

**КОМБИНИРОВАННЫЙ БЛОК АМРА И НМДА-РЕЦЕПТОРОВ
МАКСИМАЛЬНО ЭФФЕКТИВНО ПОДАВЛЯЕТ РАЗВИТИЕ
КОРАЗОВОГО КИНДЛИНГА У КРЫС**

© С. Е. Сердюк,¹ В. Е. Гмиро,^{1*} О. С. Веселкина²

¹ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН,
Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
e-mail: gmiro2119@gmail.com.

² ЗАО «Вертекс», Россия, 199106, Санкт-Петербург,
Васильевский остров, 24-я линия, 27-А

Эталонный противоэпилептический препарат вальпроат натрия в дозе 200 мг/кг при пероральном хроническом введении подавляет развитие генерализованных клонико-тонических коразоловых киндлинговых судорог у 100 % крыс, но только у 57 % животных предупреждает клонические киндлинговые судороги. В указанной дозе вальпроат натрия в 1.7 раза по сравнению с контролем уменьшает среднюю тяжесть коразоловых киндлинговых судорог. ИЭМ-2121, вызывающий комбинированный блок глутаматных рецепторов АМРА и НМДА-типа, а также ИЭМ-1676, блокирующий АМРА, НМДА и Н-холинорецепторы, при пероральном хроническом введении в дозах 10 и 20 мг/кг обладает более высокой, чем у вальпроата натрия, противосудорожной активностью, так как уменьшают среднюю тяжесть коразоловых киндлинговых судорог в 2.4—2.7 раза по сравнению с контролем и предупреждают клонические киндлинговые судороги у 87% крыс. Комбинированная блокада АМРА и НМДА-рецепторов и, возможно, Н-холинорецепторов максимально эффективно подавляет эпилептогенез как клонических, так и клонико-тонических коразоловых киндлинговых судорог.

Ключевые слова: ИЭМ-1676, ИЭМ-2121, вальпроат, коразол, судороги, киндлинг.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 99. № 5. С. 000—000. 2013

S. E. Serdyuk,¹ V. E. Gmiro,^{1} O. S. Veselkina.² COMBINED BLOCKADE OF AMPA AND NMDA RECEPTORS HAS MAXIMUM EFFECT TO ELIMINATE DEVELOPMENT OF PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED KINDLING IN RATS.* ¹ Institute for Experimental Medicine of RAMS, St. Petersburg, 197376, Acad. Pavlov St., 12, Russia, *e-mail: gmiro2119@gmail.com. ² Pharmaceutical company Vertex, St. Petersburg, 199106, Vasilevsky ostrov, 24 Line, 27-A, Russia.

Peroral chronic administration the standard antiepileptic drug sodium valproate in a dose of 200 mg/kg eliminates development of generalized clonic-tonic pentylenetetrazol kindling seizures in 100 % of rats, but only in 57 % of rats this treatment prevents clonic kindling seizures. In the specified dose sodium valproate decreases in 1.7 times average severity of pentylenetetrazol kindling seizures compare with control. IEM-2121, which combined blocks of NMDA- and AMPA-glutamate receptors, as well as IEM-1676, which also blocks AMPA-, NMDA- and N-cholinoreceptors, both after peroral chronic administration in a doses 10 mg/kg and 20 mg/kg

accordingly, possess higher, than sodium valproate, anticonvulsant activity because reduce average severity of pentylenetetrazol kindling seizures in 2.4—2.7 times in comparison with control and prevents clonic kindling seizures in 87 % of rats. Combined blockade of AMPA- and NMDA-receptors and perhaps N-cholinoreceptors has maximum effect to eliminate epileptogenesis both clonic, and clonic-tonic pentylenetetrazol kindling seizures.

Key words: IEM-1676, IEM-2121, valproate, pentylenetetrazol, seizures, kindling.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 99. N 5. P. 000—000. 2013

Коразоловый киндлинг является общепринятой хронической доклинической моделью эпилепсии височной доли у крыс, на которой исследуют влияние веществ на эпилептогенез и генерацию судорог в процессе развития киндлинга [13, 14, 17]. Установлено, что важную роль в развитии коразолового киндлинга играет повышение уровня эндогенного глутамата и увеличение экспрессии NMDA- и AMPA-рецепторов в гиппокампе и коре [5–7].

Вальпроат натрия является эталонным противоэпилептическим средством, которое при хроническом профилактическом введении у крыс и мышей максимально эффективно подавляет развитие генерализованных клонико-тонических коразоловых киндлинговых судорог, однако лишь у части животных предупреждает локальные клонические киндлинговые судороги [8, 15].

Установлено, что в основе противоэпилептического действия вальпроата лежит активация тормозных ГАМКергических механизмов вследствие усиления синтеза ГАМК, ингибирования ГАМК-трансаминазы и увеличения высвобождения ГАМК из терминалей, однако вальпроат существенно не ослабляет токсическое действие глутамата на NMDA- и AMPA-рецепторы при киндлинге [12, 18].

В то же время известно, что комбинированная блокада NMDA- и AMPA-рецепторов полностью подавляет токсическое действие глутамата и эффективно устраняет не только клонико-тонические, но и значительно ослабляет клонические киндлинговые судороги на модели киндлинга, вызванного электрической стимуляцией миндалины у крыс [9, 11].

Нами синтезированы бис-катионные соединения ИЭМ-2121 и ИЭМ-1676, терапевтической мишенью действия которых являются глутаматные ионные каналы NMDA- и AMPA-типа. Соответствующие величины ИК₅₀ (концентрация, в которой вещество блокирует 50 % открытых каналов) составляют для ИЭМ-2121 3.4 мкМ для NMDA- и 0.46 мкМ для AMPA-рецепторов. Для ИЭМ-1676 величины ИК₅₀ составляют 270 мкМ для NMDA- и 8.8 мкМ для AMPA-рецепторов [3]. Соединение ИЭМ-1676 является также блокатором Н-холинорецепторов в ганглионарных нейронах. Установлено, что ИЭМ-1676 превосходит по Н-холинолитической активности эталонный ганглиоблокатор гексоний в 1.5 раза в опытах на верхнем шейном симпатическом ганглии кошки и в 60 раз — на парасимпатическом ганглии морской свинки [1].

Можно было ожидать, что ИЭМ-2121, вызывающий комбинированный блок AMPA- и NMDA-рецепторов, а также ИЭМ-1676, вызывающий комбинированный блок AMPA-, NMDA- и Н-холинорецепторов, будут при хроническом введении максимально эффективно подавлять не только клонико-тонические, но и клонические киндлинговые коразоловые судороги.

Задача настоящего исследования — сравнить эффективность противосудорожного действия эталонного противоэпилептика вальпроата натрия с препаратами ИЭМ-2121 и ИЭМ-1676 при хроническом пероральном введении у крыс с коразоловым киндлингом.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. В первый день эксперимента проводили тестирование чувствительности животных к однократному внутрибрюшному введению коразола в минимально действующей дозе 60 мг/кг. Для дальнейших исследований отбирали крыс, у которых наблюдались клонические и клонико-тонические судороги (тяжесть 2—4 балла) в течение 30 мин после введения тестовой дозы коразола.

Для выработки коразолового киндлинга отобранным крысам вводили внутрибрюшинно коразол в субконвульсивной дозе 40 мг/кг через день с 3-го по 21-й день эксперимента. После каждого введения коразола в течение 30 мин наблюдали и фиксировали поведение животных. Конвульсивные проявления судорожной активности оценивали по шкале Racine: стадия 0 — отсутствие реакции; стадия 1 — лицевые автоматизмы, подергивание ушей и вибрисс; стадия 2 — конвульсивные волны, распространяющиеся вдоль оси туловища; стадия 3 — миоклонические судороги со вставанием; стадия 4 — клонические судороги с потерей позы; стадия 5 — повторные сильные клонико-тонические судороги; стадия 6 — тонические судороги и смерть животного [17]. Судороги стадии 1—3 являются локальными клоническими, а стадии 4—5 — генерализованными клонико-тоническими судорогами.

Для исследования влияния веществ на эпилептогенез киндлинговых судорог и развитие полного киндлинга используют профилактическую схему, когда вещество вводится хронически перед каждой инъекцией коразола в субконвульсивной дозе с 3-го по 21-й день эксперимента [13, 17].

ИЭМ-2121 в дозе 0,3, 1,0, 3,0 и 10 мг/кг, ИЭМ-1676 в дозе 1,0, 3,0, 10,0 и 20 мг/кг, а также эталонный противосудорожный препарат вальпроат натрия в дозе 50, 100 и 200 мг/кг вводили ежедневно перорально внутрижелудочно жестким металлическим зондом в объеме 1 мл за 45 мин до введения коразола с 3-го по 21-й день эксперимента. Животным контрольной группы вводили внутрижелудочно 1 мл дистиллированной воды за 45 мин до введения коразола с 3-го по 21-й день эксперимента.

В течение всего эксперимента для каждой дозы исследуемых веществ и контроля в группе из 7—8 крыс определяли среднюю тяжесть судорог в баллах, число и процент полностью киндлинговых крыс, а также число и процент крыс без киндлинга (тяжесть судорог менее 2 баллов).

Противосудорожное действие тестируемых соединений и вальпроата натрия оценивали количественно на 21-й день киндлинга, т. е. после завершения введения веществ по профилактической схеме по уменьшению средней тяжести киндлинговых судорог по сравнению с контролем, а также по уменьшению числа полностью киндлинговых крыс и увеличению числа крыс без киндлинга в процентах по сравнению с контролем.

Тестируемые соединения ИЭМ-2121 [1-амино-6-(3,5-диметил-1-адамантиламино)-гексан дигидрохлорид] и ИЭМ-1676 [1-триметиламмоний-5-(1-адамантиламмоний)-пентан дибромид] синтезированы в Институте экспериментальной медицины РАМН, а эталонный препарат сравнения вальпроат натрия был получен от компании Sigma. Данные опытов на модели коразолового киндлинга статистически обработаны с использованием теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании повторное (от 7 до 11 инъекций) внутрибрюшное введение коразола в субконвульсивной дозе 40 мг/кг у крыс контрольной группы (внутрижелудочное ежедневное введение дистиллированной воды за 45 мин до введения коразола) к последнему 21-му дню эксперимента вызывало развитие киндлинговых судорог тяжестью от 3 до 5 баллов у всех 8 крыс, а полного киндлинга (повторных генерализованных клонико-тонических судорог тяжестью 4—5 баллов) у 6 из 8 крыс (75 % крыс с полным киндлингом). Средняя тяжесть киндлинговых судорог у крыс контрольной группы составляла 3.8 ± 0.9 балла (см. таблицу).

Влияние исследуемых препаратов на развитие коразолового kindлинга и тяжесть kindлинговых судорог у крыс

Вещества	Доза (внутрижелудочно), мг/кг	Общее число крыс в группе, <i>n</i>	Число крыс с полным kindлингом, в % от общего количества крыс в группе*	Число крыс без kindлинга в % от общего количества крыс в группе**	Средняя тяжесть kindлинговых судорог в баллах***
Контроль (вода дистиллированная)		8	75	0	3.8 ± 0.9
Вальпроат натрия	50	7	71	0	3.7 ± 0.7
	100	7	14 ¹	43 ²	2.3 ± 0.61 ²
	200	8	0 ¹	57 ²	2.2 ± 0.51 ²
ИЭМ-2121	0.3	7	57	0	3.5 ± 1.1
	1.0	7	43 ²	14	3.1 ± 0.9
	3.0	8	14 ²	57 ²	2.1 ± 0.6 ²
	10	8	0 ¹	87 ¹	1.6 ± 0.4 ¹
ИЭМ-1676	1	7	43 ²	14	2.9 ± 0.7
	3	8	14 ¹	43 ²	2.1 ± 0.61 ²
	10	8	0 ¹	71 ¹	1.6 ± 0.52 ¹
	20	8	0 ¹	87 ¹	1.4 ± 0.6 ¹

Примечание. * Генерализованные клонико-тонические судороги 4—5 баллов в течение трех последних введений коразола в субконвульсивной дозе 40 мг/кг (внутрибрюшинно); ** клонические судороги менее 2 баллов на 21-й день kindлинга; *** на 21-й день kindлинга; ¹*p* < 0.01 — по сравнению с контролем; ²*p* < 0.05 — по сравнению с контролем.

При хроническом пероральном введении по профилактической схеме эталонное противосудорожное средство вальпроат натрия в дозе 50 мг/кг практически не уменьшает число крыс с полным kindлингом, а также среднюю тяжесть kindлинговых судорог по сравнению с контролем (см. таблицу). В высоких дозах 100 и 200 мг/кг вальпроат натрия при хроническом пероральном введении в 1.6—1.7 раза по сравнению с контролем уменьшает среднюю тяжесть kindлинговых судорог, а также соответственно на 86 и 100 % по сравнению с контролем снижает число полностью kindлинговых крыс (*p* < 0.01, см. таблицу). В указанных дозах вальпроат натрия достоверно соответственно на 43 и 57 % по сравнению с контролем уменьшает количество крыс без kindлинга (*p* < 0.05, см. таблицу).

Соединение ИЭМ-2121 при хроническом пероральном введении в малой дозе 0.3 мг/кг проявляет лишь тенденцию к уменьшению числа полностью kindлинговых крыс и практически не изменяет среднюю тяжесть kindлинговых судорог по сравнению с контролем (см. таблицу). ИЭМ-2121 в дозе 1 мг/кг достоверно (*p* < 0.05) по сравнению с контролем уменьшает число полностью kindлинговых крыс на 32 %, но лишь на 14 % снижает число крыс без kindлинга (см. таблицу).

ИЭМ-2121 в дозах 3 и 10 мг/кг соответственно в 1.8 и 2.4 раза по сравнению с контролем уменьшает среднюю тяжесть kindлинговых судорог, а также соответственно на 86 и 100 % по сравнению с контролем снижает число крыс с полным kindлингом (*p* < 0.01, см. таблицу). В указанных дозах ИЭМ-2121 достоверно соответственно на 57 и 87 % по сравнению с контролем уменьшает количество крыс без kindлинга (*p* < 0.05, *p* < 0.01, см. таблицу).

Таким образом, ИЭМ-2121 в дозе 10 мг/кг вызывает максимально возможный противосудорожный эффект, так как подавляет развитие генерализованных

клонико-тонических kindлинговых судорог у 100 % крыс и у 87 % крыс предупреждает развитие локальных клонических kindлинговых судорог тяжестью 2—3 балла.

Соединение ИЭМ-1676 при хроническом пероральном введении по профилактической схеме в малой дозе 1.0 мг/кг достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с контролем уменьшает число крыс с полным kindлингом на 32 %, но лишь на 14 % снижает число крыс без kindлинга (см. таблицу). ИЭМ-1676 в дозах 3, 10 и 20 мг/кг соответственно в 1.8, 2.4 и 2.7 раза по сравнению с контролем уменьшает среднюю тяжесть kindлинговых судорог (см. таблицу). В указанных дозах ИЭМ-1676 достоверно по сравнению с контролем снижает число полностью kindлинговых крыс на 61—100 %, ($p < 0.01$), а количество крыс без kindлинга соответственно на 43, 71 и 87 % ($p < 0.05$, $p < 0.01$, см. таблицу).

Следовательно, ИЭМ-1676 в дозе 20 мг/кг вызывает максимально возможный противосудорожный эффект, так как подавляет развитие генерализованных клонико-тонических kindлинговых судорог у 100 % крыс, а у 87 % крыс предупреждает развитие клонических kindлинговых судорог.

Вальпроат натрия при хроническом профилактическом введении у крыс и мышей максимально эффективно подавляет развитие генерализованных клонико-тонических коразоловых kindлинговых судорог, однако лишь у части животных предупреждает локальные клонические kindлинговые судороги [8, 15]. Предполагается, что вальпроат подавляет эпилептогенез генерализованных kindлинговых судорог в результате усиления ГАМКергического торможения нейронов пирамид гиппокампа и коры, однако вальпроат существенно не влияет на эпилептогенез клонических kindлинговых судорог, так как не ослабляет токсическое действие глутамата на NMDA- и AMPA-рецепторы [12, 18].

Результаты настоящих экспериментов подтверждают, что вальпроат натрия при пероральном профилактическом введении в дозе 100—200 мг/кг максимально эффективно подавляет развитие генерализованных клонико-тонических kindлинговых судорог (у 86—100 % крыс), но только у 43—57 % крыс предупреждает развитие клонических kindлинговых судорог.

Известно, что блокаторы NMDA-рецепторов (МК-801 и мемантин), а также AMPA блокатор CFM-2 при хроническом введении перед каждым введением коразола в субконвульсивной дозе значительно замедляют развитие kindлинга, уменьшают тяжесть kindлинговых судорог и предупреждают развитие повторных генерализованных клонико-тонических судорог у полностью kindлинговых крыс, однако селективная блокада NMDA- или AMPA-рецепторов недостаточна для предупреждения локальных клонических kindлинговых судорог [2, 4, 9]. В то же время комбинированная блокада NMDA- и AMPA-рецепторов полностью подавляет токсическое действие глутамата и эффективно устраняет не только клонико-тонические, но и значительно ослабляет клонические kindлинговые судороги на другой модели kindлинга, вызванного электрической стимуляцией миндалины у крыс [9, 11].

Установлено, что ИЭМ-2121 в экспериментах на срезах мозга обладает комбинированной NMDA и AMPA блокирующей активностью, а ИЭМ-1676 блокирует AMPA-, NMDA-рецепторы и H-холинорецепторы [1, 3]. Сравнительный анализ противосудорожной активности указанных соединений, а также вальпроата натрия свидетельствует о том, что ИЭМ-2121 в дозе 10 мг/кг и ИЭМ-1676 в дозе 20 мг/кг при хроническом пероральном введении обладают существенно более высокой, чем у вальпроата натрия, противосудорожной активностью на модели коразолового kindлинга у крыс, так как уменьшают среднюю тяжесть kindлинговых судорог в 1.5—1.6 раза сильнее, чем вальпроат натрия, а также предупреждают клонические kindлинговые судороги у 87 % крыс по сравнению с 57 % при применении вальпроата натрия.

Известно, что в основе эпилептогенеза kindлинговых судорог лежит комбинированная стимуляция NMDA- и AMPA-рецепторов эндогенным глутаматом

[2, 4, 6, 7, 9 16]. Результаты проведенных экспериментов позволяют прийти к выводу, что комбинированная блокада AMPA- и NMDA-рецепторов, вызванная ИЭМ-2121, максимально эффективно подавляет эпилептогенез не только генерализованных клонико-тонических, но и локальных клонических киндлинговых судорог.

ИЭМ-1676, так же как ИЭМ-2121, является сильным блокатором AMPA-рецепторов, но в отличие от ИЭМ-2121 обладает слабой NMDA блокирующей активностью [3]. В то же время у ИЭМ-1676 выявлена высокая Н-холинолитическая активность [1].

В статье W. Loscher и соавт. [10] показано, что вещества, вызывающие комбинированный блок NMDA- и Н-холинорецепторов, вызывают более сильный противосудорожный эффект на модели электрошока у мышей по сравнению с веществами, селективно блокирующими только один из этих рецепторов [10]. Следовательно, можно полагать, что ИЭМ-1676 максимально эффективно подавляет эпилептогенез как клонико-тонических, так и клонических коразоловых киндлинговых судорог в результате комбинированного блока не только AMPA- и NMDA-рецепторов, но и Н-холинорецепторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Бровцына Н. Б., Гмиро В. Е., Горбунова О. Б., Сердюк С. Е., Лукомская Н. Я. Особенности строения ионного канала нейронального никотинового холинорецептора, установленные на основании изучения связи структуры и активности в ряду ганглиоблокаторов. Биол. мембраны 13 (1): 57—70. 1996.
- [2] Лукомская Н. Я., Лаврентьева В. В., Старшинова Л. А., Жабко Е. П., Горбунова Л. В., Тихонова Т. Б., Гмиро В. Е., Магазаник Л. Г. Влияние блокаторов каналов инотропных глутаматных рецепторов на развитие пентилтен-тетразолового киндлинга у мышей // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 91 (11): 1241—1251. 2005.
- [3] Федорова И. М., Гмиро В. Е., Магазаник Л. Г., Тихонов Д. Б. Ионные каналы глутаматных рецепторов нервно-мышечных соединений личинки мухи *Calliphora vicina* демонстрируют высокую структурную гомологию с AMPA-каналами позвоночных. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 44 (6): 556—562. 2008.
- [4] De Sarro G., Di Paola ED., Gareri P., Gallelli L., Scotto G., De Sarro A. Effects of some AMPA receptor antagonists on the development of tolerance in epilepsy-prone rats and in pentylenetetrazole kindled rats. Eur. J. Pharmacol. 368 (2—3): 149—159. 1999.
- [5] Doi T., Ueda Y., Nagatomo K., Willmore L. J. Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylenetetrazol-kindling. Neurochem. Res. 34 (7): 1324—1331. 2009.
- [6] Ekonomou A., Angelatou F. Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazol-induced «kindling» model of epilepsy. Neurochem. Res. 24 (12): 1515—1522. 1999.
- [7] Ekonomou A., Smith A. L., Angelatou F. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy. Brain Res. Mol. Brain Res. 95 (1—2): 27—35. 2001.
- [8] Fischer W., Kittner H. Influence of ethanol on the pentylenetetrazol-induced kindling in rats. J. Neural. Transm. 105 (10—12): 1129—1142. 1998.
- [9] Giorgi O., Orlandi M., Lecca D., Corda M. G. MK-801 prevents chemical kindling induced by pentylenetetrazol in rats. Eur. J. Pharmacol. 193 (3): 363—365. 1991.
- [10] Loscher W., Potschka H., Wlaź P., Danysz W., Parsons C. G. Are neuronal nicotinic receptors a target for antiepileptic drug development? Studies in different seizure models in mice and rats. Eur. J. Pharmacol. 466 (1—2): 99—111. 2003.
- [11] Loscher W. Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. Progr. Neurobiol. 54 (6): 721—741. 1998.
- [12] Loscher W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. Progr. Neurobiol. 58 (1): 31—59. 1999.
- [13] Mehla J., Reeta K. H., Gupta P., Gupta Y. K. Protective effect of curcumin against seizure and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. Life Sci. 87 (19—22): 596—603. 2010.

[14] *Morimoto K., Fahnestock M., Racine R. J.* Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progr. Neurobiol.* 73(1): 1—60. 2004.

[15] *Ohno Y., Ishihara S., Terada R., Serikawa T., Sasa M.* Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model. *Epilepsy Res.* 89 (2—3): 360—364. 2010.

[16] *Rogawski M. A., Donevan S. D.* AMPA receptors in epilepsy and as targets for antiepileptic drugs. *Adv. Neurol.* 79: 947—963. 1999.

[17] *Tirassa P., Costa N., Aloe L.* CCK-8 prevents the development of kindling and regulates the GABA and NPY expression in the hippocampus of pentylenetetrazole (PTZ)-treated adult rats. *Neuropharmacology.* 48 (5): 732—742. 2005.

[18] *Whitlow R. D., Sacher A., Loo D. D., Nelson N., Eskandari S.* The anticonvulsant valproate increases the turnover rate of gamma-aminobutyric acid transporters. *J. Biol. Chem.* 278 (20): 17 716—17 726. 2003.

Поступила 27 XII 2012
После доработки 5 III 2013