

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Факультет хімії та фармації
Кафедра фармакології та технології ліків

Дипломна робота

на здобуття ступеня вищої освіти магістра

на тему: «**Антиепілептична дія пропоксазепаму на експериментальних моделях судом різного генезу та абсансу**»

«Antiepileptic effect of propoxazepam on experimental models
of different genesis seizures and absence»

Виконала: студентка денної форми навчання
спеціальності 102 Хімія
Беженар Наталія Павлівна

Керівник: к. б. н., доц. Еберле Л.В. _____
(підпис)

Рецензент: д.б.н., снс відділу фізико-хімічної
фармакології ФХІ імені О. В. Богатського
Ларіонов В.Б.

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
№ ____ від ____ червня 2020 р.

Завідувач кафедри
____ д.мед.н., проф. Грицук О.І.
(підпис)

Захищено на засіданні екзаменаційної комісії № ____
протокол № ____ від « ____ » ____ 2020 р.
Оцінка ____ / ____ / ____
(за національною шкалою, за шкалою ECTS, бал)

Голова екзаменаційної комісії
____ к. х. н., доц. Марцинко О.Е.
(підпис)

Одеса – 2020

РЕФЕРАТ

Епілепсія одне з найбільш поширених захворювань центральної нервової системи, що являє значну медичну і соціально-економічних проблему, яке потребує пошуку нових терапевтичних засобів для лікування та контролю епілептичних станів.

Мета роботи – проведення скринінгових досліджень протисудомної дії пропоксазепаму на моделі судом, викликаних 4-амінопіридином, пікротоксином та коразолом.

За результатами проведеного дослідження було встановлено механізм протисудомної дії алкоксипро-похідних бензодіазепіну (пропоксазепаму) на моделях хімічно індукованих моделях.

На підставі даних кривих "доза-ефект", використовуючи порівняльний квантільний аналіз для хемоконвульсантів з різним механізмом дії, показані різні етапи взаємодії пропоксазепаму з рецепторами ГАМК і гліцину в умовах *in vivo*. Оцінені величини парціальних внесків міоклонічного і тонічного компонентів в загальну структуру судомних нападів, викликаних різними хемоконвульсантами.

Одержанні результати свідчать про переважну реалізації протисудомної дії пропоксазепаму за допомогою ГАМК-ергічного механізму. Показано, що гліцинергічні компоненти, які беруть участь в гальмуванні судом, задіяні при введенні пропоксазепаму в дозах, що перевищують ефективну дозу служать додатковим засобом протисудомного захисту.

Ключові слова: *пропоксазепам, 4-амінопіридин, пікротоксин, коразол.*

Кваліфікаційна робота викладена на 51 сторінках друкованого тексту та містить: 8 таблиць; 11 рисунків; використано 40 літературних джерел.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Загальна характеристика епілепсії та її види	6
1.2. Причини появи еліптогенних осередків	7
1.5. Механізм дії протиепілептичних препаратів	10
1.6. Клініка епілептичної хвороби.....	11
1.8. Лікування епілепсії	13
1.9. Експериментальні моделі дослідження епілепсії	17
1.10. Фактори, що впливають на чутливість тварин до фармакологічних речовин.....	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	20
2.1. Реактиви та матеріали	20
2.2. Експериментальні тварини	20
2.3. Підготування тварин до експерименту	21
2.4. Визначення протисудомної дії на моделі 4-амінопіридин-індукованих судом	21
2.5. Визначення протисудомної дії на моделі судом, індукованих пікротоксином	21
2.6. Визначення протисудомної дії на моделі судом, індукованих коразолом в умовах кіндлінгу.....	22
2.6.1. Реєстровані показники.....	23
2.7. Статистична обробка експериментальних даних	23
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	25
3.1. Протиепілептична дія пропоксазепаму по антагонізму з 4-АП	25

3.2. Протиепілептична дія пропоксазепаму по антагонізму пікротоксином.	32
3.3. Протиепілептична дія пропоксазепаму на моделі кіндлінг-епілепсії.....	40
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	48

ВСТУП

Епілепсія - одне з найбільш частих і небезпечних порушень діяльності мозку у всьому світі. За даними комісії Міжнародної протиепілептичної ліги (*International League Against Epilepsy - ILAE*), в більшості розвинених країн світу щорічно реєструється 50-70 випадків захворюваності на 100 тис. населення[1].

Кожна клінічна форма епілепсії характеризується своїм механізмом розвитку, тому результативність лікування в значній мірі залежить від правильно підбраного протиепілептичного терапевтичного заходу.

На фармацевтичному ринку України існує значний арсенал препаратів для лікування епілепсії, однак не всі вони мають однакову специфічну активність, і крім того, мають цілу низку побічних ефектів, що значно ускладнюють процес лікування. Крім того, у багатьох пацієнтів відзначається фармакорезистентність до багатьох лікарських засобів, що ускладнює контроль та терапію даного захворювання [2].

У світлі цього необхідно проводити пошук і вивчення нових протиепілептичних препаратів, які б мали високу терапевтичну активність і достатній профіль безпеки для забезпечення ефективного контролю за нападами з урахуванням різних вікових категорій населення.

У цих умовах перспективні дослідження в галузі вивчення фармакологічних властивостей нових хімічних сполук на основі різних гетероциклічних систем. Нашу увагу привернув пропоксазепам, який відомий широким спектром біологічної активності та згідно попередніх досліджень, проявляє анксиолітичну, седативну та протисудомну дії [3].

Мета роботи – проведення скринінгових досліджень протисудомної дії пропоксазепаму на моделі судом, викликаних 4-АП, пікротоксином та коразолом. Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні завдання:

- визначити середню ефективну дозу пропоксазепаму на моделі судом, викликаних 4-АП та пікротоксином у мишей;

спостерігалися значущі відмінності, а саме: в контрольній групі кількість судомних нападів значно зменшується, тоді як в експериментальній групі демонструється значне збільшення їх кількості. Це свідчить про те, що попереднє тривале введення пропоксазепаму в дозі 2,0 мг / кг не має захисної дії відносно розвитку кіндлінг-стану, оскільки дані порушення функціонування ЦНС реалізуються не через ГАМК-ергічні механізми блокування збудження.

У другій фазі експерименту при скасуванні введення пропоксазепаму і введенні коразолу в експериментальній групі тварин відзначається статистично достовірний перерозподіл співвідношення різних типів судом, що підтверджує зроблений раніше висновок про відсутність протективної дії пропоксазепаму щодо медіаторних систем, відмінних від ГАМК-ергічної. Але статистично значущий вплив пропоксазепаму на співвідношення компонентів судомного нападу в контрольній групі дає підставу припустити, що розвиток стану кіндлінга не стикається в значній мірі ГАМК-ергічних механізмів, за допомогою яких реалізується ефект блокування біохімічних механізмів епілептичного процесу у тварин даної групи.

ВИСНОВКИ

1. На моделі судом, індукованих 4-амінопіридином (блокатор швидких потенціалзалежних калієвих каналів) пропоксазепам проявив помірну активність ($ED_{50} = 37,3 \pm 7,9$ мг / кг). На моделі судом, викликаних пікротоксином (конкурентний блокатор ГАМК) середня ефективна доза пропоксазепаму склала $1,67 \pm 0,09$ мг/кг.

2. Кількість міоклонічних судом і латентний час їх розвитку після введення 4-амінопіридину не зазнають статистично значущих відмінностей в порівнянні з тваринами контрольної групи. Навпаки, підвищується кількість тонічних судом (до 70-85 %) в загальному судомному нападі.

3. Міоклонічний компонент (латентний час до розвитку міоклонічних судом та їх кількість) судомного нападу та час до загибелі тварин є більш репрезентативними показниками протисудомної дії пропоксазепаму, що може бути пов'язане з механізмом його конкуренції на рівні ГАМК_A-рецепторів з пікротоксином.

4. Аналізуючи данні латентного часу розвитку судом різної важкості видно, що пропоксазепам не володіє вираженою проєктивною дією на розвиток кіндлінг-епілептичного статусу. Проте в дозі пропоксазепаму 2 мг/кг у мишей з вже розвинутою формою кіндлінгу пригнічує прояви судом, індукованих коразолом.

5. Введення пропоксазепаму (в дозі 2,0 мг/кг) при моделюванні епілептичного статусу коразолом в 2 фазі дослідження блокував судоми третього та четвертого ступеня важкості, що може виступати доказом про залучення ГАМК-ергічних механізмів в гальмуванні пароксизмальної активності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Данилов А. Б., Давыдов О. С. // Нейропатическая боль. М.: Боргес, 2007.- 198 с.
2. Pavlovsky V. I., Tsymbalyuk O. V., Martynyuk V. S., Kabanova T. A., Semenishyna E. A., Khalimova E. I., Andronati S. A. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms. *Neurophysiology* 2013; 45(5/6): 427-432.
- 3 . Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів : методичні рекомендації / Під ред. акад. М. Я. Головенко, проф. Л. О. Громова.— К. : ДФЦ МОЗ України, 2003. — 46 с.
4. Свистільник В.О. Клініка епілепсій та епілептичних припадків у дітей *Современная педиатрия* 8(56)/2013
5. D'souza D. C., Gil R. B., Zuzarte E. et al. γ -Aminobutyric acid — serotonin interactions in healthy men: implications for network models of psychosis and dissociation // *Biol. Psychiatry*. — 2006. — Vol. 59. — P. 128–137.
6. Луценко Р. В., Бобирьев В. Н., Девяткина Т. А. Анксиолитическое действие производных 2-оксииндолин-3-глиоксиловой кислоты: компьютерное прогнозирование и экспериментальное подтверждение // *Казанский мед. ж.* — 2013. — Т. 94, №4. — С. 553–560.
7. Тодорів І.В. Винник М.І. Клініка, патогенез та лікування лімбічної епілепсії, 50с.
8. Луценко Р. В. Производные 2-оксииндолин-3- глиоксиловой кислоты при резерпиновой модели депрессии // *Вестн. Винницкого гос. мед. ун-та.* — 2011. — №1. — С. 123–125.
9. Wesołowska A., Nikiforuk A., Chojnacka-Wójcik E. Anticonvulsant effect of the selective 5-HT_{1B} receptor agonist CP 94253 in mice // *Eur. J. Pharm.* — 2006. — Vol. 541, N 1–2. - P. 57 - 63.
10. Pandi-Perumal S. R., Verster J. C., Kayumov L., Lowe A. D., Santana M. G., Pires M. L. N., Tufik S. and Mello M. T. Sleep disorders, sleepiness and

trafficsafety: a public health menace// Braz. J. Med. Biol. Res. — 2006. — Vol. 39. — P. 863–871.

11. Рудакова И. Г., Белова Ю. А., Котов А. С. Фармакорезистентная эпилепсия поддается лечению // Вестн. эпилептол. — 2013. — №1. — С. 3–7

12. . Kwan P. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions / P. Kwan, M. J. Brodie // Expert. Rev. Neurother. — 2006. — Vol. 6, N 3. — P. 397-406.

13. Рудакова И. Г. Фармакорезистентная эпилепсия поддается лечению / И. Г. Рудакова, Ю. А. Белова, А. С. Котов // Вестн. эпилептологии. — 2013. — № 1. — С. 3-7.

14. White D. C. Synthesis and anticonvulsant evaluation of some new 2-substituted 3-arylpyrido [2,3-d]pyrimidinones / D. C. White, T. D. Greenwood, A. L. Downey // Bioorg. & Med. Chem. — 2004. — Vol. 12, N 1. — P. 5711-5717.

15. Canoun-Poitrine F., Bastuji-Garin S., Alonso E. et al. Risk and prognostic factors of status epilepticus in the elderly: a case-control study // Epilepsia. — 2011. — Vol. 52, N 10. — P. 1849–1856.

16. Cock R H., Schapira A. H. A comparison of lorazepam and diazepam as initial therapy in convulsive status epilepticus // Quart. J. Med. — 2002. — Vol. 95. — P. 225–231.

17 . Джагацпаян И. А., Парокинян Р. Г., Назарян И. М. Экспериментальная характеристика нейротропного спектра некоторых антиэпилептических препаратов // Эксперим. и клин.фармакол. — 2003. — Т. 66, №6. — С. 20–23.

18. Харрисон – Внутринние болезни, с.3049

19. Авакян Г. Н. Экспериментальные и клинические подходы к лечению эпилепсии / Г. Н. Авакян // «Эпилепсия — диагностика, лечение, социальные аспекты» : материалы междунар. конф. / Под ред. Е. И. Гусева, А. Б. Гехт. — М., 2005. — С. 8-9.

20. Luijtelaar G., Sitnikova E. Global and focal aspects of absence epilepsy: The Contribution Of Genetic Models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 30: 983–1003. 2006.
21. Steinlein O.K. Genetic Mechanisms That Underlie Epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*. 5(5): 400-408. 2004.
22. Gerald M.C. Acute and chronic effects of d- and l-amphetamine on seizure susceptibility in mice / M. C. Gerald, W. H. Riffée // *Eur. J. Pharmacol.* — 1973. — 21 (3) — P. 323-330.
23. Болдырева С. Р. Побочные действия антиэпилептических препаратов / С. Р. Болдырева, А. Ю. Ермаков // *Клин.эпилептология*. — 2009. — № 1. — С. 23-25.
24. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських ЗАСОБІВ. Методичні рекомендації / Стефанов О.В. // Київ: МОЗ України. Державний фармакологічний центр. — 2001. — 527 с.
25. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes // Council of Europe, - Strasbourg, 1986. — 53 p.
26. . Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // *Експерим. та клін. фізіологія та біохімія*. — 2003. — Т. 2, № 22. — С. 108-109.
27. Anil Kumar, Sharma N, Bhardwaj M, Singh S (2016) A Review on Chemical Induced Kindling Models of Epilepsy. *J Vet Med Res* 3(3): 1050-1054.
28. Ergül Erkeç Ö., Arihan O. Pentylene-tetrazole Kindling Epilepsy Model // *Epilepsi* 2015;21(1):6-12.
29. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel Киев: Морион, 2001. — 408 с. — ISBN 966-7632-33-4.
30. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М. : Практика, 1999. — 334 с.

-
31. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
 32. Куценко С. А. Основы токсикологии. Санкт-Петербург, 2002, 119 с.
 33. John G. R. Seizure., 19, 638–646 (2010).
 34. Головенко Н. Я., Ларионов В. Б., Редер А. С., Валиводзь И. П. Нейрохимия., 4, 304-309 (2017).
 35. Taylor C. P., Gee N. S, Ti-Zhi Su, et al. Epilepsy Research., 29, 233–249. (1998).
 36. Dworkin R. H., O'Connor A. B., Backonja M. et al. Pain, 132(3), 237–251 (2007) .
 37. Blommel M. L. Blommel A. L. Am J Health-Syst Pharm., 64 (15), 1475-1482. (2007).
 38. Obeten K. E., Mfem C. C., Usun U. C., Udo-Affah G. Global J Sci Frontier Research: Biological Science., 16(1), 1-12 (2016).
 39. Munro G., Dalby-Brown W. J. Med. Chem., 50, 2576-2582. (2007)
 40. Зефирова А. Л., Ситдикова Г. Ф. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология), Казань: Арт-кафе, 2010, 270 с.