О.О. НЕФЬОДОВ
Дніпропетровська медична академія
nefedov2406@gmail.com

Оцінка змін рухової та емоційної активності щурів під впливом антиконвульсантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту

Розсіяний склероз (РС) – захворювання, що характеризується демієлінізацією нервових провідників із подальшим склерозуванням вогнищ розпаду мієліну та утворенням склеротичних бляшок. Вогнища демієлінізації утворюються в головному і спинному мозку. Вірусна інфекція або інший критичний агент викликають запальну реакцію, яка реалізується через Т-лімфоцити та виявляється формуванням аутоімунної відповіді на мієлін [4, 12].

Беручи до уваги патогенетичні особливості перебігу РС, на основні ланки розвитку захворювання доцільно впливати препаратами кортикостероїдів (наприклад, метилпреднізолону) [3].

Відомо, що у хворих на РС відзначається надзвичайний поліморфізм психічних порушень – від невротичних розладів до психотичних станів і епілептиформного синдрому [2, 11]. Найчастіше коло психопатологічних явищ у хворих цієї категорії вичерпується розладами емоційної та інтелектуально-мнестичної сфер, що потребує фармакологічної корекції [1]. Для нормалізації психоемоційного стану у хворих на РС застосовують засоби ад'ювантної терапії, зокрема, антиконвульсанти.

Мета дослідження. Експериментально оцінити вплив антиконвульсантів (карбамазепін, топірамат, натрію вольпроат, габапентин і прегабалін) на орієнтаційно-дослідницьку та емоційну активність щурів у тесті “відкрите поле” за умов експериментального еквівалента РС (ЕЕРС).

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведені на 56 білих нелінійних щурах масою 220–290 г, яких утримували в стандартних умовах віварію ДЗ “ДМА МОЗ України” [9]. Дослідження виконували відповідно до принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983), “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, затверджених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) згідно з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують у експериментах та з іншою науковою метою” (Страсбург, 1986) та закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження”.

Тварин вибірково поділили на сім дослідних груп ($n = 8$), яким одноразово вводили протисудомні засоби за умов сформованого ЕАЕ на тлі 5-добової терапії метилпреднізолоном (3,4 мг/кг): I – контроль (ЕАЕ); II – метилпреднізолон (М); III – М + карбамазепін (150 мг/кг), IV – М + топірамат (300 мг/кг), V – М + натрію вольпроат (155 мг/кг); VI – М + габапентин (100 мг/кг), VII – М + прегабалін 100 мг/кг.

Для відтворення ЕАЕ використано метод введення енцефалітогенної емульсії внутрішньошкірно в основу хвоста щурів [5, 10].

Зміни поведінки тварин вивчали в тесті “відкрите поле”: рівень рухової активності характеризували за кількістю перетнутих квадратів (горизонтальна активність) та стійок (вертикальна активність). Емоційно-дослідницьку поведінку оцінювали за кількістю заглядань, активів грумінгу та болюсів [8]. Показники поведінкової активності реєстрували у вихідному стані, на піку захворювання (12-та доба) та на 17-ту добу після 5-денної терапії метилпреднізолоном та разового введення ад'юванту. У цьому ж режимі оцінювали стан м'язового тону щурів на тлі введення досліджуваних засобів за умов моделюваної патології [6]. Усі отримані дані оброблено загальноприйнятими в медико-біологічних дослідженнях методами статистичного аналізу з використанням стандартних пакетів комп'ютерних програм. Математична обробка включала обчислення середніх арифметичних значень (M), їх похибок ($\pm m$). Достовірність міжгрупових відмінностей за значеннями показника порога больової реакції визначали за допомогою параметричного t -критерію Стьюдента, критерію рангових сум Вілкоксона (Wilcoxon Rank-Sum test), критерію Манна-Вітні та методу однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Відмінності вважали статистично достовірними, якщо $p \leq 0,05$. Перед застосуванням параметричних критеріїв значень перевіряли гіпотезу про нормальний закон розподілу випадкових значень [7].

Результати дослідження та їх обговорення. У вихідному стані тварини всіх дослідних груп були досить активними: показники моторно-дослідницької та емоційної активності коливалися в межах фізіологічної норми для гризунів відповідної вікової групи.

Показано, що у 100 % тварин зміни рухово-дослідницької активності в тесті “відкрите поле” на 12-ту добу моделювання ЕЕРС мали однакову спрямованість (див. таблицю).

**Поведінкова активність щурів у тесті “відкрите поле”
за умов модельованого РС та на тлі його експериментальної терапії**

Експериментальна група	Критерії оцінки тесту “відкрите поле”	Показники (М ± m)		
		вихідний стан (BC)	через 12 діб	через 17 діб
ЕЕРС	квадрати	25,17 ± 1,75	4,50 ± 0,71	12,33 ± 1,52
	нірки	8,33 ± 1,08	2,50 ± 0,22	2,50 ± 0,67
	стійки	7,00 ± 0,73	1,00 ± 0,36	1,66* ± 0,49
	грумінг	1,50 ± 0,22	0,66 ± 0,21	0,83 ± 0,16
	болюси	0,83 ± 0,30	0,50 ± 0,22	1,16 ± 0,16
ЕЕРС + метилпреднізолон (М)	квадрати	28,83 ± 3,0	11,33* ± 1,33	25,16 ± 2,92
	нірки	9,16 ± 0,74	2,33* ± 0,49	5,00* ± 1,03
	стійки	9,33 ± 1,62	1,83* ± 0,16	8,16 ± 1,27
	грумінг	2,66 ± 0,61	0,50* ± 0,22	1,33 ± 0,49
	болюси	1,66 ± 0,33	1,33 ± 0,64	1,50 ± 0,42
ЕЕРС + М + карбамазепін	квадрати	29,16 ± 2,55	8,66* ± 1,49	15,33* ± 1,8
	нірки	5,00 ± 0,57	2,16* ± 0,30	3,50 ± 0,61
	стійки	11,00 ± 1,69	2,16* ± 0,65	4,16* ± 0,65
	грумінг	1,16 ± 0,47	1,66 ± 0,33	1,16 ± 0,16
	болюси	1,33 ± 0,49	2,00 ± 0,36	1,00 ± 0,25
ЕЕРС + М + топірамат	квадрати	34,83 ± 4,65	7,66* ± 0,84	15,83* ± 2,53
	нірки	8,66 ± 1,25	2,33* ± 0,49	3,83* ± 0,30
	стійки	10,83 ± 1,24	2,50* ± 0,61	3,33* ± 0,98
	грумінг	1,33 ± 0,49	1,00 ± 0,36	1,16 ± 0,30
	болюси	1,50 ± 0,42	1,16 ± 0,16	1,50 ± 0,42
ЕЕРС + М + натрію вольпроат	квадрати	26,16 ± 2,90	9,50* ± 1,25	11,50* ± 1,54
	нірки	7,83 ± 1,07	3,33* ± 0,61	3,50* ± 0,67
	стійки	7,83 ± 1,07	1,33* ± 0,61	2,83* ± 0,30
	грумінг	2,00 ± 0,36	1,00 ± 0,36	1,50 ± 0,42
	болюси	1,50 ± 0,56	1,33 ± 0,42	1,50 ± 0,50
ЕЕРС + М + габапентин	квадрати	36,33 ± 3,68	9,66* ± 2,23	18,33* ± 2,02
	нірки	5,00 ± 1,15	2,50* ± 0,42	2,83 ± 0,30
	стійки	8,83 ± 1,13	1,33* ± 0,61	4,66* ± 0,66
	грумінг	1,83 ± 0,16	1,33 ± 0,33	1,16 ± 0,30
	болюси	2,00 ± 0,36	1,50 ± 0,56	1,33 ± 0,21
ЕЕРС + М + прегабалін	квадрати	30,50 ± 3,00	11,50* ± 1,45	20,83* ± 1,16
	нірки	6,83 ± 1,04	1,83* ± 0,40	5,50 ± 0,56
	стійки	8,66 ± 1,58	0,33* ± 0,21	2,33* ± 0,55
	грумінг	2,33 ± 0,42	0,66* ± 0,33	1,33 ± 0,49
	болюси	2,16 ± 0,30	0,83* ± 0,30	1,16 ± 0,30

Примітка. * $p \leq 0,05$ – щодо показників вихідного стану.

Так, кількість перетнутих квадратів коливалась у межах від $4,50 \pm 0,71$ (група контролю) до $11,50 \pm 1,45$ (група М + прегабалін), що відповідало зниженню рухової активності в середньому у 3,5 разу порівняно з показниками вихідного стану. При цьому спостерігалось послаблення дослідницької активності: кількість заглядань у “нірки” та кількість вертикальних піднімань були в середньому у 4,5 разу ($p \leq 0,05$) меншими порівняно з відповідними показниками вихідного стану.

За умов отримання метилпреднізолону (М) спостерігалась позитивна динаміка змін рухової активності. Якщо кількість перетнутих квадратів на 12-й день моделювання ЕЕРС становила $11,33 \pm 1,33$, то після 5-денного введення М збільшилась у 2,2 разу ($p \leq 0,05$). При цьому на тлі експериментальної гормональної терапії частота вертикальних піднімань практично повернулася до показника вихідного стану (див. таблицю), хоча кількість заглядань у “нірки” знижена в 1,8 разу ($p \leq 0,05$).

На тлі призначення М разом із антиконвульсантами зберігалось пригнічення рухової активності: кількість перетнутих квадратів реєструвалась у межах від $11,50 \pm 1,54$ (група V) до $25,16 \pm 2,92$ (група II), що порівняно з показниками групи контролю відповідало збільшенню рухової активності лише вдвічі. При цьому спостерігалась односпрямована тенденція змін показників орієнтаційно-дослідницької активності тварин. Кількість вертикальних піднімань у вихідному стані коливалась від $7,83 \pm 1,07$ (група V) до $11,0 \pm 1,69$ (група III), а після формування експериментальної моделі та наступних 5 днів призначення дослідних комбінацій число стійок і далі залишалось меншим у 1,97 ($p \leq 0,05$) разу – для групи М + габапентин та у 3,35 ($p \leq 0,05$) разу – для групи М + топірамат. Крім цього, кількість заглядань у “нірки” була вірогідно меншою на 17-ту добу експерименту мінімально у 1,2 разу (група М + прегабалін), максимально – у 2,26 разу (група М + топірамат).

Однак на тлі призначення композицій М + габапентин та М + прегабалін спостерігалось більш виражене відновлення рухової активності: кількість перетнутих квадратів збільшилась на 80,86 % ($p \leq 0,05$) та 81,73 % ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з 12-м днем моделювання експериментальної патології. При цьому максимально виражена нормалізація дослідницької активності (заглядання у “нірки”) зареєстрована на тлі введення М + прегабаліну: приріст показника становив 300 % ($p \leq 0,05$) порівняно з 12-ю добою експерименту.

У тварин із модельованою патологією також реєстрували зміни м'язового тону у вихідному стані, на 12-ту та 17-ту добу формування процесів демієлінізації (див. рисунок).

Зміни м'язового тону на тлі введення М і антиконвульсантів за умов ЕЕРС.

Примітка. * $p \leq 0,05$ – щодо показників вихідного стану.

У вихідному стані мінімальний час, протягом якого щури висіли на пруті, зареєстровано в групі М ($9,25 \pm 1,6$ с), а максимальний – у групі М + карбамазепін ($14,0 \pm 1,2$ с). При цьому за сформованого ЕЕРС зафіксовано зменшення м'язового тону у 2,3 ($p \leq 0,05$) разу для групи ІІ (мінімальний показник) та у 5,1 ($p \leq 0,05$) разу для групи VII (максимальний показник).

На тлі 5-денного введення М та антиконвульсанту суттєво відновлювався м'язовий тонус: для груп, що отримували габапентин і прегабалін, час “зависання” був на 190 % ($p \leq 0,05$) та на 200 % ($p \leq 0,05$) відповідно більшим порівняно з показниками 12-добового формування ЕЕРС.

Таким чином, за умов ЕЕРС карбамазепін, топірамат і вальпроат натрію практично не впливають на дефіцит рухової активності й м'язового тону, але сприяють збереженню дослідницьких навиків щурів у тесті “відкрите поле”. Уведення габапентину та прегабаліну нормалізує локомоторно-дослідницьку активність і емоційний статус, а також сприяє відновленню м'язового тону експериментальних тварин за обраних умов експерименту.

Висновки. За 12-добового формування ЕЕРС спостерігається пригнічення орієнтаційно-дослідницької та емоційної активності щурів у тесті “відкрите поле” й ослаблення м'язового тону. Уведення габапентину та прегабаліну за умов ЕЕРС на тлі 5-денного призначення метилпреднізолону сприяє нормалізації рухово-емоційної активності тварин і покращенню стану м'язової сили.

Перспективи подальших досліджень. У межах дослідження доцільно оцінити характер впливу антиконвульсантів на формування ноцицептивної відповіді й тривалість сну у тварин із модельованим еквівалентом розсіяного склерозу.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алгоритми клінічного використання болетамувальних засобів (наркотичних та ненаркотичних анальгетиків) при гострому та хронічному синдромі: метод. рекомендації / О.П. Вікторов, О.В. Макаренко, В.Й. Мамчур, С.М. Дронов. – К.: ДЕЦ України, 2011. – 56 с. (*Algorithms clinical use of analgesics (narcotic and non-narcotic analgesics) in acute and chronic syndrome. Guidelines / A. Viktorov, A. Makarenko, V. Mamchur, S. Dronov. – K.: Ukraine DETS, 2011. – 56 p.*).
2. Виноградов А.А. Оценка уровня стресса по шкале Ридера у женщин с рассеянным склерозом / А.А. Виноградов // Болезни и дисфункции нервной системы у женщин репродуктивного возраста: Сб. науч. тр. – Рязань, 1995. – С. 11–12 (*Vinogradov A. Assessing the level of stress on the Richter scale in women with MS / A. Vinogradov // Diseases and nervous system dysfunction in women of reproductive age: Coll. Teach. works. – Ryazan, 1995. – P. 11–12*).
3. Волошина Н.П. Обґрунтування лікування розсіяного склерозу / Н.П. Волошина // Міжнародний неврологічний журнал. – 2006. – № 4. – С. 91–98 (*Voloshin N. Justification multiple sclerosis treatment / N. Voloshin // International Neurology Journal. – 2006. – N 4. – P. 91–98*).
4. Гусев Е.И. Рассеянный склероз: достижения десятилетия / Е.И. Гусев // Журнал неврологии и психиатрии. – 2007. – № 4. – С. 4–15 (*Gusev E. Multiple sclerosis: a decade to achieve / E. Gusev // Journal of Neurology and Psychiatry. – 2007. – N 4. – P. 4–15*).
5. Донченко Г.В. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит: некоторые показатели энергетического, белкового и липидного обмена / Г.В. Донченко, А.П. Клименко, Т.М. Кучмеровская // Нейрохимия. – 2007. – № 3. – С. 232–238 (*Donchenko G. Experimental Allergic Encephalomyelitis: some indicators of energy, protein and lipid metabolism / G. Donchenko, A. Klimenko, T. Kuchmerovskaya // Neurochemistry. – 2007. – N 3. – P. 232–238*).
6. Калыев А.В. Стресс, тревожность и поведение. Актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных / А.В. Калыев. – К., 1998. – 95 с. (*Kaluyev A. Stress, anxiety and behavior. Actual problems of modeling of anxious behavior in animals / A. Kaluyev. – K.: 1998. – 95 p.*).
7. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2001. – 408 с. (*Lapach S. Statistical methods in biomedical research using EXCEL / S. Lapach, A. Chubenko, P. Babich. – K.: Morion, 2001. – 408 p.*).
8. Мельников А.В. Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс / А.В. Мельников, М.А. Куликов, М.Р. Новикова // Журнал высшей нервной деятельности. – 2004. – Т. 54, № 5. – С. 712–717 (*Melnikov A. The choice of indicators of behavioral tests to assess the typological features*

of behavior of rats / A. Melnikov, M. Kulikov, M. Novikov / *Journal higher nervous activity*. – 2004. – Vol. 54, N 5. – P. 712–717). 9. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайретдинова. – К., 2002. – 155 с. (*Scientific and practical advice on keeping laboratory animals and work with them* / Y. Kozhemyakin, A. Khromov, M. Filonenko, G. Sayretdynova. – K., 2002. – 155 p.). 10. Нефьодов О.О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, т. 2 (114). – С. 205–208 (*Nefedov A. Feedback on modeling and experimental allergic encephalomyelitis* / A. Nefedov, V. Mamchur, Y. Kharchenko // *Bulletin problems of biology and medicine*. – 2014. – Is. 4, Vol. 2 (114). – P. 205–208). 11. Сергеев В.В. Психические расстройства у больных с демиелинизирующими заболеваниями нервной системы / В.В. Сергеев, З.А. Скударнова // Неврозоподобные состояния: сб. науч. тр. – Смоленск, 1988. – С. 43–46. (*Sergeev V. Mental disorders in patients with demyelinating diseases of the nervous system* / V. Sergeev, Z. Skudarnova // *Neurosis-like states: Sat. Teach works*. – Smolensk, 1988. – P. 43–46.). 12. Шмидт Т.Е. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т.Е. Шмидт, Н.Н. Яхно. – [2-е изд.] – М. : МЕДпресс-информ, 2010. – 272 с. (*Schmidt T. Multiple Sclerosis: A Guide for Physicians* / T. Schmidt, N. Yahno. – 2 Ed. – M. : MEDpress-Inform, 2010. – 272 p.).

Стаття надійшла до редколегії 29.10.2015

Assessment of Motor and Emotional Changes in Rats under the Influence of Anticonvulsants in the Experimental Allergic Encephalomyelitis

O. NEFEDOV

Dnipropetrovsk Medical Academy

Multiple sclerosis (MS) is a disease characterized by demyelination of nerve conductors followed sclerosing lesions collapse and destruction of myelin formation of sclerotic plaques. The most common range of psychopathological phenomenon in this category of patients include disorders of emotional and intellectual and memory areas that require pharmacological correction. To normalize the emotional state of patients with MS it is recommended to use different medication including anticonvulsants.

The aim of the present study was to assess experimental impact of anticonvulsants (carbamazepine, topiramate, sodium valproate, gabapentine and pregabalin) on emotional activity of rats in the "open field" test under the experimental equivalent of MS (EEMS).

Animals were selectively divided into seven research groups ($n = 8$), that were administered with anticonvulsants, along with EAE 5-day therapy of methylprednisolone (3.4 mg/kg) on the background. To put the subjects of the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) into the needed condition used t encephalitogenic emulsion intradermally was used, which was injected into the rats' tailset. Changes of the animals' behavior was observed in the test "open field". Indicators of behavioral activity were recorded in the initial state, at the peak of the disease (12 days) and 17 days after 5-days therapy with methylprednisolone and single administration aides.

At the initial state the animals in the research groups were very active: performance of motor and emotional activity ranged within the physiological norm for rodents' age group. We found that in 100 % of animals changes in motor activity in the "open field" test on the 12th day of simulation EEMS have the same orientation. Thus, the number of squares crossed ranged from 4.50 ± 0.71 (control group) to 11.50 ± 1.45 (group M+ pregabalin), which corresponded to reduced physical activity on average by 3.5 times compared to the original state. Weakening of the activity under study was observed: the number of looking into the "rat-hole" and the number of vertical climbs were on average 4.5 times ($p \leq 0.05$) lower compared with those of the original state.

The rats subject to receiving methylprednisolone (M) showed positive dynamics of physical activity: if the number of squares crossed on the 12th day of simulation EEMS was 11.33 ± 1.33 , then after 5-day introduction of M it increased by 2.2 times ($p \leq 0.05$). On the background of experimental hormone therapy vertical frequency rises almost returned to its original state indicator, although the quantity of looking into the "rat-hole" remained low – 1.8 times ($p \leq 0.05$).

However, against the background of the compositions M + gabapentine and M + pregabalin administration the rats demonstrated more pronounced recovery of motor

activity: the number of crossed squares increased by 80.86 % ($p \leq 0,05$) and 81.73 % ($p \leq 0.05$) respectively compared to the 12th day of simulation of experimental pathology. At most pronounced normalization of research activity (looking into the "rat-hole") registered against the backdrop of the administration of M + pregabalin, growth rate was 300 % ($p \leq 0.05$) compared with the 12 day experiment.

The study found that under the experimental equivalent of MS on the background therapy of methylprednisolone administration, gabapentine and pregabalin, but not carbamazepine, or topiramate normalizes both locomotor activity and emotional status of rats in the "open field" test and this helps to rebuild muscle tone of experimental animals.

Key words: multiple sclerosis, anticonvulsants, test of "open field", experimental allergic encephalomyelitis.