівняно до показника в групі контролю, на 26,8 та 41,5 % відповідно ($p < 0,05$). При цьому в групі із застосуванням препарату дозою 5,0 мг/кг генералізовані судомні напади спостерігались у 5 із 9 щурів, тимчасом як у контролі вони реєструвались у всіх 10 щурів ($p = 0,067$), а при застосуванні більш високої дози акситинібу подібні судомні реєструвались у 2 із 8 щурів ($p = 0,004$). На тлі ЕП мозочка тяжкість судом зменшувалась — при 5 сеансах на 12,1 % ($p > 0,05$), а при 20 — на 30,9 % ($p < 0,05$) порівняно до групи контролю. При цьому здійснення 5 сеансів ЕП запобігало генералізованим клоніко-тонічним судомним нападом у 2 із 8 щурів ($p > 0,05$), а при 20 сеансах ЕП-напади запобігались у 5 із 8 щурів ($p = 0,016$; рис. 1, б).

Тяжкість ПТЗ-провокованих судом за умов поєднаного застосування 5 сеансів ЕП та акситинібу (5,0 мг/кг) була меншою, ніж у контролі, на 38,7 % ($p < 0,05$), а при застосуванні акситинібу дозою 10,0 мг/кг — на 51,3 % ($p < 0,05$; див. рис. 1, б). При цьому генералізовані клоніко-тонічні напади реєструвались у 2 із 8 щурів ($p = 0,004$) у групі із застосуванням меншої дози акситинібу та були відсутніми у щурів при використанні більшої дози препарату ($p < 0,001$).

Дослідження електрографічних характеристик ПТЗ-викликаних кіндлінгових судом засвідчило, що в контролі застосування тестової дози ПТЗ (30,0 мг/кг, в/очер) супроводжувалося виникненням генералізованих клоніко-тонічних судомних нападів, протягом яких у структурах мозку реєструвались іктальні

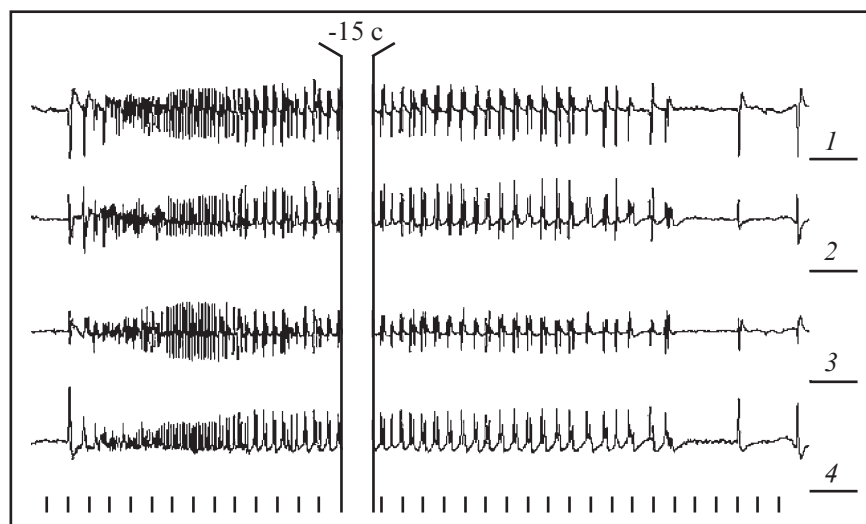


Рис. 2. Прояви судомної активності, провокованої застосуванням пентилентетразолу (30,0 мг/кг, в/очер) у кіндлінгового щура (10 діб з моменту завершення кіндлінгу та 7,5 хв з моменту застосування тестової дози). На рис. 2–4: 1, 3 — фронтальні відділи кори головного мозку відповідно лівої та правої півкуль; 2, 4 — вентральний гіпокамп відповідно лівої та правої півкуль мозку. Калібрування – відстань між горизонтальними рисками справа — 2050 мкВ; вертикальні штрихи внизу рисунка — 1 с

епілептичні розряди тривалістю від 18 до 65 с та амплітудою окремих потенціалів від 0,5 до 1,8 мВ (рис. 2).

Введення тестової дози ПТЗ щурам, яким протягом 10 діб застосовували акситиніб (10,0 мг/кг), викликало появу синхронізованих іктальних потенціалів тривалістю від 10 до 27 с і амплітудою окремих потенціалів від 0,3 до 1,5 мВ (рис. 3). У період формування подібних розрядів реєструвались клоніч-

ні судомні м'язів тулуба та передніх кінцівок у 5 із 8 щурів (див. рис. 3).

У щурів із застосуванням акситинібу (10,0 мг/кг) після 5 ЕП кори мозочка, які не були ефективними щодо запобігання судомам, у відповідь на застосування тестової дози ПТЗ (30,0 мг/кг, в/очер) виникали спайкові потенціали амплітудою від 0,2 до 2,0 мВ, які мали частоту генерування 5–15 за хвилину та формували періоди

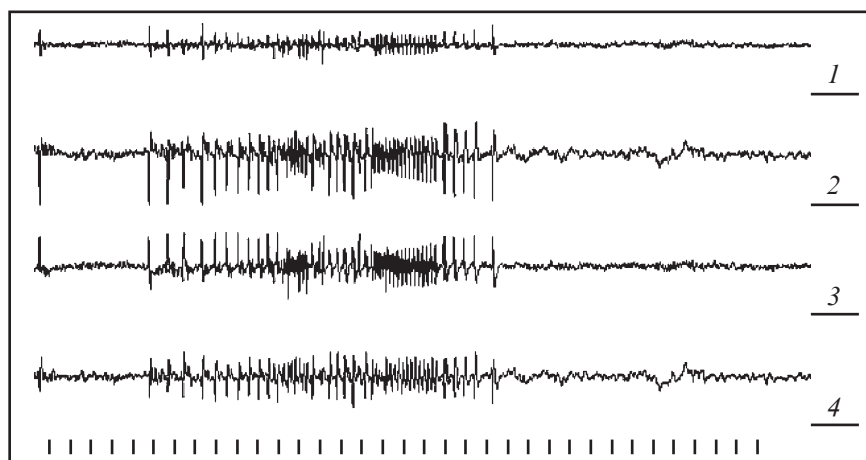


Рис. 3. Електрографічні прояви у кіндлінгових щурів у відповідь на тестове застосування пентилентетразолу дозою 30,0 мг/кг на тлі попередніх введеннь акситинібу 10,0 мг/кг, перорально, протягом 10 діб

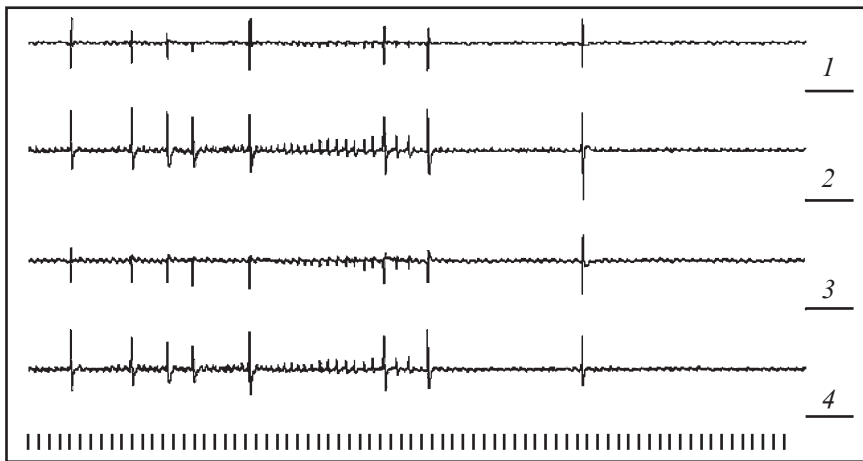


Рис. 4. Прояви ПТЗ-провокованої судомної активності у щурів із застосуванням акситинібу та електростимуляції кори мозочка

більш високої частоти до 45 за хвилину (рис. 4). У період розвитку подібної активності у щурів реєструвалися поведінкові клонічні судоми м'язів тулуба і кінцівок.

Таким чином, отримані результати засвідчили, що ЕП кори мозочка кількістю 20 сеансів ефективно запобігає виникненню генералізованих клоніко-тонічних судомних нападів, провокованих введенням ПТЗ щурам зі сформованим кіндлінг-синдромом. Виразний протекторний вплив також викликало застосування акситинібу у вищій із досліджуваних доз (10,0 мг/кг, перорально). Вказані ефекти збігаються з раніше наведеними результатами досліджень [1; 4; 6]. Новим та принципово важливим фактом є встановлене в нашому дослідженні взаємне посилення протисудомного впливу акситинібу та ЕП палеоцеребелярної кори, які застосовувались в неефективних дозах та режимі відповідно, що виявлялось у вигляді подовження латентного періоду перших судом, усунення генералізованих клоніко-тонічних нападів та іктальних електрографічних розрядів.

Вказане взаємне посилення можна розглядати з позицій вивільнення BDNF як гумораль-

ного посередника протисудомних впливів структур мозочка. Причому в нашому дослідженні йшлося про тимчасові подразнення, які повинні викликати відповідно тимчасове зростання вмісту BDNF у структурах мозку, що, згідно з результатами [5], має полегшити генерування епілептичної активності. Однак, зважаючи на гальмування активності тирозинкінази B, викликане акситинібом, подібний підйом BDNF міг би індукувати інші, не пов'язані з активацією сигнального шляху BDNF/TrkB впливи. Можливо також, що на тлі усунення BDNF-індукованого полегшення епілептичної активності реалізуються інші, наприклад, ГАМК- або норепінефрин-залежні механізми реалізації протисудомної дії ЕП палеоцеребелярної кори.

Висновки

1. Кіндлінгова епілептична активність, викликана за допомогою повторних введень ПТЗ підпороговою дозою (30,0 мг/кг, в/очер), пригнічується на тлі десятидобового застосування акситинібу — інгібітора тирозинкінази B.

2. Поєднане введення неефективних при самостійному застосуванні акситинібу (5,0 мг/кг) та

електричних подразнень VI часточки палеоцеребелярної кори (100 Гц, 5 сеансів ЕП) запобігло виникненню поведінкових та електрографічних кіндлінгових судом, викликаних тестовим застосуванням ПТЗ (30,0 мг/кг, в/очер).

Ключові слова: кіндлінг, пентилентетразол, тирозинкіназа, електричні стимуляції, мозочок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Годлевский Л. С., Коболев Е. В., Мустаца В. Ф., Дроздова Г. А. Моделирование и механизмы подавления экспериментального эпилептического синдрома. Одесса, 2010. 352 с.
2. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Брусенцов А. И. Киндлинг как модель эпилептической активности. Одесса, 1999. 270 с.
3. Activated brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in rat dorsal and ventral hippocampi following 10-day electroconvulsive seizure treatment / Sh. Enomoto et al. *Neurosci. Lett.* 2017. Vol. 660. P. 45–50.
4. Chubach V. S., Muratova T. N., Myronenko S. I., Godlevsky L. S. Antiepileptic effects of axitinib on pentylentetrazol — induced kindling in rats. 31st International Epilepsy Congress, Istanbul, Turkey, 5th–9th Sept., 2015. *Epilepsia*. Vol. 56 (Suppl. 1). P. 3–262. doi: 10.1111/epi.13241.
5. BDNF-secreting capsule exerts neuroprotective effects on epilepsy model of rats / S. Kuramoto et al. *Brain Res.* 2011. Vol. 1368. P. 281–289.
6. Anxiolytic and antidepressive effects of electric stimulation of the paleocerebellar cortex in pentylentetrazol kindled rats / L. S. Godlevsky et al. *Acta Neurobiologiae Experimental.* 2014. Vol. 74. P. 456–464.
7. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Sydney: Academic Press Inc., 1998.
8. Scagliotti G., Govindan R. Targeting angiogenesis with multitargeted tyrosine kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 2010. Vol. 15. P. 436–446.
9. Selective inhibition of kindling development by intraventricular administration of TrkB receptor body / D. K. Bender et al. *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. P. 1424–1436.
10. Shih H. C., Kuan Y. H., Shyu B. C. Targeting brain-derived neurotrophic factor in the medial thalamus for the

treatment of central poststroke pain in a rodent model. *Pain*. 2017 Jul. Vol. 158 (7). P. 1302–1313.

11. Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation Employs *trkB* Signaling for Neuroprotection and Functional Restoration / D. L. Fischer et al. *The Journal*

of Neuroscience. 2017. Vol. 37, N 28. P. 6786–6796.

12. Xu B., Michalski B., Racine R. J., Fahnestock M. The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, *Trk* expression and seizure-related morpho-

logical changes. *Neuroscience*. 2004. Vol. 126, № 2. P. 521–531.

Надійшла до редакції 03.04.2018

Рецензент д-р мед. наук,
проф. Р. С. Вастьянов,
дата рецензії 05.04.2018

УДК 616.853-053.2-085.213

М. П. Первак

ЕЛЕКТРИЧНІ ПОДРАЗНЕННЯ КОРИ МОЗОЧКА ВИКЛИКАЮТЬ БІЛЬШ ВИРАЗНИЙ ПРОТИСУДОМНИЙ ЕФЕКТ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ТИРОЗИНКИНАЗИ

Активність тирозинкінази *B* забезпечує формування пентилентетразол (ПТЗ)-індукованого кіндлінгу, а також реалізацію впливу BDNF на судомну активність. Застосування BDNF може викликати як активацію, так і пригнічення судом, а його рівень змінюється при електричних подразненнях (ЕП) мозку.

Мета роботи полягала у вивченні впливу ЕП мозочка на судомну активність, викликану у щурів з ПТЗ-індукованим кіндлінгом на тлі застосування інгібітора тирозинкінази *B* акситинібу.

Посідане застосування самостійно неефективних акситинібу (5,0 мг/кг) і ЕП мозочка (5 сеансів) запобігає виникненню поведінкових та електрографічних проявів судом, викликаних тестовим введенням ПТЗ (30,0 мг/кг, в/очер) у кіндлінгових щурів.

Ключові слова: кіндлінг, пентилентетразол, тирозинкіназа, електричні стимуляції, мозочок.

UDC 616.853-053.2-085.213

M. P. Pervak

ELECTRICAL STIMULATIONS OF CEREBELLAR CORTEX INDUCE MORE PRONOUNCED ANTISEIZURE EFFECTS AFTER TYROSIN-KINASE ACTIVITY INHIBITION

Tyrosine-kinase *B* activity plays the critical role in both pentylenetetrazol (PTZ) — induced kindling development and BDNF action upon seizure activity. BDNF administration induces both activation and inhibition of seizures, and its level is regulated along with brain electrical stimulations (ES).

Aim of the work was confined to the investigation cerebellar ES effects upon PTZ-induced kindled seizure activity at the background of tyrosine-kinase *B* activity inhibition with axitinib.

Combined usage of not-effective dosage of axitinib (5.0 mg/kg) and paleocerebellar ES (5 trials) prevented behavioral and electrographic seizures, induced in kindled rats with testing dosage of PTZ (30.0 mg/kg, i. p.).

Key words: kindling, pentylenetetrazol, tyrosine-kinase, electrical stimulation, cerebellum.

УДК 617.51-001-06:616.1/6-091-092.9-053

О. Л. Холодкова, д-р мед. наук, проф.,
Р. В. Прус

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ, МІОКАРДА І НИРОК ЩУРІВ У ДИНАМІЦІ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ ЗАЛЕЖНО ВІД ВІКУ

Одеський національний медичний університет

Для сучасної медицини суттєвою та домінуючою проблемою є черепно-мозкова травма (ЧМТ). За даними ВООЗ, поряд з онкологічними і серцево-судинними захворюваннями травматичні хвороби посідають третє місце серед причин інвалідності та летальності населення [1]. У структурі ЧМТ значна

їх частина припадає на дитячий травматизм. Відомо, що клінічні прояви й ускладнення після ЧМТ у постраждалих дитячого віку мають принципові відмінності від травм дорослих, що зумовлено анатомо-фізіологічними особливостями даного віку [2].

Відомо, що в гострому періоді після ЧМТ виникають це-

ребровісцеральні порушення, які запускають цілий каскад молекулярних змін та призводять до нейродинамічних і деструктивних порушень у внутрішніх органах [3]. Саме це є причиною виражених морфологічних змін у печінці, міокарді і нирках травмованих — як дорослих, так і дітей.

Проте досі залишаються маловивченими морфологічні та

© О. Л. Холодкова, Р. В. Прус, 2018