

УДК 615.015:213/616-009.24

М. Я. Головенко, академік НАМН України, д-р мед. наук, проф.,

Л. С. Годлевський, д-р мед. наук, проф.,

І. П. Валіводзь,

В. Б. Ларіонов, д-р біол. наук,

А. С. Редер, канд. хім. наук,

Ж. М. Цапенко, канд. біол. наук

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОПОКСАЗЕПАМУ ПРОТИ АБСАНСНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ НА МОДЕЛІ КОРАЗОВОГО КІНДЛІНГУ

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса,
Одеський національний медичний університет

Вступ

Нейропатичний біль, що виникає при органічному ураженні або порушенні функцій різних відділів нервової системи та набуває хронічного перебігу, являє собою значну медичну та соціально-економічну проблему [1]. Серед сполук, що застосовуються для зниження цього больового синдрому, використовують, зокрема, габапентин і прегабалін, які є структурними аналогами гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК) [2], що визначає залучення цієї системи до процесів контролю та обмеження даного типу больової чутливості. У Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України серед 3-алкококси-пхідних 1,4-бенздіазепіну було виявлено низку сполук з високою активністю на моделях нейропатичного та ноцицептивного болю, одна з яких — пропоксазепам, що сьогодні розглядається як потенційний лікарський засіб [3; 4]. До того ж,

сполука виявила себе активною на моделях деяких хімічно-індукованих судом [5], на підставі чого додатковим компонентом в її фармакологічному спектрі можна очікувати проти-епілептичну дію. З огляду на це, обґрунтованим є визначення можливої протисудомної ефективності пропоксазепаму на моделі коразол-індукованого кіндлінгу, що є еквівалентною абсантній формі епілепсії.

Мета даної роботи — аналіз протисудомної дії пропоксазепаму на моделі коразол-індукованого кіндлінгу у мишей, а також характеристики динаміки перерозподілу судом різного ступеня тяжкості.

Матеріали та методи дослідження

У зв'язку з тривалим характером розвитку патологічного процесу тварини піддавались експозиції судомного агента (коразол, 30 мг/кг, підшкірно) та досліджуваної сполуки (пропоксазепам, внутрішньоочеревин-

но за 30 хв до введення коразолу) протягом 30 діб. Тривале введення коразолу субсудомними дозами (25–35 мг/кг) є характерною умовою кіндлінгу, хоча окремі схеми введення варіюють від щодобового [6] до введення через кілька днів [7]. У даному дослідженні була обрана схема введення хемоконвульсанта через 2–3 доби, що поєднує зниження травматичності для тварин (у зв'язку з парентеральним шляхом введення) та можливість досягнення необхідних показників кіндлінгу.

Протягом 29 діб тваринам контрольної групи вводили коразол і реєстрували показники судомної активності. Тваринам експериментальних груп вводили у різних дозах пропоксазепам внутрішньоочеревинно за 30 хв до введення коразолу (даний спосіб введення нівелює різницю між біодоступністю), що дозволяє оцінити власне протисудомну дію пропоксазепаму в умовах кіндлінгу, який розвивається.

На підставі даних попереднього визначення протисудом-

ної дії пропоксазепаму за антагонізмом з коразолом його середня ефективна доза при одноразовому введенні становить $(0,90 \pm 0,04)$ мг/кг. Для вивчення на моделі кіндлінг-епілепсії було обрано дози 1,0 мг/кг (близька до ED_{50}), а також дози із середнім кроком 0,33 за логарифмічною шкалою — двократна ED_{50} (2,0 мг/кг) та дози у межах одного (0,6 мг/кг) і двох (0,2 мг/кг) стандартних відхилень від середньої дози, що відповідає розвитку ефекту у ~ 22 та $\sim 7\%$ тварин за даними кривої «доза-ефект». Показниками активності були кількість судомних епізодів різного типу тяжкості, а також час їхнього розвитку з моменту введення судомного агента. Ці показники реєструвались окремо для кожної тварини у групі. Судомні напади групувались за ступенем тяжкості залежно від зовнішніх проявів відповідно до стандартної шкали.

Залежно від характеру розподілу дані представлені у вигляді «середнє арифметичне \pm стандартне відхилення у вибірці» або як показники центральної тенденції — «медіана (перший \div третій квартиль)».

Відносний внесок судомних нападів різного ступеня тяжкості у загальну величину судомної готовності в кожній групі визначали як нормалізоване співвідношення суми судомних нападів кожної групи до загальної кількості судом у групі:

$$I_i = \frac{N_i}{N} \cdot 100\%,$$

де I_i — внесок (у %) судомних нападів груп тяжкості i (1–5); N_i — кількість судомних нападів відповідної групи; N — загальна кількість судомних нападів у групі тварин.

Інтегральна характеристика розвитку стану кіндлінгу в кож-

ній експериментальній групі тварин здійснювалася з використанням індексу судом (кіндлінгу):

$$I = \frac{A + 2B + 3C + 4D + 5E}{A + B + C + D + E},$$

де A, B, C, D та E — кількість судомних нападів різного ступеня важкості для кожної тварини відповідно.

Попередня оцінка характеру розподілу кожного виду даних щодо відповідності до нормального закону розподілу проводилася з використанням показників асиметрії та ексцесу. Якщо показники даних величин не перевищували значення відповідних похибок більш ніж удвічі, як характеристику різниці використовували критерій Стюдента, а дані представляли у вигляді «середнє арифметичне \pm стандартне відхилення у вибірці». У разі значного відхилення розподілу від нормального оцінку вірогідності різниці між групами проводили з використанням методів непараметричної статистики (медіанний критерій Уїлкоксона — Манна — Уїтні), наводячи дані у вигляді «медіана (перший \div третій квартиль)» [8]. Вірогідність різниці відносних нормованих показників (внесок окремих типів судомних нападів) оцінювали методом χ^2 Пірсона.

Результати дослідження та їх обговорення

Утворення патологічного осередку активності у головному мозку, що характеризується пароксизмальною активністю, яка не зменшується, є однією з відомих причин виникнення та розвитку епілептичних нападів. В умовах введення хемоконвульсантів основним механізмом виникнення таких осередків найчастіше є блокування процесів гальмування, на тлі

чого електрична активність, що виникає спонтанно у ЦНС або викликається зовнішніми стимулами, не блокується та перростає у патологічний процес.

Тривале введення коразолу викликає зміну щільності та чутливості глутаматних рецепторів, а також вміст цього нейротрансмітера у різних ділянках мозку (особливо у гіпокампі [9]). Поряд з глутаматними рецепторами також змінюється кількість рецепторів інозитолтрифосфату [10]. Вплив на ГАМК-залежні механізми гальмування є провідним у початкових фазах розвитку кіндлінгу та реалізується через рецепторну взаємодію (блокування активності ГАМК_A-рецепторів), тимчасом як у подальшому спостерігається одночасне збільшення вивільнення ГАМК (насамперед у гіпокампі) поряд зі зниженням чутливості рецепторів до цього медіатора. Також важливу роль у розвитку індукованої кіндлінгом судомної готовності відіграє зміна чутливості ампакінових рецепторів (рецептори α -аміно-3-гідрокси-5-метил-ізоксазол-4-пропіонової кислоти) [11].

Втрата контролю над процесами збудження та їх розповсюдження корою головного мозку зовнішньо проявляється у різних за величиною і локалізацією мимовільних скороченнях груп м'язів. При застосуванні моделі кіндлінг-епілепсії ці зовнішні прояви класифікуються (групуються) за характером ступеня тяжкості, що відображує зниження обмежувальних гальмівних функцій ЦНС.

Аналіз первинних експериментальних даних показав, що їх розподіл не може бути описаний нормальним (гаусовим) законом розподілу, оскільки переважна частина груп даних мають різні показники асимет-

рії та ексцесу (у 1,5–2,8 разу перевищують значення величин відповідних стандартних відхилень). У зв'язку з цим для відповідних даних контрольної та експериментальних груп тварин однакові значення різниці оцінювалися на підставі непараметричного критерію Уїлкоксона — Манна — Уїтні.

Слід відзначити, що нападів п'ятого (найвищого) ступеня тяжкості не спостерігалось у жодній експериментальній групі тварин, а напади четвертого ступеня тяжкості відмічалися лише у поодиноких тварин і лише у термінальні дні експерименту. Для нападів першого-третього ступеня тяжкості, однак, розраховані значення вірогідності різниці не демонструють належного рівня ($p > 0,2-0,6$), що не дає змоги зробити висновок про вірогідність впливу введених доз пропоксазепаму на розвиток судомних нападів при хронічному введенні коразолу. Тільки для показників кількості судомних нападів другого ступеня тяжкості у групі тварин, які отримували пропоксазепам дозою 2,0 мг/кг, розраховані значення вірогідності були нижче 0,05 (8-ме та 9-те введення).

Для тварин як контрольної (рис. 1, *a*), так і експериментальних груп (рис. 1, *b-d*) спостерігається зменшення латентного часу прояву судом першого ступеня тяжкості. У контрольній групі тварин та групі, що отримували пропоксазепам дозою 0,2 мг/кг, мінімальне значення латентного часу судом першого ступеня тяжкості припадає на 8–11-й день введення коразолу, що може бути розцінене як відсутність суттєвого впливу сполуки на розвиток тривалих нейродегенеративних змін.

У контрольній групі тварин до 8-го введення коразолу від-

мічається також виникнення судом третього та четвертого ступенів тяжкості, однак стабільно ці показники починають проявлятися лише після 11-го введення (див. рис. 1, *a*). В експериментальній групі тварин (0,2 мг/кг пропоксазепаму) судом третього та четвертого ступенів тяжкості проявляються пізніше (13-те введення). Поряд із цим, навіть при введенні пропоксазепаму високими дозами (1,0 та 2,0 мг/кг), спостерігаються судомні напади третього типу тяжкості (див. рис. 1, *b, c*).

Вочевидь, вплив пропоксазепаму навіть високими дозами на ГАМК-рецепторну систему не компенсує функціональних змін в інших медіаторних системах (NMDA-, аспартатна і глутаматна), що залучені до процесу розвитку кіндлінгу.

З точки зору глибини розвитку патологічного процесу кіндлінг-епілепсії, показовим також є парціальний внесок кожного типу судом у загальний судомний напад. З метою відносної оцінки зміни якісного складу судомного нападу парціальні внески кожного типу судом були визначені по відношенню до загальної суми всіх судом (рис. 2, *a-d*). Даний метод трансформації даних не тільки відображує окремий внесок кожного типу судом, але й дає уявлення щодо глибини впливу тривалого введення коразолу на баланс систем гальмування та збудження.

У тварин контрольної групи (див. рис. 2, *a*) протягом розвитку кіндлінг-стану спостерігається поступове зменшення внеску судом першого ступеня тяжкості з одночасним збільшенням репрезентації судом вищої тяжкості, що виникають внаслідок функціональних змін у ЦНС. Уже 4-те введення призводить не тільки до збільшення внес-

ку судомних нападів третьої групи, а й появи (до 3–6 %) більш тяжких компонентів. Після 6-го введення їх наявність у судомному спектрі стає постійною, хоча сумарний внесок не перевищує 6 % (див. рис. 2, *a*).

Загалом оцінка парціального внеску більш показово демонструє вплив введених доз пропоксазепаму на спектр судомного нападу (див. рис. 2, *b-d*). У спектрі судомної активності тварин, які отримували пропоксазепам дозою 2,0 мг/кг, практично не спостерігалось прояву нападів навіть другого ступеня тяжкості. Можна припустити, що пропоксазепам у цій дозі безпосередньо впливає на пригнічення розповсюдження збудження через ГАМК-ергічну систему, що компенсує активацію інших медіаторних систем.

Один з класичних параметрів, якими характеризують розвиток кіндлінг-стану, — це індекс судом (*I*), який є одночасно й нормалізованим, й усередненим показником внеску кожного типу судом у загальний стан кіндлінгу, що реєструється.

Розраховані величини судомного індексу не зазнають суттєвих змін і не перевищують величини 2,0 (рис. 3). Як у контрольній групі, так і в експериментальних групах тварин, що отримували низькі дози пропоксазепаму (0,2 та 0,6 мг/кг), даний показник не зазнає статистично значущих відмінностей та лише в групі тварин, які отримували пропоксазепам дозою 2,0 мг/кг, не спостерігається його тенденції до значного підвищення.

Загалом, аналіз первинних даних (латентний час розвитку судомних нападів, їхня кількість і ступінь тяжкості) не дозволяє однозначно зробити висновок про величину внеску

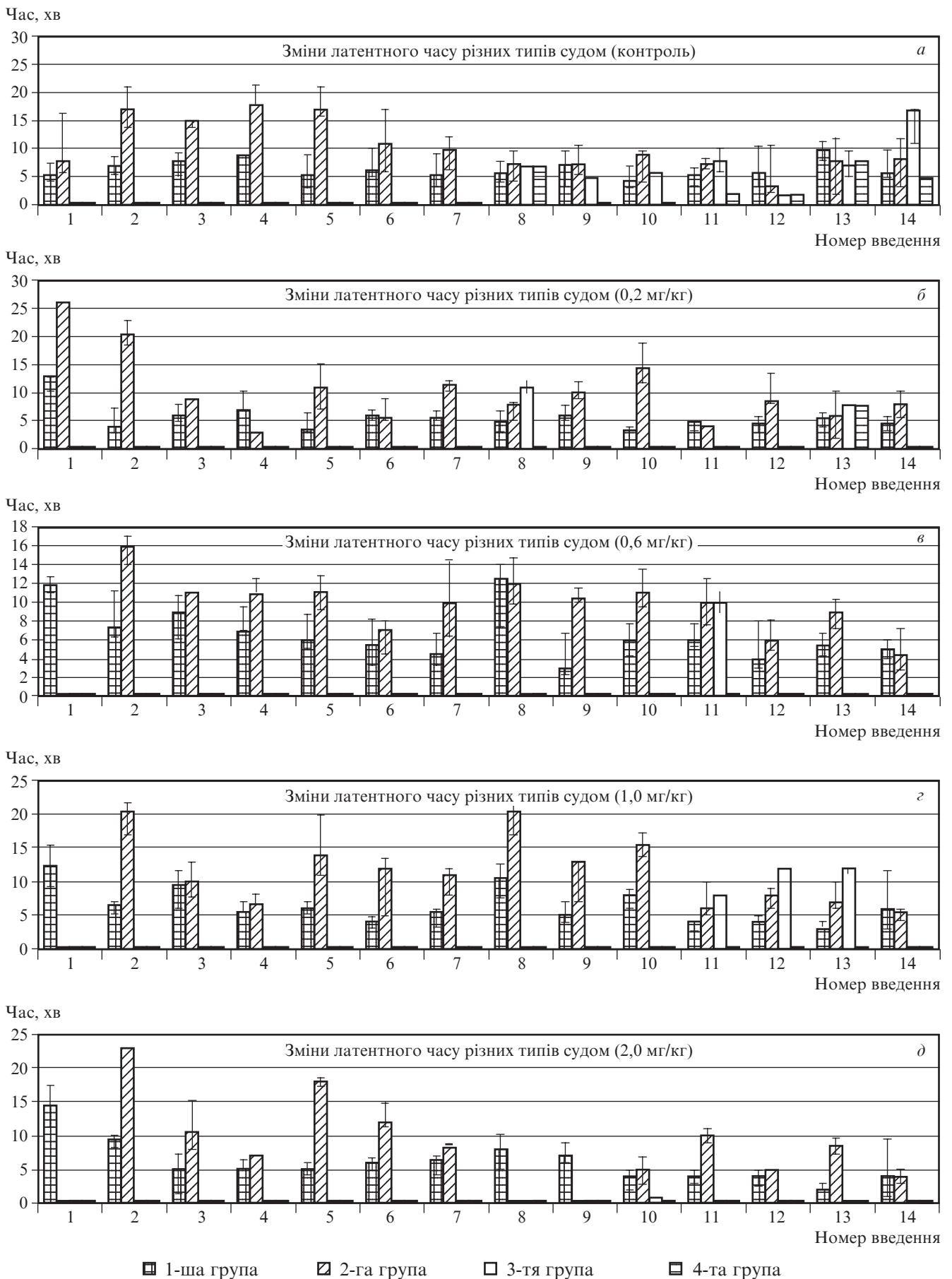


Рис. 1. Зміна латентного часу розвитку різних типів судом у контрольній групі тварин (а) та в експериментальних групах (б–д), що отримували пропоксазепам (0,2–0,6–1,0–2,0 мг/кг відповідно), медіана (перший-третій кuartиль)

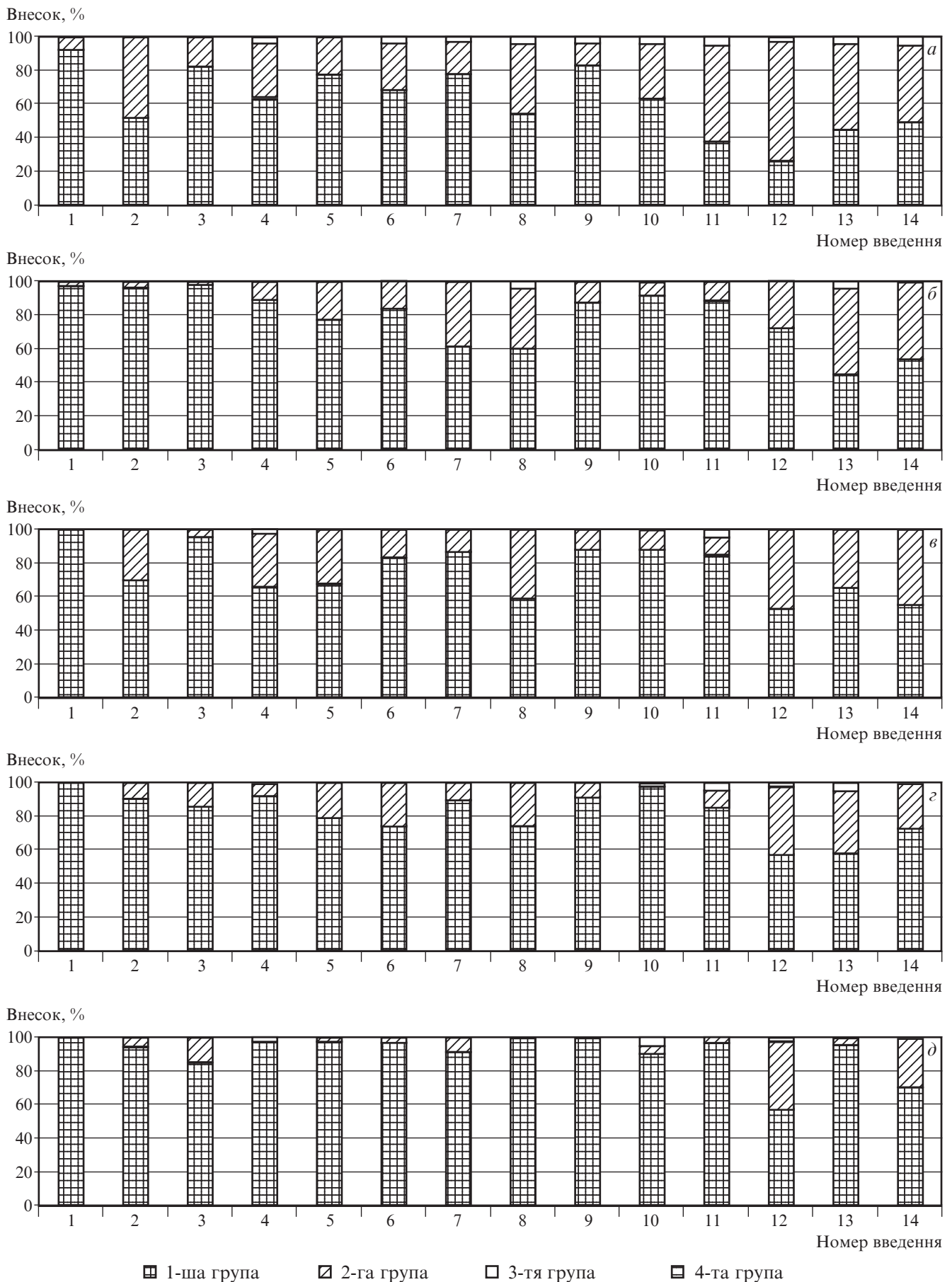


Рис. 2. Зміна парціального внеску судом різного ступеня тяжкості у загальну кількість судомного нападу мишей у контрольній групі тварин (а) та в експериментальних групах (б-д), що отримували пропоксазепам (0,2-0,6-1,0-2,0 мг/кг відповідно)

Індекс судом, I

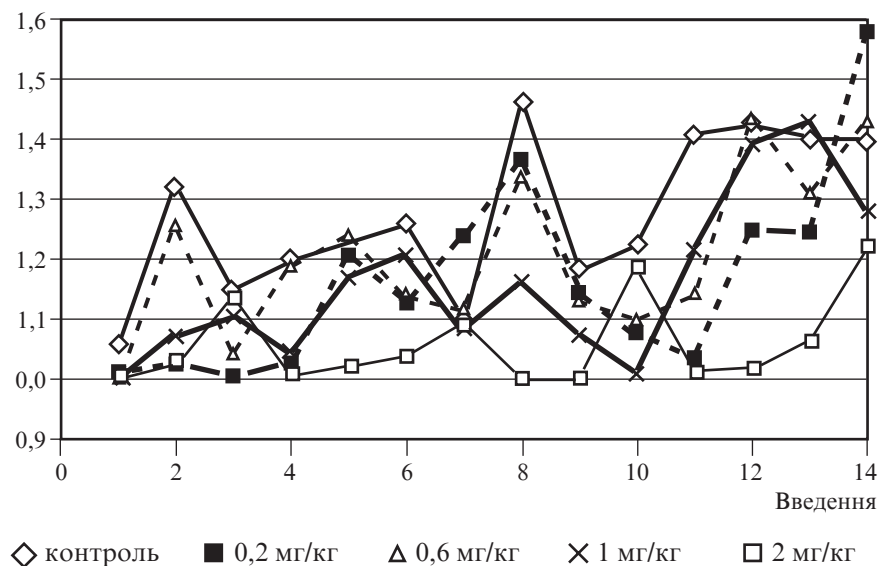


Рис. 3. Зміна величини індексу судом контрольної та експериментальних (пропоксазепам дозами 0,2–2,0 мг/кг) груп тварин у процесі розвитку кіндлінгу

пропоксазепаму, що вводиться, на гальмування розвитку кіндлінгового стану у експериментальних тварин. Однак дисперсійний аналіз цих даних у контрольній та експериментальних групах характеризує вплив сумарного фактора введених доз пропоксазепаму (0,2–2,0 мг/кг) на рівні 23 % і залише на частку неврахованих факторів близько 77 % (табл. 1). На перший погляд, це є досить низьким показником (незважаючи на статистично вірогідний результат з $p=0,002$) для сполуки, що у гострому експерименті виявила високу протисудомну дію щодо коразолу, особливо з ураху-

ванням статистично вірогідних різниць за групами судом високого ступеня тяжкості. Проте це може бути пов'язане з відсутністю впливу низьких доз пропоксазепаму, занадто високою варіабельністю контрольних значень або поєднанням факторів, що взаємно виключають один одного (наприклад, відсутність ефективності пропоксазепаму у термінальних етапах розвитку кіндлінг-стану). Сепарація комплексного фактора (сукупність доз пропоксазепаму) на окремі підгрупи й оцінка впливу кожної дози, що вводилася (порівняно з контрольною групою), дозволяють виявити підвищен-

ня впливу дози пропоксазепаму (від 11,8 до 51,9 % для доз 0,2–2,0 мг/кг). На підставі розрахованих величин внеску даних факторів можливо не тільки статистично вірогідно (для кожної окремої групи рівень вірогідності становив $<0,001$) виявити існування дозозалежного впливу пропоксазепаму, а й пояснити неможливість визначення його іншими методами аналізу даних, оскільки такий низький внесок не тільки не визначається у вигляді задовільної тенденції, але й низькі дози пропоксазепаму мають дію, що не є статистично вірогідною.

Висновки

1. При введенні коразолу (20 мг/кг, підшкірно) з інтервалами в одну добу розвиток кіндлінг-стану спостерігається при 8–11-му введенні судомного агента, що підтверджується показниками латентного часу розвитку судом і наростанням ступеня їхньої тяжкості.

2. Введення низьких доз (0,2–0,6 мг/кг) пропоксазепаму протягом періоду формування кіндлінгу не має значного протисудомного ефекту, хоча й гальмує прояв судом третього та четвертого ступеня тяжкості до 13-го введення хемоконвульсанта.

3. Високі дози пропоксазепаму (1,0–2,0 мг/кг) гальмують

Таблиця 1

Дисперсійний аналіз впливу доз пропоксазепаму на процес формування кіндлінгу у мишей

Показник	Загальний вплив	Вплив дозозалежних факторів			
		0,2 мг/кг	0,6 мг/кг	1,0 мг/кг	2,0 мг/кг
Факторна дисперсія (факторна варіанса)	1,114	0,077	0,032	0,086	0,318
Нефакторна дисперсія (групова варіанса)	0,336	0,574	0,463	0,457	0,295
Сумарна дисперсія	1,450	0,651	0,495	0,544	0,613
Внесок врахованих факторів, %	23	11,8	6,5	15,9	51,9
Внесок неврахованих факторів, %	77	88,2	93,5	84,1	48,1
Розрахований рівень вірогідності різниці, p	0,002	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$

Примітка. Загальний вплив — контроль та дози пропоксазепаму (0,2, 0,6, 1,0 і 2,0 мг/кг).

розвиток судом високого ступеня тяжкості; при аналізі парціального внеску окремих за тяжкістю судом у загальний судомний напад встановлено, що при високих дозах (2,0 мг/кг) практично не спостерігається прояву нападів навіть другого ступеня тяжкості.

4. За результатами дисперсійного аналізу внесок фактора дози пропоксазепаму при виявленні його протисудомної дії на моделі кіндлінг-епілепсії становить від 11,8 до 51,9 % (для доз 0,2–2,0 мг/кг).

Ключові слова: пропоксазепам, кіндлінг-епілепсія, протисудомна дія, коразол.

ЛІТЕРАТУРА

1. Данилов А. Б. Нейропатическая боль / А. Б. Данилов, О. С. Давыдов. – М. : Боргес, 2007. – 198 с.

2. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and

their Possible Mechanisms / V. I. Pavlovsky, O. V. Tsybalyuk, V. S. Martynuk [et al.] // *Neurophysiology*. – 2013. – Vol. 45, N 5/6. – P. 427–432.

3. Blommel M. L. Pregabalin: An antiepileptic agent useful for neuropathic pain / M. L. Blommel, A. L. Blommel // *Am J Health-Syst Pharm*. – 2007. – Vol. 64. – P. 1475–1482.

4. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology / C. P. Taylor, N. S. Gee, T. Z. Su [et al.] // *Epilepsy Research*. – 1998. – Vol. 29. – P. 233–249.

5. Активация ГАМК-ергической системы пропилоксипроизводным 1,4-бензодиазепина на моделях нейропатической боли и судорог / Н. Я. Головенко, В. Б. Ларионов, А. С. Редер [и др.] // *Журнал национальной академии медицинских наук Украины*. – 2016. – № 3. – С. 247–252.

6. Review on Chemical Induced Kindling Models of Epilepsy / A. Kumar, N. Sharma, M. Bhardwaj, S. A. Singh // *J Vet Med Res*. – 2016. – Vol. 3, N 3. – P. 1050–1054.

7. Ergul Erkek O. Pentylene tetrazole Kindling Epilepsy Model / O. Ergul Erkek, O. Arihan // *Epilepsi*. – 2015. – Vol. 21, N 1. – P. 6–12.

8. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В. Ю. Урбах. – М. : Медицина, 1975. – 297 с.

9. Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus / Z. P. Li, X. Y. Zhang, X. Lu [et al.] // *Neurochem Int*. – 2004. – Vol. 44, N 4. – P. 263–270.

10. The effect of pentylene tetrazole kindling on synaptic mechanisms of interacting glutamatergic and opioid system in the hippocampus of rats / H. Schroeder, A. Becker, G. Grecksch [et al.] // *Brain Res*. – 1998. – Vol. 811, N 1. – P. 40–46.

11. Ekonomou A. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylene tetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy / A. Ekonomou, A. L. Smith, F. Angelatou // *Brain Res Mol Brain Res*. – 2001. – Vol. 95. – P. 27–35.

Надійшла до редакції 13.10.2017

Рецензент д-р мед. наук,

проф. В. Й. Кресюн,

дата рецензії 18.10.2017

УДК 615.015:213/616-009.24

М. Я. Головенко, Л. С. Годлевський, І. П. Валіводзь, В. Б. Ларионов, А. С. Редер, Ж. М. Цапенко

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОПОКСАЗЕПАМУ ПРОТИ АБСАНСНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ НА МОДЕЛІ КОРАЗОВОГО КІНДЛІНГУ

Метою роботи був аналіз протисудомної дії пропоксазепаму на моделі коразол-індукованого кіндлінгу у мишей, а також характеристики динаміки перерозподілу судом різного ступеня тяжкості.

Протягом 29 днів тваринам контрольної групи вводили коразол. Тваринам експериментальних груп — пропоксазепам (2,0, 1,0, 0,6 та 0,2 мг/кг) внутрішньоочеревинно за 30 хв до введення коразолу. Враховувалися кількість судомних епізодів різного типу тяжкості, а також час їх розвитку з моменту введення коразолу. Визначали внесок судом різного ступеня тяжкості у загальну величину судомної готовності, а також індексу судом.

Встановлено, що введення низьких доз (0,2–0,6 мг/кг) пропоксазепаму протягом періоду формування кіндлінгу не має значного протисудомного ефекту, хоча й гальмує прояв судом третього та четвертого ступеня тяжкості. Високі дози пропоксазепаму (1,0–2,0 мг/кг) гальмують розвиток судом високого ступеня тяжкості; при введенні високих доз (2,0 мг/кг) практично не спостерігається прояву нападів навіть другого ступеня тяжкості. За результатами дисперсійного аналізу внесок фактора дози пропоксазепаму на моделі кіндлінг-епілепсії становить від 11,8 до 51,9 % для доз 0,2–2,0 мг/кг.

Ключові слова: пропоксазепам, кіндлінг-епілепсія, протисудомна дія, коразол.

UDC 615.015:213/616-009.24

M. Ya. Golovenko, L. S. Godlevsky, I. P. Valivodz', V. B. Larionov, A. S. Reder, Zh. N. Tsapenko

EVALUATION OF PROPOXAZEPAM EFFICACY AGAINST ABSENCE EPILEPSY IN THE MODEL OF PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED KINDLING

The aim of the study was the analysis of propoxazepam anticonvulsive action on the model of pentylene tetrazole-induced kindling in mice, and various seizures redistribution dynamics characterization.

Animals of the control group were receiving pentylene tetrazole for 29 days subcutaneously, while those of experimental groups were administered prior to it (30 min before) with propoxazepam (2.0, 1.0, 0.6 and 0.2 mg/kg) intraperitoneally. The number of different severity seizures and time of their appearing after chemoconvulsive agent administration were recorded. The contribution of varying severity seizures into the total convulsive readiness, as well as the seizure index, was determined.

It has been found that administration of propoxazepam low doses (0.2–0.6 mg/kg) in the period of kindling formation does not have a significant anticonvulsant effect, although the manifestation of third and fourth severity degree seizures was inhibited. Propoxazepam high doses (1.0–2.0 mg/kg) inhibit the development of highest severity convulsions. When high doses are administered (2.0 mg/kg), there is practically no seizure even in the second severity degree. Based on the results of the dispersion analysis, the contribution of the propoxazepam dose factor to the model of kindling epilepsy ranges from 11.8% to 51.9% (for doses of 0.2–2.0 mg/kg).

Key words: propoxazepam, kindling epilepsy, anticonvulsant effect, pentylene tetrazole.