

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

ЗЛАТИНА ПЕТРОВА НЕНЧОВСКА

**ПРОУЧВАНЕ ЕФЕКТИТЕ НА ХОРМОНА МЕЛАТОНИН
ВЪРХУ ПОВЕДЕНЧЕСКИ И БИОХИМИЧНИ ПРОМЕНИ,
СЪПЪТСТВАЩИ ЕПИЛЕПТОГЕНЕЗАТА ПРИ КАИНАТЕН
МОДЕЛ НА ТЕМПОРАЛНА ЕПИЛЕПСИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Научна специалност “Фармакология (вкл. фармакокинетика и
химиотерапия)” (шифър 03.01.24)

Направление: “Поведенческа невробиология“

Научен ръководител:

Проф. д-р Яна Чекаларова

Официални рецензенти:

Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн

Проф. д-р Христо Гагов

СОФИЯ, 2019

Дисертационният труд е написан на 132 страници и е онагледен с 30 фигури, 27 от които двойни, 1 таблица и 1 схема. В библиографския списък са включени 256 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на научен семинар на направление „Поведенческа невробиология“ към Институт по невробиология-БАН, проведен на 16.05.2019 година.

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

Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн- Институт по невробиология, БАН

Проф. д-р Христо Гагов, Биологически факултет-СУ „Климент Охридски“

Проф. д-р Росица Замфирова-Митова- Институт по невробиология, БАН

Доц. д-р Румен Николов, дм- Медицински университет, София

Доц. д-р Паулина Гатева, дм- Медицински университет, София

Резервни членове:

Доц. д-р Катерина Стамболиева, Институт по невробиология, БАН

Проф. д-р Катерина Георгиева, дм- Медицински университет, Пловдив

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 30.09.2019 год. от 11 часа в заседателната зала на Институт по невробиология- БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“ бл. 23, ет. 2.

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на *Институт по невробиология- БАН*, ул. „Акад. Георги Бончев“ бл. 23, ет. 2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих искала да изразя искрената си признателност и благодарност на научния ми ръководител проф. д-р Яна Чекаларова за безграничната подкрепа и отдаденост, за безценните съвети и напътствия, за търпението и съветите по време на експерименталната работа и обработката на резултатите, за предоставените ми възможности и гласуваното ми доверие. Благодаря, че ме въведохте в света на науката и ми помогнахте да усвоя ценни методики!

Изказвам огромната си благодарност и признателност към колегите от Институт по невробиология- доц. д-р Даниела Пехливанова, ас. Лидия Кортенска, ас. Румяна Митрева, д-р Наташа Иванова за разбирането, подкрепата и помощта в хода на работа.

Специални благодарности на доц. д-р Димитринка Атанасова за съдействието в морфологичните изследвания и предадените ценни съвети и основни стъпки в областта на транскардиалната перфузия.

Благодаря безкрайно и на доц. Д-р Милена Атанасова от МУ Плевен за помощта при провеждане на биохимичните изследвания.

Благодаря на семейство ми за безрезервната подкрепа и вяра!

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

5-HT	серотонин
EPM	повдигнат кръстосан лабиринт/elevated plus maze
FST	тест за принудително плуване/forced swimming test
GD	gyrus dentatus
HPLC	високо-ефективна течна хроматография
KARs	каинатни рецептори
Mel	мелатонин
OF	тест отворено поле/open field
PB	фосфатен буфер
Pir	пириформена кора
RAM	радиален осем-раменен лабиринт/radial arm maze
RNS	реактивни азотни видове/reactive nitrogen species
ROS	реактивни кислородни видове/reactive oxygen species
SHR	спонтанно-хипертензивни плъхове
SOD	супероксид дисмутаза
TE	темпорална епилепсия
Veh	vehicle
WKY	Wistar Kyoto
ЕЕГ	електроенцефалограма
ЕС	епилептичен статус
КА	каинова киселина
СПГП	спонтанно-повтарящи се гърчови пристъпи
СХЯ	супрахиазматично ядро
ЦНС	централна нервна система

СЪДЪРЖАНИЕ

1. УВОД	8
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	10
3.1. Експериментални животни.....	10
3.1.1. Порода Wistar	11
3.1.2. Порода спонтанно хипертензивни плъхове (SHR)	11
3.2. Експериментална постановка и въвеждане на вещества	11
3.3. Оперативна процедура за имплантиране на електроди	12
3.4. Предизвикване на епилептичен статус чрез инжектиране с каинова киселина	12
3.5. Видео и ЕЕГ регистрация на спонтанна епилептиформена активност	13
3.6. Поведенчески тестове	13
3.6.1. Тест за отчитане на предпочитание към сладки разтвори- депресивен тип поведение (анхедония).....	13
3.6.2. Тест отворено поле	14
3.6.3. Повдигнат кръстосан лабиринт.....	14
3.6.4. Тест за оценка на депресивно състояние- принудително плуване ...	14
3.6.5. Тест за изследване на хипокамп-зависима пространствена памет- радиален осем-раменен лабиринт	14
3.7. Хистологичен метод за изследване на невронална загуба в мозъчни структури (хипокампа, хилус на gyrus dentatus и пириформена кора)	15
3.8. Високоэффективна течна хроматография	16
3.9. Биохимични методи (отчитане на липидна пероксидация и активност на ензима супероксид дисмутаза).....	16
3.9.1. Измерване на липидната пероксидация	17
3.9.2. Измерване на цитозолна супероксид дисмутаза.....	17
3.10. Статистическа обработка и анализ	17

4. РЕЗУЛТАТИ	18
4.1. Индуциране на епилептичен статус	18
4.2. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху развитието на епилепсията и денонощното разпределение на спонтанно повтарящите се гърчове при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове	20
4.3. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху коморбидната депресия при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове	23
4.4. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху двигателната активност и състоянието на безпокойство, изследвано чрез теста OF при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове	25
4.5. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху двигателната активност и състоянието на безпокойство, изследвано чрез теста повдигнат кръстосан лабиринт (EPM) при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхов	27
4.6. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху коморбидна депресия - тест за принудително плуване (FST) при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове	30
4.7. Проучване влиянието на мелатонина върху хипокамп-зависима пространствена памет, изследвана чрез радиален-осемраменен лабиринт (RAM) при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове	32
4.8. Проучване ефектите на хормона мелатонин върху нивата на 5-НТ в хипокамп и хистологични изменения в резултат от ЕС при породите Wistar и SHR	33
4.9. Проучване ефектите на хормона мелатонин върху оксидативния стрес	39
4.9.1. Ефекти на хормона мелатонин върху нивото на липидна пероксидация	39
4.9.2. Ефекти на мелатонина върху активността на на цитозолна супероксид дисмутаза (Cu/Zn-SOD)	41
5. ОБСЪЖДАНЕ	44
6. ИЗВОДИ	57
7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	58
8. П Р И Л О Ж Е Н И Я	59
8.1. Списък на публикациите, включени в дисертационния труд	59

8.2. Списък с участия и научни съобщения по темата на дисертационния труд	60
8.3. Награди и отличия	62
Summery	63
1. Aims.....	64
2. Tasks.....	64
3. Materials and methods	64
3.1. Animals	64
3.2. Experimental groups and drug treatment	64
3.3. Surgery	64
3.4. Induction of status epilepticus with kainic acid	65
3.5. Video and EEG monitoring of spontaneous recurrent seizures	65
3.6. Behavioral tests	65
3.6.1. Sucrose preference test	65
3.6.2. Open field test	66
3.6.3. Elevated-plus maze test	66
3.6.4. Forced swim test (FST)	66
3.6.5. Radial arm maze (RAM) test	66
3.7. Histology	66
3.8. High-performance liquid chromatography	67
3.9. Biochemical methods	67
3.9.1. Measurement of lipid peroxidation	68
3.9.2. Measurement of cytosolic superoxide dismutase	68
3.10. Statistical analysis	68
4. Result and discussion	68

1. У В О Д

Епилепсията е едно от най-разпространените неврологични заболявания. Тя засяга 1% от населението на Земята - около 50 милиона души по света, а за България - около 70 хиляди.

Епилепсията се разглежда като хронично, мултифакторно заболяване, характеризиращо се с трайно предразположение на мозъка към спонтанни, повтарящи се епилептични пристъпи, със съпътстващи невробиологични, когнитивни, психологически и социални последици (Fisher et al., 2005).

Причината за епилептичните пристъпи е нарушение на баланса между процесите на възбуждане и задържане в мозъка, с доминиране на възбудните, което предизвиква синхронни, високо амплитудни послеразреди в т.н. епилептогенно огнище, локализирано в мозъчни структури с по-нисък праг на възбудимост. Епилептиформената активност може да се разпространи към съседни или по-отдалечени области или да обхване целия мозък.

Темпоралната епилепсия (ТЕ) е най-често срещаната симптоматична форма на фармакорезистентна епилепсия (Litt et al., 2001; McKeown and McNamara, 2001).

През последните години, в експерименталната практика се наложиха редица модели, които с известно приближение симулират клиничната картина на заболяването. Един от най-ефикасните модели за изучаване на ТЕ е каинат (КА) -индуцирания пост-ЕС, характеризиращ се с остра, латентна и хронична фаза.

Невротоксинът КА ($C_{10}H_{15}NO_4$), изолиран от японско водорасло, е аналог на глутамата, който активирайки мозъчните КА рецептори (KARs), осъществява своя епилептогенен ефект, предизвиквайки селективно увреждане в хилуса на хипокампа, СА3 и СА1 полето и невронална смърт при гризачи. Свързването на КА с KARs води до освобождаване на вътреклетъчния Ca^{2+} , повишаване нивата на реактивните кислородни видове (reactive oxygen species,

ROS) и реактивните азотни видове (reactive nitrogen species, RNS). Повишената концентрация на Ca^{2+} , ROS и RNS води до митохондриална дисфункция, ядрена кондензация и ДНК-фрагментация. Най-често използваният начин, по който се въвежда КА е интраперитонеално (ип). Въвеждането на токсина предизвиква ЕС продължаващ няколко часа.

В литературата има данни в подкрепа на теорията, че хормонът мелатонин притежава антиконвулсивна активност както при пациенти страдащи от епилепсия, така и при експериментални животински модели (Anton-Tay, 1974; Molina-Carballo et al., 1997; Albertson et al., 1981; Yamamoto and Tang, 1996; Liang and Patel, 2005; Borowicz et al., 1999). До голяма степен биологичните ефекти на мелатонина се опосредстват от активиране на мелатониновите рецептори, а други са вследствие на ролята му на мощен антиоксидант. Хормонът има пряко отношение към регулирането на цикъла сън-бодърстване и синхронизацията на биоритмите на важни физиологични процеси у бозайниците, включително при човека.

Проведените от нас изследвания и резултатите от тях, заложили в настоящия дисертационен труд, имат за цел да изяснят и да разширят знанията, относно влиянието на продължителното третиране с хормона мелатонин върху епилептогенезата свързана с развитието на спонтанните гърчови пристъпи, коморбидна депресия, биохимични и морфологични промени в лимбичната система. В дисертацията акцентът е поставен върху паралелния анализ на две породи плъхове, нормотензивни Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове (SHR), целящ да изясни ролята на хипертонията за развитието на епилептогенезата, от една страна, а от друга, предполагаемата ефикасност на мелатонина върху патофизиологията на епилепсията при модел на есенциална хипертония, както и механизмите, определящи развитието на коморбидна депресия през хроничната фаза на епилепсия.

2. Ц Е Л И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд бе изследване ролята на мелатонина върху честотата на спонтанна епилептиформена активност и съпътстващите епилептогенезата поведенчески, биохимични и хистологични изменения, при експериментален модел на темпорална епилепсия, индуциран с каинова киселина при две породи плъхове, нормотензивни (*Wistar*) и спонтанно хипертензивни (*SHR*).

За осъществяването на тази цел си поставихме няколко основни задачи: да се проучат ефектите на многократното третиране с мелатонин, при плъхове от порода *Wistar* и *SHR* върху:

1. Циркадианните ритмични промени в честотата на спонтанно повтарящите се гърчови пристъпи (СПГП);
2. Денонощните вариации в поведенческите реакции: двигателна активност, изследователско поведение, състояние на тревожност, депресивен тип поведение и пространствена памет;
3. Промени в нивата на 5-НТ във фронтална кора и хипокампа;
4. Хистологични изменения в определени мозъчни структури, вследствие на епилептогенезата;
5. Нивата на маркери на оксидативен стрес предизвикан от ЕС.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Експериментални животни

За всички експерименти са използвани млади полово зрели мъжки плъхове от две породи, нормотензивни *Wistar* плъхове и *SHR*, с тегло около 250-300 g. отглеждани при стандартизирани условия.

Изследванията се изпълняват съгласно нормативната уредба за работа с експериментални животни в България и правилата на Етичната комисия към

ИБН, БАН (регистрация FWA 00003059 US Department of Health and Human Services).

3.1.1. Порода Wistar

Плъховете от порода Wistar са линия, получена чрез кръстосване на плъхове албиноси, принадлежащи към видове *Rattus norvegicus*,. използвани в биологични и медицински изследвания.

3.1.2. Порода спонтанно хипертензивни плъхове

SHR се разглеждат като животински модел на есенциална хипертония и се използват за проучване на сърдечно-съдови заболявания, а също и като модел на заболяване с хиперактивност и дефицит на вниманието.

In vivo методи

3.2. Експериментална постановка и въвеждане на вещества

Животните са разделени в четири основни групи: C-veh (контролна, третирана с разтворител, n=20); C-mel (контролна група, третирана с мелатонин, n=20); KA-veh (група с епилепсия n= 20); KA-mel (група с епилепсия третирана с мелатонин, n= 20). Третирането с мелатонин (Sigma-Aldrich, България) започва три часа след началото на ЕС, в доза от 10 mg/kg, за период от 8 седмици. Контролните групи се третират с чешмяна вода. За изследване на оксидативен стрес, третирането с мелатонин се извърши с помощта на имплантирани мини-сомотични помпи Alzet, за период от 2 седмици преди ЕС, в доза 10 mg/kg/ден, със скорост на инфузия 0.5 μ l/h.

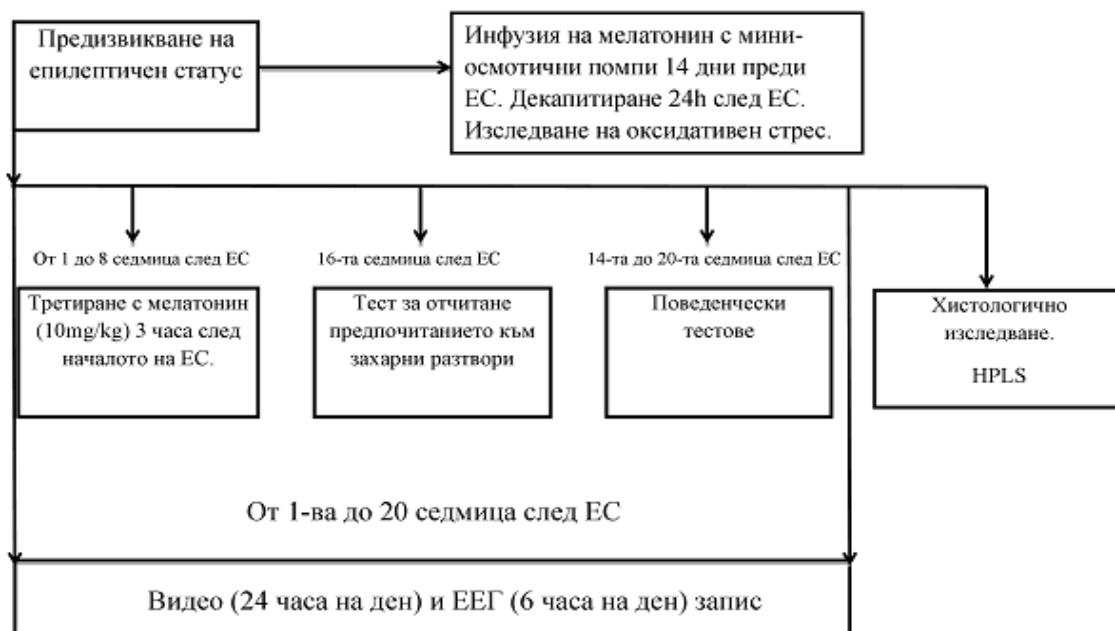


Схема 3.2.1. Схема на експериментална постановка

Поведенческите тестове започват около 14 дни след ЕС върху плъховете с отчетени спонтанни моторни гърчове. Двадесет седмици след ЕС, плъховете се перфузират за последващо хистологично изследване или декапитират с изолиране на мозъчни структури за биохимичен анализ.

3.3. Оперативна процедура за имплантиране на електроди

Операциите за имплантиране на епидурални корови и хипокампални електроди за ЕЕГ регистрация се извършват на петия ден след ЕС, под пълна упойка, след фиксиране в стереотаксичен апарат (Narishige Sci. Inst. Labs, Japan).

3.4. Предизвикване на епилептичен статус чрез инжектиране с каинова киселина

Епилептичният статус се предизвиква чрез и.п. въвеждане на КА (Ascent Scientific, UK) чрез титриране в неефективна доза от 2.5-5 mg/kg на всеки един час, съгласно протокола на Hellier et al. (1998) с малки модификации (Tchekalarova et al., 2010), при максимална допустима доза до 30 mg/kg/плъх. Контролната група се третира с еквивалентния обем и брой инжекции

физиологичен разтвор Интензивността на поведенческите гърчовете се оценява въз основа на модифицирана скала на Racine (1972). Критерий за достигане на ЕС е честотата на поведенческите гърчове от клас III, IV и/или V минимум 9 пристъпа за час, в продължение три часа.

3.5. Видео и ЕЕГ регистрация на спонтанна епилептиформена активност

Денонощните видео-записи (24 часа/ден за около 20 седмици започват 48 часа след ЕС) се реализират при стандартни условия, в изолирано помещение, с помощта на инфрачервена чувствителна цветна камера. ЕЕГ регистрацията се извършва през ден, с продължителност на експеримента един час на животно, за период от пет месеца след КА-индуцирания ЕС. ЕЕГ данните се записват и обработват чрез специализиран програмен продукт (Acknowledge software ASK100W BIOPAC Inc., USA).

3.6. Поведенчески тестове

Всички поведенчески тестове се провеждат 14-16 седмици след ЕС, като интервалът между всеки тест е най-малко два дни. Наблюдението, обработката и анализът на експерименталните данни се осъществява чрез специализирана видео-записваща система (SMART PanLab software, Harvard Apparatus, USA).

3.6.1. Тест за отчитане на предпочитание към сладки разтвори-депресивен тип поведение (анхедония)

Тестът е за оценка на депресивен тип поведение, съгласно протокола на Willner (1987). През първия ден- адаптация с две бутилки вода, втори ден- претест, водата в една от поилките се заменя с 1% захарен разтвор за 24 часа. На третия ден в началото на светлата фаза (08:00 часа), поилките се зареждат с еднакъв обем от 100 ml вода и захар. Двете поилки с вода и захарен разтвор се

отчитат двукратно през 12 часа и се зареждат със същото количество течност за период от 12 часа (за светла фаза от 08:00-20:00 ч. и тъмна фаза- 20:00-08:00 ч.).

3.6.2. Тест отворено поле

Апаратът се състои от сива кутия от полистирен (100 x100 cm x 60 cm, разграфена на 25 еднакви квадрата), разделена на 2 зони- външна (периферна) и вътрешна зона (център). Централната зона на апарата се разглежда като аверсивна за животните зона. Продължителността на теста е пет минути. Престоят в дадена зона се отчита с автоматична видео-записваща система *Smart Video Traking Software- Panlab*.

3.6.3. Повдигнат кръстосан лабиринт

Апаратът се състои от две отворени рамена (50 x 10 cm), две затворени рамена (50x10x50 cm) и централна платформа (10x10 cm). Тестът е с продължителност пет минути. Двигателната активност и времето за престой в дадена зона се отчита с помощта на автоматична видео-записваща система *Smart Video Traking Software- Panlab*

3.6.4. Тест за оценка на депресивно състояние- принудително плуване

Тестът за принудително плуване е рутинен скринингов метод за отчитане на антидепресантна активност на веществата и въведен от Porsolt et al., 1979. Опитът се провежда в две сесии през 24 часов интервал: А./ 1 ден (тренировка) за 15 минути престой в цилиндъра без отчитане на резултат; Б./ 2-ри ден (тест) за 5 минути. Чрез теста се отчита времето на имобилност в секунди.

3.6.5. Тест за изследване на хипокамп-зависима пространствена памет- осем-раменен радиален лабиринт

Изследването на пространствената памет се извърши с помощта осем-раменен радиален лабиринт (Harvard Biosci. Comp., USA). Седем дни преди

старта на тренировката и по време на същинския тест, плъховете се поставят на диета, с цел намаляване на телесното тегло с около 15%. След тридневен период на адаптацията (Olton and Samuelson, 1996), животните се тестват на апарата, в продължение на 18 дни, по един тест на ден. Четири от рамената на апарата се обозначават с различни символи. В края на всяко от тези маркирани рамена се поставя по една пелета като положително подкрепление. Критерий за преустановяване на теста е изяждането на всички пелети от маркираните рамена до десет минути. Подобряването на паметта се отчита с намаляване на броя грешките в процеса на тестване до 18-ия ден. Влизане в рамото с храна се отчита като грешка на оперативната памет.

In vitro методи

3.7. Хистологичен метод за изследване на невронална загуба в мозъчни структури (хипокампа, хилус на gyrus dentatus и пириформена кора)

Двадесет седмици след индуциране на ЕС с КА, част от животните (n=5) се подлагат на перфузия под пълна упойка, през възходящата аорта, като канюлата се вкарва през лявата камера на сърцето. Първоначално кръвоносната система се промива за около пет минути с 0,05 М фосфатно буфериран разтвор на натриев хлорид (PBS), след което се използва фиксатор, състоящ се от 4% параформалдехид (Merck) в 0.1 М фосфатен буфер (PB) за около 20 минути. След перфузията, мозъкът се отпрепарирва като се оставя за една нощ в същия фиксатор на 4° С. След постфиксацията се прави коронарен срез на мозъците, приготвят се тъканни блокчета, промиват се в 0.1 М фосфатен буфер, дехидратират се през възходяща редица от алкохоли и след потапяне с кедрово масло за просветляване се включват в парафин.

Приготвят се срези, с помощта на Reichert Jung замразяващ микротом с дебелина 5 µm, които се поставят върху хром-желатинирани предметни стъкла. Преди оцветяване, нарязаният материал се депарафинира. Срезове се

оцветяват с хематоксилин и еозин. Материалите се изследват, чрез светлинен микроскоп и фотографират с цифров фотоапарат. Отчита се невронална загуба в септо-темпорална и темпорална част на CA1, CA2, CA3 полета на дорзален хипокампа и хилуса на GD.

3.8. Високоефективна течна хроматография

След декапитация мозъците бързо се отпрепарират върху лед и се изолира фронтална кора и хипокампа. Тъканните срези се замразяват в течен азот, лиофилизират и съхраняват при -70 °C преди анализа.

Готовите тъкани се притеглят и хомогенизират в предварително охладена мравчена киселина 0.5 M, с помощта на MICRA D-8 (ART, Germany) хомогенизатор.

Хомогената се центрофугира на 13 000 оборота в минута при 4 °C за 20 минути, след което 10 мл от супернатантата се използва за анализ. Пробите от двете хемисфери се анализират за нива на 5-HT, чието съдържание се измерва с помощта на LC/MS/MS. Измерванията се извършват чрез LTQ Orbitrap Discovery® спектрофотометър. Анализираните компоненти се разделят в ZIC®-HILIC (Merck, Germany) аналитична колона, с подвижна фаза 70% ацетонитрил, съдържащ 15 mM мравчена киселина при скорост на потока 200 мл/мин. Данните се обработват с помощта на Xcalibur® софтуер.

3.9. Биохимични методи (отчитане на липидна пероксидация и активност на ензима супероксид дисмутаза)

Анестезираните с CO₂ животни се декапитират на четвъртия час след инжектирането с КА. Извършва се бърза дисекция на мозъците върху лед за билатерално отделяне на фронтална кора и хипокампа. Тъканните проби се замразяват в течен азот и се съхраняваха при -70 °C преди биохимичния анализ.

3.9.1. Измерване на липидната пероксидация

Тъканните проби се хомогенизират в студен 20 mM HEPES буфер (pH 7.2) и екстрахират с хлороформ. Екстрахираните липидни пероксиди се анализират чрез използване на кит за анализ на липидни пероксиди (Cayman Chemical Company, САЩ), съгласно предоставените инструкции. Железните йони се каптират с използване на тиоцианатен йон като хромоген, и чрез отчитане на абсорбцията при дължина на вълната 500 nm. Степента на липидна пероксидация се изразява в nmol.

3.9.2. Измерване на цитозолна дисмутаза

Тъканните проби се хомогенизирани в студен 20 mM HEPES буфер (pH 7.2) и центрофугират при 1.500 g за 5 минути, при 4 °C. с цел разделяне на цитозолна супероксид дисмутаза, супернатантата отново се центрофугирана при 10.000 g за 15 мин., при 4 °C. От получената супернатанта се изследва цитозолната супероксид дисмутаза, чрез използване на кит за анализ SOD (Cayman Chemical Company, САЩ). Резултатите се изразяват в U/ml.

3.10. Статистическа обработка и анализ

За статистическа обработка на данните е използван специализиран софтуеър SigmaStat 11.0. Всички данни са представени като средна стойност \pm средна статистическа грешка (SEM). В зависимост от разпределението на данните, резултатите се обработват с параметрични (при нормално разпределение на данните: Shapiro-Wilk) или непараметрични (при неправилно разпределение на данните: Kruskal-Wallis, след което Mann-Whitney U тест) тестове. Еднофакторен ANOVA анализ е използван за изчисление прогресията в честотата на спонтанните гърчови пристъпи (фактор Месец) и изследване на пространствена памет. Двухфакторен вариационен анализ е използван за обработка на данните от хистологичните и биохимични показатели (фактори: Епилепсия и Вещество).

Трифакторен вариационен анализ е използван за обработка на данните от: теста за предпочитание към сладки разтвори, тест за принудително плуване, тест отворено поле, тест повдигнат кръстосан лабиринт (фактори: Епилепсия, Вещество, Тъмна-светла фаза) и тест за изследване на зависима от хипокампа пространствена памет (RAM) (фактори: Епилепсия, Вещество, Сесия). Всички стойности с $p < 0.05$ се считат за статистически достоверни.

4. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

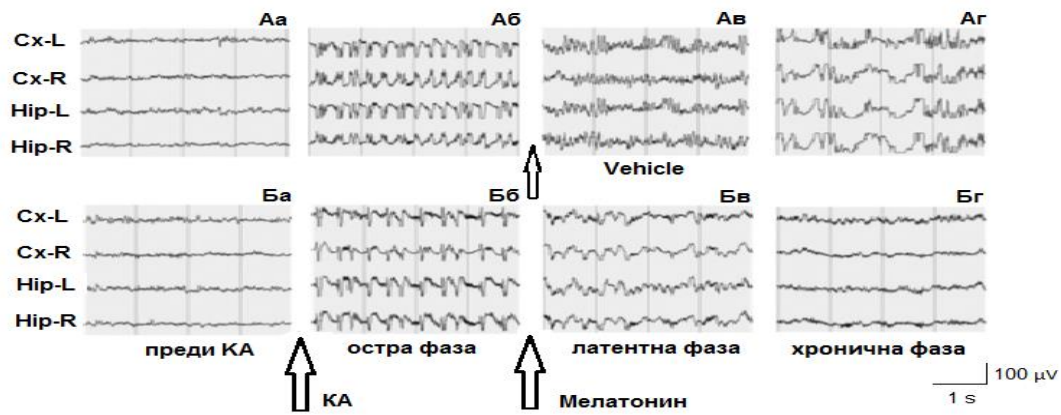
4.1. Индуциране на епилептичен статус

Всички плъхове, навлезли в продължителен ЕС след 3-4 инжектирания с КА се характеризират с интензивни повтарящи се припадъци (клас IV / V, т.е. > 9 моторни припадъка/час в продължение на поне 3 часа). Дозата на КА, необходима за предизвикване на ЕС е $16.25 \pm 5.52 \text{ mg/kg}$. Наблюдаваното поведение по време на инжектирането с КА е съпроводено от лицев автоматизъм, “wet dog shake” и клонуси на главата. След това тези поведенчески реакции прогресират до вторични генерализирани пристъпи, т.е. клонус на преден крайник (клас III), последвано от изправяне на задни крайници (клас IV), спазми на предните крайници и загуба на равновесие (клас V) съгласно модифицирана скала на Racine (1972).

Електроенцефалографските записи по време на гърчовете от клас IV/V при плъхове с имплантирани електроди демонстрират спорадични спайкове, пик-вълна послеразреди, епилептиформена активност, характеризираща се с висока амплитуда (Фиг. 4.1.1. А,Б- Аб, Бб).

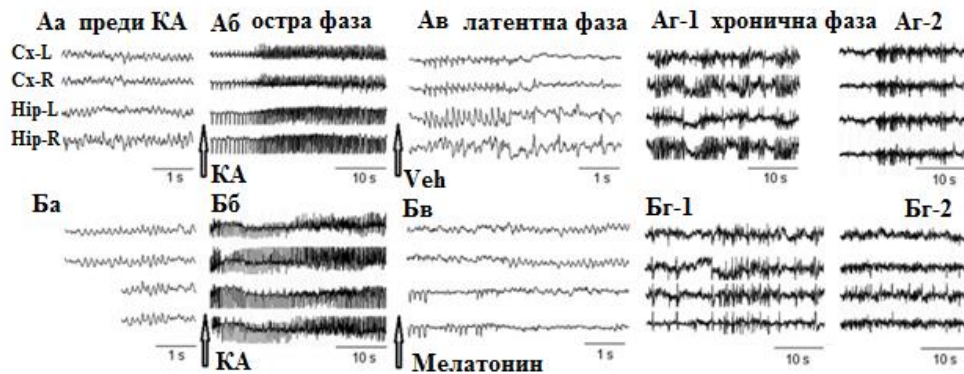
A

Wistar



B

SHR



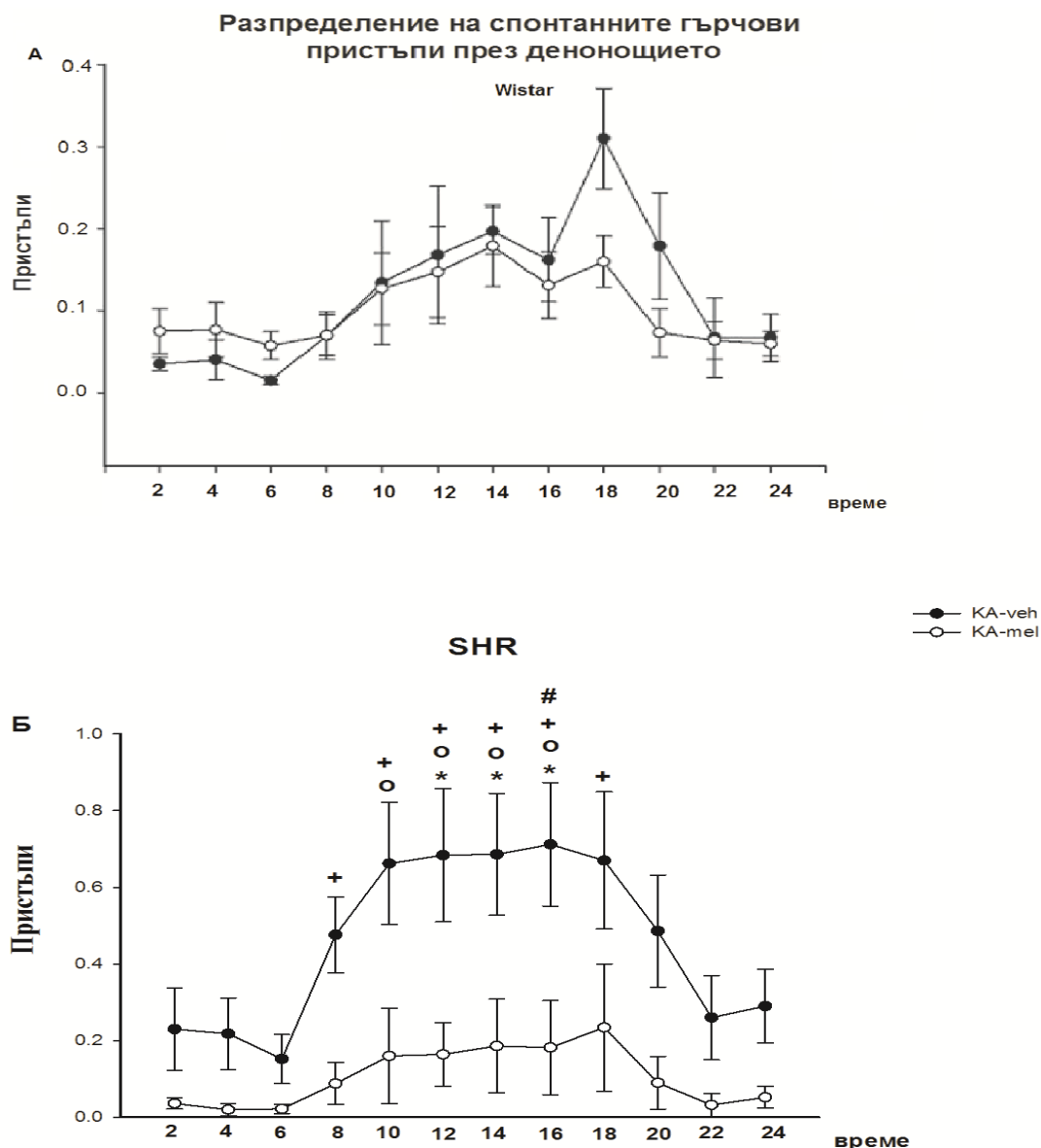
Фиг. 4.1.1. Контролни ЕЕГ записи при Wistar (А) и SHR (Б) от лява и дясна париетална кора (Cx-L и Cx-R) и ляв и десен- хипокамп (Hip-L и Hip-R) при два плъха от епилептичната група (КА-veh)- А и от епилептичната група, третирана с мелатонин (КА-mel)- Б; Аа, преди КА: десинхронизация в ЕЕГ записа- активна фаза; Аб, по време на КА-предизвикания ЕС (остра фаза); Ав, по време на латентната фаза: субконвулсивна ЕЕГ активност (пик-вълни и тета вълни); Аг, хронична фаза: спонтанен епилептичен припадък по време на ЕЕГ записа, придружен с поведенчески и двигателни промени. Типична ЕЕГ активност (висока амплитуда, ниско-честотни вълни и остри спайкове), отчетени по време на четвъртия месец след ЕС, предизвикан от КА / моторни, повтарящи се припадъци при епилептичната група (КА-veh), по време на периода на наблюдение. Б: Ба, преди КА: нарушения в ЕЕГ (активна фаза) при епилептичната група, третирана с мелатонин (КА-mel); Бб, по време на острата фаза на ЕС; по време на латентната фаза: високо-амплитудни делта/тета вълни, без високо-честотните вълни; Бг, хронична фаза, ЕЕГ по време на 4-ти месец.

4.2. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху развитието на епилепсията и денонощното разпределение на спонтанно повтарящите се гърчове при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове

Латентната фаза и при двете породи се характеризира с нормален ЕЕГ запис, с редки абнормени прояви, придружени от поза на вцепеняване на животното (Фиг. 4.1.1. (А,Б- Ав)). След ЕС и третирането с мелатонин, се отчита преобладаване на делта/тета вълнова активност в ЕЕГ записите без поведенчески изяви конвулсивни гърчове (Фиг. 4.1.1. Бв). Латентният период до поява на първия спонтанен припадък, определен чрез използване на продължително видео-наблюдение (24 ч/ден, 168 ч/седмица) е $12,5 \pm 7,31$ дни (средно \pm SD; обхват 6-32) при епилептичната група KA-veh група. Независимо от високата индивидуална вариабилност в този параметър, третирането с мелатонин статистически значимо удължава латентния период до поява на спонтанна епилептиформена активност на $60 \pm 32,87$ дни (средна стойност \pm стандартно отклонение /SD/; диапазон 8-109) (Mann-Whitney U-тест: $T = 74.5$, $p = 0.014$).

Спонтанните епилептични гърчове, регистрирани чрез ЕЕГ при плъховете, са придружени от поведенчески изменения по време на хроничната фаза на епилепсията (фиг. 4.1.1. (А,Б- Аг)). Поведенчески, интензитета на гърчовете не се различава между епилептичната група (KA-veh) и епилептичната група, третирана с мелатонин (KA-mel), по време на хронична фаза на епилепсията. Циркадианно разпределение на спонтанните моторни гърчове е отчетено между 9-та и 20-та седмица след ЕС, когато плъховете се характеризират с относително висока честота на пристъпите (Фиг. 4.1.1. А). Епилептичната Wistar група (KA-veh) показва по-висока честота на спонтанните моторни гърчове по време на светлата фаза (Mann-Whitney U-тест, $p < 0.005$) и имат отчетени общ брой моторните гърчове 1 241 (76%) по време на светлата фаза на денонощието, в сравнение с 385 (24%) гърчове по време тъмната фаза на денонощието (Фиг. 4.1.1. А). В сравнение с епилептичните плъхове третирани с

разтворител (KA-veh), при епилептичната група, третирана с мелатонин (KA-mel) не се наблюдава денонощен ритъм на експресия на спонтанните гърчови пристъпи (Mann-Whitney U-тест, $p = 0.113$). Като цяло, 1047 от припадъците (66%) са наблюдавани по време на светлата фаза на денонощието, в сравнение с общия брой на гърчовете - 551 (34%) по време на тъмната фаза (Фиг. 4.1.1. А).

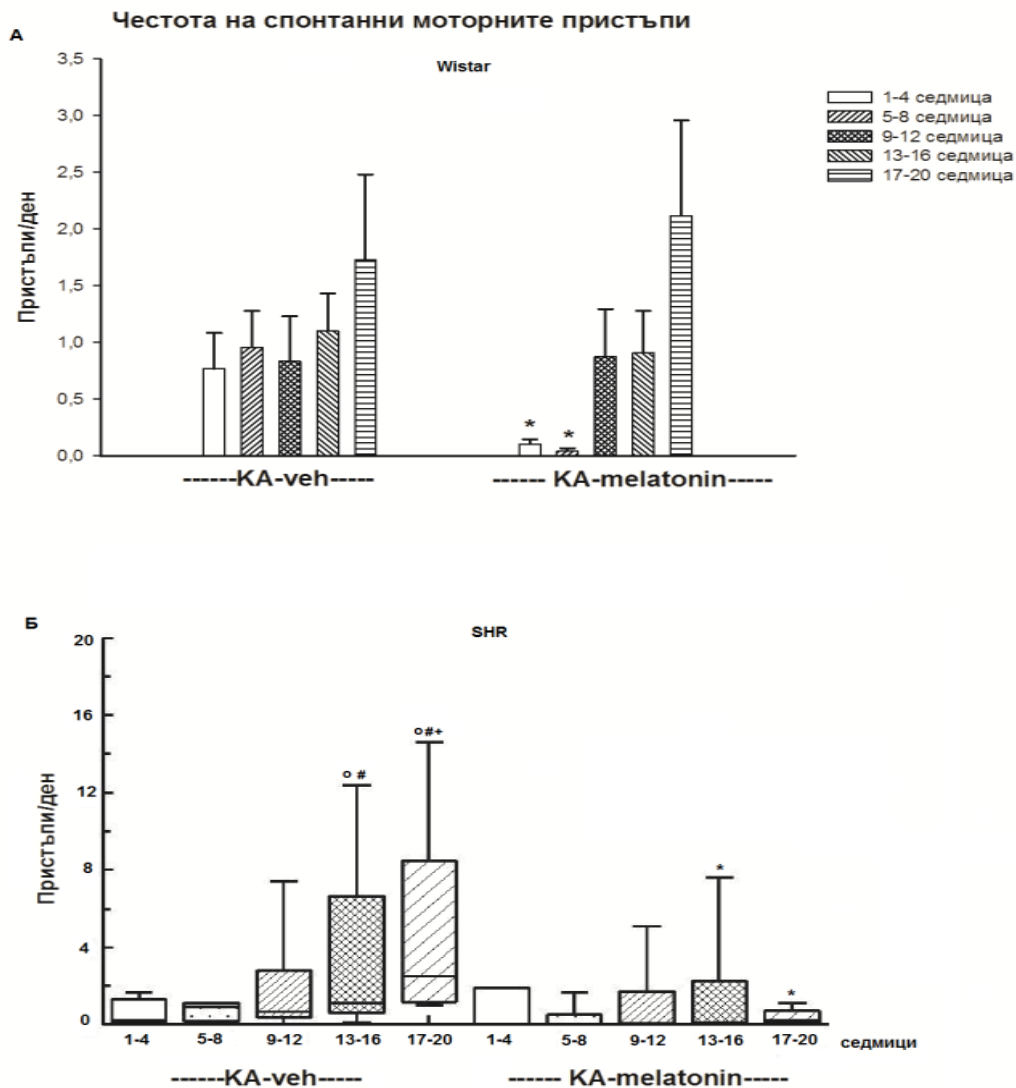


Фиг. 4.2.1. (А, Б) Циркадианен ритъм на разпределение на спонтанно повтарящи се гърчове при порода Wistar- А.) 9-20 седмици след ЕС; Б.) при порода SHR, 9-20 седмици след ЕС. Въз основа на четири плъха от двете епилептични групи- KA-veh и KA-mel, средната честота на гърчовете (на час, определена за всеки два часа от денонощието). Съкращения в легендата: KA-veh (групата с епилепсия); KA-mel (групата с епилепсия, третирана с мелатонин).

Спонтанно-повтарящите се гърчови пристъпи се наблюдават при епилептичната SHR група КА-veh и при КА-mel групата. При КА-veh групата гърчовете са повече от 3 на ден при 9 от 13 плъхове (69%), докато при КА-mel група са установени при 3 от 17 (18%) плъха. Разпространението на гърчовата активност като функция от денонощния цикъл е определена между 9-та и 20-та седмица след ЕС, когато животните показват повишена честота на гърчовете (Фиг. 4.2.1.Б). В съгласие с предишни изследвания, КА-veh група показва по-голяма интензивност на гърчовете по време на светлата фаза. (Holm-Sidak метод, $p < 0.01$) (Tchekalarova et al., 2010, 2011).

Честотата на пристъпите при породата Wistar е значително намалена само през първите 8 седмици след индуциране на ЕС, което съвпадна с периода на третиране с мелатонин (Mann-Whitney U-тест: $T = 230$; $p \leq 0,001$) (Фиг. 4.2.2. А).

Честотата на гърчовите пристъпи е статистически намалена при епилептичната група, третирана с мелатонин (КА-mel), в сравнение с епилептичната група третирана с разтворител (КА-veh) по време на последните два месеца- 13-16 и 17-20 седмица след ЕС ($*p < 0.05$) (Фиг. 4.2.2). Статистически достоверна прогресия на честотата на гърчовете, като функция от времето е установена само при епилептичните плъхове (КА-veh) ($^{0\#\#} p < 0.05$) (Фиг. 4.2.2).



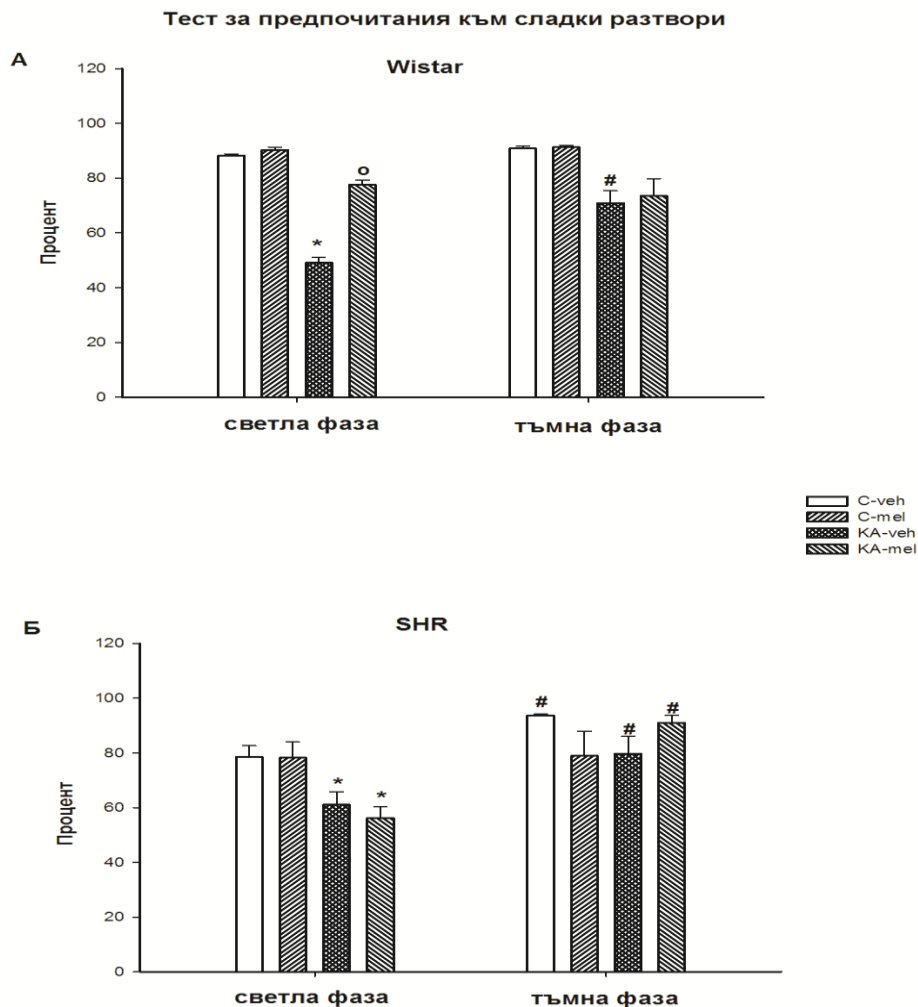
Фиг. 4.2.2. (А, Б) Честотата на разпределение гърчовете при Wistar (n=13) (А) плъхове през 1-4, 5-8, 9-12, 13-16, и 17-20 седмици след индуциране на ЕС с КА. (А). Двухфакторната ANOVA, показва значителен ефект на времето за честотата на гърчовете [$F_{3,99} = 4.195$, $p < 0.008$]. * $p < 0.05$ спрямо KA-veh група; # $p < 0.05$ в рамките на група; (Б) при породата SHR (n=13). Резултатите са обработени с помощта на двухфакторна ANOVA и показват достоверност на ефекта Време [$F_{1,142} = 4.37$, $p < 0.002$], Вещество [$F_{1,142} = 18.449$, $p < 0.001$], както и взаимодействие между факторите Време и Вещество [$F_{1,142} = 3.826$, $p < 0.006$]; * $p < 0.05$ спрямо контролната група; # $p < 0.05$, ° $p < 0.05$, + $p < 0.05$ вътре в групата (спрямо 1-4; 5-8 и 9-12 седмици след статуса). Съкращения в легендата: KA-veh (групата с епилепсия); KA-mel (групата с епилепсия, третирана с мелатонин).

4.3. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху коморбидната депресия при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове

С помощта на теста за предпочитание към сладки разтвори е изследван ефекта на мелатонина върху коморбидната депресия. Значителна разлика между групите при породата Wistar, се наблюдава само по време на светлата фаза.

Wistar плъховете с епилепсия показват понижено предпочитание към захарния разтвор ($p < 0.001$) и денонощни флуктуации ($^{\#}p < 0.012$), в сравнение с контролите, четири месеца след ЕС (Фиг. 4.3.1.). Това депресивно поведение не се наблюдава при KA-mel групата по време на светлата фаза ($p = 0.047$) (Фиг. 4.3.1. А).

При SHR денонощните различия при теста за предпочитание към захарни разтвори се установяват при контролната и KA-третирана група (Фиг. 4.3.1. Б) ($^{\#}p < 0.05$). Третирането с мелатонин не повлиява депресивния тип поведение вследствие епилептогенезата, тъй-като се наблюдава понижено предпочитание към сладкия разтвор през светлата фаза при двете епилептични групи (KA-veh и KA-mel) ($*p < 0.05$).

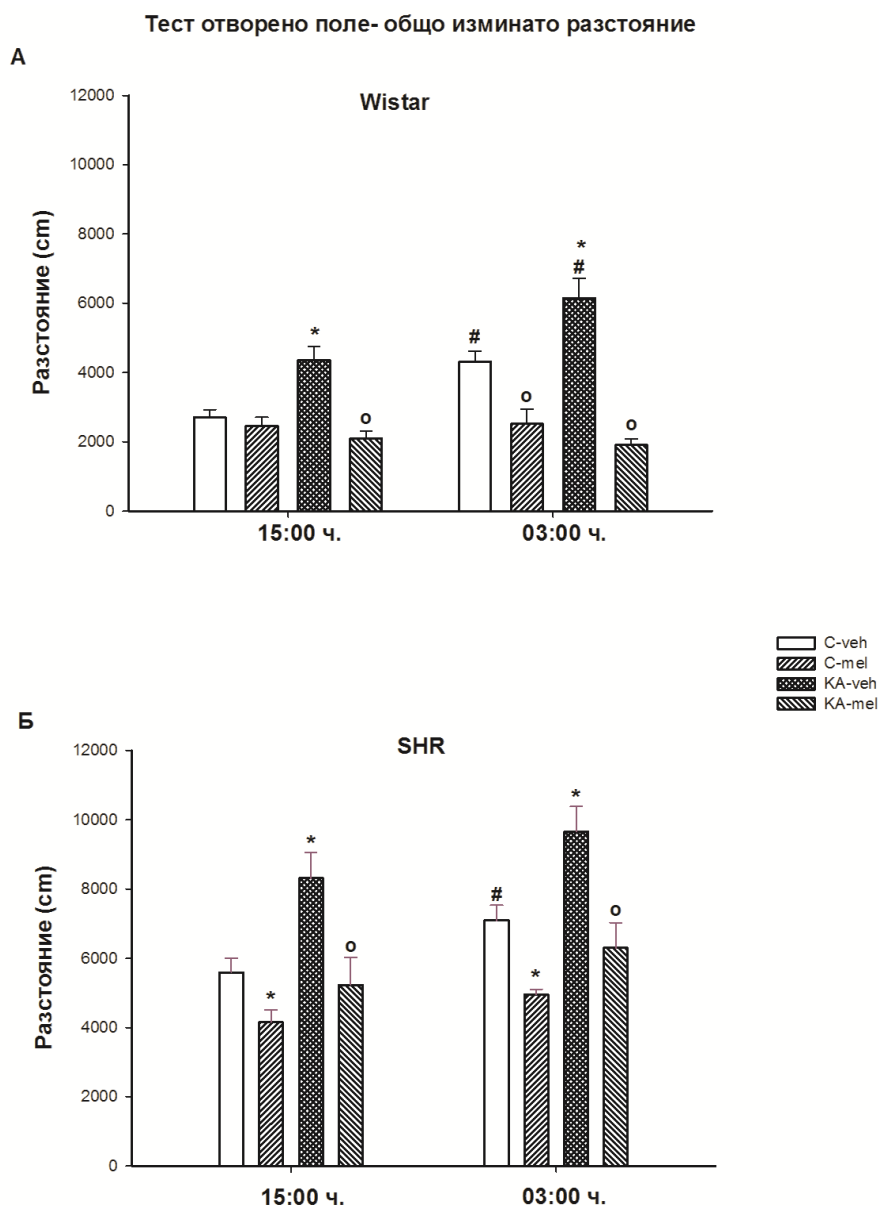


Фиг. 4.3.1. (А, Б) Денонощни вариации при Wistar плъхове (А) в предпочитанието към захарен разтвор 13-16 седмици след ЕС. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM ($n = 10$). Анализът на данните е направен с помощта на трифакторна ANOVA, показваща ефекта на Епилепсията [$F_{1,78} = 4.41$, $p = 0.039$], ефекта на действие на Фазата [$F_{1,78} = 7.04$, $p = 0.001$], както и взаимодействието между факторите Епилепсия x Фаза [$F_{1,78} = 7.20$, $p = 0.009$]; Б.) При SHR- ефект на фактор Епилепсия [$F_{1,95} = 6.712$, $p = 0.011$], ефект на Фазата [$F_{1,95} = 18.812$, $p < 0.001$] и взаимодействие на факторите Епилепсия и Фаза [$F_{1,95} = 5.629$, $p = 0.020$]. Резултатите са представени като средни стойности \pm SEM ($n = 10$). * $p < 0.05$ спрямо контролната група (C-veh); ° $p < 0.05$ спрямо епилептичната група (KA-veh); # $p < 0.05$ вътре в групата (светла спрямо тъмна фаза).

4.4. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху двигателната активност и състоянието на безпокойство, изследвано чрез теста OF при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове

Контролните плъхове от порода Wistar показват денонощни различия в двигателната активност, измерена като общо изминато разстояние и вертикална активност (брой изправяния на задни лапи) (# $p < 0.05$) (Фиг. 4.4.1. А, Б).

Третирането на животните с мелатонин премахва този денонощен ритъм ($p > 0.05$).



Фиг. 4.4.1. (А, Б). Денонощни изменения на двигателната активност (общо изминато разстояние) у Wistar плъхове при теста OF: (А). Анализът на данните с помощта на трифакторна ANOVA показва ефект на фактора Епилепсия и Вещество [$F_{1,78} = 4.04$, $p = 0.048$], както взаимодействие между факторите Епилепсия x Вещество x Фаза [$F_{1,78} = 3.89$, $p < 0.05$], ефект на фактор Епилепсия [$F_{1,78} = 122.546$, $p < 0.001$], ефект на фактора Вещество [$F_{1,78} = 11.598$, $p < 0.001$]. SHR (Б) - анализът на данните, показваща ефект на фактора Епилепсия [$F_{1,96} = 13.208$, $p < 0.001$], ефект на фактора Вещество [$F_{1,96} = 22.229$, $p < 0.001$] и ефект на фактора Фаза [$F_{1,96} = 4.936$, $p = 0.029$]. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; ^o $p < 0.05$ спрямо епилептичната група (KA-veh), # $p < 0.05$ в група (15:00 ч. срещу 03:00 ч).

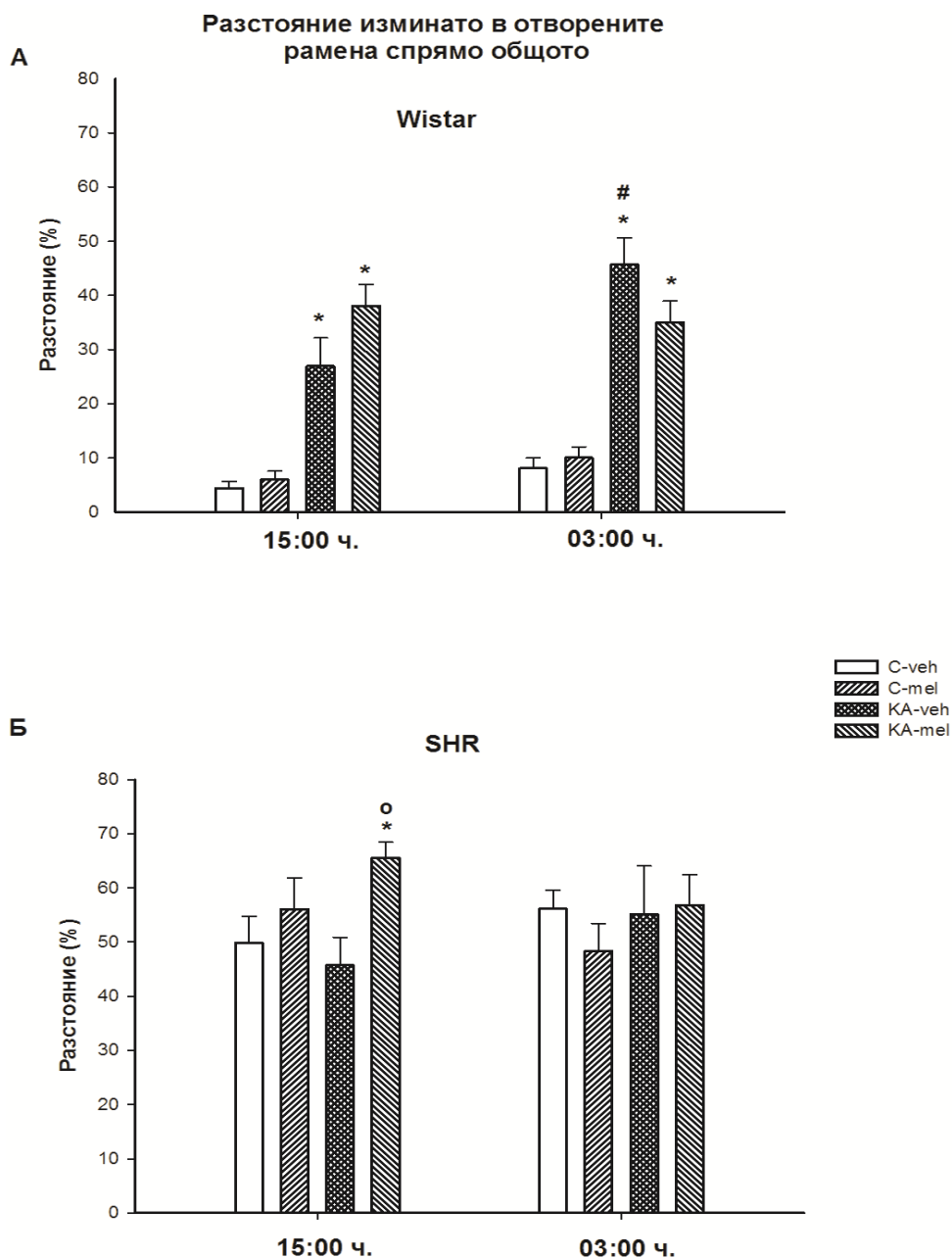
Общото изминато разстояние е намалено при контролната група, третирана с мелатонин (С-mel) по време на тъмната фаза (*p<0.05) (Фиг. 4.4.1. А). Wistar плъховете с епилепсия (КА-veh) показват хиперактивност по време на двете фази, докато при епилептичната група, третирана с мелатонин (КА-mel) е намалена повишената двигателна активност (°p<0.05) (Фиг. 4.4.1. А). Wistar групата с епилепсия (КА-veh) се характеризира с по-ниски нива на безпокойство, в сравнение с контролната група, което се определя от изминатото разстояние в централната част на апарата, от времето за престой там, както и от броя на фекалии (*p<0.05).

При SHR, контролната група животни показва денонощни разлики в двигателната активност и в изследователското поведение, установени също чрез ощото изминато разстояние (Фиг. 4.4.1. Б) (#p<0.05). Третирането с мелатонин премахва този денонощен ритъм (#p>0.05), изминатото разстояние е намалено при контролната група, третирана с мелатонин (С-mel) и през двете фази (*p<0.05) (Фиг. 4.4.1. Б). Епилептичната група (КА-veh) показва хиперактивност, без денонощни флукуации. Въпреки това, тази група проявява по-слабо изследователско поведение по време на тъмната фаза (*p<0.05) (Фиг. 4.4.1. Б). Мелатонинът намалява повишената двигателна активност до контролни нива при епилептичната група (КА-mel) (°p<0.05) (Фиг. 4.4.1. Б).

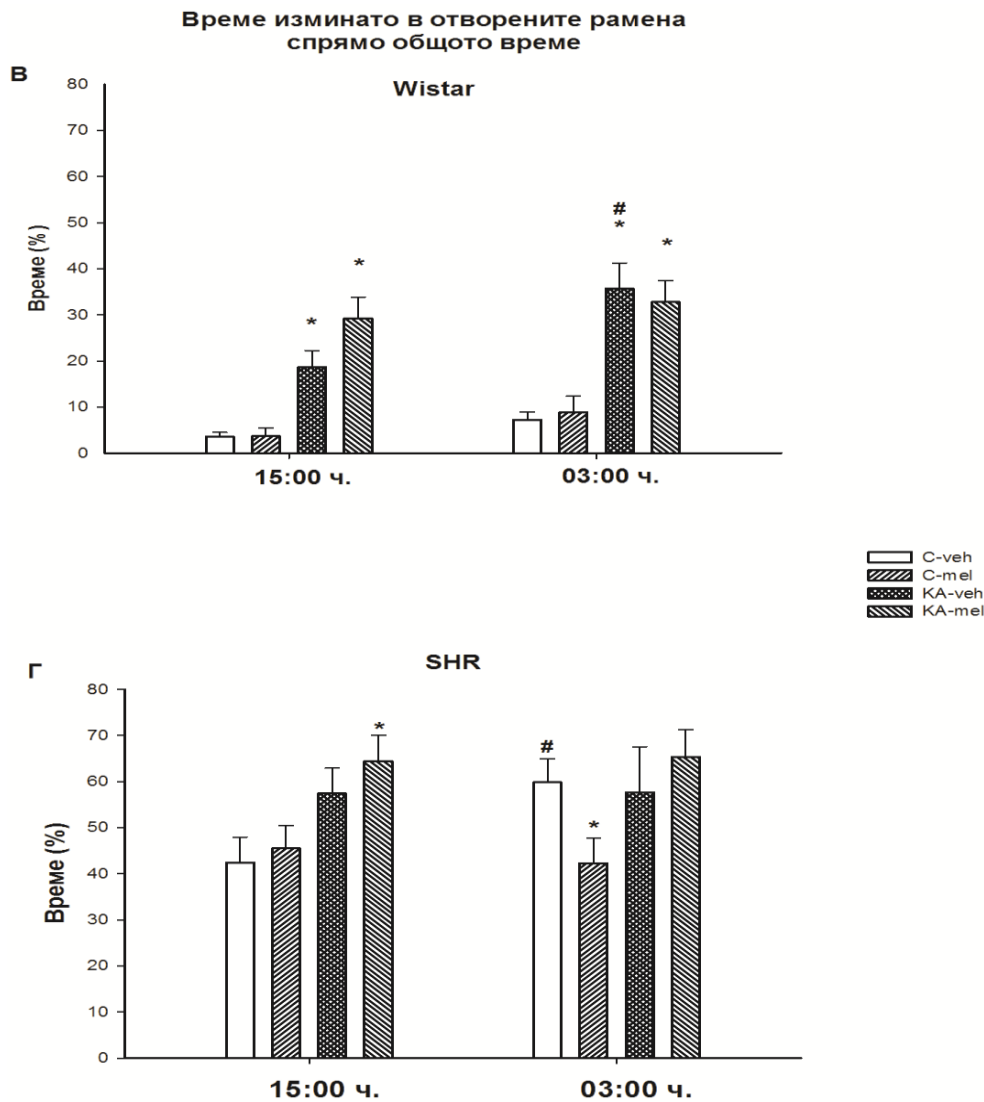
4.5. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху двигателната активност и състоянието на безпокойство, изследвано чрез теста повдигнат кръстосан лабиринт (EPM) при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове

В теста EPM, епилептичната група от порода Wistar показва увеличаване на разстоянието изминато в отворените рамена измерено в проценти по време на двете фази на денонощието (*p<0.05) (Фиг. 4.5.1. А), което е признак за понижени нива на безпокойство при КА-група. Аналогично, епилептичните Wistar плъхове, показват и по-ниско ниво на безпокойство, с повишен процент на изминатото разстояние в отворените рамена на апарата, (* p<0.05) (Фиг.

4.5.1. В). Пост-хок анализът потвърждава импулсивния тип поведение, характерен за КА-третираните плъхове и през двете фази на денонощието.



Фиг. 4.5.1. (А, Б). Денонощни различия в нивото на безпокойство- съотношение между разстоянието в отворени рамена и цялото изминато разстояние при Wistar плъховете при теста ЕРМ (А). Данните са представени като средна стойност \pm SEM ($n = 10$); Анализ на данните е извършен чрез трифакторна ANOVA, показваща ефекта на фактора Епилепсия [$F_{1,99}=141.588$, $p<0.001$]; при SHR (Б) се наблюдава ефект на взаимодействие на факторите Вещество x Фаза [$F_{1,87}=3,897$, $p=0.05$]; * $p<0.05$ спрямо контролната група; # $p<0.05$ в рамките на група (15:00 ч. срещу 03:00 ч).



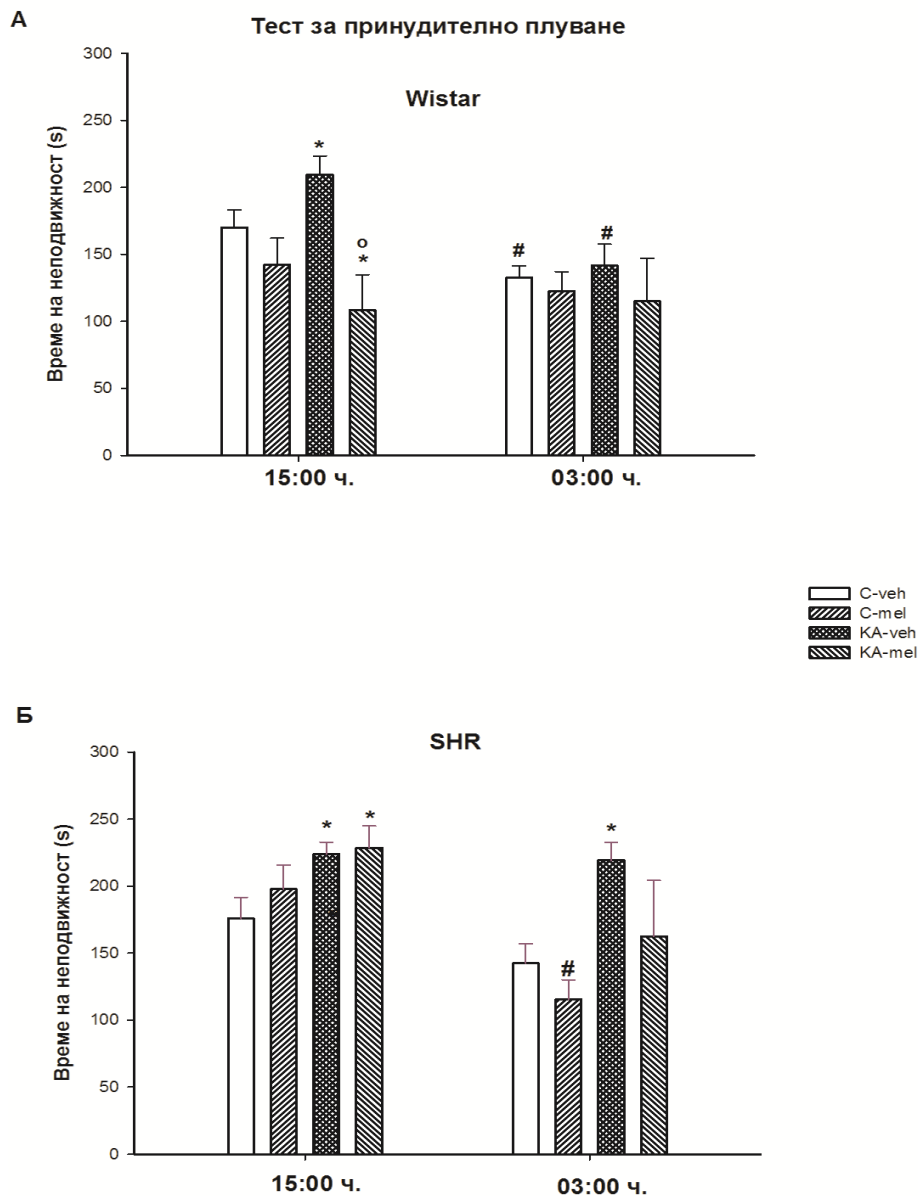
Фиг. 4.5.1. (В, Г). Денонощни различия в активността и нивото на безпокойство при Wistar плъховете: съотношение на времето, прекарано в отворените рамена спрямо общото време при теста ЕРМ. Данните са представени като средна стойност \pm SEM ($p = 10$); Анализ на данни е извършен чрез трифакторна ANOVA, показваща ефекта на фактора Епилепсия [$F_{1,109}=86.108, p<0.001$]; при SHR (Г) се наблюдава ефект на фактора Епилепсия [$F_{1,86}=8.751, p=0.004$]; * $p<0.05$ спрямо контролната група; $^{\circ}p<0.05$ спрямо епилептичната група (KA-veh), # $p<0.05$ в рамките на група (15:00 ч. срещу 03:00 ч).

За разлика от Wistar плъховете, единствено хипертензивната порода с епилепсия и третирана с мелатонин се характеризира със занижено ниво на безпокойство (увеличено изминато разстояние и време в аверсивните отворени рамена) спрямо контролната група и епилептичната група третирана с разтворител през светлата фаза на денонощния цикъл при теста ЕРМ ($^{\circ}p<0.05$) (Фиг. 4.5.1 Б, Г).

4.6. Проучване влиянието на хормона мелатонин върху коморбидна депресия - при тест за принудително плуване (FST) при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове

Тестът за принудително плуване е вторият метод, с който е изследвана коморбидната депресия при КА модел на ТЕ. Контролната и епилептична групи, порода Wistar (C-veh и КА-veh) се характеризират с денонощни флукуации ($^{\#}p<0.05$) на времето за неподвижност при теста FST. При контролните и епилептични плъхове, третирани с мелатонин (C-mel и КА-mel), отсъства денонощния ритъм по отношение на тази поведенческа реакция (Фиг. 4.6.1. А). Епилептичните плъхове проявяват депресивен тип поведение, изразен чрез увеличено време за неподвижност по време на светлата фаза ($*p<0.05$) (Фиг. 4.6.1. А). Мелатонинът облекчава депресивното поведение на плъховете с епилепсия по време на светлата фаза ($^{\circ}p<0.05$) (Фиг. 4.6.1. А).

От фиг. 4.6.1. Б се вижда, че SHR плъхове, третирани с мелатонин (C-mel) показват денонощни вариации, с намалено време на имобилизация по време на тъмната фаза ($^{\#}p<0.05$). Групата, третирана с КА се характеризира с депресивен тип поведение, без денонощни различия, докато КА-третираната с мелатонин група показва депресивен тип поведение само по време на светлата фаза ($*p<0.05$).

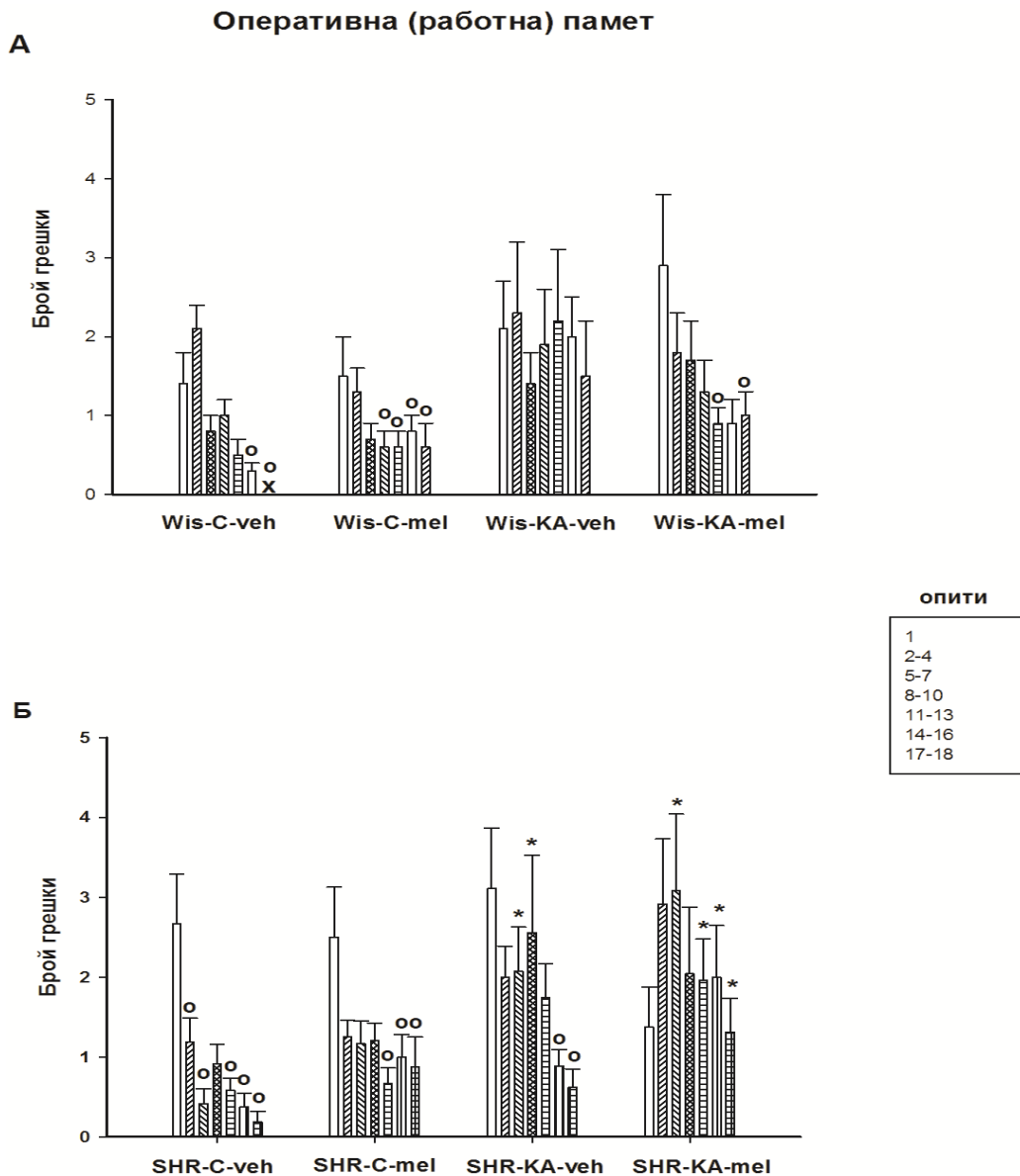


Фиг. 4.6.1. (А, Б). Денонощни различия на показателя време на неподвижност на порода Wistar (А) при теста FST. Данните са представени като средна стойност \pm SEM ($n = 10$); Анализът на данните е направен с помощта на трифакторна ANOVA, ефект на Веществото [$F_{1,104} = 11.052$, $p=0.001$], ефект на фактора Фаза [$F_{1,104} = 5.651$, $p = 0.019$]; при SHR (Б)- ефект на фактора Епилепсия [$F_{1,110} = 14.917$, $p<0.001$], ефект на Фазата [$F_{1,110} = 12.629$, $p<0.001$] също така и взаимодействие между фактор Вещество и Фаза [$F_{1,110} = 4.439$, $p=0.038$]. * $p<0.05$ спрямо контролите, # $p<0.05$ вътре в групата (15:00 ч. срещу 03:00 ч), ° $p<0.05$ спрямо епилептичната група (KA-veh).

4.7. Проучване влиянието на мелатонина върху хипокамп-зависима пространствена памет, изследвана чрез RAM тест при породи Wistar и спонтанно хипертензивни плъхове

При контролната група животни, порода Wistar (нетретирани и третирани с мелатонин) се установява намаляване броя на грешките на оперативната памет (еднофакторна ANOVA: C-veh, $p \leq 0.001$; C-mel, $p = 0.002$) и общият брой на влизания в рамената на сесия (еднофакторна ANOVA, $p \leq 0.001$), което показва добра способност за заучаване на групата (Фиг. 4.7.1. А). Анализ на резултатите чрез трифакторна ANOVA показва достоверен ефект на фактора Сесия [$F_{5,229} = 10.361$, $p < 0.001$] и ефект на фактора Епилепсия [$F_{1,260} = 42.779$, $p < 0.001$] както и взаимодействие между факторите Сесия \times Епилепсия [$F_{5,229} = 11.955$, $p < 0.001$]. Wistar групата с епилепсия (KA-veh) показва влошаване на оперативната памет без отчитане на намаляване на броя грешки във времето ($p > 0.05$) докато третирането с мелатонин подобрява този показател ($^{\circ}p < 0.05$) (Фиг. 4.7.1. А).

При SHR, Анализ на резултатите чрез трифакторна ANOVA показва достоверен ефект на фактора Епилепсия [$F_{1,231} = 21.988$, $p < 0.001$] (Фиг. 9 Б). За разлика от плъховете с епилепсия порода Wistar, епилептичните хипертензивни плъхове третирани с разтворител имат намален брой грешки на оперативната памет в 14-16 и 17-18 сесии ($^{\circ}p < 0.05$) (Фиг. 4.7.1. Б). Третираните с КА и мелатонин плъхове с епилепсия имат нарушение в пространствената памет (повишен брой грешки на оперативната памет и общ брой на влизанията в рамената за сесия, в сравнение с контролната група животни) (еднофакторна ANOVA: C-veh= 27.007, $p < 0.001$; C-veh: H: 17.505, $p = 0.008$).



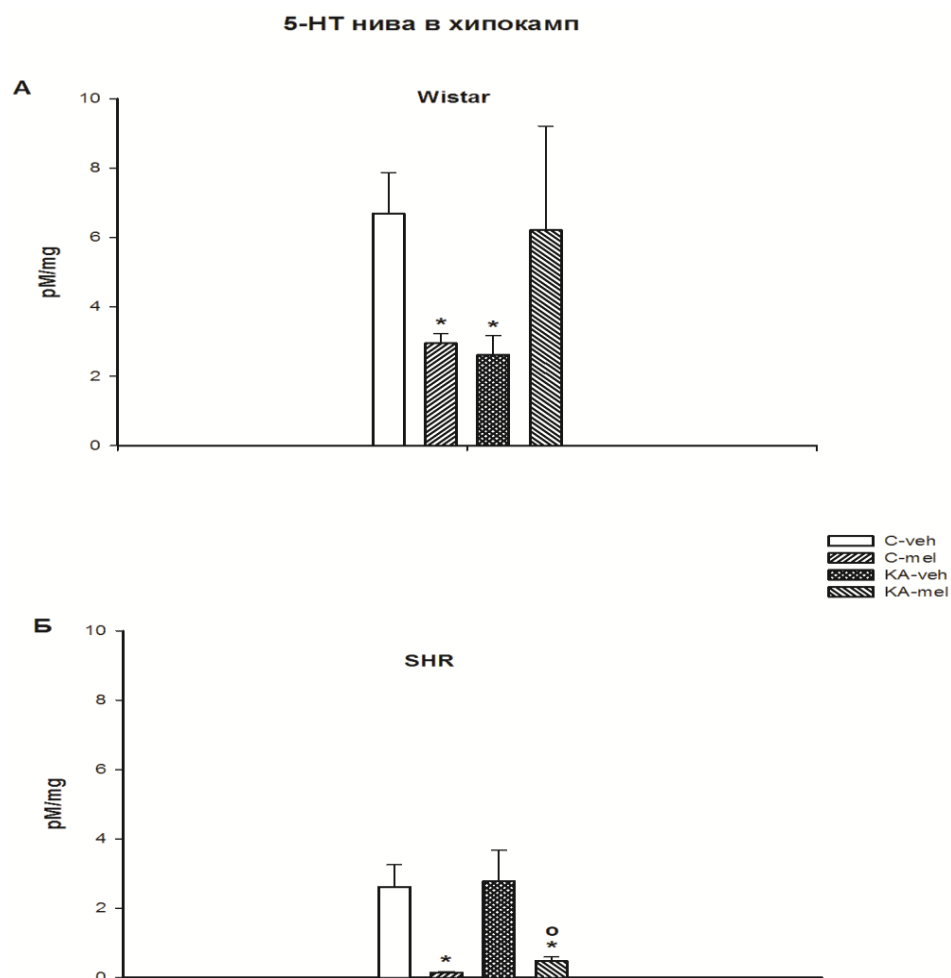
Фиг. 4.7.1. (А, Б) . Ефекти на мелатонина върху пространствената памет, отчетени чрез: А.) брой грешки на оперативна памет на порода Wistar при теста RAM (с изключение на 1-ва сесия, останалите са обединени по три при отчитане). Анализът е направен чрез еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA (C-veh: $N = 30.286$, $p \leq 0.001$; C-mel: $N = 20.668$, $p = 0.002$); Б.) при порода SHR (C-veh: $N = 27.007$, $p < 0.001$; KA-veh: $N = 17.505$, $p = 0.008$). Данните са представени като средна стойност \pm SEM, * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $\circ p < 0.05$ спрямо групата, третирана с аналогични вещества.

4.8. Проучване ефектите на хормона мелатонин върху нивата на 5-НТ в хипокамп и хистологични изменения в резултат от ЕС при породите Wistar и SHR

Чрез HPLC метод се установява, че при породата Wistar, третирана с КА се наблюдават по-ниски нива на 5-НТ в хипокампа, в сравнение с контролната група (C-veh) (* $p < 0.05$) (Фиг. 4.8.1. А). Многократното третиране с мелатонин

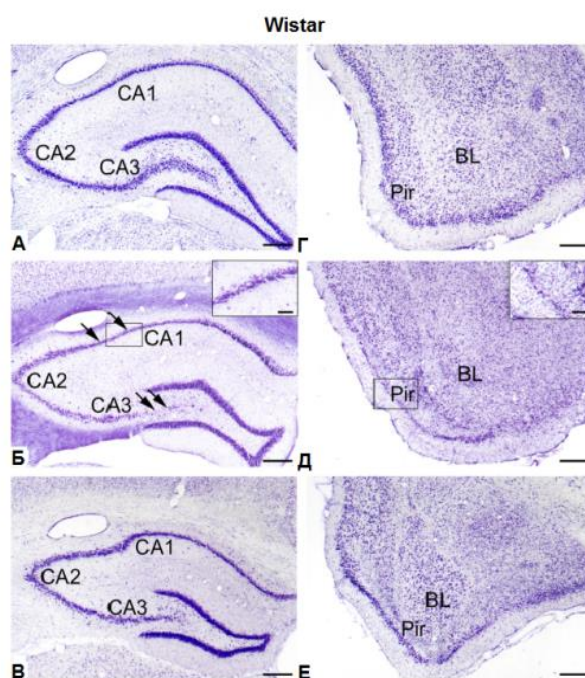
намалява хипокампапните нива на 5-НТ при контролната група (* $p < 0.05$), докато при епилептичните плъхове, мелатонинът възстановява този дефицит (Фиг. 4.8.1. А).

По отношение нивата на 5-НТ в хипокамп при породата SHR, продължителното третиране с мелатонин предизвиква намаляване нивата им при контролната (C-mel) и епилептичната група, третирана с мелатонин (KA-mel) (Фиг. 4.8.1. Б) (* $p < 0.05$).



Фиг. 4.8.1. (А, Б). Концентрация на 5-НТ в хипокампа при порода Wistar (А) в pM/mg, измерен по метода на HPLC. Резултатите са представени като средна стойност \pm SEM (n=9–10); Анализът е извършен с помощта на двуфакторна ANOVA и показва взаимодействие между факторите Епилепсия x Вещество [$F_{1,39}=4.02$, $p < 0.05$]; при порода SHR (Б)- ефект на фактора Епилепсия [$F_{1,41}=7,05$, $p < 0.05$] и фактора Вещество [$F_{1,41}=8,254$, $p < 0.05$]; * $p < 0.05$ спрямо контролната група; ° $p < 0.05$ спрямо епилептичната група (KA-veh)

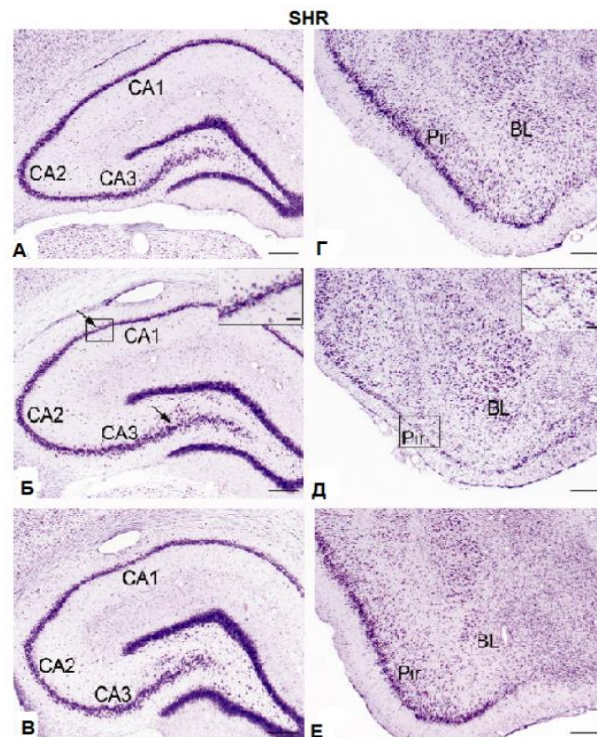
Хистологичният анализ е извършен, за да се установи степента на невронално увреждане в структури от лимбичната система. Фигура 4.8.2. показва типичното оцветяване по Nissl хипокампа, пириформена кора (Pir) и базолатералното ядро на амигдалата (BL) на контролните животни и двете групи плъхове с епилепсия (КА-veh и КА-mel).



Фиг. 4.8.2. Срези от хипокамп, пириформена кора (Pir), и базолатерално ядро на амигдалата (BL) , оцветени по Nissl при контролни Wistar плъхове (А, Г), при Wistar плъхове с епилепсия (Б, Д) и епилептични Wistar плъхове с епилепсия, третирани с мелатонин след ЕС (В, Е). Епилептичната група показва голяма загуба на неврони в хипокамп. Невронална загуба се наблюдава и в СА1 полето на хипокампа и пириформената кора (Б и Д). Епилептичните Wistar плъхове, третирани с мелатонин не се различават съществено от контролите.

Срезите от контролната група Wistar плъхове се характеризира с гъсто разположени и интензивно оцветени пирамидални неврони във всички слоеве на хипокампа, Pir и BL (Фиг. 4.8.2. А, Г). Не са открити морфологични различия между контролните групи (С-veh и С-mel). При епилептичната група (КА-veh) се наблюдават невронални увреждания на тези структури и загуба на неврони в СА1 полето на хипокампа и Pir (Фиг. 4.8.2. Б, Д).

Хистологичното изследване при SHR плъхове чрез оцветяване по Nissl на срези от дорзална хипокампална формация, Pir и BL показват, че при контролните плъхове пирамидалните неврони във всички слоеве на хипокампа (А), в Pir и BL (Г) са гъсто разположени и интензивно оцветени (фиг. 4.8.3.).



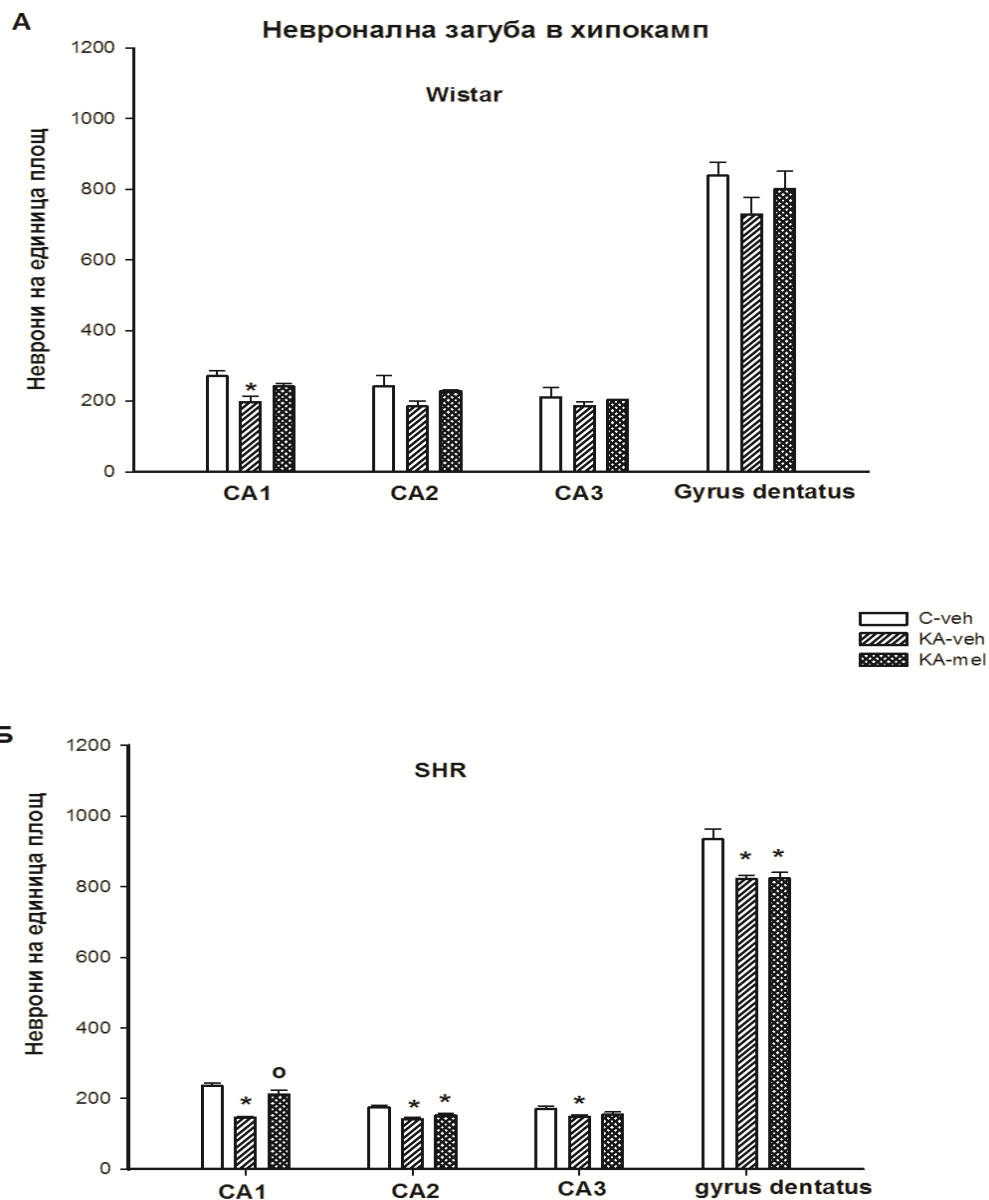
Фиг. 4.8.3. Срези от хипокамп, пириформена кора (Pir), и базолатерална амигдала (BL), оцветени по Nissl при контролни SHR плъхове (А, Г), при SHR плъхове с епилепсия (В, Д) и епилептични SHR плъхове с епилепсия, третирани с мелатонин след епилептичния статус (В, Е). Калибровка: scale bars = 200 μm (A-F); 50 μm в правоъгълните маркери с представено по-голямо увеличение (in B and E).

Третитането с КА води до загуба на неврони във всяка от изброените по-горе структури- хипокамп (Б), Pir и BL (Д). Гъстотата на невроните е статистически намалена в хипокампа, BL и Pir при групата с епилепсия. (Фиг. 4.8.3. А, Б) (* $p < 0.05$). Третитането с мелатонин оказва протективен ефект по отношение на невроналната загуба, в резултат от епилепсията, в изследваните

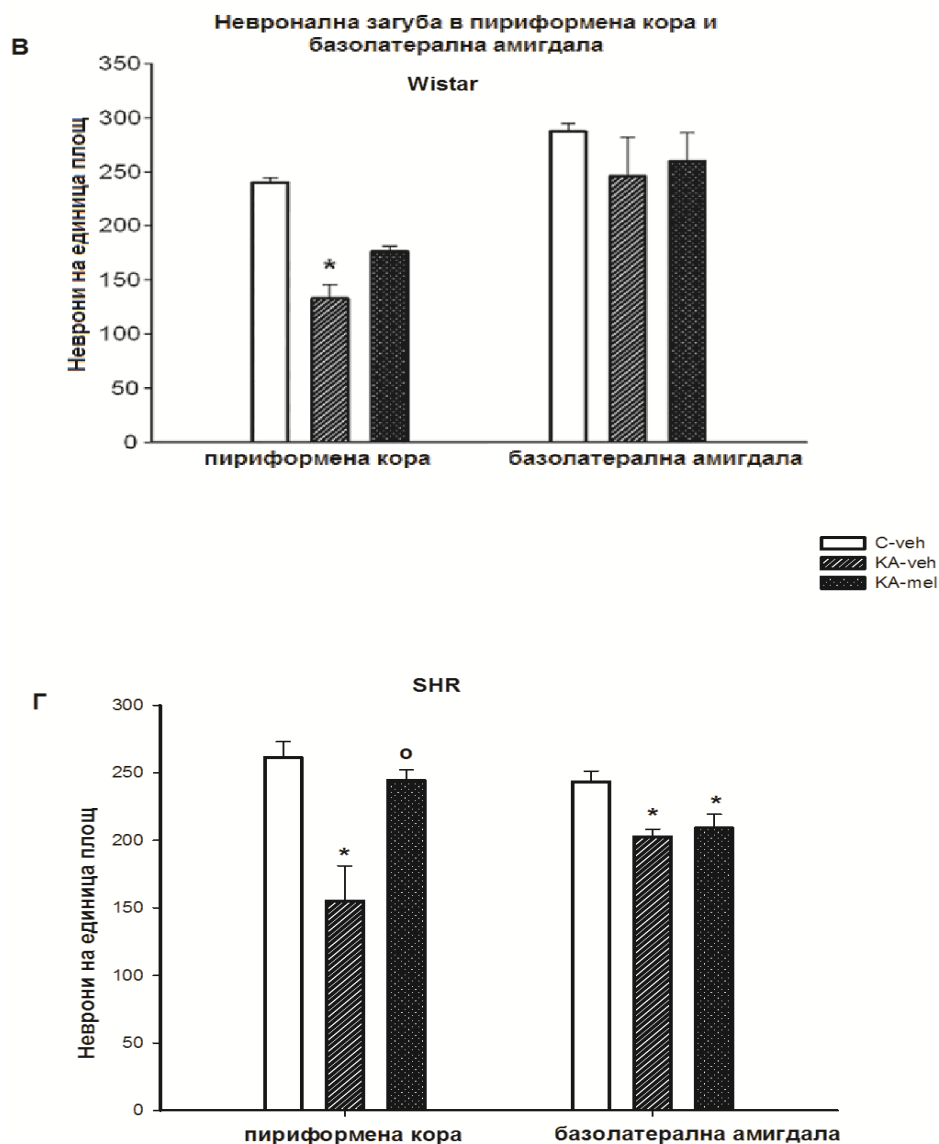
структури (Фиг. 4.8.3. В, Е), с отчетени стойности, близки до контролните нива в СА1 и СА3 полето на хипокампа и Pir ($^{\circ}p < 0.05$).

Невроналното увреждане в хипокампа на Wistar е съпътствано и от абнормено увеличаване на латералните вентрикули. Гъстотата на невроните (неврони на единица площ) е статистически намалена в двете СА1 полета на хипокампа и Pir на епилептичната група (Фиг. 4.8.2. В, Д; Фиг. 4.8.3. А, 4.8.4. А).

При епилептичните SHR плъхове, статистически достоверна невронална загуба се наблюдава в СА1, СА2 и СА3 полето на хипокампа и GD, като третирането с мелатонин показва статистически протективен ефект в СА1 полето на хипокампа (Фиг. 13 Б). В Pir и VL, също се наблюдава невронална загуба при групите третирани с КА, но в Pir, третирането с мелатонин показва протективен ефект (Фиг. 4.8.4. Г).



Фиг. 4.8.4. (А, Б). Ефект на продължителното третиране с мелатонин (10 mg/kg/ден в питейната вода, в продължение на 8 седмици) върху КА-индуцираната ТЕ при хистологични срези (оцветяване по Nissl). А./ невронална загуба в хипокампа на Wistar- CA1, CA2, CA3 полета на хипокампа и gyrus dentatus. Еднофакторна ANOVA [$F_{2,18}=7.235$, $p<0.025$]. Б/ при SHR [$F_{1,20}=7.235$, $p<0.005$]. * $p<0.05$ спрямо контролната група; ° $p<0.05$ спрямо епилептичната група.



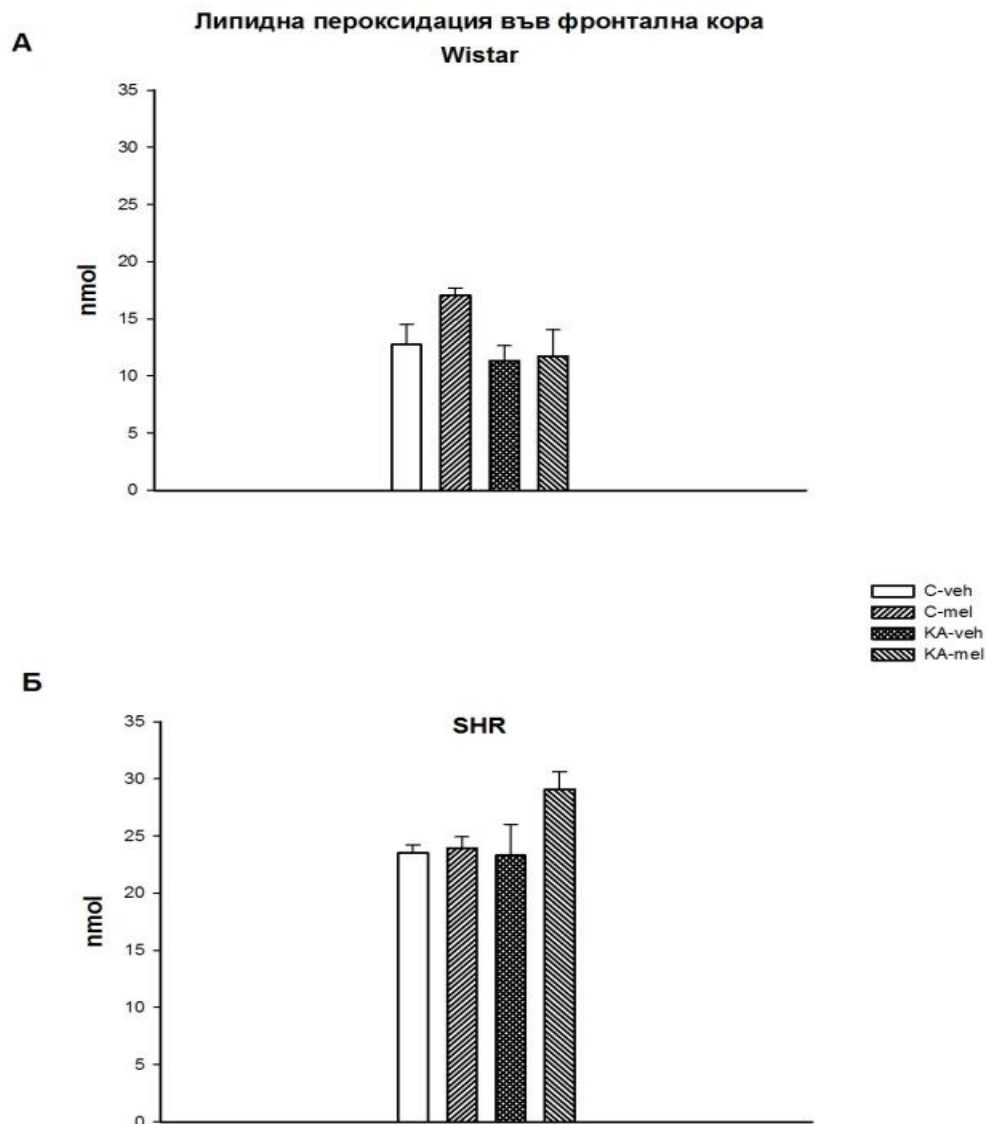
Фиг. 4.8.4. (В, Г). Ефект на продължителното третиране с мелатонин (10 mg/kg/ден в питейната вода, в продължение на 8 седмици) върху КА-индуцираната ТЕ при хистологични срези (оцветяване по Nissl). В./ невронална загуба в Pir и BL на Wistar. Еднофакторна ANOVA [$F_{2,18}=42.528$, $p<0.001$]. Г/ при SHR [$F_{1,20}= 17.255$, $p<0.005$]. * $p<0.05$ спрямо контролната група; ° $p<0.05$ спрямо епилептичната група.

4.9. Проучване ефектите на хормона мелатонин върху оксидативния стрес

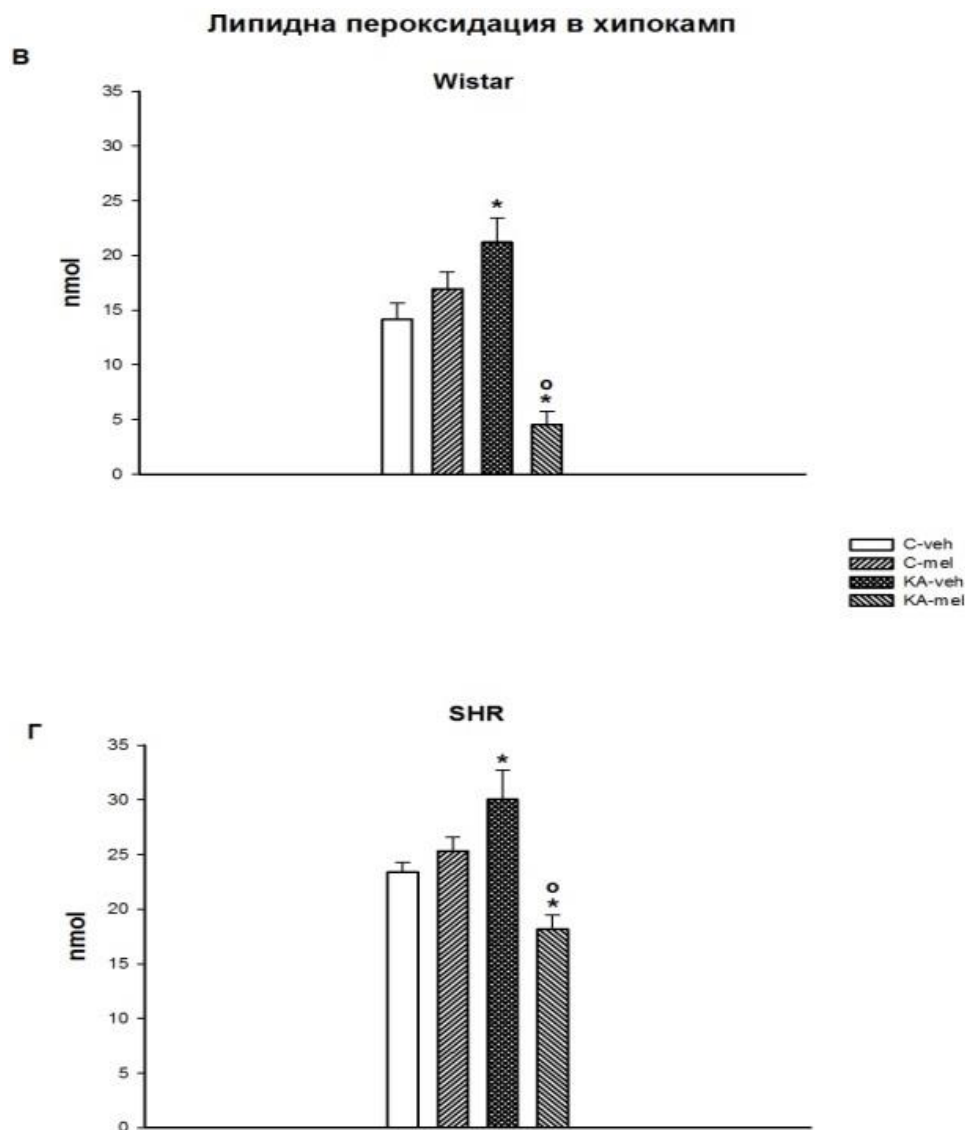
4.9.1. Ефекти на хормона мелатонин върху нивото на липидна пероксидация

Контролните SHR показват по-високо ниво на оксидативен стрес от нормотензивните плъхове Wistar с повишена липидна пероксидация във

фронтална кора (Фиг. 4.9.1.1. А, Б). Не се наблюдават промени в липидната пероксидация в тази структура при групите с епилепсия и при двете изследвани породи плъхове. Каинат-индуцираният ЕС провокира значително повишаване на нивото на липидна пероксидация в хипокампа както на порода Wistar (* $p = 0.008$), така и на SHR плъхове докато третирането с мелатонин статистически значимо намалява оксидативния стрес (* $p < 0.05$ спрямо контролна група, ° $p < 0.05$ спрямо KA-veh група) (Фиг. 4.9.1.1. В, Г).



Фиг. 4.9.1.1. (А, Б). Липидна пероксидация в фронталния кора (А) Wistar и SHR (Б). Данните са представени като средни стойности \pm SEM ($n = 10$). Анализът на данните е направен чрез двуфакторна ANOVA.

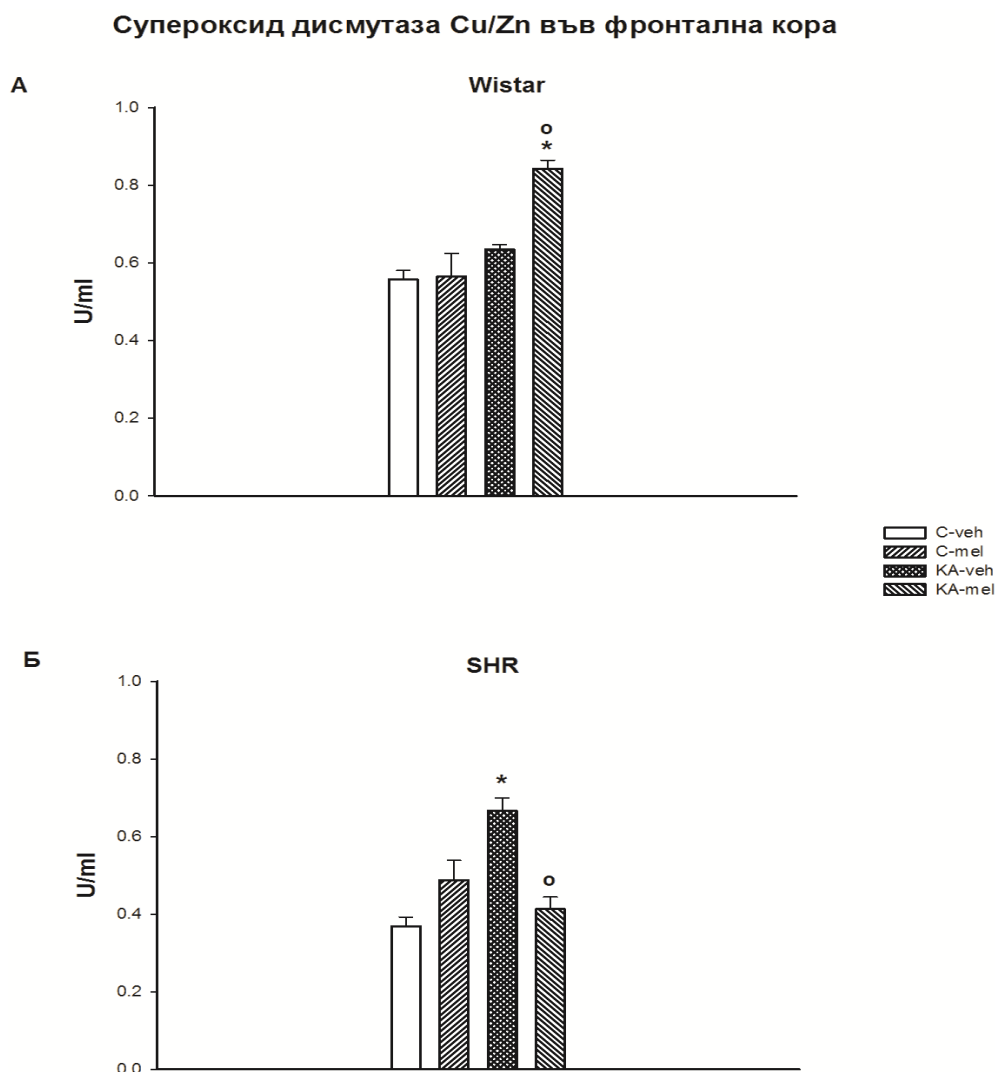


Фиг. 4.9.1.1. (В, Г). Липидна пероксидация в хипокамп (В) Wistar и SHR (Г). Данните са представени като средни стойности \pm SEM ($n = 10$). Анализът на данните чрез двуфакторна ANOVA, показва основен ефект на третирането с мелатонин [$F_{1,30} = 15,566$, $p < 0,001$] и взаимодействие на факторите КА x вещество [$F_{1,30} = 30,538$, $p < 0,001$] за данните от порода Wistar (В); взаимодействие на факторите КА x вещество [$F_{1,32} = 16,371$, $p < 0,001$] за данните от порода SHR (Г); * $p < 0.05$ спрямо C-veh група; ° $p < 0.05$ спрямо KA-veh група.

4.9.2. Ефекти на мелатонина върху активността на цитозолна супероксид дисмутаза (Cu/Zn- SOD)

Контролните SHR показват по-ниски ниви на цитозолна SOD Cu / Zn във фронтална кора, за разлика от контролите на Wistar. Индуцираният ЕС с КА не повлиява ензимната активност на Wistar плъхове, но причинява адаптивното й усилване както във фронтална кора, така и в хипокампа на SHR (* $p < 0.001$) (Фиг.

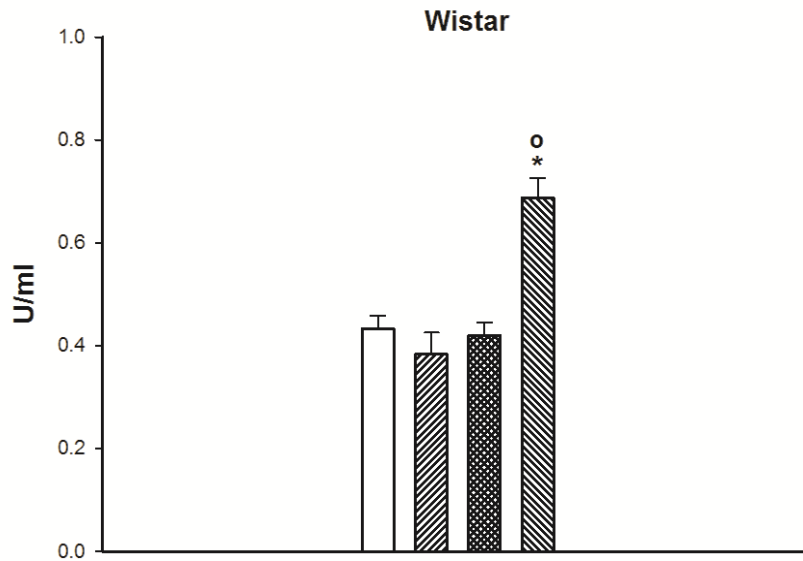
4.9.2.1. Б, Г). Хроничното третиране с мелатонин увеличава SOD Cu/Zn активността и в двете изследвани мозъчни структури на Wistar плъхове след ЕС (* $p < 0.001$) (Фиг. 4.9.2.1. А, В). От друга страна, при КА-третирани SHR мелатонинът потиска КА-индуцираната SOD Cu /Zn активност във фронтална кора ($^{\circ}p < 0.001$) (Фиг. 4.9.2.1. Б). Третирането с мелатонин повишава активността на SOD Cu/Zn при контролни SHR в хипокамп (* $p = 0.016$) (Фиг. 4.9.2.1. Г).



Фиг. 4.9.2.1. (А, Б). Активност на цитозолната супероксид дисмутаза (SOD Cu /Zn) във фронтална кора при Wistar (А) и SHR (Б). Данните са представени като средни стойности \pm SEM ($n = 10$). Анализът на данните чрез двуфакторна ANOVA показва основен ефект на КА-третиране [$F_{1,27} = 39,652$, $p < 0.001$] и ефект на мелатонина [$F_{1,27} = 14,684$, $p < 0.001$] за данните от графика (Д). При SHR (Е) се прояви ефект на взаимодействие на фактора КА x вещество [$F_{1,30} = 24.533$, $p < 0.001$]; * $p < 0.05$ спрямо C-veh група; $^{\circ}p < 0.05$ спрямо KA-veh група.

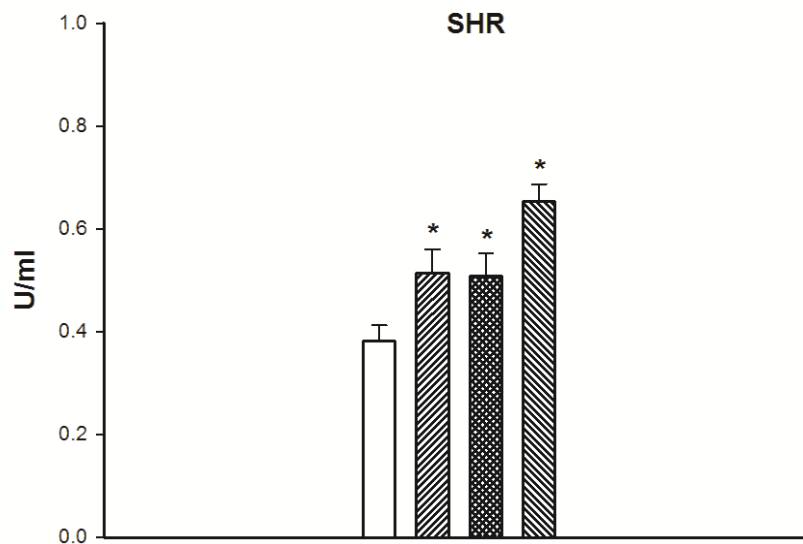
Супероксид дисмутаза Cu/Zn в хипокамп

В



C-veh
 C-mel
 KA-veh
 KA-mel

Г



Фиг.4.9.2.1. (В, Г). Активност на цитозолната супероксид дисмутаза (SOD Cu/Zn) в хипокамп при Wistar (В) и SHR (Г). Данните са представени като средни стойности \pm SEM ($n = 10$). Анализът на данните чрез двуфакторна ANOVA показва основен ефект на КА-третиране [$F_{1,36} = 17,648$, $p < 0.001$] и ефект на взаимодействие на фактора КА x вещество [$F_{1,36} = 21,124$, $p < 0.001$] за данните от графика (Ж) и ефект на фактора епилепсия [$F_{1,25} = 11,078$, $p = 0.003$] и ефект на фактора вещество [$F_{1,25} = 12,260$, $p = 0.002$]; * $p < 0.05$ спрямо C-veh група; ^o $p < 0.05$ спрямо KA-veh група.

5. ОБСЪЖДАНЕ

Анализът на получените резултати показва, че продължителното третиране с хормона мелатонин в доза 10 mg/kg, в продължение на 8 седмици, с начало 3 часа след предизвикан с КА ЕС, оказва протективно действие върху някои от вредните въздействия на епилептогенезата, свързани с поведенческите промени, включително импулсивен тип поведение, коморбидна депресия и дефицит на пространствената памет, намалени нива на серотонин в хипокампа и увреждане на невроните в лимбичните структури.

Според някои клинични изследвания, пациентите с епилепсия показват повишена честота на припадъците по време на покой (тъмна фаза), докато нощните животни, каквито са плъховете, получават по-често гърчови пристъпи по време на неактивната за тях, светла фаза (Arida et al., 1999; Stewart and Leung, 2003; Goffin et al., 2007). В съгласие с литературни данни и предишни резултати на нашия екип, породата Wistar се характеризира с циркадианен ритъм на разпределение на спонтанните епилептични гърчове (Arida et al., 1999; Stewart and Leung, 2003; Raedt et al., 2009). Породата SHR, която е подходящ модел за изследване на връзката между хипертония и епилепсия, показва нарушен циркадианен ритъм, което от своя страна прави породата подходящ модел за изследване и в хронобиологичен аспект (Minami et al., 1988; Fang et al., 2000). Десинхронизацията във физиологичните циркадианни ритми придружават сърдечно-съдовите отклонения при този модел животни. Поради тази причина, третирането с мелатонин е адекватен подход за превенция срещу нарушаване на тези ритми. В съгласие с литературните данни и наши предишни изследвания (Arida et al., 1999; Stewart and Leung, 2003, Tchekalarova, 2010, 2011) настоящите проучвания показват денонощни колебания в появата на спонтанни гърчови пристъпи у двете породи плъхове, нормотензивните Wistar плъхове и епилептични SHR плъхове при КА модел на темпорална епилепсия. В статията си Hofstra et al. (2011) установяват, че произходът на темпоралните и фронтални

пристъпи са синхронизирани при хората от хормоналния маркер на циркадианната система- мелатонин, допускайки, че циркадианните ритми и епилептичните гърчовете са тясно свързани. Проучванията ни показват, че многократно прилагане на хормона мелатонин премахва денонощните флукутации в проявата на спонтанните гърчови пристъпи и при двете породи плъхове. Третирането с мелатонин по време на епилептогенезата премахва циркадианния ритъм на гърчовата активност и намалява честотата на гърчовете по време на стабилната хронична фаза на епилепсията. Въпреки това, резултатите от нашето изследване не бяха достатъчни, за да се разкрие влиянието на циркадианните ритми върху гърчовата активност, защото не бяха измерени плазмените нива на мелатонина и неговото отражение върху разпределението на гърчовете. За целта е необходимо да бъдат направени бъдещи изследвания, за да бъде доказана хипотезата за връзката между циркадианните ритми и появата на гърчове при експерименталните животни. Бъдещи изследвания и анализ на хормоналния маркер, биха могли да отговорят на въпроса за точната роля на хормона мелатонин в ендогенния механизъм на циркадианния ритъм на гърчовата активност.

При Wistar плъхове с епилепсия, третирани с мелатонин в периода на епилептогенезата в продължение на 8 седмици, се наблюдава достоверно увеличаване на латентния период до появата на първия спонтанен припадък. Анализът на честота на спонтанната гърчовата активност при Wistar плъховете за период от 5 месеца след ЕС показва, че мелатонинът проявява антиконвулсивен ефект, установен по време на третиране, а след преустановяването му, се наблюдава засилване на гърчовата активност. Независимо от това, мелатонинът не спомага за предотвратяване развитието на епилепсия. Дневният прием на мелатонин в доза 10 mg/kg в продължение на 60 дни, започвайки 3 часа след начало на ЕС, оказва по-ефективно действие върху гърчовата активност при породата SHR, в сравнение с породата Wistar, тъй като потиска активността на пристъпите и след прекратяване на третирането, т.е. през четвърти и пети месец

след ЕС. Може да се предположи, че тези порода-зависими различия спрямо ефекта на мелатонина при КА-модел на темпорална епилепсия, могат да бъдат свързани с едновременното намаляване на кръвното налягане, наблюдавано при епилептичните SHR. Хроничното хипертензивно състояние предизвиква кръвно-мозъчна дисфункция в хипокампа на SHR (Ueno et al., 2002). Тази порода се препоръчва като подходящ модел на съдова деменция поради появата на неблагоприятни промени в хипокампа и астроглиална реакция, подобни на тези, наблюдавани при невродегенеративни заболявания с когнитивно увреждане (Sabbatini et al., 2002).

В настоящата работа са използвани поведенчески тестове даващи информация за промени в състоянието на тревожност, депресивен тип поведение, двигателна активност, паметта. С помощта на изследванията се установява, че Wistar плъховете с епилепсия се характеризират с хиперактивност, понижено ниво на безпокойство и липса на денонощна динамика в поведенческите отговори. При тази порода мелатонинът облекчава хиперлокомоцията и промените в нивото на безпокойство в резултат от епилептогенезата при теста отворено поле. Хиперактивността, която беше наблюдавана при Wistar и SHR плъхове с епилепсия и третирани с мелатонин, бе значително намалена. Мелатонин-третираната група SHR с епилепсия се характеризира с понижена двигателна активност и намаляване на импулсивния тип поведение, подобно на показания ефект при плъховете порода Wistar.

Мелатонинът оказва ефект върху двигателната активност и при теста повдигнат кръстосан лабиринт, като се наблюдава облекчение в хиперактивността при Wistar плъхове с епилепсия. Въпреки това, пониженото ниво на безпокойство, което е характерно за плъхове по време на хронична фаза на епилепсия, не се повлиява от мелатонина при този теста. В нашето изследване, наблюдаваните разлики в ефекта на мелатонин върху тревожността при два отделни теста, могат да бъдат свързани със спецификата на използвания тест. В

съответствие с това, се установява, че еднократно третиране с мелатонин има анксиолитичен ефект и води до намаляване на двигателната активност (Loiseau et al., 2006). Бихме могли да предположим, че по-малкото изминато разстояние в централната, аверсивна част при теста отворено поле на Wistar групата с епилепсия, третирани с мелатонин може да се дължи предимно на ефекта на мелатонин върху двигателната активност. За разлика от Wistar плъховете, където мелатонинът благоприятства намаляването на гърчовете, включително депресивния тип поведение, породата SHR с епилепсия (нетретирани и третирани с мелатонин) се характеризира с ниско ниво на тревожност при теста повдигнат кръстосан лабиринт. Мелатонинът намалява хиперактивността характерна за този модел на епилепсия, подобно на Wistar плъховете), без да повлияе ниското ниво на безпокойство при теста EPM, което е характерно за плъхове с епилепсия. Различията в ефектите на мелатонина, установени при двата теста за тревожност- тест отворено поле и повдигнат кръстосан лабиринт, може да се дължат на различната чувствителност на тестовете при този модел (Loiseau et al., 2006).

Изследванията ни показват, че КА модел на темпорална епилепсия е подходящ за изучаване на коморбитните депресивни състояния, които са често срещани по време на хроничната фаза на епилепсията.

Нормотензивните Wistar плъхове с епилепсия се характеризират с депресивно поведение, проявено при тест за изследване на анхедония през светлата фаза на денонощния цикъл и поведение на заучена безпомощност при теста за принудително плуване. За разлика от други автори, които са изследвали развитието на коморбидна депресия при други модели на епилепсия, ние установяваме, че този тип поведение се характеризира с денонощни флукуации и се наблюдава само по време на неактивния период при Wistar плъхове, т.е. по време на светлата фаза, период, който се характеризира същевременно с по-висока честота на припадъците. От друга страна, прилагането на мелатонин след ЕС

оказа благоприятен ефект върху КА-предизвиканите отклонения в поведенческите отговори, което корелира добре с намалената честота на спонтанната гърчова активност в периода на прилагането му. Нашите резултати са в съответствие с предишни проучвания, при които е установено, че мелатонинът има ефект при модели на депресия след хронично приложение, но не и след остро въвеждане (Brotto et al., 2000; Hill et al., 2003; Micale, et al., 2006).

Контролите SHR се характеризират с депресивен тип поведение при теста за предпочитание към сладки разтвори по време на светлата фаза, в сравнение с интактните Wistar плъхове (Tchekalarova et al., 2011). Мелатонинът не повлиява депресивния тип поведение, развит по време на епилептогенезата.

При теста за принудително плуване, Wistar плъхове с епилепсия показват депресивен тип поведение, изразен чрез удължено време на неподвижност по време на светлата фаза. Третирането с мелатонин облекчава тази поведенческа реакция при плъховете с епилепсия.

Спонтанните хипертензивни контролни плъхове, третирани с мелатонин се характеризират с денонощни вариации при теста за принудително плуване, с по-малко време на неподвижност по време на тъмната фаза. Епилептичната група показва депресивен тип поведение, без денонощни различия, докато при КА-третираната с мелатонин група е отчетена депресивен тип реакция само по време на светлата фаза.

Предполага се, че дефицитът на серотонинергичната система има решаваща роля в механизмите на депресия (Graeff et al., 1996) и предразположеност към епилепсия (Jobe et al., 1999). Мелатонинът понякога се използва като адювант при лечение на депресия, тъй като този хормон е краен продукт от метаболизма на 5-НТ. Системното прилагане на мелатонин във фармакологични дози, потиска освобождаването на 5-НТ от мозъка (Chuang, and Lin, 1994). От друга страна, мелатонинът предизвиква отделянето на 5-НТ по време на светлата фаза в хипокампа (Monnet, 2002). Тази зависима от фазата активност на действието на

хормона върху освобождаването на 5-НТ, е в подкрепа на установения в нашето изследване антидепресивен ефект на мелатонинът само през светлата фаза.

Експериментални и клинични данни, са в съгласие с установения и в нашите проучвания дефицит на 5-НТ в хипокампа на Wistar плъховете, като следствие от връзката между епилепсията и депресията (Tchekalarova et al., 2011; Mazarati et al., 2009; Jobe et al., 1999; Montgomery et al., 2004; Kondziella et al., 2007). В това изследване, установихме, че мелатонинът възстановява нарушените нива на 5-НТ в хипокампа при плъхове с епилепсия, а при контролната група, намалява тези нива. Тези данни са в съгласие с предишните изследвания, показващи, че хронично прилагане на ниски дози мелатонин в питейната вода, предизвиква дефицит в моноаминергиновите невротрансмитери (Esteban et al., 2010).

Нашите изследвания показват, че интактните SHR проявяват атипично поведение и биохимични параметри, подобни на тези при плъхове с епилепсия. Контролните и епилептични SHR имат ниско ниво на безпокойство, което корелира с понижени нива на 5-НТ и допамин в хипокампа (Tchekalarova et al., 2011). От друга страна е известно, че 5-НТеригчната невромедиаторна система играе важна роля при депресията, докато антидепресивния ефект на мелатонина се предполага, че се постига с помощта на 5-НТ_{2A} рецепторите, тъй като е доказано, че хормонът действа като антагонист на 5-НТ_{2A} (Gorzalka et al, 1999; Raghavendra and Kulkarni, 2000). Мелатонинът предизвиква освобождаване на 5-НТ в хипокампа, който механизъм се предполага, че има определяща роля за антидепресивната ефикасност на инхибиторите на обратното поемане на 5-НТ (Mone et al., 2002). За разлика от Wistar плъхове с епилепсия, при които екзогенно приложеният мелатонин възстановяваше нарушения баланс на 5-НТ, мелатонинът не показва възстановяващ мозъчните нива ефект при SHR с епилепсия, тъй като интактните хипертензивни плъхове се характеризират с нарушения в 5-НТеригчната невромедиаторна система в хипокамп. *Ин vivo* данни

обясняват връзката между освобождаването на НА и секрецията на мелатонин (Drijhout et al., 1996), което предполага, че дневният ритъм на синтеза на мелатонин зависи от активността на симпатиковите влакна от супрахиазматичното ядро. При SHR се наблюдаваха нарушения в НАергичната невромедиация, което предполага промени в циркадианните ритми на ендогенното освобождаване на НА.

Нашите изследвания са в съгласие с литературните данни, показващи нарушения на паметта при теста RAM при плъхове, тествани пет месеца след ЕС (Detour et al., 2005; Letty et al., 1995). Wistar плъховете с епилепсия се характеризират с дефицит или нарушения на оперативната пространствена памет. Нарасналият брой на посетените рамена на сесия отразява влошаване на възможност за обучение и стратегия за ориентиране при плъхове с епилепсия. Освен това, тези плъхове показват по-висока двигателна активност, в сравнение с контролната група плъхове. Многократното третиране с мелатонин не подобрява пространствената памет при контролните Wistar плъхове. Има данни, които доказват, че мелатониновото третиране потиска дълготрайно потенциране на (LTP) в хипокампа, за което е известно, че корелира с дефицит на пространствената памет (Niewoehner et al., 2007) и предизвиква отслабване на паметта при контролните плъхове (Feng et al., 2002). В групата на Wistar плъховете с епилепсия, третирани с мелатонин установяваме подобряване на пространствената памет с намаляване на грешките на оперативната памет, по време на 18-дневните тренировки. Тези данни са в противоречие с констатацията, че третирането с мелатонин уврежда визуално-пространствената памет (Cao et al., 2009; Soto-Moyano et al., 2006). Тези несъответствия могат да възникнат от различните механизми, участващи в ефектите на мелатонина при физиологични и патофизиологични условия.

Спонтанно хипертензивните животни демонстрират различия по отношение на обучителната способност, в зависимост от използваните методики.

Докато някои автори съобщават за нарушена пространствена ориентация при SHR в сравнение с Sprague-Dawley плъхове (Gattu et al, 1997;. Diana, 2002;. De Bruin et al, 2003) или нормотензивни плъхове Wistar (Nakamura-Palacios et al., 1996.; Hernandez et al., 2003), други установяват по-добро представяне на SHR в сравнение с нормотензивни породи плъхове (Lukaszewska and Niewiadomska, 1995). При SHR се наблюдава увреждане на хипокамп-зависимата пространствена памет в сравнение с контролната група.

При контролната Wistar група се наблюдават гъсто разположени и интензивно оцветени пирамидални неврони във всички слоеве на хипокампа, пириформения кортекс и BL на амигдалата. От друга страна, се регистрират невронални увреждания на тези структури и загуба на неврони в CA1 полето на хипокампа и Pir при епилептичната група Wistar. Невроналното увреждане в хипокампа е съпътствано и от абнормено увеличаване на латералните вентрикули. Епилептичните SHR също се характеризират със загуба на неврони в хипокампа, BL на амигдалата и и пириформена кора - структури, които са уязвими към невротоксичния ефект на КА (Strafstrom and Sutula, 2005). В литературата има данни за хипокампални невропатологии, включително загуба на неврони, най-вече в CA1 полето, и астроцитна реактивност при интактни възрастни SHR (Sabbatini et al, 2000; Pietranera et al, 2006). Chen and Buckmaster (2005) доказват, че третираните с КА Sprague-Dawley плъхове имат сериозни увреждания най-често в амигдалата и обонятелната кора. Въпреки това, при мъжки SHR се наблюдава по-засилена неврогенеза в GD, в сравнение с мъжките Sprague-Dawley плъхове (Perfilieva et al., 2001). Неврогенезата в GD и астроглията открити при SHR (Perfilieva et al., 2001. Pietranera et al, 2006) се потвърждава и от резултатите при модели на лимбична епилепсия и при хора с ТЕ (Parent et al., 1997). Тези резултати предполагат наличие на порода-специфични различия по отношение на мозъчните увреждания, предизвикани от ЕС.

Множество изследвания подкрепят идеята, че мелатонинът е потенциално ефективен при лечение на акутни мозъчни увреждания, Епифизният хормон

оказва антиоксидантно, протективно действие и предотвратява КА-индуцирани невронални лезии и ROS-медираната апоптоза на нервната клетка (Chung and Han, 2003). В допълнение към антиоксидантите, противовъзпалителни и невропротективни свойства в различни *in vitro* и *in vivo* животински модели, мелатонинът значително подобрява обучението и паметта при патофизиологични условия (Mevissen and Ebert, 1998; Chung and Han, 2003; Costa-Lotuf et al., 2002). Нашите изследвания показват, че мелатонинът проявява мощен невропротективен ефект в специфични мозъчни структури, свързани с пространствената памет, каквито са СА1 полето на хипокампа и пириформена кора и при двете породи плъхове. Wang et al. (2011) допуска, че мелатонинът упражнява невропротективен ефект чрез рецептор-медиран механизъм (MT₁ рецептор), а също така и антиоксидантен механизъм, защото въвеждането му в невропротективна доза не възстановява напълно експресията на MT₁ рецепторите. Хормонът мелатонин се смята за обещаващ агент и изследването му би имало ключова роля за протекцията при невродегенеративните заболявания (Lauterbach et al., 2010). Мелатонинът проявява невропротективни свойства и при състояния на оксидативен стрес, невропатологии, включително и церебрална исхемия (Borlongan et al., 2010; Letechipia-Vallejo et al., 2001), невротоксичност (Cabrera et al., 2000, Giusti et al., 1996), модели на Паркинсон (Dabbeni-Sala et al., 2001) и Алцхаймер (Clapp-Lilly et al., 2001). Добавянето на мелатонин в *in vitro* условия доказва, че той има защитно действие, тъй като предотвратява смъртността на хипокампаалните неврони, причинена от превалираща глутаматергична невротрансмисия и азот оксидния път. Hung and Han (2003) доказват, че кумулативна доза мелатонин от 10 mg/kg намалява КА-индуцираната невронална смърт, пероксидацията на липидите и активирането на микроглията, като намалява и броя на нарушенията в ДНК. Въпреки това, някои от описаните действия на мелатонина, като потенциален невропротективен агент, не са доказани при други модели на епилептогенеза, като травмично увреждане на мозъка (Kelso et al., 2011). По отношение на липсата на невропротективен ефект

на мелатонина в изследването на Kelso et al. (2011), някои автори разглеждат няколко важни въпроса, които могат да бъдат причина за несъответствието в резултатите им. От значение за ефекта на хормона са и продължителността на прилагането му и възрастта на третираните експериментални животни. В тази връзка, въпреки че прилагането на мелатонин чрез питейната вода по време на светлата фаза е измерено и съпоставено спрямо общата консумация на вода по време на светлата и тъмната фаза, и преобладаващата консумация по време на активния период, предполага, че този ефектът на веществото е по-ясно изразен по време на тъмната фаза.

Изложените резултати за оксидативен стрес (Dal-Pizzol et al., 2000; Gupta et al., 2002) показват, че КА-индуцираният ЕС води до повишено ниво на липидната пероксидация в хипокампа и при двете изследвани породи, нормотензивни Wistar и SHR плъхове, 4 часа след началото на ЕС, което е в съгласие с предишни литературни данни и в подкрепа на хипотезата, че ROS участват в механизма на невротоксичност, причинена от КА по време на острата фаза. Освен това, литературните данни показват, че увеличена липидна пероксидация в мозък може да се регистрира и през късните периоди (24-72 h след ЕС) (Dal-Pizzol et al., 2000, Candelario-Jalil et al., 2001, Kubera et al., 2004). Нашите резултати потвърждават предишни открития, че еднократно инжектиране с мелатонин може да предотврати КА-индуцираната липидна пероксидация при мишки (Mohan and Yamamoto, 2002). Въпреки че, голяма част от *in-vivo* и *in-vitro* изследвания разкриват, че мелатонинът функционира като антиоксидант на свободни радикали (Galano et al., 2011), при нашето изследване мелатонинът не успява да намали нивото на липидна пероксидация под базалната стойност при контролната група хипертензивни плъхове. Всъщност, Gönenç et al. (2005) разкриват, че третирането с мелатонин намалява нивото на липидна пероксидация само в хипокампа, но не и във фронтална кора, в сравнение с контролните нормотензивни плъхове. Предполага се, че наблюдаваните

несъответствия се дължат на различни механизми, които са в основата на ефективността на мелатонина.

В нашето изследване, маркерите на оксидативния стрес, показват повишено ниво на липидна пероксидация и понижена активност на SOD Cu /Zn при модел на есенциална хипертония в сравнение с контролни плъхове Wistar, и повишен оксидативен стрес при SHR. Тези резултати потвърждават предишни констатации, че контролните SHR се характеризират с нарушена оксидативна защитна система в сравнение с плъховете Wistar Kyoto при физиологични условия (Polizio and Peña, 2005). Отчетения повишен оксидативен стрес при SHR подкрепя предположението, че активността на антиоксидантните ензими е от решаващо значение за нарушения в регулацията на физиологичните процеси, свързани с патогенезата на артериалната хипертония (Harris, 1992).

Супероксид дисмутазата (SOD) е един от най-важните антиоксидантни ензими, който предпазва от окислително увреждане чрез катализиране на димутацията на супероксиден анион до водороден пероксид, като по този начин допринася за намаляване на образуването на хидроксилни радикали (Coyle и Puttfarcken, 1993).

Митохондриалната дисфункция и локализираната ROS играят решаваща роля в механизмите, водещи до невронална клетъчна смърт по време на епилептогенеза (Kunz, 2002). Няколко проучвания показват нарушение на митохондриалната функция при гризачи, предизвикано от КА (Liang and Patel, 2005, Milatovic et al., 2001). Установихме, че невротоксинът КА предизвиква адаптивно усилване на цитозолния SOD Cu /Zn четири часа след началото на ЕС във фронтална кора и хипокамп на SHR, но не и на нормотензивните плъхове. Данните от литературата показват, че гърчовете и ЕС могат да променят оксидативния стрес чрез активиране или потискане на свободните радикални ензими като СОД в различни мозъчни области (Devi et al., 2008). Повишената цитозолна активност на SOD при SHR може да се дължи на по-високата

предразположеност към пристъпи след инжектиране на КА, в сравнение с плъховете Wistar. Литературните данни подкрепят теорията, че пристъпите, предизвикващи промени в оксидативната защитна система, се влияят от предишни нива на оксидативен стрес, мозъчна област, щам и времеви точки. Candelario-Jalil et al. (2001) разкриват, че системното прилагане на екзитотоксична доза КА намалява активността на хипокампа SOD по отношение на базовите нива, установени 24 часа след прилагането на КА. От друга страна, повишеното хипокампа ниво на липидна пероксидация след КА или пилокарпин-индуциран ЕС при женски плъхове Wistar е по-изразено на 12–14 час след ЕС, но се възстановява до базално ниво при КА модел или намалява при пилокарпинов модел 7–9 дни или 75–80 дни след края на ЕС (Dal-Pizzol et al., 2000).

Нашите резултати показват, че ефикасността на мелатонина по отношение на активността на цитозолния и митохондриалния SOD също е порода- и структура-специфична, като по-силен антиоксидантен ефект се наблюдава в хипокампа на нормотензивните Wistar плъхове. Последните данни подкрепят идеята, че в допълнение към непрекъснатата защита от мелатонина, чрез каскадата за отстраняване на свободните радикали, някои от антиоксидантните действия биха могли да са резултат от неговите метаболити (Galano et al., 2013). Освен това, констатацията на Chang et al. (2012) разкрива, че мелатонинът може да упражнява своя невропротивен ефект чрез инхибиране на КА-индуцираната автофагия и последваща митохондриална загуба, както и да намали α -синуклеиновата агрегация чрез повишаване на α -синуклеиновото убиквитиниране в ЦНС. Въпреки това, сравнението на антиконвулсантната и антиоксидантната ефикасност на мелатонина в двете породи предполага липса на пряка връзка между антиконвулсантната и антиоксидантната ефективности на мелатонин.

Концентрацията на мелатонин е по-висока в мозъчните вентрикули, отколкото в периферната плазма след екзогенното му приложение (Tan et al., 2010). Поради близостта си до вентрикулите, хипокамът е една от най-характерните мозъчни структури, които могат да бъдат податливи на действието на мелатонин. Това може да обясни, защо в нашето изследване мелатонинът е по-ефективен в хипокампа, отколкото във фронтална кора. Според тези констатации, моделът на оксидативното увреждане, индуциран от КА, изглежда силно структурно специфичен.

В заключение, при Wistar плъхове с епилепсия, продължителното прилагане на мелатонин след ЕС оказва антиконвулсивен ефект, облекчавайки спонтанната гърчова активност по време на третиране. За разлика от нормотензивните Wistar плъхове, хормонът мелатонин упражнява антиепилептогенен ефект у хипертензивните плъхове, намалявайки честотата на спонтанните гърчови пристъпи и след преустановяване на третирането му. От друга страна, докато този хормон коригира поведенческите нарушения през хроничната фаза на Wistar плъхове, той не възстановява КА-предизвиканите промени в денонощните ритми, поведенческия и паметов дефицит при SHR. Въпреки че третирането с мелатонин при двете породи плъхове след ЕС не потиска развитието на хроничната фаза на епилепсия, той оказва невропротективен ефект в уязвими спрямо невротоксина КА мозъчни структури като хипокамп и пириформена кора. Обяснение за липсата на ефикасност на мелатонина при SHR по отношение на поведенческите отклонения и биохимични параметри, вследствие епилептогенезата може да е наличието на такива нарушения и при интактните SHR. Следователно, КА-индуцираните разстройства в денонощните поведенчески ритми може да не е от решаващо значение за епилептогенезата при прилагане на мелатонин, но има роля за невропротекцията и гърчовата активност при модел на коморбидност на хипертония и епилепсия.

6. ИЗВОДИ

1. Мелатонинът, прилаган през епилептогенезата, оказва порода-зависим ефект по отношение на спонтанната гърчово-пристъпна активност, антиконвулсивен при нормотензивни Wistar плъхове и антиепилептогенен при модел на коморбидна хипертония и епилепсия.

2. Третирането с мелатонин след ЕС не потиска развитието на хроничната фаза на епилепсията при двете породи- Wistar и SHR, но премахва денонощните колебания на спонтанната гърчова активност и увеличава латентния период за появата на първия спонтанен гърчов пристъп, което дава основание да се разглежда като обещаващ агент използван като адювант при терапията на заболяването.

3. Продължителното прилагане на мелатонин по време на епилептогенезата оказва благотворно влияние върху импулсивното поведение, характерно за хроничната фаза при модел на ТЕ и при двете породи плъхове.

4. Хормонът упражнява антидепресивна активност при нормотензивните Wistar плъхове с епилепсия посредством възстановяване на 5-НТ нива в хипокамп до контролни стойности.

5. При плъхове порода SHR мелатонинът не повлиява коморбидната депресия, което корелира с липсвата на ефект на хормона върху нарушеното освобождаване на 5-НТ в хипокамп през хроничната фаза.

6. Невропротективният ефект в хипокампа и пириформена кора, оказван от мелатонина, при продължително прилагане през епилептогенезата, както при нормотензивни Wistar плъхове, така и при SHR плъхове не е необходимо условие за ефикасност на хормона върху паметовите нарушения, тъй-като те се повлияват благотворно от препарата единствено при нормотензивната Wistar порода плъхове.

7. Ефективността на хормона в предотвратяването на КА-индуцираните промени в маркерите на оксидативния стрес и невротоксичността е по-изразена при плъхове Wistar, отколкото при SHR, което предполага липса на пряка връзка между честотата на пристъпите и нивото на оксидативен стрес.

7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е установено, че моделът на ТЕ индуциран с КА се характеризира с коморбидна депресия и е подходящ за проучване на нови терапевтични подходи за третиране на съпътстващите хроничната фаза на епилепсия нарушения.
2. Получени са оригинални данни, че интактните и епилептични спонтанно хипертензивни плъхове се характеризират с подобни поведенчески, биохимични и морфологични показатели, което предполага, че тази порода е подходящ модел за изследване на коморбидна хипертония и епилепсия.
3. Получени са оригинални данни, че продължителното третиране с мелатонин след ЕС оказва антиепилептогенен ефект при модел на коморбидна хипертония и епилепсия, който корелира с интензивна невропротекция в хипокампа и пириформена кора.
4. За първи път се установява, че мелатонинът проявява породозависими разлики в ефектите си по отношение на спонтанната гърчова активност, поведенчески реакции и морфологични промени в лимбичната система, което предполага ролята на мелатониновата система при модел на коморбидна депресия и епилепсия.
5. Получени са оригинални данни за липсата на пряка връзка между антиконвулсивния и антиоксидантен ефект на мелатонина при модел на ЕС предизвикан с КА при две породи плъхове, нормотензивни Wistar и SHR.

8. ПРИЛОЖЕНИЯ

8.1. Списък на публикациите, включени в дисертационния труд

Статия в списание с ISI импакт-фактор

- Tchekalarova J., Petkova Z., Pechlivanova D., Moyanova S., Kortenska L., Mitreva R., Lozanov V., Atanasova D., Lazarov N., Stoynev A. Prophylactic treatment with melatonin after status epilepticus: effects on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral changes in a kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*, 2013, 27(1): 174-187. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.01.009. IF=2.655
- Atanasova M., Petkova Z., Pechlivanova D., Dragomirova P, Blazhev A., Tchekalarova J. Strain-dependent effects of long-term treatment with melatonin on kainic acid-induced status epilepticus, oxidative stress and the expression of heat shock proteins. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 111:44-50. doi: 10.1016/j.pbb.2013.08.006. IF=2.82
- Petkova Z., Tchekalarova J., Pechlivanova D., Moyanova S., Kortenska L., Mitreva R., Lozanov V., Atanasova D., Lazarov N., Stoynev A. Treatment with melatonin after status epilepticus attenuates seizure activity and neuronal damage but does not prevent the disturbance in diurnal rhythms and behavioral alterations in spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*, 2014, 31: 198-208. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.12.013. IF=2.655

Статия в национално списание без ISI импакт-фактор

- Petkova Z., Atanasova M., Pechlivanova D., Tchekalarova J. Interstrain differences in the effect of longterm treatment with melatonin on kainic acid-induced status epilepticus, oxidative stress and the expression of heat shock proteins. *Experimental models and methods in biomedical research*, 2013, 171-174. ISSN 1314-9091.
- Tchekalarova J., Pechlivanova D., Petkova Z., Stoynev A. Effect of chronic treatment with melatonin on diurnal variations of spontaneous motor seizures and behavior of Wistar and spontaneously hypertensive rats in kainite model of temporal lobe epilepsy. *Scripta Scientifica Medica* 2012, Vol. 44 (1). 47-51. ISSN 2367-7236.

8.2. Списък с участия и научни съобщения по темата на дисертационния труд

Постер на международен форум

Petkova, Z., Tchekalarova, J., Pechlivanova, D., Lozanov, V., Atanasova, D., Lazarov, N., Stoynev, A. Effects of long-term treatment with melatonin on epileptogenesis, neuronal damage and behavioral changes in kainate model of epilepsy in SHR, THE 4th LONDON - INNSBRUCK COLLOQUIUM ON STATUS EPILEPTICUS AND ACUTE SEIZURES. 2013, 4-6 April, Salzburg, Austria.

Petkova Z., Tchekalarova J., Pechlivanova D. Effects of chronic treatment with melatonin after status epilepticus on working and reference hippocampus-dependent spatial memory in Wistar and spontaneously hypertensive rats in kainite model of temporal lobe epilepsy. 57th Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy, 2013, 12-15 Sept. Erlangen, Germany/ doi: 10.3205/12dgn121.

D. Atanasova, J. Tchekalarova, Z. Petkova, D. Pechlivanova, N. Lazarov: Treatment with melatonin after kainate-induced status epilepticus: Effects on epileptogenesis, neuronal damage and behavioral changes in spontaneously hypertensive rats. 45th European Brain and Behaviour Society Meeting, 6-9 September 2013, Munich, Germany, P184, Abstract, p. 163.

Petkova, Z., Tchekalarova, J., Pechlivanova, D., Atanasova, D., Stoynev, A. Effect of chronic treatment with melatonin after status epilepticus on working and референце Hippocampus-dependent spatial memory in Wistar and spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. European Neuroendocrine Association in Sofia, Bulgaria, from 10th until 13th of September 2014.

Tchekalarova, J., Petkova, Z., Pechlivanova, D., Stoynev, A. Treatment with melatonin after kainate-induced status epilepticus: effects on epileptogenesis, neuronal damage and behavioural changes in spontaneously hypertensive rats. European Neuroendocrine Association in Sofia, Bulgaria, from 10th until 13th of September 2014.

Постер на международен workshop

Petkova, Zl., Pechlivanova, D, Tchekalarova, J. Effects of melatonin on diurnal variations of spontaneous seizures and behavioural changes in kainate model of temporal lobe epilepsy. European college of neuropsychopharmacology Workshop, 2012, 15-18 March, Nice, France.

Доклад на национален workshop с чуждестранно участие

Petkova Z., Atanasova M., Pechlivanova D., Tchekalarova J. Interstrain differences in the effect of long-term treatment with melatonin on kainic acid-induced status epilepticus, oxidative stress and the expression of heat shock proteins. Fourth workshop on experimental models and methods in biomedical research- 27-29 May 2013, Institute of Experimental Morphology and Anthropology with Muzeum , Bulgarian Academy of Science. Presentation.

Постер на национален форум с чуждестранно участие

Petkova, Zl., Tchekalarova, J., Pechlivanova, D, Stoynev, Al., Effect of chronic treatment with melatonin on diurnal variations of motor and exploratory behavior and anxiety of Wistar and spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. Scientific anniversary conference with international participation 30 years Higher Medical Education, 2012, May 21-22, Stara Zagora.

Доклад на национален форум

Z. Nenčovska, L. Kortenska, M. Stefanova, L.Alova, M. Atanasova, Jana Tchekalarova. Effect of pinealectomy on anxiety and depressive-like behavior in Wistar rats. Scientific conference- 145 years since the establishment of the Bulgarian Academy of Sciences: “Neuroscience- from theory to experiment”, 04 December 2014, Presentation.

Постер на национален форум

Petkova, Zl., Pechlivanova, D, Tchekalarova, J. The effect of chronic treatment with melatonin after status epilepticus on working and reference hippocampus-dependent spatial memory in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. Poster. 2011, X-ти Национален конгрес по физиологични науки, 6-9 октомври, Варна.

Доклад на семинар у нас

Златина Ненчовска. Проучване ефектите на хормона мелатонин върху поведенческите и биохимични изменения, съпътстващи епилептогенезата при каинатен модел на темпорална епилепсия. Научен семинар, направление „Поведенческа невробиология” във връзка със зачисляване на докторант на самостоятелна подготовка, 26.11.2013 година.

8.3.Награди и отличия

1. Награда за изявен млад учен, с дарител Акад. Дамян Дамянов, Декември 2013. година.
2. Награда за изявен млад учен, с дарител Акад. Дамян Дамянов, Декември 2014. година.
3. Едногодишна стипендия за млад учен, във връзка разработването и работата по тематиката „The role of melatonin system on disturbed diurnal behavioral rhythms in kainite model of temporal lobe epilepsy” в областта Медицина и Биотехнология, финансирана от Световната Федерация на Учените, със седалище Женева, за периода 2013-2014 година.
4. Финансирано участие в Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe от European college of neuropsychopharmacology, Франция, Ница, Март 2010.

Summary

Epilepsy is one of the most common neurological diseases. It affects 1% of the Earth's population - about 50 million people in the world and about 70,000 in Bulgaria.

Epilepsy is a chronic, multifactorial disease, characterized by an enduring predisposition of the brain to spontaneous, recurrent epileptic seizures with neurobiological, cognitive, psychological and social consequences (Fisher et al., 2005).

The cause of epileptic seizures is a disturbance of the balance between excitatory and inhibitory processes in the brain, with the dominance of excitations. Epileptiform activity can spread to adjacent or more distant areas or to cover the whole brain.

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common symptomatic form of pharmaco-resistant epilepsy (Litt et al., 2001; McKeown and McNamara, 2001).

In recent years, numbers of models have been applied in experimental practice with some approximation simulating the clinical picture of the disease. Kainate (KA) - induced post-status epilepticus (EC) model is one of the best described and most frequently used model of TLE that is characterized by acute, latent and chronic phase.

Neurotoxin Kainic acid (KA) ($C_{10}H_{15}NO_4$), isolated from Japanese algae, is a glutamate analogue, that activates brain KA receptors (KARs). Its performs epileptogenic effect that is accompanied by a selective damage in hippocampal formation, including the hilus, CA3 and CA1 fields in rodents. Binding of KA to KARs receptors induce a release of intracellular Ca^{2+} and an increase of reactive oxygen species (ROS), and reactive nitrogen species (RNS). The increased concentration of Ca^{2+} , ROS and RNS leads to mitochondrial dysfunction, nuclear fusion and DNA fragmentation. The most common route of administration of KA is intraperitoneal (ip). The introduction of a toxin causes a continuous SE for several hours.

In the literature, there is evidence that the hormone melatonin has anticonvulsant activity in epileptic patients and experimental animal models (Anton-Tay, 1974; Molina-Carballo et al., 1997; Albertson et al. Yamamoto and Tang, 1996; Liang and Patel, 2005; Borowicz et al., 1999). The biological effects of melatonin are mediated by activation of melatonin receptors, others are due to its role as a powerful antioxidant. Hormone has a direct influence on the regulation of the sleep-wake cycle and the synchronization of the circadian rhythms of important physiological processes in mammals, including humans.

We aimed to investigate and expand the knowledge about the effects of long-term treatment with melatonin on epileptogenesis, associated with the development of spontaneous seizures, comorbid depression, biochemical and morphological changes in the limbic system.

The thesis focused on the parallel analysis of two strains rats- normotensive Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) with an idea to clarify the role of hypertension in the development of epileptogenesis. The effect of melatonin on the pathophysiology of epilepsy in a model of essential hypertension, as well as the mechanisms underlying the comorbid depression in the chronic phase of epilepsy was studied.

1. Aims:

To investigate the role of melatonin on the frequency of spontaneous motor seizures and the concomitant behavioral, biochemical and morphological changes in limbic structures in KA-post SE model of TLE in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive rats

2. Tasks:

To investigate the effects of long-term treatment with melatonin in Wistar and SHR rats on:

1. Changes in the circadian rhythm and frequency of spontaneous recurrent seizures;
2. Diurnal variations in behavioral responses, including motor activity, exploratory behavior, anxiety, depression, and cognition.
3. Changes in 5-HT levels in the frontal cortex and hippocampus;
4. Morphological changes in certain brain structures;
5. Levels of markers of oxidative stress induced by SE.

3. Materials and methods

3.1. Animals

The experiments were performed on male young adult rats- normotensive Wistar rats and SHR, weighing about 250-300 g.

In vitro methods

3.2. Experimental groups and drug treatment

The rats were randomly distributed in four experimental groups (n=20) as follows: C-veh, C-mel, KA-veh, KA-mel. The melatonin treatment (Sigma-Aldrich, Bulgaria) started 3h after the beginning of SE at a dose 10 mg/kg, for a period of 8 weeks. Controls were given a tap water. For the study of oxidative stress, melatonin was applied subchronically for a period of two weeks via osmotic minipumps Alzet osmotic at a dose of 10 mg/kg/day, pumping rate 0.5 µl/h. The method of melatonin infusion via s.c. osmotic mini-pumps provided constant steady-state hormonal concentration.

Behavioral tests started at the 14th week after SE when the rats had developed a chronic epileptic state. After about 20 weeks post-status, the rats were transcardially perfused for histology.

3.3. Surgery

The rats were implanted with epidural and deep electrodes for electroencephalography (EEG) recording on the fifth day post-SE, under full anesthesia.

3.4. *Induction of status epilepticus with kainic acid*

SE was induced by repetitive KA (KA, Ascent Scientific, UK) injections (5 mg/kg/h, i.p.) according to the protocol of Hellier et al. (1998). Matched controls were treated with an equivalent volume and number of injections of saline. Kainic acid was diluted in sterile saline (0.9% NaCl) at 2.5 mg/ml. Seizure intensity was evaluated by a modified Racine's scale. Treatment with KA continued until sustained convulsive seizures of class III, IV, or V (i.e., > 10 motor seizures/h) were observed in rats.

3.5. *Video and EEG monitoring of spontaneous recurrent seizures*

Video monitoring was performed under environmentally controlled conditions (12-h/12-h light/dark cycle), continuous 24 h/day for 20 weeks. Video monitoring was accomplished using an infrared-sensitive colored camera (S-2016, AVTECH, Taiwan, no. AVC307R) connected to a computer.

The EEG of the KA-treated rats implanted previously with electrodes were recorded for at least of an hour three times a week. Rats were allowed to habituate in a Faraday's cage for 20 min and then were connected to a socket in a swivel mounted on the cage's ceiling. The behavior of the rat was simultaneously video-monitored. The EEG files were recorded by means of the Acknowledge software ACK100W (BIOPAC Inc., USA).

3.6. *Behavioral tests*

All behavioral tests were carried out under artificial diffused light during the light phase and in red dim light during the dark phase. The behavior of the rats in the OF, EPM, and FS tests was recorded using an infrared sensitive CCD camera and a video tracking system (SMART PanLab software) from Harvard Apparatus, USA.

3.6.1. *Sucrose preference test*

The impairment of the “hedonic” state of an animal (ability to experience pleasure) is considered as a manifestation of clinical depression. On the first day (habituation), each cage was supplied with two identical graduated water bottles with a volume of 100 ml. On the 2nd (pretest) and 3rd (test) days, water in one of the bottles was replaced with 1% sucrose solution. The test started at 08:00 a.m. and was conducted during the following 24 h. During the test, both bottles were weighed after 12 h and replaced by a second pair of pre-weighed bottles. Taste preference was expressed as the percentage of the volume of sucrose solution of the total volume of fluid consumed during 12 h (light phase — 8:00–20:00 h and dark phase — 20:00–8:00 h).

3.6.2. Open field test

The apparatus consisted of a gray polystyrene box (100 × 100 cm × 60 cm) divided into two zones: outer square (periphery) and inner square (center). The rat was placed in the center of the box and was allowed to explore it for 5 min.

3.6.3. Elevated-plus maze test

The apparatus consisted of two open arms (50 × 10 cm), two enclosed arms (50 × 10 × 50 cm), and a central platform (10 × 10 cm) elevated 50 cm above the floor level. At the beginning of the test, the rat was placed on the central platform facing an open arm. The test lasted 5 min.

3.6.4. Forced swim test (FST)

The test was carried out in a clear and transparent cylinder (50 cm tall, 25 cm diameter) filled to a level of 30 cm from the bottom with 24 °C tap water. The water in the apparatus was changed from rat to rat. The immobility time in seconds was recorded by experimenter.

3.6.5. Radial arm maze (RAM) test

Visuospatial learning and memory was assessed using an 8-arm radial maze (RAM) (Harvard Biosci. Comp., USA). The stainless-steel RAM consisted of a central octagonal platform (30 cm in diameter) from which eight identical arms (42 × 12 × 12) radiated from the platform. A variety of environmental cues (wall pictures, table, cupboards, door, and window) were available for facilitation of spatial navigation. Seven days before the start of training and during the test, rats were put on a diet for 15% reduction in b.w. Before the memory testing, all animals were habituated (shaping) to the maze and the experimental set-up for up to 3 days. Following habituation, the animals were trained in the standard RAM task with one session per day for 18 trials. Four arms were baited with one piece of sweet food pellet placed at the end of each arm. The session ended when all baits were found or after 10 min had elapsed. Memory acquisition was assessed through the decrease in the number of errors between each trial. Reentry into a baited arm from which the food pellet had already been retrieved was scored as working memory errors. Entry into an unbaited arm was scored as reference memory errors.

In vivo methods

3.7. Histology

After about 20 weeks post-*status*, under deep anesthesia the rats were transcardially perfused initially with 0.05 M phosphate buffered saline at pH 7.3 followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.3. The

brains were dissected out and postfixed overnight at 4 °C in the same fixative solution. After postfixation, the brains were sliced in the coronal plane and cryoprotected in 20% phosphate-buffered sucrose solution. After an overnight incubation at 4 °C, the brains were cut using a Reichert Jung freezing microtome, and 30- μ m thick serial sections were taken in subsets of 4. Every first section of the subset was mounted on chrome-gelatin-coated slides, and Nissl staining with cresyl violet was performed. Sections were analyzed for major cell loss with special attention to the dorsal and ventral hippocampus, the piriform cortex, and some nuclei of the amygdala. The staining intensity and density of nerve cell bodies in the hippocampus, amygdala, and piriform cortex were estimated by the Nikon NIS Elements Digital Imaging software. The relative neuronal densities of the selected brain areas were quantified by determining the percentage of the measurement grid occupied by stained cells. The resulting values provide a relative index of the number of stained neurons in the selected brain areas.

3.8. *High-performance liquid chromatography*

Additional subgroups of rats were decapitated, brains were quickly dissected on ice, and the frontal cortex and hippocampus were bilaterally removed. The tissue samples were frozen in liquid nitrogen, lyophilized, and stored at -70 °C before analysis. Dry tissues were accurately weighed and homogenized in pre-cooled 0.5 M formic acid using a MICRA D-8 (ART, Germany) homogenizer. The samples were centrifuged (13,000 rpm at 4 °C) for 20 min, and an aliquot of 10 μ l of the supernatant was used for analyses. Each pooled sample (from both hemispheres) was analyzed for 5-HT content as measured by LC/MS/MS. The measurements were performed by electrospray ionization in positive mode on an LTQ Orbitrap Discovery® spectrometer (ThermoFisher, Germany) connected to a Surveyor® HPLC system (ThermoFisher, Germany). The analyzed compounds were separated on a ZIC®-HILIC (Merck, Germany) analytical column in isocratic elution mode with a mobile phase of 70% acetonitrile containing 15 mM formic acid at a flow rate of 200 μ l/min. The quantitative analyses were performed using the “selected ion monitoring” mode with external calibration. The data acquisition and processing were performed by means of the Xcalibur® software.

3.9. *Biochemical methods*

Biochemical tests were conducted 4 h after KA injection. The animals were sacrificed by decapitation under a light anesthesia (CO₂). Brains were quickly dissected on ice and the frontal cortex and the hippocampi were bilaterally removed. The tissue samples were frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C before analysis.

3.9.1. Measurement of lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was determined quantitatively by direct measurement of hydroperoxides in redox reactions with ferrous ions. Therefore the tissue samples were homogenized in cold 20 mM HEPES buffer (pH 7.2) and extracted with chloroform. The extracted lipid peroxides were assayed with LPO assay kit (Cayman Chemical Company, USA) according the instructions provided. The resulting ferric ions were detected using thiocyanate ion as the chromogen and by reading the absorbance at 500 nm. The extent of lipid peroxidation was expressed as nmol.

3.9.2. Measurement of cytosolic superoxide dismutase

The tissue samples were homogenized in cold 20 mM HEPES buffer (pH 7.2) and centrifugated at 1500 ×g for 5 min, at 4 °C. To separate cytosolic SOD, the 1500 ×g supernatant was again centrifuged at 10,000 ×g for 15 min, at 4 °C. The resulting supernatant was tested for cytosolic SOD with SOD assay kit (Cayman Chemical Company, USA). The results were expressed as U/ml.

3.10. Statistical analysis

All results were presented as mean ± SEM. Parametric (for normally-distributed data) or nonparametric tests (for data not normally distributed) were used for the statistical analysis (SigmaStat® 11.0). Experimental data were evaluated by one-way ANOVA on ranks within groups (RAM test), two-way ANOVA (seizure, histological, and HPLC data), and three-way ANOVA (OF, EPM, and RAM tests). Post hoc comparisons between groups were conducted by Bonferroni *t*-test or Mann–Whitney *U*-test. A *p*-value < 0.05 was accepted as indicating a statistically significant difference.

4. Results and discussion

The analysis of the obtained results indicates that chronic treatment with melatonin at 10 mg / kg for 8 weeks starting 3 hours after KA-induced SE protects against some of the deleterious effects of epileptogenesis associated with behavioral changes, including impulsive type of behavior, comorbid depression and spatial memory deficiency, decreased serotonin levels in the hippocampus, and neuronal damage in limbic structures.

In agreement with other data and previous results of our team, Wistar rats are characterized by a circadian rhythm of distribution of spontaneous epileptic seizures (Arida et al., 1999, Stewart and Leung, 2003, Raedt et al., 2009). The SHR rats, which are a suitable model for the study of the relationship between hypertension and epilepsy, show a disturbed circadian rhythm, which in turn makes the strain a plausible model for study and chronobiological aspect (Minami et al., 1988; Fang et al., 2000).

Desynchronization in physiological circadian rhythms accompanies cardiovascular abnormalities in this animal model. For this reason, treatment with melatonin is an adequate approach to preventing disturbance of these rhythms.

Melatonin treatment during epileptogenesis removes the circadian rhythm of seizure activity and reduces the frequency of seizures during the chronic phase of epilepsy. However, the results of our study were not enough to reveal the influence of circadian rhythms on seizure activity, because the plasma levels of melatonin and its effect on the distribution of seizures, were not measured. Future studies and analysis of the hormonal marker could answer the question of the exact role of the melatonin hormone in the endogenous mechanism of the circadian rhythm of seizure activity.

In Wistar rats with epilepsy, treated with melatonin during the period of epileptogenesis (for 8 weeks) increase the latent period for onset of the first spontaneous seizure. The analysis of the frequency of spontaneous seizures in Wistar rats for a period of 5 months after the SE showed that melatonin exhibited clear anticonvulsant effect exhibited during the treatment period that disappear after discontinuation of the treatment.

Unlike Wistar rats, daily intake of melatonin at a dose of 10 mg / kg for 60 days, starting 3 hours after the onset of the SE, has antiepileptogenic effect in SHR, as melatonin suppresses seizure activity also after the stop of treatment. It can be assumed that these strain-dependent differences in melatonin effect in the KA model of temporal epilepsy may be associated with the simultaneous reduction in blood pressure observed in epileptic SHR.

In the present work, behavioral tests have been used to investigate changes in motor and exploratory activity, anxiety, depressive behavior and cognition. Epileptic Wistar rats are characterized by hyperactivity, low anxiety level, and a lack of diurnal rhythms of behavior. Melatonin alleviates hyperlocomotion and changes in the level of anxiety as a result of epileptogenesis in the open field test in normotensive rats. The hyperactivity observed in Wistar and SHR rats with epilepsy and melatonin was significantly reduced. The melatonin-treated SHR group with epilepsy is characterized by decreased motor activity and alleviated impulsive-like behavior similar to that shown in the Wistar rat.

The effects of melatonin on motor activity are confirmed in the elevated plus maze test (EPM) in epileptic Wistar rats. However, the decreased level of anxiety that is characteristic of rats during the chronic phase of epilepsy is not affected by melatonin in this test. In our study, observed differences in the effect of melatonin on anxiety in two separate tests may be related to the specificity of the test used. It has been found that, single treatment with melatonin has an anxiolytic effect and reduces motor activity (Loiseau et al., 2006).

In Wistar rats melatonin mitigated also depressive-like behavior. Epileptic SHR (untreated and treated with melatonin) are characterized by low anxiety in the EPM. Like in Wistar rats, melatonin reduces the hyperactivity without affecting the low level of anxiety. Normotensive Wistar rats with epilepsy are

characterized by depressive behavior during the light phase in the sucrose preference test (SPT) and forced swimming test (FST).

Treatment with melatonin after the SE had a beneficial effect on the KA-induced abnormalities in behavioral responses, which correlated well with the decreased frequency of spontaneous seizure activity during the time of application.

The SHR controls are characterized by a depressive-like behavior in SPT during the light phase, compared to intact Wistar rats (Tchekalarova et al., 2011). Melatonin does not affect the depressive-like behavior developed during epileptogenesis.

In the FST, Wistar rats with epilepsy show a depressive-like behavior expressed by a prolonged immobility during the light phase. Melatonin treatment alleviates this behavioral response in rats with epilepsy.

Control SHR rats, treated with melatonin, are characterized by diurnal variations in the FST, with decreased immobility during the dark phase. The epileptic group shows a depressive behavior without diurnal rhythm. The KA-treated melatonin group has experienced a depressive-like responses only during the light phase.

In agreement with our and other previous studies in models of epilepsy (Tchekalarova et al., 2011, Mazarati et al., 2009, Jobe et al., 1999, Montgomery et al. 2004; Kondziella et al., 2007), here we have found that the KA model is associated with a 5-HT deficiency in the hippocampus in Wistar rats. While the long-term treatment with melatonin in Wistar rats caused a decrease in the levels of 5-HT in the hippocampus it restored the deficiency of 5-HT in hippocampus in rats with epilepsy. These data are in agreement with previous studies, showing that chronic administration of low doses of melatonin in drinking water causes deficiency in monoaminergic neurotransmitters (Esteban et al., 2010). However, we report that the disturbed serotonergic system in the hippocampus in naïve hypertensive rats is not corrected by melatonin treatment during epileptogenesis.

Furthermore, epileptic Wistar rats are characterized with impaired hippocampus-dependent spatial memory that is demonstrated in the RAM test. Increased number of session arms per session reflects worse learning skills and orientation strategy in normotensive epileptic rats. Furthermore, these rats show higher motor activity compared to the control group. Chronic melatonin administration is unable to enhance the learning skills in control conditions. The group of rats with epilepsy treated with melatonin can successfully acquired spatial information as reflected by a decrease of working memory errors over the 18-days of sessions.

In the SHR, damage to the hippocampal-dependent spatial memory is observed compared to the control group.

Neuronal damage in the hippocampus is also accompanied by an abnormal increase in the lateral ventricles. The neuronal density (neurons per unit area) is statistically reduced in the CA1 fields of the hippocampus of the Wistar rat with epilepsy.

In the epileptic Wistar and SHR the neuronal density is decreased in the limbic structures, including the CA1 and CA2 fields of the hippocampus, piriform cortex and the amygdala. Our studies have shown that melatonin exhibits a powerful neuroprotective effect in specific brain structures, associated with spatial memory, such as the CA1 domain of hippocampus and piriform cortex in both strains.

The markers of oxidative stress, which showed an increased level of LP and decreased activity of SOD Cu/Zn in a model of essential hypertension compared to control Wistar rats, indicate an enhanced oxidative stress in the SHR. These results confirm previous findings that the control SHR are characterized by a disturbed oxidative defence system compared to Wistar rats. The reported divergence in the defence system as a sequence of enhanced oxidative stress in the SHR supports the assumption that the activity of antioxidant enzymes is crucial for dysregulation of physiological processes implicated in the pathogenesis of arterial hypertension (Harris, 1992).

The SOD is one of the most important antioxidant enzymes, which protects against oxidative damage by catalyzing the dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide, thus contributing to decreased formation of hydroxyl radical formation (Coyle and Puttfarcken, 1993). In vertebrates, copper/zinc-containing SOD Cu/Zn and manganese-containing SOD Mn are the predominant isoforms found either in the cytosol or the mitochondrial matrix, respectively. The increased cytosolic SOD activity in SHR might reflect the higher seizure susceptibility following KA injection of SHR compared to Wistar rats. Literature data support the presumption that seizures that provoked changes in the oxidative defence system are influenced by previous level of oxidative stress, brain area, strain used and time points detected for the direction of changes. Our results show that the efficacy of melatonin as concerns the activity of the cytosolic SOD is also strain- and area-specific in the normotensive Wistar rats.

In conclusion, the long-term administration with melatonin after SE has an anticonvulsant effect, alleviating the spontaneous seizures during the treatment period in normotensive Wistar rats with epilepsy while it exerts an antiepileptogenic effect in the spontaneous hypertensive rats, reducing the incidence of spontaneous seizure attacks after discontinuation of the treatment. However, while the hormone corrects epileptogenesis-induced behavioral deficits in Wistar rats it is ineffective in a model of essential hypertension. The strong neuroprotective effect of melatonin detected in both the Wistar and SHR suggests that there is no direct relationship between seizure activity and impaired behavioral responses.