

## EFFECT OF TOPIRAMATE TREATMENT ON PASSIVE COGNITIVE FUNCTIONS AND LOCOMOTOR ACTIVITY IN A MODEL OF DRUG-INDUCED AMNESIA

Michaela Shishmanova-Doseva

Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy, Medical University - Plovdiv, Bulgaria, [shishmanovamichaella@gmail.com](mailto:shishmanovamichaella@gmail.com)

**Abstract:** Introduction: Epilepsy is a chronic neurological disorder which can affect negatively behavior and cognition. On the other hand, most antiepileptic drugs (AEDs) can also further impair cognitive functions. Benzodiazepines are widely used in experimental models to induce cognitive deficits. Topiramate (TPM) exerts its antiepileptic effects by several mechanisms of action and it is widely used in clinical practice. The aim of the present study was to investigate the effect of topiramate on cognitive functions and locomotor activity in a model of diazepam (DZP)-induced amnesia. Material and methods: We used 24 male adult rats (Wistar), which were randomly divided into 3 groups (n = 8), as follows: 1<sup>st</sup> group - control (treated with saline p.o.); 2<sup>nd</sup> group (DZP-veh) – treated with saline p.o. and Diazepam 2.5 mg/kg i.p. and the 3<sup>rd</sup> group (DZP-TPM) – treated with topiramate 5 mg/kg p.o. and DZP 2.5 mg/kg i.p. In the test for locomotor activity (Activity cage), the number of horizontal and vertical movements was recorded. In the two passive avoidance tests (step-through and step-down), the training session was conducted on two consecutive days. 24 hours after the last learning session was the test for short-term memory. The test for long-term memory in the Step-through was performed on the 10<sup>th</sup> day. The latency of reactions (the rat remaining in the light chamber of the apparatus for more than 178 sec in 2 consecutive training sessions) was considered as a criterion for acquisition and retention. In the step-down test, the long-term memory was tested on the 8<sup>th</sup> day. The latency of reactions (the rat remaining on the platform for more than 60 sec in 2 consecutive training sessions) was taken as a criterion for acquisition and retention. Results: One-way ANOVA showed that both groups DZP-veh and DZP-TPM decreased the number of horizontal movements compared to the controls on day 7 (p < 0.001, resp.) and day 14 (p < 0.001, p < 0.05, resp.). In the step-through test, the DZP-veh group had a shorter latency time than that of the C-veh animals in the short-term memory retention test (p < 0.01), while in the long-term memory retention test, both groups DZP-veh and DZP-TPM (p < 0.05, resp.) had a shorter latency time and spent less time in the light chamber of the device. In the step-down passive avoidance test, the DZP-veh group shortened the latency time compared to the controls during the learning session on day 2 (p < 0.001). In the short-term- and long-term memory tests, both groups DZP-veh (p < 0.001) and DZP-TPM (p < 0.05) spent less time on the platform compared to the control animals. Conclusion: Topiramate failed to counteract the cognitive deficit induced by diazepam administration, leading to impaired formation of short-term and long-term memory traces. Topiramate failed to restore the suppressed locomotor activity. The AED did not have a negative effect on learning abilities.

**Keywords:** Topiramate, Diazepam, learning, memory, step-through, step-down.

## ЕФЕКТ ОТ ПРИЛАГАНЕТО НА ТОПИРАМАТЕ ВЪРХУ ПАСИВНИТЕ КОГНИТИВНИ ФУНКЦИИ И ДВИГАТЕЛНА АКТИВНОСТ ПРИ МОДЕЛ НА МЕДИКАМЕНТОЗНО-ИНДУЦИРАНА АМНЕЗИЯ

Михаела Шишманова-Досева

Катедра Фармакология, Токсикология и Фармакотерапия, Медицински университет – Пловдив, България, [shishmanovamichaella@gmail.com](mailto:shishmanovamichaella@gmail.com)

**Резюме:** Въведение: Епилепсията е хронично неврологично заболяване, което може да окаже негативен ефект върху поведението и когницията. От друга страна повечето антиепилептични медикаменти (АЕМ) също могат да влошат допълнително когнитивните функции. Бензодиазепините са често използвани в експериментални модели за предизвикване на когнитивен дефицит. Топирамате (TPM) осъществява своето антиепилептично действие по няколко механизма и се използва широко в клиничната практика. Целта на проучването беше да изследва ефекта на топирамате върху когнитивните функции и двигателната активност при модел на diazepam (DZP)-индуцирана амнезия. Материал и методи: В експеримента взеха участие 24 броя мъжки плъха (Wistar), разделени на случаен принцип в 3 групи (n = 8), както следва: 1-ва група – контрола (физ. разтвор p.o.); 2-ра група (DZP-veh) – третирана с физ. разтвор p.o. и Diazepam 2.5 mg/kg i.p. и

3-та група (DZP-TPM) – третирана с topiramate 5 mg/kg p.o. и DZP 2.5 mg/kg i.p. При теста за двигателна активност (Activity cage) бяха регистрирани броя на хоризонталните и вертикалните движения. При двата теста за пасивно избягване (step-through и step-down) обучителната сесия се проведе в два последователни дни. 24 часа след последната обучителна сесия се проведе тестът за краткотрайна памет. При step-through теста дълготрайната памет се изследва на 10-тия ден. Като критерии за обученост се приемаше престоят на животното в светлото помещение на апарата за 178 sec при 2 последователни тренировки. При step-down теста дълготрайната памет се изследва на 8-мия ден. Като критерий за обученост се приемаше престоя на животното върху платформата на апарата над 60 sec при 2 последователни тренировки. Резултати: One-way ANOVA показва, че DZP-veh и DZP-TPM животните понижиха броя на хоризонталните движения спрямо контролата на 7-мия ( $p < 0.001$ , съотв.) и 14-тия ден ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ , съотв.). При step-through теста DZP-veh групата имаше по-кратко латентното време спрямо C-veh животните по времена теста за краткотрайни паметови следи ( $p < 0.01$ ), докато при теста за дълготрайна памет и двете групи DZP-veh и DZP-TPM ( $p < 0.05$ , съотв.), имаха по-кратко време в светлото помещение на апарата. При теста за пасивно избягване step-down DZP-veh групата скъси латентното време спрямо контролата по време на обучителната сесия на 2-рия ден ( $p < 0.001$ ). При тестовете за краткотрайна и дълготрайна памет и двете групи DZP-veh ( $p < 0.001$ ) и DZP-TPM ( $p < 0.05$ ) имаха по-кратко време на престой върху платформата. Заключение: Topiramate не успя да противодейства на когнитивния дефицит, предизвикан посредством прилагането на diazepam, като доведе до затруднено формиране на краткотрайни и дълготрайни паметови следи. Topiramate не успя да възстанови и потисната двигателната активност. Медикаментът не оказа негативен ефект върху обучителните способности.

**Ключови думи:** Topiramate, Diazepam, обучение, памет, step-through, step-down.

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсията е хронично неврологично заболяване, което засяга около 1% от населението на света като обхваща хора от различна възраст, пол, етнос и раса. (Falco-Walter, 2020). Повишената невронална активност при епилепсия може да окаже значително въздействие върху нормалните познавателни процеси, както и върху поведението (Meador, 2002). Поради факта, че основните механизми на епилептогенезата се различават, клиничните прояви и последствията върху когнитивните функции от заболяването варират значително. От друга страна не само самата епилепсия, но и повечето антиепилептични медикаменти (АЕМ) също могат да влошат допълнително когнитивните функции, засягайки най-често възприятието, вниманието, обучението и паметта (Watkins et al, 2019; Kilova & Kitova, 2021).

Съществуват няколко начина за дефиниране на паметта: (1) според нейната продължителност (краткосрочна и дългосрочна), (2) според информационната форма (декларативна и недеklarативна) и (3) в зависимост от етапа, може да се засегне съответно: нейното придобиване, консолидиране или извличане (Savić et al, 2005).

Амнезията е количествено разстройство на паметта, което се проявява в неспособността да бъдат възстановени паметови следи за минал опит (Savić et al, 2005; Segura et al, 2021). Въз основа на времето за настъпване, се различават два вида амнезия: ретроградна – загуба на паметта за минали събития или антероградна – неспособност за придобиване на нови, дълготрайни паметови следи (Miller & Butler, 2022).

В експериментални условия широко използвани са методите за увреждане на когнитивните функции с цел да се изследва ефектът на медикаментите върху тях, както и да се проучат механизмите на тези ефекти. Бензодиазепините са често използвани в модели за предизвикване на когнитивен дефицит, т.к. е добре известно, че посредством усилване действието на  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-ергичната медиация, те водят до увреждане на епизодичната памет и по-често засягат дълготрайната отколкото краткотрайната памет (Savić et al. 2005). Има данни, че различните бензодиазепини могат и в различна степен да засегнат пасивното или активното обучение и памет (Beracochea, 2006). Нещо повече бензодиазепините имат различни ефекти върху паметта според продължителността, типовете или етапите на тестваната памет (Savić et al. 2005). Златен стандарт при този модел е прилагането на diazepam (DZP), който води до антероградна амнезия (Costa et al, 2010).

През последните години се създадоха редица нови антиепилептични медикаменти (АЕМ) с широкоспектърно действие, сред които е и topiramate (TPM). Той представлява сулфамид, чиято структурна близост с acetazolamide определя неговата противоепилептичната активност (Frisch et al, 2007). Противоречиви са данните в литературата за влиянието на topiramate върху когнитивните функции както при интактни животни, така и при различни експериментални модели на епилепсия и когнитивен дефицит.

Целта на настоящото проучване беше да изследва ефектът на topiramate върху двигателна активност, пасивното обучение и памет при експериментален модел на амнезия с diazepam.

## 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В експеримента взеха участие 24 броя зрели мъжки бели плъха (Wistar) с тегло 150-180 g. Плъховете бяха отглеждани при стандартни лабораторни условия при съотношение на светлина:тъмнина – 12h:12h,  $t^{\circ} = 22 \pm 2$  °C, влажност – 50-55%, вода и храна *ad libitum*. Експериментът е одобрен от Българската агенция по безопасност на храните (№ 50/30.06.2011) и Комисията по етика към МУ – Пловдив (№3/26.06.2014).

На случаен принцип животните бяха разделени в 3 групи по 8, както следва: 1-ва група – контрола (физиологичен разтвор p.o.); 2-ра група (DZP-veh) – третирана с физиологичен разтвор p.o. и Diazepam 2.5 mg/kg i.p. и 3-та група (DZP-TPM) – третирана с topiramate 5 mg/kg p.o. и DZP 2.5 mg/kg i.p.

Приложените методи включваха тестове за пасивно условно избягване с наказателно подкрепление на плъхове (step-through и step-down тестове) и тест за двигателна активност (Activity cage).

- *Activity cage test*

Тест за двигателна активност. При този тест беше използван апарата Activity cage (Ugo Basile, Italy), който автоматично регистрираше броя на хоризонталните и броя на вертикалните движения на опитните животни за 3 минути. Поведението на животните беше регистрирано с инфрачервени термо-детектори.

- *Passive-Avoidance Step-through test*

Беше използван автоматичен електронен апарат Step-through (Ugo Basile, Italy) за пасивен авойданс с наказателно подкрепление. Експериментът беше проведен в клетка по стандартна програма. Клетката се състоеше от светла и тъмна част, разделени с вратичка. Всеки експериментален ден включваше три тренировки през 60 min, като характеристиката на една тренировка включваше: закъснение (delay) от 7 sec преди да се отвори вратата, последвано от 12 sec отворена врата. Ако плъхът не преминеше в тъмното помещение автоматично се включваше брояч за време (sec), който отчиташе максимално 3 минути ( $180 \pm 2$  sec). Обучителната сесия беше проведена в два последователни дни. Тестовите за запаметяване беха два: тест за краткосрочна памет - 24 часа след обучителната сесия и тест за дълготрайно съхраняване на паметовите следи на 10-ти ден (считано от първия ден на тренировката). Като критерий за обученост се приемаше престоят на животното в светлото помещение на апарата в рамките на максималното време от 178 sec при 2 последователни тренировки.

- *Passive-Avoidance Step-down test*

Беше използван автоматичен електронен апарат Step-down (Ugo Basile, Italy) за пасивен авойданс с наказателно подкрепление. Беше използвана стандартна клетка, с пластмасова платформа на пода. Всеки експериментален ден включваше 2 тренировки през 60 min. Постановка на експеримента: плъхът беше поставян върху пластмасова платформа, която след включване на апарата, вибрираше вертикално. При слизване на плъха от нея с 3-те или 4-те лапи беше отчетено времето за реакция и същевременно беше подадена електрическа стимулация по решетъчния под на клетката от 0.4 mA в продължение на 10 sec. Обучението беше проведено в два последователни дни. Тестовите за запаметяване бяха 24 часа след последния обучителен ден и на 8-мия ден от началото на теста “step-down”. Като критерий за обученост се приемаше престоя на животното върху платформата на апарата над 60 sec при 2 последователни тренировки.

### *Статистически анализ*

Всички данни са представени като средна аритметична  $\pm$  стандартна грешка на средната аритметична ( $X \pm SEM$ ). След оценка на разпределението на получените стойности, проверено чрез непараметричен критерий на Kolmogorof-Smirnov, резултатите бяха подложени на параметричен и графичен анализ. Статистически значими се приемаха различията при  $P < 0.05$ . Вътрегруповите различия бяха анализирани с чифтен *t*-test, а за междугруповите различия беше приложен еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA).

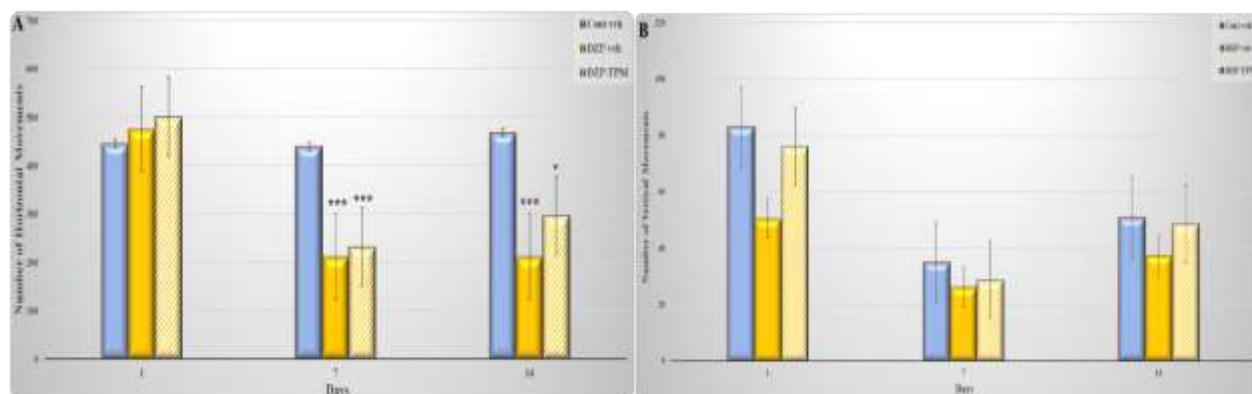
## 3. РЕЗУЛТАТИ

### *Activity cage test*

One-way ANOVA показва, че животните с модел на DZP-индуцирана амнезия понижиха броя на хоризонталните движения спрямо контролната група като разликата беше статистически значима на 7-ми и 14-ти ден от тестването ( $p < 0.001$ , съответно) (Фиг. 1A). DZP-TPM групата също понижиха броя на хоризонталните движения на 7-ми ( $p < 0.001$ ) и 14-ден ( $p < 0.05$ ) в сравнение с контролната група.

По отношение на вертикалните движения се наблюдаваше само тенденция за тяхното увеличаване от контролната група спрямо DZP-veh групата на 1-вия ден от тестването ( $p = 0.077$ ) (Фиг. 1B).

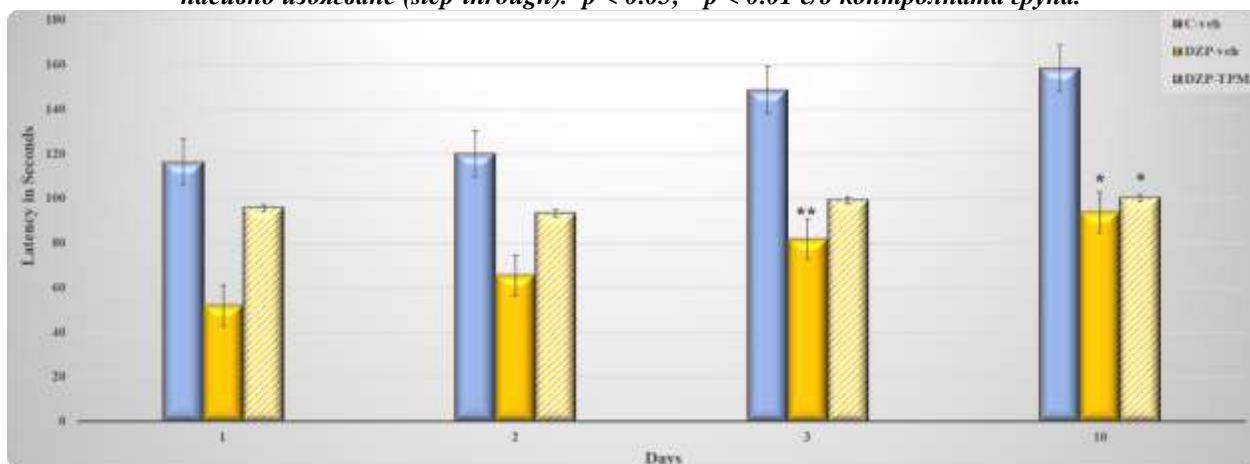
**Фигура 1. Ефект на прилагането на toripamate (TPM) върху (А) броя на хоризонталните движения при модел на diazepam-индуцирана амнезия. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  с/о C-veh животните. (В) броя на вертикалните движения при модел на diazepam-индуцирана амнезия.**



**Passive-Avoidance Step-through test**

One-way ANOVA показва, че групата с модел на амнезия имаше тенденция за по-кратко латентното време спрямо контролните животни по време на обучителната сесия на 1-вия ( $p = 0.084$ ) и 2-рия ( $p = 0.064$ ) ден. Разликата достигна статистическа значимост както по времена теста за краткотрайни паметови следи ( $p < 0.01$ ), така и по време на теста за дълготрайна памет ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 2). Групата с модел на амнезия и третирана с toripamate също скъси времето на престой в светлото помещение на апарата спрямо контролната група като разликата беше статистически значима само при ре-теста за дълготрайна памет ( $p < 0.05$ ).

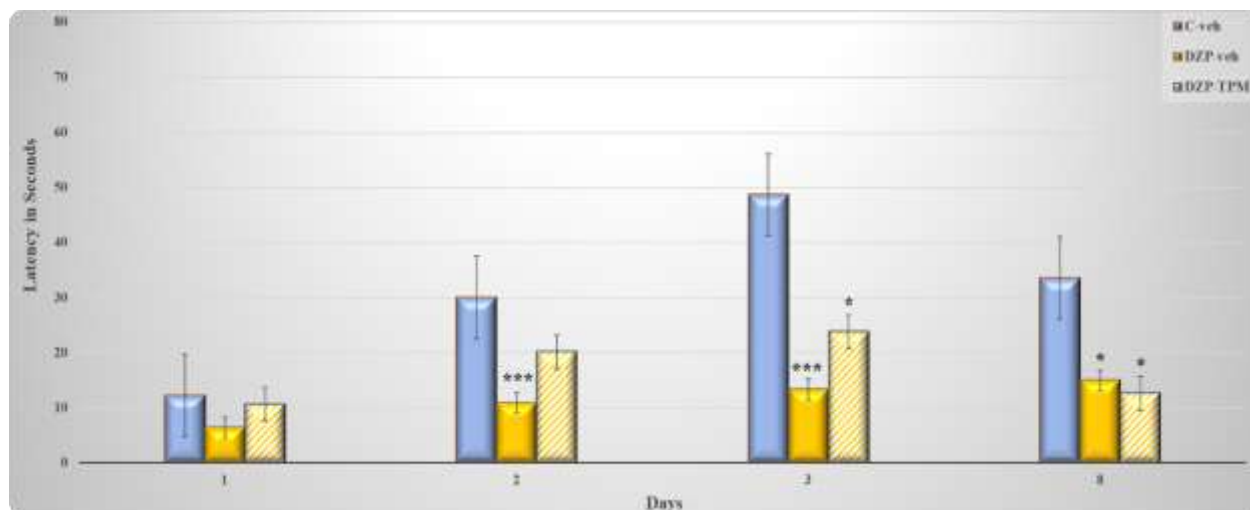
**Фигура 2. Ефект на прилагането на toripamate (TPM) върху латентното време (sec) при теста за пасивно избягване (step-through). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  с/о контролната група.**



**Passive-Avoidance Step-down test**

При теста за пасивно избягване Step-down DZP-veh групата скъси латентното време за престой върху платформата спрямо контролните животни както по време на обучителната сесия на 2-рия ден ( $p < 0.001$ ), така и време на теста за краткотрайна ( $p < 0.001$ ) и дълготрайна памет ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 3). DZP-TPM животните също доведоха до по-кратко латентно време спрямо контролните животни като разликата достигна статистическа значимост само по време на двата теста за краткотрайни и дълготрайни паметови следи ( $p < 0.05$ , съответно).

**Фигура 3. Ефект на прилагането на topiramate (TPM) върху латентното време (sec) при теста за пасивно избягване (step-down). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  с/о контролната група.**



#### 4. ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото проучване изследва ефекта на topiramate върху процесите на обучение и памет при плъхове с модел на амнезия, предизвикана чрез прилагането на бензодиазепина DZP. Той доведе до значително влошаване на пасивното обучение и памет както и на потискане на двигателната активност, което е в съответствие с други автори (Savić et al, 2005). Установихме, че прилагането на topiramate не успя да противодейства на тези ефекти и той също доведе до намаляване на хоризонталните движения. По отношение на пасивното обучение медикаментът не оказа негативен ефект, докато формирането на краткотрайните и дълготрайните паметови следи също беше нарушено. Установено е, че topiramate осъществява своето действие по няколко механизма: усилва хлорния инфлукс, медиран от GABA<sub>A</sub> рецепторите; блокира карбоанхидразата; блокира бързата инактивация на волтаж-зависимите Na<sup>+</sup>-канални; инхибира селективно волтаж-зависимите L-тип Ca<sup>2+</sup>-канални и е антагонист на йонотропните глутаматергични  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/kainite рецептори (Gryder & Rogawski, 2003). Предвид факта, че бензодиазепините усилват действието на GABA-ергичната медиация и този ефект допълнително се потенцира от topiramate, вероятно това е един от механизмите, водещ до наблюдавания от нас негативен ефект върху когнитивните функции.

Противоречиви са данните за влиянието на topiramate върху когнитивните функции както при интактни животни, така и при различни експериментални модели на епилепсия. Нашите данни са в съответствие с други автори, които установяват, че системното прилагане на медикамента (от 3 до 30 mg/kg) при интактни плъхове води до увреждане на работната памет, без да оказва негативен ефект върху вниманието (Shannon & Love, 2007). Други автори наблюдават, че ниски дози TPM 0.01, 0.1 и 1 mg/kg водят до подобряване, докато високите дози от 10 и 100 mg/kg увреждат консолидацията и възстановяването на разпознавателната памет при плъхове (de Lima et al., 2007). Тези резултати допълват други наши данни, при които установяваме, че при модел на епилепсия, topiramate проявява изразен позитивен ефект върху редица когнитивни домейни, което се дължи на значителен невропротективен ефект в хипокампуса (Shishmanova-Doseva et al, 2022). От друга страна, редица клинични данни показват, че при част от болните, лекувани с topiramate, се засягат когнитивните функции, най-често проявени като нарушения в концентрацията и вниманието; близо 8-16% имат проблеми с паметта и трудно намират думи (Stefan et al, 2008; Yang et al, 2009). Повечето имат преходен характер и са свързани обикновено със скоростта на титрация. Голяма част от страничните действия на topiramate са резултат от бързото повишаване на дозата или от взаимодействието с други АЕМ.

#### 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Topiramate не успя да противодейства на когнитивния дефицит, предизвикан посредством прилагането на diazepam, като доведе до затруднено формиране на краткотрайни и дълготрайни паметови следи при двата пасивни теста. Topiramate не успя да възстанови и потиснатата двигателната активност. Медикаментът не оказва

негативен ефект върху обучителните способности. Допълнителни изследвания са необходими за изясняване на механизмите на тези ефекти.

## REFERENCES

- Beracochea, D. (2006). Anterograde and retrograde effects of benzodiazepines on memory. *Scientific World Journal*, 6, 1460-1465.
- Costa, J. C., Costa, K. M., & do Nascimento, J. L. (2010). Scopolamine- and diazepam-induced amnesia are blocked by systemic and intraseptal administration of substance P and choline chloride. *Peptides*, 31(9), 1756-1760.
- de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Bromberg, E., & Schröder, N. (2007). Differential effects of low and high doses of topiramate on consolidation and retrieval of novel object recognition memory in rats. *Epilepsy and Behavior*, 10(1), 32-37.
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Seminars in Neurology*, 40(6), 617-623. doi: 10.1055/s-0040-1718719.
- Frisch, C., Kudin, A. P., Elger, C. E., Kunz, W. S., Helmstaedter, C. (2007). Amelioration of water maze performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced status epilepticus is negatively dose-dependent. *Epilepsy Research*, 73(2), 173-180.
- Gryder, D. S., & Rogawski, M. A. (2003). Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(18), 7069-7074.
- Kilova, K., & Kitova, T. (2021). Student opinion on the quality of distance medical learning in pandemic conditions. *Journal of Environmental Protection and Ecology*; 22(4), 1706-1714.
- Meador, K. J. (2002). Cognitive outcomes and predictive factors in epilepsy. *Neurology*, 58(8 Suppl 5), S21-6. doi: 10.1212/wnl.58.8\_suppl\_5.s21.
- Miller, T. D., Butler, C. R. (2022). Acute-onset amnesia: transient global amnesia and other causes. *Practical Neurology*, 22(3), 201-208. doi: 10.1136/practneurol-2020-002826.
- Savić, M. M., Obradović, D.I., Ugresić, N.D., & Bokonjić, D.R. (2005). Memory effects of benzodiazepines: memory stages and types versus binding-site subtypes. *Neural Plasticity*, 12(4), 289-98.
- Segura, I. A., McGhee, J., Della Sala, S., Cowan, N., & Pompéia, S. (2021). A reappraisal of acute doses of benzodiazepines as a model of anterograde amnesia. *Human Psychopharmacology*, 2021; 36(3):e2774.
- Shannon, H. E., & Love, P.L. (2007). Effects of antiepileptic drugs on learning as assessed by a repeated acquisition of response sequences task in rats. *Epilepsy and Behavior*, 10(1), 16-25. doi: 10.1016/j.yebeh.2006.11.004.
- Shishmanova-Doseva, M., Atanasova, D., Ioanidu, L., Uzunova, Y., Atanasova, M., Peychev, L., Tchekalarova, J. (2022). The anticonvulsant effect of chronic treatment with topiramate after pilocarpine-induced status epilepticus is accompanied by a suppression of comorbid behavioral impairments and robust neuroprotection in limbic regions in rats. *Epilepsy and Behavior*, 134, 108802. doi: 10.1016/j.yebeh.2022.108802.
- Stefan, H., Hubbertz, L., Peglau, I., Berrouschot, J., Kasper, B., Schreiner, A., Krimmer, J., Schauble, B., & TOPGER-13. (2008). Epilepsy outcomes in elderly treated with topiramate. *Acta Neurologica Scandinavica*, 118(3), 164-174. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01018.x.
- Watkins, L.V., Pickrell, W.O., & Kerr, M.P. (2019). Treatment of psychiatric comorbidities in patients with epilepsy and intellectual disabilities: Is there a role for the neurologist? *Epilepsy and Behavior*, 98(Pt B), 322-327.
- Yang, L., Weihua, Y., & Wang, X. (2009). Efficacy of topiramate in adult patients with symptomatic epilepsy: an open-label, long-term, retrospective observation. *CNS Drugs*, 23(4), 351-359. doi: 10.2165/00023210-200923040-00006.