© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2010
УДК 616.853 — 092.9: 599.323.4] — 085.213

Толерантність до протисудомної дії нового похідного пептидамідобензофенону та діазепаму за умов їх тривалого застосування

І.В.Погоріла, В.В.Годован, Л.С.Годлевський

Одеський державний медичний університет, кафедра загальної та клінічної фармакології, кафедра біофізики, інформатики і медичної апаратури
Одеса, Україна

Наприкінці 3 тижня внутрішньоочеревинного введення діазепаму дозами 0,1 мг/кг та 0,5 мг/кг число щурів з генералізованими бензилпеніцилін-викликаними судомами зростало відповідно на 19,5% та більше ніж удвічі порівняно до його однократного застосування даними дозами. У вказаний термін після внутрішньоочеревинного застосування нового похідного пептидамідобензофенону дозами 0,5 мг/кг і 1,5 мг/кг досліджуваний показник підвищувався у порівнянні з однократним введенням речовини відповідно на 10,5% і 3,2%. Діазепам (0,1 мг/кг та 0,5 мг/кг) викликав зниження тяжкості бензилпеніцилін-викликаних судом та збільшення латентного періоду перших судом (0,5 мг/кг) у щурів із 4-тижневим повторним застосуванням похідного пептидамідобензофенону, в той час як ця речовина у щурів, толерантних до протисудомної дії діазепаму, дозозалежно збільшувала латентний період перших судом, а також зменшувала їх тяжкість.

Ключові слова: похідне пептидамідобензофенону, діазепам, судомна активність, толерантність.

ВСТУП

Дотепер фармакотерапія найпоширеніших захворювань центральної нервової системи, що характеризуються хронічною і нерідко прогресуючою течією (епілепсія, паркінсонізм, хвороба Альцгеймера та ін.), недостатньо ефективна і, в першу чергу, внаслідок формування фармакорезистентності [1, 2]. Це обумовлено як гетерогенними механізмами розвитку цих хвороб, так і механізмами дії існуючих препаратів. Так, встановлено, що при тривалому використанні класичних антиконвульсантів — бензодіазепінів — розвиток толерантності до їх протисудомної дії обумовлено змінами рецепторних властивостей $ГАМК_A$-бензодіазепін-іонофорного комплексу [3, 4]. Тому залишається актуальним пошук нових протисудомних препаратів, які протягом тривалого застосування мають високу ефективність. В цьому плані представляє значний інтерес нова біологічно активна речовина (БАР) з похідних пептидамідобензофенону (ПАБФ) — 2-N-карбобензилгліцил-гліциламідо-5-бромбензофенон (сполука I). Клас ПАБФ є пролі-ками, синтезованими як попередники типових (1,4-бензодіазепінових) транквілізаторів з метою оптимізації фармакологічних властивостей останніх (пролонгування транквілізуючої дії, зменшення небажаних ефектів та ін.) [5]. Тому похідні ПАБФ за спектром фармакологічної активності схожі з транквілізаторами бензодіазепінового ряду, хоча самі по собі не зв'язуються із бензодіазепіновими рецепторами [6]. Встановлено, що сполука I відрізняється від інших похідних ПАБФ тим, що має «м'який», але тривалий протисудомний ефект [6]. Такий профіль фармакологічної активності антиконвульсанта особливо важливий при лікуванні хворих на хронічну патологію. Тому метою даної роботи було встановлення можливості виникнення резистентності до протисудомної дії вищевказаного похідного ПАБФ порівняно зі стандартним антиконвульсантом діазепамом за умов їх тривалого застосування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди виконано згідно з біоетичними вимогами за умов хронічного експерименту на щурах

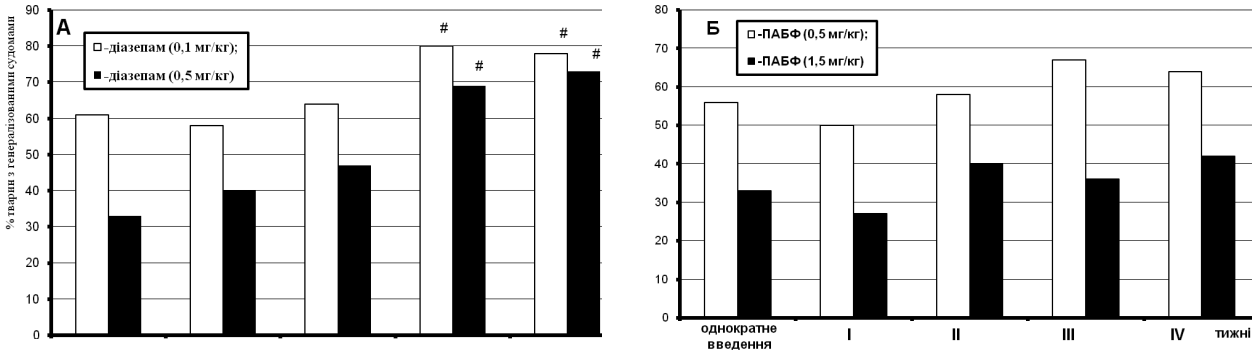

Рис. 1. Формування толерантності за умов тривалого застосування діазепаму (А) та похідного ПАБФ (Б). # — достовірність порівняно до однократного застосування речовин (P<0,05).

лінії Вістар масою 180-270 г розведення віварію Одеського державного медичного університету, які знаходились за звичайних умов утримання та годування та вільним доступом до води та їжі.

Похідне ПАБФ вводили внутрішньоочеревинно, виходячи із розрахунку 0,5 мг/кг протягом 4-х тижнів. В такий строк, як правило, формується фармакорезистентність [3]. Після 6-ти діб щодобового введення нової БАР на наступну добу (через 24 год. з моменту 6 доби) проводили тестування її протисудомної ефективності, застосовуючи похідне ПАБФ за 30 хв. до введення конвульсанту, в якості якого використовували свіжовиготовлений розчин натрієвої солі бензилпеніциліну (3,0 млн МО/кг внутрішньоочеревинно). БАР вводили дозами 0,5 мг/кг і 1,5 мг/кг, які були дещо вищі від таких, що викликали протисудомну дію на моделі коразолового кіндлінга [7]. Подібні процедури проводили 4 рази з моменту початку відтворення толерантності. До уваги приймали число тварин з генералізованими судомами, тривалість латентного періоду перших судом та виразність судомних проявів, яку оцінювали за 5-бальною шкалою [4]. Щурам групи контролю за тих же умов застосовували розчинник даної БАР «Твін-80» в еквівалентному об'ємі перед кожним введенням епілептогену.

Аналогічним чином проводили тестування протисудомних ефектів препарату порівняння діазепаму («Гедеон Ріхтер», Угорщина) при його 4-тижневому внутрішньоочеревинному застосуванні дозами 0,1 мг/кг та 0,5 мг/кг. Тваринам контрольної групи вводили аналогічний об'єм 0,9% розчину натрію хлориду.

По завершенні 4-тижневих курсів застосування досліджуваних речовин тестували протисудомну ефективність похідного ПАБФ у толерантних до дії діазепаму щурів і, відповідно, ефективність діазепаму у щурів з повторним застосуванням нової БАР.

ТАБЛИЦЯ 1

Ефективність застосування досліджуваних антиконвульсантів у щурів із толерантністю до діазепаму та щурів з тривалим застосуванням похідного ПАБФ

Препарати, доза (мг/кг)	Число щурів з судомами (відповідно до тяжкості судом в балах)						Достовірність відносно контролю	Латентний період судом, M±m (хв.)
	0	1	2	3	4	5		
Ефективність антиконвульсантів у толерантних до дії діазепаму щурів								
Контроль	0	0	0	1	8	3	-	3,7±0,5
Діазепам (0,5)	0	0	0	3	7	0	P= 0,059	6,8±1,1*
Похідне ПАБФ (0,5)	0	0	2	3	5	0	P=0,013	7,2±0,9*
Похідне ПАБФ (1,5)	0	3	4	1	2	0	< 0,001	7,7±1,2*
Ефективність антиконвульсантів у щурів з повторним застосуванням похідного ПАБФ								
Контроль	0	0	0	1	8	3	-	3,7±0,5
Похідне ПАБФ (0,5)	0	2	2	4	4	0	P=0,002	8,1±1,5*
Діазепам (0,1)	0	0	3	3	6	0	P=0,009	4,7±1,1
Діазепам (0,5)	1	1	2	3	4	0	P=0,003	6,4±0,8*

*Примітка: * — P<0,05 порівняно з відповідним показником у контролі (ANOVA+Newman-Keuls тест). Для порівняння тяжкості судомних проявів використано критерій Kruskal-Wallis.*

Результати досліджень обробляли статистично з використанням методу ANOVA та критерію Newman-Keuls для визначення відмінностей тривалості латентного періоду перших судом, а також Kruskal-Wallis критерію для визначення відмінностей тяжкості судом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов однократного застосування діазепаму дозами 0,1 мг/кг та 0,5 мг/кг генералізовані судоми спостерігались в групі із використанням діазепаму відповідно у 8 із 13 (61,5%) та у 5 із 15 (33,3%) щурів (рис. 1А). Після 7-ми повторних введень діазепаму (0,5 мг/кг, останнє введення за 30 хв. до застосування тестової дози епілептогену) генералізовані судомні прояви мали місце відповідно у 58,3% та 40,0% щурів (рис. 1А). Наприкінці 3-го тижня застосування діазепаму в обох дозах число щурів з генералізованими судомними нападами було достовірно вищим у порівнянні з аналогічними показниками при однократному введенні діазепаму і склало відповідно 80,0% та 69,2% (P<0,05). Достовірні відмінності зберігались до кінця спостереження (4 тижня введень діазепаму).

В той же час застосування похідного ПАБФ дозами 0,5 мг/кг та 1,5 мг/кг з наступним введенням розчину бензилпеніциліну-натрію викликало генералізовані судоми відповідно у 9 із 16 (56,2%) та у 5 із 15 щурів (33,3%) (рис. 1Б). Наприкінці 1-го тижня повторних введень нової БАР генералізовані судомні прояви мали місце відповідно у 50,0% та 26,7% експериментальних тварин. Наступні введення похідного ПАБФ супроводжувались деяким збільшенням числа щурів з генералізованими судомними проявами, які після 4-х тижнів введень БАР спостерігались у 6 із 11 (63,6%) при дозі 0,5 мг/кг та у 5 із 12 (41,7%) при дозі 1,5 мг/кг та не відрізнялись від відповідних показників, зареєстрованих після однократного застосування сполуки (P>0,05).

Застосування діазепаму у дозі 0,5 мг/кг щурам із модельованою толерантністю до його дії викликало подовження латентного періоду перших судом, провокованим застосуванням розчину конвульсанту, на 83,8% порівняно із контролем (P<0,05) (табл. 1).

За умови застосування похідного ПАБФ (0,5 мг/кг) у щурів з модельованою толерантністю до діазепаму застосування розчину бензилпеніциліну-натрію латентний період перших судомних проявів перевищував відповідний показник у групі контролю в 1,95 разу (P<0,05) (табл. 1). Під впливом епілептогену виникали генералізовані тоніко-клонічні судомні напади у половини експериментальних тварин (5 із 10) — тяжкість судом була достовірно нижчою ніж в групі контролю (введення епілептогену) (P<0,05), але не відрізнялась від такої в групі щурів із викликаною толерантністю на тлі застосування діазепаму (0,5 мг/кг) (P>0,05). Аналогічне застосування епілептогену на тлі введення похідного ПАБФ (1,5 мг/кг) супроводжувалось збільшенням латентного періоду перших судом в 2,1 рази порівняно з контролем (P<0,05). За цих умов генералізовані судомні напади мали місце у 20,0% щурів, в той час як у 30,0% спостерігались лише окремі судомні здригання м'язів (1 бал). Тяжкість судом була нижчою від такої в групі контролю (P<0,001), а також від такої в групі щурів із застосуванням діазепаму (P<0,01) (табл. 1).

В групі щурів, яким протягом 4-х тижнів проводили введення похідного ПАБФ, застосування БАР (1,5 мг/кг) викликало достовірне збільшення латентного періоду перших судом в 2,2 рази порівняно із контролем (табл. 1). Генералізовані судомні напади реєструвались у 30,0% експериментальних тварин, в той час як у 15,0% мали місце окремі судомні здригання м'язів кінцівок та тулуба (1 бал). Тяжкість судомних проявів була достовірно нижчою від такої в групі контролю (P<0,01). Застосування діазепаму (0,1 мг/кг) супроводжувалось незначним подовженням латентного періоду перших судом — на 27,0% (P>0,05), а також зменшенням тяжкості судомних проявів у порівнянні із контролем (P<0,01). Застосування діазепаму дозою 0,5 мг/кг викликало достовірне збільшення латентного періоду перших судом на 73,0% у порівнянні із контролем. Генералізовані судомні напади спостерігались у 40,0% щурів а тяжкість судом була достовірно нижчою ніж в групі контролю (табл. 1).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що за умов повторного застосування діазепаму відбувається зниження протисудомної дії препарату. Тобто йдеться про виникнення толерантності, яка має місце як при застосуванні діазепаму дозою 0,1 мг/кг, так і 0,5 мг/кг. Суттєве збільшення числа щурів з генералізованими тоніко-клонічними судомами має місце наприкінці 3-го тижня введень діазепаму і зберігається до кінця спостереження. Причому йшлося про збільшення числа тварин із генералізованими судомами в групах із застосуванням різних доз діазепаму, хоча відносне число

щурів із генералізованими судомами, яке спостерігалося наприкінці 3-го тижня введень діазепаму, було більш швидким в групі із застосуванням більшої дози препарату (0,5 мг/кг). Так, при дозі діазепаму 0,1 мг/кг генералізовані судоми після однократного введення мали місце у 61,5% щурів, а після трьох тижнів введень препарату — у 80,0%, в той час як відповідні показники при застосуванні діазепаму дозою 0,5 мг/кг склали 33,3% та 69,2%. Тобто отримані результати свідчать про дозозалежний характер формування толерантності до протисудомної дії діазепаму.

В той же час за умов повторного застосування похідного ПАБФ в обох досліджуваних дозах (0,5 мг/кг та 1,5 мг/кг) не відбувається зміни виразності протисудомного впливу речовини протягом 4-ох тижнів її застосування. У щурів із розвиненою толерантністю до протиепілептичної дії діазепаму зберігається протисудомний вплив похідного ПАБФ, який виявляється за показниками зменшення тяжкості судомних проявів, а також збільшення латентного періоду виникнення судом. У щурів із тривалим використанням нової БАР діазепам здійснює антиконвульсантний ефект на фоні пеніцилін-викликаних судом за умов використання обох досліджуваних доз препарату (0,5 мг/кг та 1,5 мг/кг).

Відмінності у формуванні толерантності до протисудомного впливу сполуки I і діазепаму при їх тривалому застосуванні можуть пояснюватися їх відмінностями у фармакокінетичному профілі. Як діазепам, так і його активні метаболіти зв'язуються з бензодіазепіновими рецепторами, що в подальшому при тривалому застосуванні і зумовлює формування десенситизації рецепторів до бензодіазепінів [8]. Фармакологічна активність похідних ПАБФ, які є проліками і фізіологічно неактивні, проявляється тільки після їх біотрансформації і залежить від концентрації активних метаболітів у головному мозку (біофазі дії) [6, 9]. Основними продуктами їх біотрансформації є гетероциклічні сполуки, відомі метаболіти 1,4-бензодіазепінів, які реалізують фармакологічний ефект. Відтворенню активних метаболітів передує ферментативний процес відщеплювання пептидного фрагмента і спонтанна конденсація до циклічних продуктів. Ці процесі впливають на форму залежності «доза-ефект» похідних ПАБФ [6]. Крім того, стаціонарний (пролонгований) протисудомний ефект сполуки I, як і інших карбобензилпохідних ПАБФ, зумовлено двофазністю виразності її фармакологічної активності: перший максимум («швидка» фаза) відмічається у 0,1-1 год., другий максимум («повільна» фаза) — через 2-10 год. [6]. Це прямо пов'язано з двофазністю змін концентрації активних метаболітів, що пояснюється змінами швидкості біотрансформації БАР [9]. Таким чином, відмічається «порційна» поступова взаємодія активних метаболітів похідного пептидамидобензофенону з ГАМК$_A$-бензодіазепін-іонофорним комплексом. Цікавим є той факт, що серед їх метаболітів бензодіазепінової структури виявлені метоксипохідні по бензильному кільцю і 3-метоксипохідні, які не властиві для відомих бензодіазепінів [6]. Ці особливості біотрансформації похідних ПАБФ (відтворення до процесу циклізації метоксипохідних шляхом метоксилювання пептидного фрагмента, ортогідроксилювання та ін.) в певному ступені можуть впливати на їх фармакокінетику і особливості прояву фармакологічної активності.

ВИСНОВКИ

1. Тривале застосування діазепаму (0,1 мг/кг та 0,5 мг/кг внутрішньоочеревинно) протягом 4-х тижнів супроводжується виникненням толерантності до судом, викликаних натрієвою сіллю бензилпеніциліну, в той час як за аналогічних умов застосування похідного ПАБФ його протисудомна дія зберігається.

2. У толерантних до дії діазепаму щурів зберігається виразна протисудомна дія похідного ПАБФ на моделі гострих генералізованих судом, викликаних застосуванням бензилпеніциліну-натрію, яка носить дозозалежний характер.

3. Діазепам викликає дозозалежний протисудомний ефект відносно до бензилпеніцилін-провокованих генералізованих судом у щурів, яким протягом 4-х тижнів застосовували похідне ПАБФ (0,5 мг/к та 1,5 мг/кг внутрішньоочеревинно).

ЛІТЕРАТУРА

1. Вольф П. Фармакорезистентность и эпилепсия / П.Вольф // Международный неврологический журнал. — 2006. — №4 (8). — С. 3-5.
2. Карлов В.А. Фармакорезистентность и толерантность при эпилепсии / В.А.Карлов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. — 2008. — Т.108, №10. — С. 75-80.
3. Кресюн В.И. Особенности эффектов эпилептогенов у крыс, толерантных к диазепаму / В.И.Кресюн, Л.С.Годлевский, Е.В.Коболев // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2009. — №3. — С. 27-30.

4. Pratt J.A. Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression / J.A.Pratt, R.R.Brett // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1998. — Vol. 59. — №4. — P. 925-934.
5. Peptidamidobenzophenones, a novel class of Ring-open derivatives of 1,4-benzdiazepines / K.Hirai, T.Ishiba, H.Sugimoto [et al.] // J. Med. Chem. — 1980. — Vol. 23, №11. — P. 764-773.
6. Тотрова М.Ю. Структура и биокинетика производных пептидамидобензофенона и их активных метаболитов [Текст]: дис. ... канд.хим.наук: 02.00.10 / Марина Юрьевна Тотрова. — Одесса, 1989. — 135 с.
7. Шандра А.А. Киндлинг и эпилептическая активность [Текст] / А.А.Шандра, Л.С.Годлевский, А.И.Брусенцов. — Одесса: Астропринт, 1999. — 191 с.
8. Svob Starc D. Differential effects of diazepam treatment and withdrawal on recombinant GABA-A receptor expression and functional coupling / D.Svob Starc, J.Valinic, M.J.Jazvinscak, D.Pericic // Brain Res. — 2008. — Vol. 30, №1246. — P. 29-40.
9. Zhuk O.V. Biokinetics of gidazepam, derivatives of peptideaminobenzophenones and their metabolites / O.V.Zhuk, V.G.Zinkovski, N.Y.Golovenko [et al.] // Exp. Toxicol. Pathol. — 1999. — Vol. 54, №4-5. — P. 451-454.

И.В.Погорелая, В.В.Годован, Л.С.Годлевский. Толерантность к противосудорожному действию нового производного пептидамидобензофенона и диазепама в условиях их длительного применения. Одесса, Украина.

Ключевые слова: *производное пептидамидобензофенона, диазепам, судорожная активность, толерантность.*

В конце 3-й недели внутрибрюшинных введений диазепама дозами 0,1 мг/кг и 0,5 мг/кг число крыс с генерализоваными бензилпенициллин-вызванными судорогами увеличивалось соответственно на 19,5% и больше чем вдвое в сравнении с его однократным применением в данных дозах. В тот же срок после внутрибрюшинного применения нового производного пептидамидобензофенона дозами 0,5 мг/кг и 1,5 мг/кг изучаемый показатель повышался, в сравнении с однократным введением соединения, соответственно на 10,5% и 3,2%. Диазепам (0,1 мг/кг и 0,5 мг/кг) вызывал снижение тяжести бензилпенициллин-вызванных судорог и увеличения латентного периода первых судорог (0,5 мг/кг) у крыс с 4-недельным применением производного пептидамидобензофенона, в то время как данное соединение у крыс, толерантных к противосудорожному действию диазепама, дозозависимо увеличивало латентный период первых судорог, а также уменьшало их тяжесть.

I.V.Pogorelaya, V.V.Godovan, L.S.Godlevskiy. The tolerance to anticonvulsant action of novel peptideaminobenzophenone and diazepam derivative at prolong usage. Odessa, Ukraine.

Key words: peptideamidobenzophenone derivative, diazepam, convulsing activity, tolerance.

At the end of the third week of diazepam administration (0,1 mg/kg and 0,5 mg/kg, intraperitoneal) the number of animals with generalized benzylpenicillin-induced seizures, increased by 19,5% and more than twice comparatively with single administration of diazepam in the same dosages. At the same conditions the administration of peptideaminobenzophenone (0,5 mg/kg and 1,5 mg/kg intraperitoneal) increase of investigated index, comparatively with single administration on 10,5% and 3,2% correspondently. Diazepam (0,1 mg/kg and 0,5 mg/kg intraperitoneal) caused the decrease of the severity of penicillin-induced seizures as well as prolonged the latent period of the first seizures (0,5 mg/kg) in rats with four-weeks repeated peptideaminobenzophenone administrations, while peptideaminobenzophenone caused both dosage-depended increase latency and decrease of seizure severity in rats with the tolerance to diazepam.

Надійшла до редакції 28.05.2010 р.