МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД «ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ»

На правах рукопису

**ШАСТУН НАТАЛЯ ПЕТРІВНА**

УДК 616.8-009.24:615.214:615.065

**АНАЛІЗ МЕХАНІЗМІВ СПІВВІДНОШЕННЯ ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ПОБІЧНОЇ ДІЇ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ РІЗНИХ ГРУП**

14.03.05. – фармакологія

дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

**Науковий керівник:**

**доктор медичних наук,**

**професор Опришко Валентина Іванівна**

Дніпро – 2017

ЗМІСТ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | | стор. | |
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .……......................................................... | | | 4 |
| ВСТУП ..……………………………………………………................................... | | | 5 |
| РОЗДІЛ 1  ПРОТИЕПІЛЕПТИЧНА ТЕРАПІЯ ТА ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ НА ОРГАНІЗМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) ............... | | | 11 |
|  | 1.1 Питання безпеки застосування антиконвульсантів ……………………... | | 11 |
|  | 1.2 Патобіохімічні порушення в головному мозку при епілепсії ………….. | | 20 |
|  | 1.3 Роль оксидативного стресу в процесах нейродеструкції при епілепсії .. | | 25 |
| РОЗДІЛ 2  МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ……………................................ | | | 37 |
| 2.1 Об’єкт та предмети дослідження …………………….................................... | | | 37 |
| 2.2 Методи дослідження ………………………………………………………… | | | 38 |
| РОЗДІЛ 3  ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ ХЕМОІНДУКОВАНИХ ПАРОКСИЗМІВ ……………... | | | 50 |
|  | 3.1 Оцінка протисудомної дії протиепілептичних препаратів на моделі коразолових судом.…………………………………………………………… | | 50 |
|  | 3.2 Протисудомна дія досліджуваних препаратів на моделі бікукулінових судом …………………………………………………………………………… | | 53 |
|  | 3.3 Вплив досліджуваних препаратів на судоми на моделі судом викликаних введенням каїнової кислоти …………………………………… | | 55 |
|  | 3.4 Оцінка протисудомної дії досліджуваних препаратів на моделі нікотинових судом …………………………………………………………….. | | 55 |
|  | 3.5 Оцінка протисудомної дії досліджуваних препаратів на моделі ареколінових судом …………………………………………………………… | | 58 |
| РОЗДІЛ 4  ВПЛИВ ПРОТИСУДОМНИХ ЗАСОБІВ НА ПСИХІЧНУ ТА ФІЗИЧНУ ПРАЦЕЗДАТНІСТЬ ТВАРИН…………………………………………………. | | | 64 |
|  | 4.1 Визначення психічної працездатності …………………………………… | | 64 |
|  | 4.2 Зміни емоційно-рухової активності тварин під впливом антиконвульсантів в тесті «відкрите поле» …………………………………. | | 69 |
|  | 4.3 Вплив досліджуваних антиконвульсантів на фізичну працездатність … | | 74 |
|  | 4.4 Гіпногенна дія досліджуваних антиконвульсантів ……………………... | | 81 |
| РОЗДІЛ 5  АНАЛІЗ ЗМІН МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ В УМОВАХ КОРАЗОЛОВОГО КІНДЛІНГУ ………………………………………………… | | | 86 |
|  | 5.1 Вплив досліджуваних препаратів на показники тіол-дисульфідної системи ………………………………………………………………………… | | 86 |
|  | 5.2 Вплив досліджуваних препаратів на показники системи оксиду азоту та розвиток нітрозативного стресу …………………………………………... | | 92 |
|  | 5.3 Вплив антиконвульсантів на механізмів апоптозу та морфометричні показники нейронів при моделюванні коразолових судом ………………… | | 99 |
| РОЗДІЛ 6  УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ. ШЛЯХИ ІНДИВІДУАЛІЗАЦІЇ ПРОТИСУДОМНОЇ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ ТЕРАПІЇ В УМОВАХ ПІДВИЩЕНОЇ СУДОМНОЇ ГОТОВНОСТІ МОЗКУ ………….. | | | 108 |
| ВИСНОВКИ ..………………………………………………….............................. | | | 122 |
| ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ……………………………................................ | | | 125 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ……………………….......................... | | | 126 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

NO – оксид азоту

ЦНС – центральна нервова система

ГР – глутатіонредуктаза

УРПУ – умовна реакція пасивного уникнення

АХ – ацетилхолін

GSH - відновлена форма глутатіону

GSSG – окислена форма глутатіону

КС – коразолові судоми

РНК – рибонуклеїнова кислота

в/о – внутрішньоочеревинне введення

НАДФН - нікотинамідаденіндинуклеотидфосфа́т

ГТ - глутатіонпероксидаза

ГП – глутатіотрансфераза

АФК - аденозинфосфокіназа

АОС – антиоксидантна система

СОД - супероксиддисмутаза

**ВСТУП**

**Актуальність проблеми.** Епілепсія є найпоширенішим захворюванням нервової системи, відсоток якої у популяції становить 0,5 - 1 % [R.S. Fisher et al., 2011 A. Wilne, 2015]. Епілепсія посідає третє місце за поширеністю серед хвороб нервової системи в Україні [С.О. Євтушенко, 2005] В Україні на кінець 2013 року кількість зареєстрованих хворих на епілепсію становила 0,25 % від загальної кількості населення і відповідала 246,4 на 100 тис. населення. За 13-річний період показник поширеності епілепсії збільшився з 235,1 до 246,4 на 100 тис. населення. Наголошуються значні (у 3-4 рази) коливання цих показників у різних регіонах країни. Особи працездатного віку становили 63,6 % зареєстрованих хворих [П.В. Волошин, Т.С. Міщенко, Є.В. Лекомцева; 2013, Л.І. Дьяченко, 2014].

Зазначені синаптичні механізми є фармакологічними мішенями для дії антиконвульсантів. При цьому протисудомна активність може бути пов'язана як з підвищенням гальмівних, так і зниженням збуджуючих синаптичних процесів. У кінцевому підсумку ефективність антиконвульсантів визначається збігом патогенетичної ланки розвитку судомного нападу з механізмом синаптичної дії протисудомного засобу, тобто за типом «ключ до замка» [C.F. Jackson, 2015; C.M. Korff, 2015].

Разом з тим, якість життя хворого на епілепсію пов'язана зі співвідношенням фармакологічного контролю судомних нападів, з одного боку, і розвитком побічних ефектів, властивих практично всім протисудомним засобам, з іншого боку. До цих ефектів належать порушення координації рухів, міорелаксація, зниження фізичної працездатності, зниження уваги, здатності до навчання, конформації і відтворення енграм пам'яті, гіпногенна дія [А.В. Зінченко, 2013; William Barr 2016; А.Є. Дубенко , 2013; В.Й. Мамчур, 2014].

Як відомо, гальмівні нейрофізіологічні процеси мозку опосередковані головним чином ГАМК-, гліцин- і серотонінергічними медіаторними системами, активуючі - пов'язані з функціонуванням глутамат- і холінергічної синаптичної передачі [E. Farina, A. Raglio A 2015; Опришко В.І., 2013; [J. Bidwell](javascript:void(0);) et al., 2015].

Тому виправданим є вивчення протисудомної активності різних антиконвульсантів на моделях судомних станів, які індукуються селективними антагоністами гальмівних механізмів мозку (ГАМК, гліцин, серотонін) і агоністами збуджуючих систем (глутамат, АХ), а також їх впливу на фізичну працездатність і когнітивні функції мозку [K.B. Howell, 2016; E.C. Wirrell, 2015; А.А. Шандра, 2014; Н.Я. Головенко, 2013].

У той же час, епілептичні напади, які повторюються, супроводжуються стійкими порушеннями обміну речовин у головному мозку і значними дисгемічними порушеннями [Т.А. Літовченко, 2014; A. Capasso et al., 2008; И.Ф. Беленичев и соавт., 2009].Локальна тканинна гіпоксія при судомах призводить до надмірного викиду глутамату, запуску ряду нейрохімічних реакцій з накопиченням надлишкової кількості вільних радикалів кисню, розвитку «оксидантного стресу», посиленню ексайтотоксичних ефектів, перезбудження і пошкодження глутаматних рецепторів [І.Ф. Бєленічев та співавт., 2002].Тому доцільно вивчити патобіохімічні порушення в головному мозку при епілепсії.

Все це визначає наукову і практичну необхідність дослідження фармакологічних ефектів та побічних дій антиконвульсантів, що може бути теоретичною основою оптимізації фармакотерапії судомних станів та підвищення якості життя хворих з епілепсією.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана як фрагмент планової науково-дослідної роботи кафедри фармакології та клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Експериментально-теоретичне обґрунтування особливостей болезаспокійливої та нейропротекторної медикаментозної терапії в умовах моделюємої патології» (№ держреєстрації 0104U006269).

**Мета і завдання дослідження.** Теоретично обґрунтувати таекспериментально визначити взаємозв'язок між ефективністю та безпечністю антиконвульсантів різної хімічної будови та різних механізмів протисудомної дії.

Згідно з метою дослідження були сформульовані такі задачі:

1. Провести порівняльний аналіз активності антиконвульсантів на різних моделях хемоіндукованих пароксизмів.
2. Дослідити порушення психічної працездатності тварин, що викликані цими препаратами (пам'ять, емоційно-рухова сфера).
3. Вивчити вплив дослідних препаратів на фізичну працездатність (координація рухів, міорелаксація, тривалість плавання з вантажем).
4. Визначити наявність гіпногенної дії препаратів досліджуваних груп (потенціювання і пролонгування дії снодійних).
5. Вивчити вплив антиконвульсантів з різним механізмом дії на патобіохімічні порушення в головному мозку в умовах еквівалентів епілепсії**.**

*Об’єкт дослідження* – нейрохімічний профіль фармакодинаміки та токсикодинаміки антиконвульсантів різних груп.

*Предмет дослідження* – молекулярно-біохімічні механізми виникнення побічних ефектів антиконвульсантів з різним механізмом дії.

*Методи дослідження* – фармакологічні, біохімічні, гістологічні, імуногістохімічні, біостатистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше встановлено, що коразоловий кіндлінг супроводжується зміщенням тіол-дисульфідної системи нейрона за рахунок зниження її відновлених інтермедіатів - значного зниження рівня цитозольного глутатіону і пригнічення активності глутатіонредуктази (ГР). Вперше показано, що антиконвульсанти, дія яких супроводжується підвищенням вмісту відновленого глутатіону та зниженням рівня маркера нітрозуючого стресу в головному мозку, проявляють менш виражені побічні ефекти по відношенню до когнітивних функцій ЦНС. Встановлена залежність між індексом нітротирозин/глутатіон відновлений при коразоловому кіндлінгу та впливом антиконвульсантів на когнітивні процеси — чим вищий індекс, тим більш негативний вплив чинять антиконвульсанти на когнітивні функції. Встановлено, що антиконвульсанти з переважною ГАМК-ергічною дією мають більш виражену антипароксизмальну активність, однак більш негативно впливають на когнітивні процеси (пам'ять, здатність до навчання, увагу). Антиконвульсанти з переважно глутаматергічною дією мають менш виражену антипароксизмальну активність, однак менший негативний вплив на когнітивні процеси. Збереженість когнітивних функцій при реалізації терапевтичного ефекту в глутаматергічних антиконвульсантів пояснюється виявленим в їх механізмі дії нейропротективним ефектом (підвищенням виживаності нейронів, підвищенням їх трансляційної активності та зниженням нейроапоптозу і підвищенням експресії bcl-2), а також позитивною модуляцією на стан тіол-дисульфідної системи, зниженням щільності nNOS- і iNOS-позитивних клітин у сенсомоторній зоні кори головного мозку після судомного нападу.

Наукова новизна підтверджена патентом України №74602 «N-(біцикло [2,2,1]гепт-5-ен-ендо-2-їлметил)-3-гідрокси-1,1-діоксотіалоніл-4-сульфоніламід, який виявляє аналгетичну та транквілізуючу дію»

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати проведених досліджень є передумовою обґрунтування раціональних підходів до медикаментозної терапії епілепсії з урахуванням механізмів дії антиконвульсантів та їх побічних дій. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням використання в клінічній практиці коефіцієнта нітротирозин/відновлений глутатіон для прогнозу нейротоксичних побічних реакцій при призначенні антиконвульсантів та для раціонального підбору препаратів – модуляторів системи глутатіону, для корекції цих явищ і підвищення безпечності протиепілептичної терапії. Результати дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес кафедр фармакології Національного фармацевтичного університету, Запорізького державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є особистою науковою працею автора. Внесок дисертанта в її виконання полягає у визначенні мети і задач роботи, проведенні експериментальних досліджень, наукового аналізу та інтерпретації отриманих результатів, формулюванні основних положень висновків дисертації. Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, виконана статистична обробка даних, підготовка наукових праць до публікації, написання й оформлення дисертації та автореферату.

Проведення морфологічних досліджень зразків тканин мозку експериментальних тварин виконано за консультативною допомогою професора кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету, д.м.н. А.В. Абрамова.

**Апробація роботи.** Основні положення дисертації викладені та обговорені на VII Національному з’їзді фармацевтів України (Харків, 2010), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології, присвяченій 90-річчю проф. О.О. Столярчука (Вінниця, 2010), науково-практичній конференції “Безпечність ліків і фактори ризику небажаних ефектів фармакотерапії” (Тернопіль 2010), на “V Національному конгресі геронтологів і геріатрів України” (Київ 2010), науковій конференції студентів та молодих учених “Новини і перспективи медичної науки” (Дніпропетровськ, 2010), VII Національному з’їзді фармацевтів України (Київ, 2011), IX науковій конференції студентів та молодих учених “Новини і перспективи медичної науки” (Дніпропетровськ, 2010), науково-практичній конференції студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів (Суми, 2011), науково-практичній конференції „Сучасні аспекти неврології” (Івано-Франківськ, 2014), 10th World Congress on Controversies in Neurology (CONy) (Lisbon, Portugal, 2016).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових робіт, в яких повною мірою відображено її зміст, у тому числі 6 статей, з них 5 - у наукових фахових журналах, рекомендованих МОН України, 1 - в закордонному, та 10 тез у матеріалах з’їздів, конгресів, науково-практичних конференцій та симпозіумів, 1 патент України, 2 інформаційні листи.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 153 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел, що включає 244 роботи, з них іноземних – 189. Роботу проілюстровано 19 таблицями, 22 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ПРОТИЕПІЛЕПТИЧНА ТЕРАПІЯ ТА ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ НА ОРГАНІЗМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Питання безпеки застосування антиконвульсантів

Майже всі лікарські препарати можуть викликати небажані побічні ефекти, що може стати причиною тяжких ускладнень або навіть призвести до летального результату. Особливість лікування багатьох захворювань, у тому числі й епілепсії, полягає в необхідності довготривалого, іноді пожиттєвого прийому ліків [1].

Поширеність побічних ефектів і ускладнень антиепілептичної терапії достатньо висока і становить, за даними багатьох авторів, від 7% до 25% [2, 3, 4]. При розвитку тяжких ускладнень виникає необхідність відмовитись від препарату, навіть якщо він ефективний щодо контролю нападів, та змінити схему терапії. Медикаментозні ускладнення можуть негативно впливати на якість життя та соціальну адаптацію хворого, іноді більшою мірою, ніж саме захворювання [5].

Небажані побічні ефекти, пов'язані з прийомом лікарських препаратів, можуть бути зумовлені багатьма причинами. Серед них важливим є людський фактор. За даними ВООЗ, приблизно половина хронічних хворих не виконують медичні рекомендації [6]. Найкращі ліки можуть ставати марними, якщо пацієнт не виконує призначення лікаря: у кращому випадку стан хворого не змінюється, в гіршому - хвороба продовжує прогресувати. Крім того, переоцінка лікарем дисциплінованості хворого в поєднанні з неефективністю лікування призводить до багаторазових переглядів терапії і призначення нових препаратів, що, в свою чергу, призводить до збільшення побічних ефектів [6, 7].

Необхідно відмітити, що важливу роль у розвитку побічних дій має і професійність лікаря. Він повинен покладатися у своїй діяльності на широку теоретичну базу знань в області медицини, постійно цікавитися новинками, досягненнями в цій галузі, відвідувати конференції, читати статті, володіти комп'ютером для ознайомлення із сучасними тенденціями в лікуванні хворого. Так, на цей час у нашій країні і за кордоном розроблені стандарти і протоколи фармакотерапії епілепсії, які з плином часу і появою нових підходів до лікування переглядаються. Такий підхід дозволяє оптимізувати лікування й об'єктивно оцінювати його результати і причини відсутності успіху. Наприклад, ламотриджин був вперше впроваджений у клінічну практику в 1994 р. і запропонований в якості засобу протиепілептичної терапії, а саме як препарат другої лінії при резистентній парціальній епілепсії [8]. Пізніше зазначені рамки застосування ламотриджину були істотно розширені за рахунок доведеної ефективності цього препарату при лікуванні як парціальних, так і генералізованих нападів у дорослих, дітей і осіб похилого та старечого віку; як у вигляді додаткової терапії при лікуванні рефрактерної епілепсії, так і у вигляді монотерапії в пацієнтів із вперше встановленим діагнозом епілепсії і при рефрактерних формах захворювання [9, 10, 11], що дало змогу розширити і внести зміни в інструкцію із застосування цього протисудомного засобу.

Отож, лікар повинен пам'ятати, що раціональна антиепілептична терапія має сприяти поліпшенню якості життя пацієнта і його соціальній адаптації, вона повинна бути виважена і відповідати сучасним світовим стандартам лікування.

Значущим фактором у розвитку побічних ефектів препаратів, у тому числі й антиконвульсантів, є причини, зумовлені власне організмом пацієнта. Перш за все, при призначенні протисудомних засобів важливо враховувати попередню терапію у хворого, оскільки неправильно підібрана доза чи сам препарат на початку лікування може призвести до фармакорезистентності, коли тяжкість і частота нападів, неврологічні і психічні супутні симптоми або побічні дії протиепілептичних препаратів не піддаються задовільній корекції [12].

Не слід відкидати і той факт, що пацієнт може мати декілька патологій, що потребує приймання ліків різних груп. Несприятливі наслідки лікарської взаємодії розвиваються в 3-5% випадків при одночасному прийманні 2-5 препаратів [13]. Наприклад, прийом фенобарбіталу одночасно з парацетамолом веде до утворення високотоксичного гепатотропного метаболіту, продукція якого різко підвищується, що може призвести до некрозу гепатоцитів [14]. Прийом ацетилсаліцилової кислоти веде до збільшення концентрації вальпроатів та їх здатності викликати геморагії [14, 15].

Крім того, побічні реакції можуть визначатися ідіосинкразією. Це атипова, частіше генетично зумовлена, реакція пацієнта на препарат [15]. До реакцій цього типу належать агранулоцитоз (фенобарбітал, фенітоїн, карбамазепін, вальпроат); печінкова недостатність (солі вальпроєвої кислоти, фенітоїн, карбамазепін); апластична анемія (фенітоїн, фенобарбітал, карбамазепін, етосуксимід); синдром Стівенса-Джонсона (фенітоїн, фенобарбітал, карбамазепін, етосуксимід, ламотриджин); вовчаковоподібний дерматит (фенітоїн, карбамазепін, етосуксимід); алергічний дерматит та сироваткова хвороба (будь-які протиепілептичні препарати) [16]. До реакцій ідесинкразії також належить гостра енцефалопатія та кома, яка може виникнути на початковій стадії лікування вальпроатами [16, 17]. Передбачається, що це ускладнення виникає в пацієнтів із заздалегідь компенсованим дефектом мітохондріальних бета-оксидаз [18]. У багатьох випадках реакції ідіосинкразії вкрай тяжкі та вимагають негайної відміни препарату. Важливо те, що ці реакції не залежать від дози й можуть виникати на будь-якому етапі терапії [17, 18].

Багато побічних ефектів антиконвульсантів опосередковується їх впливом на ферменти системи цитохрому Р450 [19]. Це означає, що лікарю важливо враховувати стан знешкоджуючої функції печінки, щоб не спровокувати ускладнення фармакотерапії антиконвульсантами. Призначення потужних індукторів ферментів печінки хворому, в якого й так погіршена ферментативна система печінки, може призвести до тяжких наслідків. До числа потужних індукторів ферментів печінки належать фенітоїн, фенобарбітал, карбамазепін, етосуксимід [20]. Слабкі індукуючі властивості мають тіагабін, топірамат, ламотриджин. Габапентин та бензодіазепіни не надають індукуючого ефекту. Вальпроєва кислота, навпаки, може інгібувати ферменти цитохрому Р450 [20, 21].

Важливим є й те, що в лікуванні хворого може виникати потреба в застосуванні декількох антиконвульсантів або поєднувати протиепілептичні препарати з іншими ліками, при розвитку супутніх захворювань [20].

Отже, робота печінки та її ферментативної системи має важливий вплив на дозу препарату в організмі. Зміни в роботі метаболізму печінки можуть призвести до тяжких побічних ефектів [21].

У той же час індукція ферментів печінки викликає посилення метаболізму й ендогенних речовин. Наприклад, фенобарбітал і фенітоїн здатні викликати порушення метаболізму вітаміну D в результаті інтенсифікації перетворення його активного метаболіту в неактивний [22, 23, 24].

Характер побічних дій залежить також від механізму дії антиконвульсантів, що є дуже важливим і на сьoгоднішній день найменш вивченим. Так, цілий ряд антиконвульсантів посилюють гальмівні процеси мозку за рахунок збільшення рівня гальмівного медіатору ГАМК (барбітурати, габапентин, вальпроат, тіагабін) [25, 26].

Показано, що, препарати, які збільшують ГАМК-ергічне гальмування частіше, ніж інші, викликають у хворих порушення поведінкових реакцій, вони можуть призводити до розвитку снодійного та транквілізуючого ефектів, впливати на поведінку, викликати когнітивні розлади [26, 27 ].

Так, у доклінічних дослідах на щурах було виявлено, що фенобарбітал мав негативний вплив на процеси пам'яті [27]. Порівняльний аналіз дії окскарбамазепіну, ламотриджину, топірамату при пентилентетразолових судомах показав, що найбільш виражені зміни когнітивних функцій серед цих препаратів викликає топірамат, який значно зменшує показники консолідації пам'ятного сліду у щурів [28, 29]. Однак в інших експериментальних дослідах відмічено, що при довготривалому введенні топірамату (21 день) у дозі 15 мг/кг щурам інтраперитонеально, навпаки, відмічається покращення просторової пам'яті при дослідженні у водному лабіринті Моріса [30].

Нейропротективниий ефект топірамат виявляв і при гіпоксично-ішемічній травмі головного мозку в новонароджених щурят [31].

Негативний вплив на когнітивні процеси в експериментальних дослідах показав карбамазепін [31, 32]. Було виявлено, що при інтраперитонеальному введенні препарату в дозі 10 мг/кг та 20 мг/кг зменшувалась здатність до навчання, однак на процеси пам'яті антиконвульсант майже не впливав [33]. Найчастіше при вживанні карбамазепіну розвивається запаморочення, атаксія, сонливість [33, 34, 35].

Показано також значне погіршення процесів навчання та пам'яті при інтраперитонеальному введенні щурам вальпроєвої кислоти в дозі 100, 200 та 400 мг / кг [36, 37].

У клінічних дослідах було відмічено, що фенобарбітал часто призводить до зниження успішності в школі та інтелектуально-мнестичних порушень [38]. Частота поведінкових порушень при прийомі барбітуратів становить 20-40% і може досягати 60% у дітей із затримкою розвитку [39]. Барбітурати можуть викликати агресію, аутоагресію, симптоми депресії, гіперактивність, синдром гіперактивності з дефіцитом уваги (у 18-40% дітей), дратівливість, порушення сну, напади гніву, опозиційну поведінку, відмову від виконання лікарських призначень [39, 40].

При дослідженні впливу топірамату, габапентину та ламотриджину на когнітивний профіль у здорових людей було відмічено, що габапентин і ламотриджин мали мінімальний вплив на когнітивні функції, на відміну від топірамату, який у дозі 300 мг/кг, через два тижні після вживання, при нейропсихологічному тестуванні показав погіршення пам'яті та уваги в 15% порівняно з 0% у контрольній групі [41, 42].

В останніх дослідженнях топірамату була встановлена чітка дозозалежність впливу на когнітивні процеси хворого. Так, при прийомі 384 мг препарату порушення когнітивних функцій відмічалось у 35% хворих порівняно з 5% у групі плацебо [43].

До препаратів, які мають снодійний ефект, належать фенобарбітал, габапентин, карбамазепін, топірамат, діазепам [44]. В експерименті було показано, що фенобарбітал (100 мг/кг) значно зменшував фазу швидкого сну та збільшував тривалість сну , у той час як фелбамат (30-300мг) не мав снодійного ефекту, а ламотриджин (100 мг\кг) значно зменшував фазу швидкого сну та збільшував його тривалість [45].

При лікуванні дітей фелбаматом у 6% спостерігалась сонливість, у 5%-безсоння[45, 46].

Седативний же ефект спостерігається на початку лікування фенобарбіталом, примідоном, карбамазепіном (11%), етосуксимідом (13%), вальпроатом (2%), фенітоїном, ламотриджином. Вігабатрін викликає седативний ефект у 9%, а в поєднанні з вальпроєвою кислотою - в 10% дітей [47, 48, 49].

До препаратів з транквілізуючою дією, яка зумовлена стимуляцією ГАМК рецепторів, належать похідні вальпроєвої кислоти, клоназепам, бензодіазепіни [50, 51].

Так, в експериментальному дослідженні анксіолітичних властивостей вальпроєвої кислоти було показано, що при інтраперитонеальному введенні 300 мг/кг антиконвульсанту за 30 хвилин до тестування в «піднесеному хрестоподібному лабіринті» збільшувалась кількість заходів у світлі рукави та час перебування в них [52].

Анксіолітичний ефект має і клоназепам, який при введенні щурам у дозі 0,25 мг/кг і/п теж збільшував кількість заходів у «світлі рукави» та час перебування в них при тестуванні у хрестоподібному лабіринті [53].

Відомо, що препарати, застосування яких призводить до пригнічення полісинаптичних спинальних рефлексів та роз'єднання дії кори головного мозку з підкірковими структурами , мають центральну міорелаксуючу дію [54, 55].

Згідно із сучасними дослідами, міорелаксуючі властивості мають вальпроат натрію, клоназепам [56]. У дослідах на мишах було доведено, що вплив на міорелаксацію таких антиконвульсантів, як окскарбамазепін, ламотриджин, топірамат, фенобарбітал, фенітоїн, прямопропорційно залежить від дози. Середньоефективна доза, при якій у 50% тварин розслаблялась скелетна мускулатура, у дослідах для топірамату становила 509,5 мг / кг, ламотриджину - 47,7 мг / кг, окскарбазепіну - 87,3 мг / кг, фенобарбіталу - 128,7 мг / кг, фенітоїну - 69,7 мг / кг, що набагато перевищує середньоефективну дозу, для попередження виникнення МЕШ – індукованих судом [56, 57].

Не менш важливим механізмом дії антиконвульсантів є пригнічення глутаматергічної нейромедіації. Глутамат є найбільш поширеним і значущим нейромедіатором збуджуючої дії в головному мозку людини [51, 58]. Вважається, що протиепілептичні препарати, механізм дії яких зводиться до блокади глутаматергічних рецепторів, більшою мірою характеризуються активуючою дією. До таких препаратів, перш за все, належать ламотриджин та топірамат [59]. Потрібно відмітити, що антиконвульсанти мають декілька механізмів дії, на глутаматергічну дію можуть впливати карбамазепін, барбітурати [59, 60].

Досить унікальним препаратом є топірамат. Так, він, з одного боку, через активацію ГАМК–ергічної системи проявляє седативну дію, а через глутаматергічну дію - пояснює деяку когнітивну сповільненість, сонливість на етапі нарощування дози [61, 62].

У дослідах на тваринах ламотриджин виявляв мінімальний вплив на когнітивні процеси щурів [63, 64]. При застосуванні його в лікуванні епілепсії в дітей він майже не впливає на розвиток їх розумових здібностей [65, 66].

До центральних побічних ефектів протисудомних препаратів належать і гіперкінези, атаксія. Тремор найбільш часто виникає при прийомі вальпроєвої кислоти (у 10% всіх пацієнтів і в 15% дітей) [67, 68]; у 6-45% хворих він, за даними закордонних авторів, може бути дозозалежним [69, 70]*.* Тремор також виникає при прийомі фенітоїну, карбамазепіну, тіагабіну, габапентину, ламотриджину [71, 72].

Атаксія з'являється на тлі високої концентрації в плазмі багатьох антиепілептичних препаратів. Транзиторна атаксія зареєстрована на початку лікування фенобарбіталом, примідоном, карбамазепіном (у 4% дітей), у дітей, які лікувались ламотриджином, вона розвивається в 6% [73]. Особливо характерна атаксія при прийомі фенітоїну (служить маркером порушення функції мозочка і часто поєднується з тремором) [73, 74].

Отже, основний протисудомний механізм дії антиконвульсантів більшою мірою пов'язаний з центральними побічними ефектами.

На сьогоднішній день відомо, що дозозалежні побічні ефекти антиконвульсантів можна розподілити на 3 великі групи:

1. З боку центральної нервової системи (фенобарбітал, фенітоїн, карбамазепін, бензодиазепіни, топірамат);

2. Гематологічні (вальпроати, карбамазепін, фенітоїн, фенобарбітал);

3. Які ведуть до порушення репродуктивного здоров’я (вальпроати) [75, 76, 77].

До гематологічних ускладнень при прийомі антиконвульсантів належать лейкопенія, тромбоцитопенія, нейтропенія, а також більш складні – апластична анемія, агранулоцитоз і мегалобластична анемія [78, 79]. Так, наприклад, фелбамат може викликати апластичну анемію з частотою 1:4000 [78]. Гематологічні побічні реакції виникають і при застосуванні карбамазепіну [79]. Тяжка та помірно виражена лейкопенія спостерігалась у результаті клінічних досліджень у 2% хворих [80], у меншості карбамазепін призводив до розвитку апластичної анемії, агранулоцитозу [80, 81]. Досить рідко агранулоцитоз і апластична анемія зустрічались і при застосуванні етосуксиміду [81, 82].

При вживанні вальпроєвої кислоти виникали тромбоцитопенія, пригнічення факторів згортання крові, в тому числі й рівня фібриногену [83, 84, 85].

У хворих з дефіцитом фолієвої кислоти можливий розвиток мегалобластної анемії на фоні довготривалого прийому фенобарбіталу [86, 87].

Вальпроати викликають гіперандрогенізм у дівчат, що небезпечно під час статевого дозрівання [88, 89, 90].

Отже, слід зауважити, що на сьогоднішній день достовірно вивчені побічні ефекти, пов'язані з організмом хворого, з людським фактором, однак немає зв'язку та систематизації побічних дій, пов'язаних з механізмом дії антиконвульсантів. Залишається актуальним необхідність проведення кореляції, наскільки пов'язаний механізм дії з частотою виникнення побічних ефектів, тому що шлях до раціональної фармакотерапії лежить через дослідження взаємовідносин терапевтичної дії та небажаних побічних дій.

1.2 Патобіохімічні порушення в головному мозку при епілепсії

Епілептичні напади, які повторюються, супроводжуються стійкими порушеннями обміну речовин у головному мозку і значними дисгемічними порушеннями [91].Локальна тканинна гіпоксія при судомах призводить до надмірного викиду глутамату, запуску ряду нейрохімічних реакцій з накопиченням надлишкової кількості вільних радикалів кисню, розвитку «оксидантного стресу», посилення ексайтотоксичних ефектів, перезбудження і пошкодження глутаматних рецепторів [91, 92].Так, при вивченні показників оксидантно-антиоксидантної системи в сироватці крові у хворих з епілептичними тоніко-клонічними судомами була виявлена стимуляція вільно-радикального окиснення з накопиченням продуктів перекисного окиснення ліпідів [93]. Утворення активних форм кисню стимулює синтез прозапальних цитокінів, які включаються в каскад апоптичних процесів при епілепсії.Епілептиформна активність супроводжується різким підвищенням вмісту вільних жирних кислот у корі мозку, а також зміною вмісту деяких фосфоліпідів [94]. Як наслідок гідролізу мембранних ліпідів і вивільнення вільних жирних кислот та діацилгліцеролів, змінюються деякі властивості нейронних мембран, наприклад мікров'язкість, провідність іонних каналів, активність мембранозв'язаних ферментів [94, 95]. У той же час пошкодження мембрани або метаболізму нейрона призводить до зміни його чутливості і підвищення нейронної збудливості.Полярність мембрани нейронів підтримується за рахунок діяльності іонного насосу, що вимагає адекватного енергетичного забезпечення, у зв'язку з чим тенденція до деполяризації мембран нейронів, у тому числі й пароксизмального деполяризаційного зрушення мембранного потенціалу, може посилюватися при розладі метаболічної генерації енергії [95]. Цей процес певною мірою пов'язаний з виникаючими прогресуючим дисбалансом між обмеженими можливостями кровопостачання і підвищеним енергетичним попитом при судомах. Тому доцільно поєднувати антиепілептичні препарати з препаратами, що впливають на окиснювально-відновні процеси, нормалізують метаболізм ЦНС, підвищують енергозабезпечення тканин. З іншого боку, перспективним є пошук серед відомих антиконвульсантів препаратів, що мають здатність обмежувати явища окисного стресу і нормалізувати метаболізм нейронів при гіпоксії [96, 97, 98].

Біохімічні механізми судомних станів і індукція синдрому епілепсії належать глутамінергічній системі [99, 100]. Очевидним є також значення ГАМК-ергічної та ендозепамергічної систем. З глутамінергічною трансмісією тісно пов'язана не тільки можливість індукції судомних станів, але й ряд вищих функцій ЦНС, таких, наприклад, як пам'ять. У цьому одна з причин того, що епілепсія зводиться до судомного синдрому і пов'язана з низкою складних змін психіки [101].

Рецептори глутамінової кислоти - утворення складні і неоднорідні. Характерно, що розкриття їх структури і різноманітності було прискорене виявленням речовин, які іноді називають збуджуючими нейротоксинами. До них належить каїнова кислота, квісквалева кислота і ряд інших сполук, багато з яких мають спільні з глутаматом елементи структури [102]. Сам по собі глутамат при інтрацеребральному введенні в певні зони мозку може викликати напади судом. Однак каїнат і квісквалат виявилися особливо потужними індукторами судом і, більше того, агентами, здатними специфічно руйнувати нейрони, що несуть глутаматні рецептори [103, 104] .

На глутаматних рецепторах виявлені ділянки зв'язування барбітуратів - агентів, що гальмують їх функцію і володіють відповідно протисудомною активністю. Один з найбільш потужних і специфічних блокаторів NMDA глутаматних рецепторів - 2-аміно-7-фосфоногептанова кислота - запобігає нападам епілепсії в експериментальних тварин [105, 106]. Все це змушує вважати зміни глутамінергічної трансмісії одними з вузлових у патогенезі епілептиморфних судомних станів [96, 107].

Підтримкою цієї ж гіпотези служить виявлення в плазмі крові епілептиків значно підвищених рівнів антитіл до білків глутаматного рецептора [108]. Це використовується для діагностики прихованих форм епілепсії та оцінки тяжкості захворювання [109, 110]. Подібне явище відображає, можливо, зниження функцій гематоенцефалічного бар'єру при розвитку епілепсії, що супроводжується виходом до периферичного кровотоку певних кількостей білків рецептора та їх фрагментів і, далі, утворенням антитіл до них. Можливо, сам патогенез епілепсії подібний патогенезу аутоімунних хвороб мозку, при яких аутоантитіла до білків мозку служать основним пошкоджуючим фактором. У тому, що остання гіпотеза правомірна, переконують, по-перше, дані про підвищений рівень у плазмі крові епілептиків не тільки антитіл до білків глутаматного рецептора, а й до інших білків і ліпідів синаптичних мембран мозку, наприклад до білка S100, а також результати експериментів з введенням у мозок антитіл, отриманих до різних білкових та ліпідних фракцій мозку [107]. Епілептиформні процеси виникали, зокрема, при ін'єкції антитіл до деяких фракцій гангліозидів [111, 112].

Інша система, зв'язок якої із судомними станами й епілепсією вельми вірогідна, - ГАМК-ергічна. Гальмівні функції ГАМК-ергічної системи мають більш універсальний, менш специфічний характер, ніж функції збуджуючих нейромедіаторних систем. Це відображає, зокрема, той факт, що частка ГАМК-ергічних терміналей у мозку є найбільшою [113]. Зниження судомної готовності і полегшення судомних станів встановлено при центральному введенні ГАМК, а також при периферичному введенні його аналогів, здатних проходити через гематоенцефалічний бар'єр. Такий же ефект сполук, що гальмують розпад, стимулюючих синтез і зворотне захоплення ГАМК: вальпроату натрію, а також прогабіда, γ-ацетилен-ТАМК та ін. [114]. На рецепторах ГАМК виявлений барбітурат-зв'язуюча ділянка. У цьому випадку, на відміну від аналогічної ділянки на глутаматних рецепторах, барбітурати підсилюють ефект основного нейромедіатору. Таким чином, барбітурати проявляють протисудомну дію, змінюючи стан двох категорій рецепторів: глутаматних, пригнічуючи збуджуючу дію їх лігандів, і ГАМКд-рецепторів, стимулюючи їх гальмівну дію [115, 116, 117].

Ще більше підтверджує уявлення про роль ГАМК-ергічної системи в запобіганні та купуванні судомних станів той факт, що пригнічення синтезу ГАМК, навпаки, провокує судоми [117]. Яскравим прикладом є судоми в людей при авітамінозі В6. Вітамін В6 служить попередникам піридоксаль-5-фосфату, який, у свою чергу, є кофактором глутаматдекарбоксилази, яка каталізує останню стадію синтезу ГАМК. Провокують судоми і такі інгібітори цього ферменту, як аллілгліцин, гідразиди та ін. [118]. Судомні напади викликає й одна з отрут грибів - пікротоксинін, теж зв'язується з ГАМК-рецепторами і пригнічує їх активність. З ГАМК-рецепторами поєднані ділянки зв'язування ендозепінів - пептидів, що викликають збудження, страх і проконфліктну поведінку. Вони знижують активність ГАМК-рецепторів. Тому зрозуміло, що блокатори рецепторів ендозепінів - бензодіазепінові транквілізатори - виявилися агентами, що полегшують епілептичні процеси [119].

На цей час виділяють п'ять типів глутаматних рецепторів. Найбільш вивченими і мають значення для патології NMDA-аспартатові рецептори. Глутаматні рецептори мають тісний зв'язок з іонними каналами. Тому разом утворюється функціональна ланка глутамат-іонний комплекс. Глутамат активує рецептори, відбувається входження всередину клітини кальцію і вихід калію [120]. Це найбільш значущі іонні порушення, які виникають при порушенні глутаматних комплексів. На сьогодні добре вивчений хімічний каскад, який розвивається при будь-якому ступені гіпоксії більшою чи меншою мірою. У результаті цього відбувається деполяризація клітинних мембран, викид, вивільнення глутамату, активація NMDA-рецепторів і активація кальцієвих каналів. Далі відбувається збільшення вмісту внутрішньоклітинного кальцію, активація ферментів, синтез окису азоту й утворення вільних радикалів [121]. У результаті цих ланок і при виражених порушеннях виникає необоротна клітинна смерть або аноксична деполяризація нейронів. Внутрішньоклітинний ацидоз утворюється при внутрішньоклітинному накопиченні іонів водню і лактату. Ацидоз впливає на окисне фосфолювання мітохондрій і сприяє розвитку внутрішньоклітинного набряку [122]. Додатковим результатом активації NMDA-рецепторів є внутрішньоклітинна продукція активних форм кисню, насамперед супероксид-аніону і гідроксид-радикалу. При дефіциті аргініну, субстрату нітроксидсинтази також може утворюватися супероксид-аніон. Як зазначає Snyder S.H., в умовах надлишкового утворення різних радикалів можлива взаємодія вторинного месенджера - оксиду азоту та супероксиду з утворенням пероксинітрита, що має виключно високий окиснювальний потенціал [123].

Найбільша щільність NMDA-рецепторів виявлена в структурах переднього мозку. У щурів максимальна концентрація цих рецепторів характерна для СА1 зони гіпокампу. У неокортексі найбільша їх щільність спостерігається в І, ІІ, ІІІ та V шарах. Якщо розглядати кору в топографічному аспекті, то найбільше рецепторів, чутливих до NMDA, знаходиться у фронтальній корі [123, 124, 125].

Maragos W.F., застосовуючи радіолігандний аналіз, показав, що найбільша щільність NMDA-рецепторів насамперед у гіпокампі, корі великих півкуль, мигдалині і стріатумі. Саме ці структури, насамперед, відповідальні за пам'ять і навчання в традиційному розумінні цих слів і асоційовані з сенсорною функцією, здійснення якої вимагає підвищеного ресурсу синаптичної пластичності [126]. Представляє також інтерес те, що зазначені структури мають низький поріг епілептизації і високий ступінь збудливості [127].

В усіх прошарках гіпокампу виявлено високий рівень NMDA-рецепторів, за винятком тіл нейронів пірамідного і гранулярного шарів, а також термінальної зони моховитих волокон гіпокампу [127, 128]. Серед кортикальних ділянок асоціативні зони кори часто мають більшу щільність рецепторів, ніж проекційні зони. Фронтальна, інсулярна, піриформна, периринальна і передня поясна кора також містять більшу кількість рецепторів, на відміну від скроневої, потиличної, парієтальної і задньої поясної ділянок кори. Гранулярні коркові ділянки мають виражену ламінарність розподілу NMDA-рецепторів. Так, у зовнішніх шарах I-III і V шарі парієтальної кори показана більша щільність рецепторів, ніж в інших коркових шарах [129, 130].

1.3 Роль оксидативного стресу в процесах нейродеструкції при епілепсії

Посилення утворення АФК в умовах гіпоксії відбувається при зниженні функціональної активності антиоксидантної системи нейрона. У ряді робіт показано, що ушкодженню антиоксидантних ферментів, особливо супероксиддисмутази (СОД), при гіпоксії сприяє ряд факторів [131]:

1. зниження рівня макроергічних фосфатів;
2. різке підвищення концентрації активних форм кисню, особливо ОН2;
3. метаболічний ацидоз, що розвивається в ішемізованих тканинах.

До кінця причина різкого зниження активності антиоксидантних ферментів при гіпоксії не з'ясована, найімовірніше це пов'язано з їх високою чутливістю до активних форм кисню або ліпідних перекисів [123].

Крім антиоксидантних ферментів, в організмі важливе значення мають ендогенні антиоксиданти та антиоксидантні сполуки (токофероли, аскорбінова кислота, тво- і селенвмісні з'єднання) [132].

Активність протікання реакцій оксидативного стресу та ініціювання АФК залежить від абсолютного або відносного вмісту в тканинах ендогенних антиоксидантів, внаслідок чого підвищення або зниження їх кількості може впливати на інтенсивність оксидативного стресу [133, 134].

На цей час виділяють чотири групи антиоксидантної системи (АОС) клітини.

До *першої групи* АОС захисту можна віднести жиророзчинні ендогенні антиоксиданти: вітаміни групи Е (токофероли), убіхінон, вітаміни групи А (ретинол) і провітаміни групи А (α-, γ-, β-каротини), вітаміни групи D (кальциферол), К (філохінон і менахінон), ліпоєвої кислоти, деякі стероїдні гормони, мелатонін та інші [135].

Механізм антиоксидантної дії цих сполук зумовлений їх високими донорськими властивостями (зменшення кількості вільного кисню в клітині, наприклад, шляхом активації його утилізації, підвищення активності процесів окиснення і фосфорилювання) і здатністю відновлювати ліпідні радикали. Всі перераховані сполуки відносять до речовин антирадикального захисту або "прямих" антиоксидантів. Однак сумарна антиоксидантна активність цих речовин (здатність гальмувати вільнорадикальні перекисні реакції на всіх етапах оксидативного стресу) визначається не тільки їх антирадикальною активністю, але і здатністю утвореного радикала самого антиоксиданту паралельно з реакціями рекомбінації з утворенням стабільних молекул ініціювати нові ланцюги вільно-радикального окиснення при взаємодії з кожною новою молекулою окисненого з'єднання [136, 137].

До *другої групи* АОС захисту можна віднести захисні ферменти: СОД, каталазу, глутатіонредуктазу, а також низько- і високомолекулярні сполуки, які містять тіольні та селеногрупи, зокрема глутатіон, цистеїн, цистин та інші [135].

Захисні ферменти запобігають надмірному утворенню активних форм кисню і беруть участь у нерадикальному розпаді перекисів ліпідів. Так, СОД є ключовим ферментом антирадикального захисту. Вона дисмутує супероксидрадикал до менш токсичного перекису водню [136]. Каталаза відновлює Н2О2 до води. В активний центр входить тривалентне залізо, протопорфірин, що взаємодіє з перекисом водню по каталазному або по пероксидазному шляху, залежно від концентрації субстрату. Фермент є практично у всіх тканинах, де його концентрація досягає 10ˉ**6** М. У сукупності дія всіх захисних ферментів зводиться до зниження концентрації цитотоксичних гідроксильних радикалів [136, 137].

Фізіологічні концентрації сірковмісних сполук також виявляють безсумнівний антиоксидантний ефект, що перевершує прооксидантний. Основним сірковмісним антиоксидантом в організмі є глутатіон у відновленій формі. Крім інактивації ферментативним шляхом гідропериокису ліпідів, глутатіон неферментативним шляхом інактивує Н2О2 та інгібує активні форми кисню, з одночасним окисненням тіольних груп, у першу чергу до дисульфідів [138].

Для регенерації окисненого глутатіону в його відновлену форму в клітинах присутня глутатіонредуктаза. Ферментативне відновлення глутатіону залежить від НАДФН, тому функціонування GSH-залежних компонентів АОС тісно пов'язане з активністю НАДФН-утворюючих ферментів [139]*.*

*Третя захисна система* - це два ферменти: глутатіонпероксидаза (ГП) і глутатіотрансфераза (ГТ). ДП каталізує розпад гідроперекисів ліпідів нерадикальним шляхом за допомогою глутатіону відновленого [135, 140, 141]. Глутатіoн у відновленій формі може функціонувати як антиоксидант багатьма способами: хімічно взаємодіяти з синглетним киснем, супероксидом і радикалами гідроксилу або на пряму руйнувати вільні радикали; стабілізувати мембранну структуру переміщенням ацилпероксидів, що утворюються шляхом перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). GSH є коферментом ряду ферментів, активність яких полягає в зміні редокс-потенціалу глутатіону. Активність глутатіонпероксидази (ГП) і швидкість утилізації перекису водню безпосередньо залежать від концентрації відновленого глутатіону в клітині [142]. Кон'югування ксенобіотиків і видалення пероксидів ліпідів клітинних мембран, здійснюване глутатіонтрансферазою (ГТ), не відбувається без наявності відновленого глутатіону в клітині. Відновлений глутатіон необхідний для підтримки реакцій аскорбат-глутатіонового циклу, пов'язаного з нейтралізацією перекису водню. Тут його основна роль, як відновлюючого агента, полягає в рециклюванні аскорбінової кислоти від окисненої до відновленої форми за допомогою ферменту дегідроаскорбатредуктази. Основний же пул відновленого глутатіону підтримується глутатіонредуктазою (ГР), яка є невід'ємним елементом цього циклу [142, 143].

Різноманітні і дуже важливі функції глутатіону пов'язані з наявністю в молекулі SH-групи, що належить залишку цистеїну. Окиснюючи по SH-групі, він стає учасником багатьох важливих процесів [144, 145].

Для детоксикації Fe2 + в організмі існує четверта захисна система: система окиснення і зв'язування іонів Fe2 +. У плазмі крові ця система представлена ферментом церулоплазміном (фероксидазою), окиснює Fe2 + до Fe3 + киснем без утворення вільних радикалів, і білком трансферином, що зв'язує і переносить у кров'яному руслі іони Fe3 + [146]. Різке посилення продукції АФК в умовах антиоксидантної недостатності призводить до розвитку "оксидативного стресу", що є основним універсальним механізмом пошкодження клітин [147, 148].

В умовах "оксидативного стресу" АФК атакують макромолекули клітинної мембрани нейрона, що призводить до їх окиснювальної модифікації і деструкції. Мембрани клітин, зокрема нейронів, характеризуються високим вмістом арахідонової, декозогесаенової та інших жирних поліненасичених кислот, легко окиснюється під дією АФК, особливо супероксидрадикалу і гідроксилрадикалу [149]. Окиснення жирних кислот мембран має ланцюговий характер і відбувається по вільно-радикальному механізму з проміжним утворенням нестабільних алоксильних і пероксильних радикалів і, в кінцевому підсумку, з утворенням стабільних продуктів: п-алкеналей, 2-алкеналей, 2,4-алкандієнів, алкантрієнів, α -гідрокіалкеналей, гідропероксиалкенів і малонового діальдегіду. Пероксидні продукти окиснення мембранних ліпідів порушують регулярну упаковку мембранного бішару і викликають утворення в мембрані дефектних зон [150].

Малоновий діальдегід, взаємодіючи з білками і нуклеїновими кислотами, крім того, викликає утворення міжмолекулярних зшивок, причому ця властивість посилюється при ацидозі. Подібна дія альдегідів і гідроксиалкеналей призводить до зміни структури рецепторів, іонних каналів, цитоскелету клітини, ферментів, гальмування синтезу внутрішньоклітинних посередників і викликає деструкцію ДНК і РНК [151].

Процеси ушкодження білків і нуклеїнових кислот під дією АФК відбуваються паралельно з окиснювальним пошкодженням ліпідів. У окиснювальної модифікації білків провідна роль належить NO, гіпохлориту, супероксидрадикалу, гідроксилрадикалу, пероксинітриту. В окиснювальну модифікацію білків залучаються різні амінокислотні фрагменти, такі як цистеїн, метіонін, гістидин, пролін, аргінін, триптофан, тирозин. Найбільш легко окиснюються під дією АФК сульфгідрильні групи в цистеїні й метіоніні з утворенням сульфонових і дисульфідних груп. Цей вид модифікації є оборотним і його перетворення залежить від енергетичного потенціалу клітини і наявності в ній відновлених форм глутатіону, тіоредоксину [152, 153].

Окиснення SH - груп у білкових молекулах призводить до порушення або модифікації їх функцій. Так, під дією АФК на K + / Na + АТФ - азу, в останньої втрачається чутливість до регулюючої дії АТФ, окиснення SH - групи ксантиндегідрогенази перетворює її на ксантиноксидазу, яка сама продукує АФК, посилюючи тим самим інтенсивність оксидативного стресу [154]. Окиснювальна модифікація білкових молекул призводить до порушення здатності мембран генерувати, проводити нервовий імпульс, до порушення рецепторних, медіаторних, енергетичних, секреторних і метаболічних систем клітини [154, 155].

Надлишок NO підсилює експресію каспаз, які належать до сімейства IL-1β-конвертуючих протеаз, причетних до розгалуження ланцюга апоптозу. Експресія каспаз-3 виявлена в нейронах і астроглії пацієнтів з хворобою Альцгеймера, а каспаз-1 - у нейронах пацієнтів з черепно-мозковою травмою та каротидним інсультом. Надлишок АФК, особливо ОН • і ONOO-, здатні піддавати окиснювальної модифікації нуклеїнові кислоти, в результаті чого відбувається пошкодження основ, пошкодження дезоксирибози і поява нових ковалентних зв'язків ("зшивок") [156]. Утворений у результаті взаємодії ОН • і ONOO- пероксинітрит сприяє відкриттю гігантської пори мітохондрій, а також нітрозилює цитохром С у мітохондріях, що призводить до зміни його функцій, зокрема він працює нездатним підтримувати перенесення електронів у дихальному ланцюзі і не відновлюється аскорбатом [157, 158]. Оскільки одночасно відбувається вихід цитохрому С (у тому числі й нітрованого) в цитоплазму, то можна припускати участь такого процесу нітрозилювання і в якихось сигнальних процесах. Пероксинітрит нітрозилює гуанін, що призводить до розриву ланцюжків ДНК і до мутацій або запуску процесів апоптозу. Надлишок NO пригнічує ферменти, відповідальні за репарацію ДНК. Показана дія на алкілтрансферазу, формамідопіримідин-ДНК-глікозилазу і лігазу. NO активує PARP і АДФ-рибозилювання, особливо на тлі дефіциту АТФ та накопичення відновлених піридиннуклеотидів. NO позитивно впливає на синтез білка р53, який індукує експресію Bax, Fas, p53AIP (apoptosis inducing protein) та інших апоптогенних білків, а також переміщується в мітохондрії при апоптозі, що може бути однією з причин вироблення АФК і зниження трансмембранного потенціалу на внутрішній мембрані. Нині існує узагальнене поняття «мітохондріальна дисфункція» [159]. Це типовий патологічний процес, який має етіологічну та нозологічну специфічність. Розвиток мітохондріальної дисфункції призводить до порушення зворотного захоплення медіаторів (катехоламінів, дофаміну, серотоніну), іонного транспорту, генерації та проведення імпульсу, синтезу білка de novo, процесів трансляції та транскрипції; активізуються «паразитарні» енергопродукуючі реакції, що призводить до істотного спаду енергетичних запасів клітини. Крім того, під дією гідроксил-радикала відбувається відкриття мітохондріальних пор з експресією і виходом у цитозоль проапоптотичних білків. Відкриття пор відбувається за рахунок окиснення тіольних груп цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій (АТФ / АДФ-антипортер), що перетворює його в проникний неспецифічний канал-пору. Відкриття пор перетворює мітохондрії з «електростанцій» у «топку» субстратів окиснення без утворення АТФ [160, 161]. У точних біохімічних дослідженнях було встановлено, що порушення кисневого режиму тканин, гіперпродукція ексайтотоксичних амінокислот, зниження «нормальної» акумуляції Са2 + мітохондріями, пошкодження мембрани мітохондрій АФК підсилює відкриття пор і вивільнення апоптогенних білків з пошкоджених мітохондрій [162]. У цьому контексті істотна роль одного з нейротрофічних факторів - фактора некрозу пухлини-α (TNF-α), з яким пов'язані відкриття пор у мітохондріях, подальше порушення їх мембран і розвиток мітоптозу [163, 164]. Мітохондріальна пора являє собою канал, що проходить через обидві мітохондріальні мембрани і складається з трьох білків: транслокатора аденінових нуклеотидів, потенціалзалежного аніонного каналу (поринів) і бензодіазепінового рецептора. Коли цей комплекс зв'язується з Са2 +, через мембранну пору можуть проходити речовини з невеликою молекулярною масою. Це призводить до зниження мембранного потенціалу і набухання матриксу, цілісність зовнішньої мембрани неминуче порушується, і з міжмембранного простору в цитоплазму виходять білки апоптозу [165]. Їх декілька: фактор, індукуючий апоптоз (APOptosis-inducing factor), вторинний мітохондріальний активатор каспаз (second mitochondria-derived activator of caspases - Smac) і деякі прокаспази. Індукуючий фактор прямує прямо в ядро, де викликає деградацію ДНК. Поряд зі специфічними апоптозними білками з мітохондрії через відкриту пору виходить цитохром С, який у нормі служить кінцевою ланкою електронтранспортного ланцюга [166, 167]. У цитоплазмі цей білок зв'язується з білком Apaf-1 (APOptotic protease activating factor-1 - активує протеазу фактор 1) і формує апоптосомний комплекс. Він за допомогою Smac і ще одного фактора (Omi / HtrA2) активує прокаспазу-9, яка, ставши каспазою-9, перетворює два інші проферменти в каспаз-3 і 7; а вони вже розщеплюють структурні білки, призводячи до появи біохімічних і морфологічних ознак апоптозу. У числі перших можна назвати, зокрема, перехід фосфатидилсерину в зовнішній мембранний шар і фрагментації ДНК під дією АФК і NO [168]. З других ознак найбільш характерними є «відлущування» клітини від матриксу, зморщування мембрани, стиск ядра і формування бульбашок з клітинним вмістом - апоптозних тілець. Виходу цитохрому С в цитоплазму сприяють зниження рН при розвитку лактат-ацидозу, посилення окисної модифікації мітохондріальних білків і ліпідів [169, 170].

Останню реакцію як раз і викликають АФК, які неминуче утворюються в результаті «паразитарних» енергетичних реакцій. Цитохром С може вивільнятися у відповідь на підвищення концентрації іонів Са2 +, яке викликає відкривання пори, а також контролюватися білками сімейства Bcl-2. Саме вони регулюють апоптоз на рівні мітохондрій. З явищем мітохондріальної дисфункції тісно пов'язана гіперекспресія ранніх генів — c-fos [171]. Так, в умовах гіперпродукції АФК нейрохімичними і біоенергетичними системами головного мозку в умовах гіпоксії головного мозку, а також при ряді інших нейродеструктивних патологічних процесів відбувається активація експресії редоксчутливих генів, багато з яких необхідні для захисту клітин від токсичних ефектів окисного стресу [172]. Так, при нормальній концентрації кисню в навколишньому клітинному середовищі (нормоксії) під дією АФК відбувається в основному активація JunB, ATF-2 - факторів транскрипції, а в умовах окисного стресу - переважно факторів c-Jun і c-fos. Активація саме цих факторів транскрипції в умовах гіперпродукції АФК пояснюється тим, що JunB і c-fos містять у своїх ДНК-зв'язуючих доменах високочутливі до АФК залишки цистеїну - Cys252, Cys54, Cys61. Окиснення їх SH-груп призводить до зворотної інактивації АР-1 і NF-kB. Крім цього, білок c-fos безпосередньо бере участь у процесі фрагментації мітохондріальної ДНК та ініціювання процесів апоптотичної загибелі нейрональної клітини. c-fos відповідальний за гіперпродукцію NO при нейродеструктивних захворюваннях за допомогою активації індуцибельної NO-синтази [173, 174]. c-fos являє собою одну з основних ядерних мішеней для передачі сигналів регуляції клітинного росту і трансформації, залучений у безліч клітинних функцій, у тому числі в процеси клітинної проліферації і диференціювання. NO є потужним нітролізуючим агентом, мішенями якого можуть бути нуклеофільні групи активних тіолів, аміни, карбоксили, гідроксили й ароматичні кільця. NO + утворюється з надлишку NO за участю двовалентного заліза і кисню. NO- має відновлювальні властивості, чинить позитивну інотропну, лузитропну дію на міокард, знижує поріг судомної готовності [175, 176]. В умовах ішемії, коли спостерігається гіперпродукція NO- на тлі лактат-ацидозу, проявляються прооксидантні властивості цього деривата оксиду азоту по відношенню до тіолів та амінів. Результати досліджень in vitro показують, що внесення в суспензію нейронів донатора NO- солі Ангелі знижує вміст глутатіону [176]. Також за допомогою солі Ангелі було встановлено, що NO- порушує електричну активність нейронів, пригнічує активність натрієвих каналів [177]. Певно, різноспрямованість NO- пов'язана з його концентрацією, підвищення якої призводить до утворення токсичного нітританіону. N2O3, яке є джерелом NO +, проявляє властивості сильного нітрозилюючого агента, взаємодіє з аліфатичними та ароматичними амінами й утворює N-нітроаміни. Нітроаміни, а саме продукти їх перетворення, під дією Р450 (іон діазонію і формальдегід) є факторами, які алкілують нуклеїнові кислоти, дезамінують пурини, вони пригнічують 6-метилгуанін-ДНК-метилтрансферазу, збільшують утворення 8-гідроксигуаніну. N2O3 взаємодіє з цистеїном з утворенням S-нітрозоцистеїну і з глутатіоном з утворенням S-нітроглутатіону. Ці реакції контролюються глутатіонредуктазою і глутатіонтрансферазою. При інгібуванні цих ферментів в умовах гіпоксії відбувається окиснювальна модифікація низькомолекулярних тіолів, утворення гомоцистеїну і, як наслідок, порушення транспорту NO з утворенням його цитотоксичних дериватів, які ще більше підсилюють окиснення тіолів [178]. Наявність досить активної тіольної антиоксидантної системи, здатної регулювати транспорт NO, забезпечує і стійкість клітини до нітрозилюючого стресу. Мішенями окисної і нітрозуючої атаки пероксинітриту є меркаптани, СО2, металопротеїни, нуклеїнові кислоти, метаболітотропні трансмітери і ліпіди [179, 180]. Пероксинітрит, який є відносно стійким з'єднанням, при зміщенні рН у кислу сторону швидко протонірується з утворенням основного продукту - нітрат-аніону, а також гідроксил-радикала і діоксиду азоту, що зумовлює його окисні властивості [181]. Тому на початкових стадіях ішемії пероксинітрит взаємодіє з тіолами за типом нітрозилювання, в результаті чого утворюються нітрозотіоли, надалі при прогресуванні процесу і проявах лактатацидозу взаємодія відбувається за типом окиснення з утворенням більш стійких дисульфідів [182]. Пероксинітрит гальмує активність взаємодіючих метаболічних циклів метіоніну і цистеїну, пригнічуючи ключові ферменти, що регулюють рівень цистеїну, і підвищуючи утворення гомоцистеїну. Пероксинітрит реагує і з метаболітотропним трансмітером СО2 з утворенням сильного нітрозилюючого агента — нітрозопероксикарбонату [183]. Важливим механізмом цитотоксичної дії пероксинітриту є його реакція з тіозином і утворення нітротирозину. Пероксинітрит значно пригнічує активність СОД за допомогою нітрування її тирозинового залишку, а також зв'язування з міддю та зміни її валентності. Пероксинітрит є специфічним агентом, необоротно пригнічуючим мітохондріальне дихання при ішемії, безпосередньо взаємодіючи із залізом активних центрів ключових ензимів, а також нітрозуючи по S-, N-, O-елементам тіольні, фенольні, гідроксильні й аміногрупи білкової частини цих ензимів, а при більш вираженому прояві нітрозуючого стресу необоротно окиснюючи їх [184]. Пригнічення мітохондріального дихання призводить до зниження заряду мітохондрій, що може ініціювати апоптотичний процес, а за відсутності глюкози - і до некрозу [185].

Найбільш схильні до окиснення під дією АФК і активних дериватів NO піримідинові основи в положенні С5-С6, утворюючи тимідингліколь, тимінгліколь, цитозингліколь, які можуть піддаватися гідролітичному дезамінуванню, перетворюючись на похідні метилурацилу [186]. Так, оксидативний стрес в умовах гіпоксії мозку викликає утворення ковалентних зв'язків між ДНК і білками, наприклад, між метильною групою тиміну і киснем тирозину і між сусідніми піримідиновими і пуриновими залишками [187, 188]. Однак найбільше значення при багатьох патологічних станах має окиснювальна модифікація піримідинових основ. Таким чином, неконтрольована продукція АФК біоенергетичними і нейрохімічними системами нейрона і подальший розвиток оксидативного стресу є важливою ланкою ушкоджуючої дії нейронів при нейродеструктивних захворюваннях, у тому числі і при епілептизації [189, 190].

Згідно матеріалів, наведених в цьому розділі, опубліковані такі роботи:

1. Опришко В.І. Побічні ефекти нових протиепілептичних препаратів / Опришко В.І., Шастун Н.П., Іванов А.В // Матеріали науково-практичної конференції “ Безпечність ліків і фактори ризику небажаних ефектів фармакотерапії”, 21-22 жовтня 2010. – Тернопіль. – 2010. – С. 15-16.
2. Опрышко В.И Влияние ноотропов на судорожную готовность мозга / Опрышко В.И., Шастун Н.П.,Иванов А.В // Тезисы доклада «V Національного конгресу геронтологів і геріатрів України”, 21-14 жовтня 2010. – Київ. – 2010. – С. 244.(Внесок дисертанта: пошук літературних даних, участь у проведенні експерименту, аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).
3. Шастун Н.П. Особливості впливу протиепілептичних препаратів на організм / Шастун Н.П., Опришко В.І. // Український медичний альманах. – 2012. – Т. 15, №2. – С. 206-209.
4. Опришко В.І. Нейрофізіологічний аналіз збудливості та внутрішньоцентральних взаємовідносин різних структур мозку при дії топірамату / Опришко В.І., Шастун Н.П., Іванов А.В // Матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології, присвяченої 90-річчю проф. О.О. Столярчука,, 10-11 листопада 2010. – Вінниця. – 2010. – С. 317-318.

Розділ 2

МАТЕРІАЛИ та МЕТОДи ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об’єкт та предмети дослідження

*Об’єкт дослідження* – нейрохімічний профіль фармакодинаміи та токсикодинаміки антиконвульсантів різних груп.

*Предмет дослідження* – молекулярно-біохімічні механізми виникнення побічних ефектів антиконвульсантів з різним механізмом дії.

2.1.1 Характеристика лабораторних тварин, залучених до експериментальних досліджень. Експериментальні дослідження виконані на 864 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 180-220 г, та на 120 білих нелінійних мишах масою 18-25 г.

Тварини знаходилися на стандартному раціоні та в стандартних умовах відповідно до санітарно-гігієнічних норм [191]. Усі досліди проводили відповідно до методик і вимог ДФЦ МОЗ України [192, 193, 194] та до правил "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою" (м. Страсбург, 1986).

2.1.2 Лікарські засоби, які використані в роботі. В експериментальних дослідженнях було використано 5 антиконвульсантів, які мають різний механізм дії та найпоширеніше застосовуються у практиці для лікування епілепсії:

1. Вальпроат натрію 155 мг/кг для мишей та 150 мг/кг для щурів («Вальпроат натрію», таблетки по 300 мг, виробництва «Sanofi Winthrop Industria», Франція)
2. Карбамазепін 125 мг/кг для мишей, та 200 мг/кг для щурів («Карбамазепін-Дарниця», таблетки по 200 мг., виробництва «Дарниця», Україна).
3. Топірамат 304 мг/кг для мишей, 300 мг/кг для щурів («Топіромакс», таблетки по 100 мг, виробництва «[Фарма Старт»](http://tabletki.ua/search/?p=Фарма+Старт%2C+ООО%2C+г.Киев%2C+Украина) Україна)
4. Габапентин 100 мг/кг, для мишей, 150 мг/кг для щурів(«Габагама», капсули по 300 мг, виробництва Вьорваг Фарма ГмбХ , Німеччина)
5. Ламотриджин 30 мг/кг для мишей та 60 мг/кг для щурів («Ламіктал», таблетки по 100 мг, виробництва Глаксо Сміт Кляйн Фармасьютікалз С.А., Польща )

Протиепілептичні засоби вводили одноразово внутрішньоочеревинно з 1 % розчином твіну-80 («Servia») щурам та мишам. Для вивчення протисудомної активності антиконвульсанти вводили таким чином: вальпроат натрію за 15 хв, карбамазепін, ламотриджин - за 30 хв, габапентин - за 60 хв, топірамат - за 120 хвилин до тестування протисудомної активності [195, 196, 197, 198, 199, 200, 201]. Визначення часу тестування базувалося на даних про пік їх протисудомної активності, описаної в літературі [202, 203].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Методи вивчення антиконвульсантної активності на моделях підвищеної судомної готовності мозку. Для виявлення і вивчення фармакологічних препаратів запропоновані різноманітні експериментальні моделі судомних припадків. Хоча експериментальні пароксизмальні напади не можуть повністю відображати етіопатогенез судомних захворювань у людини, однак багато ланок експериментальних і клінічних судом є спільними, що проявляється не тільки в зовнішніх ознаках, але і в біохімічних, мікроскопічних та ультра мікроскопічних змінах, а також у змінах біопотенціалів головного мозку. Крім того, у деяких тварин, переважно ссавців, в природних умовах трапляється захворювання, за своїми морфофункціональними ознаками ідентичне епілепсії.

Моделювання судом для визначення протисудомної активності антиконвульсантів проводили на мишах за допомогою різних хемоконвульсантів відповідно до методичних рекомендацій ГФЦ МОЗ України [204].

Інтенсивність судомного нападу оцінювалась за 5 бальною шкалою [204]. ( 0-відсутність судомної активності; 1-судомні здригання, стрибки; 2-клонічні судоми тіла; 3-виражені тоніко-клонічні судоми з падінням тварини на бік, присутня чітка фаза тонічної екстензії (опістотонус); 4-загибель тварини;)

Ефект препаратів оцінювали за їх здатністю попереджувати розвиток клонічних судом, тонічних судом, усувати летальність, знижувати загальну кількість балів судомного нападу.

2.2.1.1 Модель пентілентетразолових судом. Досліди проведено на білих статевозрілих нелінійних щурах двох статей масою 170-230 г та мишах, кількістю 40, обох статей масою 18-25 г, котрі утримувались в стандартних умовах віварію. Гострий приступ клоніко-тонічних судом створювали шляхом одноразової внутрішньоочеревинної ін’єкції коразола в дозі 40 мг/кг щурам та 100 мг/кг мишам (доза залежить від чутливості експериментальних тварин) [204, 205]. Попередньо вводили досліджувані препарати, час ін’єкції котрих залежав від їх фармакокінетичних властивостей. Про активність препарату судили по статистично достовірним змінам між показниками стану контрольних (введення фізіологічного розчину) і піддосдідних (введення досліджуваних препаратів) груп тварин [191].

2.2.1.2 Модель бікукулінових судом. Бікукулін є конкурентним блокатором місця зв’язування ГАМК, який викликає гострий напад клоніко-тонічних судом за рахунок блокади проведення іонів хлору всередину клітини та формування стійкої деполяризації клітини.

Бікукулін вводили в дозі 20 мг/кг внутрішньоочеревинно. Після введення хемоконвульсанту у тварин в 57-100 % виникали судоми з летальним результатом.

2.2.1.3 Судоми викликані введенням каїнової кислоти. Каїнова кислота є агоністом каінатних рецепторів глутамату. Цей конвульсант вводили у дозі 30 мг/кг в/о. У 100% тварин спостерігалися клонічні судоми, однак тонічні не розвивалися. Спостереження за тваринами проводилось протягом 60 хв. Тварини гинули від тривалих клонічних судом (до 30 хв.).

2.2.1.4 Ареколінові судоми. Ареколін є селективним М-холіноміметиком. Після його введення мишам в дозі 17,5 мг/кг в/о, протягом 60 сек. з’являвся виражений тремор, гіперсалівація, які тривали 15-20 хв.

Оцінювалась здатність досліджуваних антиконвульсантів попереджувати вказані симптоми. За тваринами спостерігали протягом 45 хв.

2.2.1.5 Нікотинові судоми. Нікотин – селективний Н-холіноміметик. Цей конвульсант вводили тваринам внутрішньоочеревинно в дозі 0,75 мг/кг. Конвульсантна дія нікотину пояснюється зв'язуванням його з Н-холінорецпторами, що викликає їх перезбудження. Вивчалась здатність антиконвульсантів попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину, які виникали через 60 сек. Після його введення у вигляді тремору, клонічних і тонічних судом, рухової гіперактивності. Тривалість спостереження за тваринами становила 90 хв.

2.2.2 Дослідження побічних ефектів протисудомних засобів.

2.2.2.1 Визначення психічної працездатності. Вплив антиконвульсантів на когнітивні процеси вивчали на моделі одноразового навчання - умовного рефлексу пасивного уникнення (УРПУ) без застосування амнезуючого фактору, формування якої здійснювали на основі одноразового негативного підкріплення за методикою Я. Буреша та співавт. в модифікації Ю.С.Бородкіна та Ю.В. Зайцева [206, 207].

Вироблення умовного рефлексу проводилось в експериментальній установці, яка складалася із двох камер: великої освітленої (42 см х 24 см) та малої затемненої (18 см х 24 см), сполучених отвором. Підлога затемненого відсіку була електрифікованою. Для формування УРПУ щура поміщали в середину освітленої камери хвостом до отвору в затемнений відсік. Після короткочасного періоду нерухомості, тварина, досліджуючи освітлену частину установки, знаходила вхід в затемнену камеру і проникала в неї. Через 15 секунд після прояву “норкового” рефлексу на електроди підлоги затемненого відсіку подавали перемінний струм (50 Гц, 2 – 3 сек, 10 мс), величина якого для кожної тварини підбиралася індивідуально; при цьому отвір між камерами залишався відкритим. Внаслідок електробольового подразнення гризун перебігав до освітленої половини експериментальної установки, де знаходився під наглядом протягом 3 хвилин. Якщо, на протязі цього часу тварина не здійснювала спроб повернутися до затемненого відсіку, умовна реакція пасивного уникнення вважалася виробленою. Щурів, які протягом контрольного часу спостережень (3 хвилини) повторно проникали до затемненої камери, виключали з дослідження.

Тварин із сформованою пасивно-оборонною реакцією поміщали в клітку, де вони звичайно утримувалися. Через 3 години контролювали надійність виробленого навику, поміщуючи попередньо навчену тварину в освітлену камеру на 3 хвилини. Якщо протягом цього часу гризун заходив до затемненого відсіку, це розцінювалося як амнезія навику, і тварина виключалася з подальших досліджень.

Здатність до навчання. З метою вивчення препаратів на початкові фази обробки пам’ятного сліду (навчання), щурам вводили внутрішньоочеревинно дослідні антиконвульсанти у відповідних дозах за 60 хвилин до навчання, контрольній групі вводили дистильовану воду. Ефект досліджуваних препаратів оцінювали за їх здатністю збільшувати або зменшувати кількість тварин з УРПУ, яка була вироблена при формуванні пасивно-оборонного навику через годину після введення препарату, а також по різниці латентного часу заходження в темний відсік до та після навчання.

Консолідація пам’ятного сліду. Для оцінки впливу препаратів на консолідацію пам’ятного сліду, щурам дослідних груп після формування пасивно-оборонного навику (методика викладена вище 2.3.1), вводили внутрішньоочеревинно антиконвульсанти у відповідних дозах. Ефект препаратів оцінювали за їх здатностю зменшувати кількість тварин, які втратили УРПУ, при перевірці збереженності виробленого навику через годину після однократного введення антиконвульсантів та по різниці латентного часу заходу в темний відсік.

Відтворення енграм пам’яті. В серії дослідів для оцінки дії антиконвульсантів на процеси відтворення енграм пам’яті, тваринам через 72 години після вироблення УРПУ, одноразово вводили протисудомні препарати за 1 годину до перевірки виробленого навику [207]. Ефект препаратів оцінювали за їх здатностю зменшувати кількість тварин, які втратили УРПУ, при тестуванні збереженості виробленого навику, через годину після однократного введення препаратів.

2.2.2.2 Метод вивчення рухово-дослідницької активності та емоційного реагування в тесті «відкрите поле». Тест «відкрите поле» дозволяє визначити тип дії лікарського засобу на центральну нервову систему, а також з’ясувати характер його впливу на орієнтовно-дослідницьку активність і емоційну сферу експериментальних тварин [208]. Тестування показників рухово-дослідницької активності та емоційного реагування щурів проводили з використанням спеціальної площадки розмірами 100 х 100 см, поділеної на 16 квадратів, в кожному з яких знаходився круглий отвір діаметром 30 мм – «нірка». Реєстрацію результатів тестування показників безумовно-рефлекторної активності щурів, проводили шляхом підрахунку перетнутих квадратів (горизонтальна рухова активність), кількості підйомів на задні лапи (вертикальна рухова активність), кількості заглядань в «нірки» (дослідницька активність), тривалості актів грумінгу та кількості болюсів дефекацій (емоційно-вегетативні реакції) протягом 3 хвилин спостереження [209].

2.2.3 Вивчення фізичної працездатності.

2.2.3.1 Метод визначення м’язового тонусу щурів у тесті «міорелаксація». Даний тест є додатковим при визначенні спектру побічного впливу протисудомних засобів.

Досліджували міорелаксантні властивості антиконвульсантів у тесті «натягнутого дроту» на щурах [191, 210, 211].

Тварин підвішували за передні лапи на металевий натягнутий дріт (дріт натягнуто горизонтально на 2-х штативах). Інтактні тварини тримаються всіма чотирма лапами за дріт протягом декількох десятків секунд. Про активність речовини судили за статистично достовірними змінами між показниками контрольних (введення фізіологічного розчину) і дослідних (введення речовин) груп тварин.

2.2.3.2 Дослідження координації рухів. Порушення координації рухів свідчить перш за все про нейротоксичність досліджуваних препаратів. Координація рухів досліджується за методом обертального стрижня (ротород-тест), за допомогою якого оцінюється неспроможність тварин утримуватись на стрижні діаметром 6 см, що обертається на швидкості 8 обертів за хвилину. Реєструвався час (у сек.), протягом якого тварина може втриматися на стрижні та кількість тварин, які падають зі стрижня протягом 30 с. Спробу повторювали 3 рази.

2.2.3.3Тривалість плавання з вантажем. Фізична працездатність визначалась за допомогою плавального тесту. Скляний циліндр наповнювали водою (температура води +25°С, висота водяного стовпа -18 см) і поміщали туди білих мишей з навантаженням 10 % від маси тіла. Спостереження припинялось у момент занурення тварин у воду на 7 с. Тестування проводили через 60 хв після внутрішньоочеревинного введення дослідних антиконвульсантів.

2.2.4 Дослідження гіпногенної дії препаратів. Потенціювання дії снодійних та пролонгування снодійної дії. Потенціювання досліджуваними речовинами снодійного ефекту оцінювали за властивістю збільшувати тривалість сну, викликаного введенням тіопенталу натрію (40 мг/кг), згідно методичним рекомендаціям [191]. Виникнення медикаментозного сну і його зникнення визначали за наявністю бокового положення у піддослідних тварин.

Тваринам дослідних груп внутрішньоочеревинно вводили антиконвульсанти за 30 хв. до введення тіопенталу натрію, контрольній – воду для ін’єкцій в еквівалентних об’ємах. Рахували час до початку сну і його тривалість в кожній групі тварин. Зміни тривалості гіпнотичної дії виражали у відсотках відносно аналогічних показників контролю.

2.2.5 Біохімічні методи дослідження. В якості моделі хронічного судомного стану використовували модель коразолового кіндлінгу. Коразоловий кіндлінг є адекватною та найбільш використовуваною моделлю клінічного стану хворих епілепсією. Схема кіндлінгу передбачала шестиразове з інтервалом 48 годин внутрішньоочеревинне введення коразолу в дозі 40 мг/кг на 0,9 % розчині натрію хлориду (Шандра A.A. и соавт., 1983). В роботі використовували коразол виробництва «Ніжфарм» (Росія) и Sigma-Aldrich (USA).

Тканини головного мозку гомогенізувались на холоді, в сольовому ізотонічному середовищі (0,15М КСl) при температурі +4 оС, за допомогою скляного гомогенізатора у співвідношенні тканина-сольовий розчин 1:20. У подальшому при температурі +4 оС, методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифузі Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну фракцію в 10-кратному об’ємі середовища, яка містить (в ммолях): сахарози - 250, трис-HCl-буферу – 20, ЭДТА -1 (рН 7,4). Для очистки мітохондріальної фракції від крупних кліткових фрагментів, попередньо проводилось центрифугування. Для очистки мітохондріальної фракції від великих клітинних фрагментів, попередньо проводилось центрифугування протягом 7 хвилин при 1000 g, а потім супернатант повторно центрифугували протягом 20 хвилин при 17000 g.. Осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення, яка містить бичачий сироватковий альбумін (0,5 мг/мл) та знову осаджували протягом 10 хвилин 17000 g. Мітохондрії суспендували в середовищі виділення, суспензія містила 80-100 мг білку/мл. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометрично по реакції з 5,5-дітіо-біс-7-нітробензойною кислотою. Активність ГР визначали за методикою в тесті з окисленим глутатіоном. Відновлений та окиснений глутатіон визначали флюорометрично за реакцією з-фталевим ангідридом. Нітротирозин визначали в цитозольній фракції гомогената головного мозку твердофазним імуносорбентним сендвидж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat.№ HK 501-02) фірми Hycult Biotech та виражали в нм/г тканини.

2.2.6 Гістохімічні методи дослідження. Метод вивчення морфометричних і денситометричних характеристик нейронів кори (4-й шар соматосенсорної зони). Для гістологічних досліджень головний мозок на 24 години фіксували в рідині Карнуа та далі за стандартною схемою заливали в блоки парапластом-Х100, з яких готували серійні фронтальні 14-мікронні гістологічні зрізи в області сенсомоторної кори.

Для визначення інтенсивності експрес індуцібельної (iNOS) і нейрональної (nNOS) NO-синтази гістологічні зрізи мозку виділяли з парапласта і регідрували, тричі по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН=7,4) і протягом 30 хвилин інкубували з 2н соляною кислотою (Т = 37 °С). Потім двічі по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН=7,4), двічі по 5 хвилин відмивали боратним буфером по Холмсу (рН=8,4) і чотири рази по 5 хвилин - фосфатним буфером (рН=7,4), після чого протягом 30 хвилин інкубували з 0,1% розчином трипсину в фосфатному буфері (Т=37 °С). Після інкубації, зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН=7,4), а потім протягом 24 годин інкубували у вологій камері (Т = 4-6 °С) з первинними поліклональними антитілами кроликів IgG (1 : 500) nNOS (R-20 # SC-648) виробництва Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Після інкубації, зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН=7,4). Потім протягом години (t=37 °С) інкубували з вторинними антитілами кози до фрагмента IgG кролика, кон’югованими з флюоресцентним барвником (FITC) фірми Sigma-Aldrich (Кат.№ F 2266). Для визначення експерес iNOS зрізи, також після інкубації, чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН=7,4), а потім протягом 24 годин інкубували у вологій камері (Т=4-6°С) з первинними поліклональними антитілами iNOS (C-20 # SC -654 FITC), коньюгованими з флюоресцентним барвником (FITC) фірми Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Після заключного чотирикратного відмивання фосфатним буфером (рН=7,4) зрізи укладали в суміш гліцерин-фосфатний буфер (9 : 1). При визначенні антиапоптичного білка Bcl-2 зрізи, як УАЗа, вище інкубували з первинними поліклональними антитілами Bcl-2 миші IgG1 (1 : 500) (C-2 # sc7382) виробництва Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН=7,4). Потім протягом години (t=37°С) інкубували з вторинними антитілами кози до фрагмента миші, кон’югованими з флюоресцентним барвником (FITC) фірми Sigma-Aldrich (Кат.№ F 2 266). На флюоресцентному мікроскопі Axioskop (Ziess, Germany) визначали інтенсивність експрес ізоформ NOS по щільності iNOS, nNOS-позитивних клітин, а також bcl-2, по щільності bcl-2-позитивних клітин в зрізах за допомогою відеокамери COHU - 4 922 (USA) і вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS -386 (Kontron Elektronic, Germany).

Морфометричні методи дослідження. Головний мозок експериментальних тварин поміщали на добу в фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парафін. Для вивчення морфології нейронів на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи сенсомоторної кори товщиною 5 мікрон. Зрізи гіпокампу депарафінували і фарбували для визначення нуклеїнових кислот галлоціанін-хромовими квасцями за Ейнарсоном. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop (Ziess, Німеччина), збільшення х40. Зображення нейронів в області зони сенсомоторної кори, які були одержані на мікроскопі, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-+4922 (COCHU Inc., США), вводили в комп’ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення VIDAS, розроблену професором кафедри патофізіології, д. мед. н. А.В. Абрамовим. Аналіз зображень проводили в напівавтоматичному режимі.

Дегенеруючими вважалися нейрони, що мають ознаки каріопікнозу або цитолізу. Програмно визначалась щільність розташування нейронів, які вижили і дегенерували, співвідношення числа інтактних нейронів до загинувших (індекс нейродегенерації) і відношення щільності нейронів, які вижили при використанні препарату, до щільності інтактних нейронів у контрольній групі (індекс поліпшення виживаності). Оскільки частина загиблих нейронів до моменту гістологічного дослідження, вже була фагоцитована клітинами мікроглії, окремо оцінювався індекс відносної активності мікроглії, рівний частці від розподілу різниці в щільності нейронів, які вижили на різницю, в щільності дегенеруючих нейронів (різниця між групою контролю та фармакологічного препарату). Величина індексу нейродегенерації менш одиниці свідчила про переважання числа загинувших нейронів над вижившими, індекс поліпшення виживаності й активності мікроглії більш одиниці, свідчив про позитивну дію, фармакологічного препарату, менш одиниці - про негативне. Про функціональний стан нейронів, які вижили, судили на підставі зміни площі ядер і ядерець нейронів, вмісту в них нуклеїнових кислот, ядерно-цитоплазматичного співвідношення та кількості багатоядерцевих клітин.

Біостатистичні методи. Для обробки результатів дослідження застосовувалися методи статистичного аналізу з використанням пакетів програм Excel-2010 та STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний № AGAR909E415822FA) [212, 213].

Перевірка нормальності розподілу кількісних показників виконувалась за допомогою критеріїв Шапіро-Уілка, Колмогорова-Смірнова з виправленням Ліллєфорса. Враховуючи невеликий обсяг вибіркових сукупностей перевага віддавалася критерію Шапіро-Уілка. Для перевірки тотожності дисперсій використовувався коефіцієнт Левіна.

Основні статистичні характеристики включали: кількість спостережень (n), середню арифметичну (M), стандартне відхилення (SD), похибку середньої величини (m), 95% довірчий інтервал (95% ДІ), коефіцієнт варіації (СV, %), відносні величини (Р), середню похибку відносної величини (m), медіану (Ме), інтерквартильний розмах (25 %; 75 %), рівень статистичної значущості (р). Ці величини представлені у тексті, в таблицях та на рисунках.

У разі нормального розподілу (який було визначено у переважаючі більшості випадків) кількісні дані описувались за допомогою середнього значення та помилки середнього (M±m), за інших умов – медіани (Ме) та інтерквартильного розмаху (першого (25 %) і третього квартилю (75 %)) [212].

Порівняння статистичних характеристик в різних групах проводилось з використанням параметричних і непараметричних критеріїв (з урахуванням закону розподілу): дисперсійний аналіз ANOVA; перевірка рівності дисперсій і середніх – за критеріями Фішера (F), Ст’юдента (t); для кількісних ознак з асиметричним розподілом за критерієм Манна-Уітні (U); вірогідність відмінностей відносних показників – за точним критерієм Фішера та критерієм Хі-квадрат Пірсона (χ2), в тому числі з поправкою Йейтса на безперервність при значеннях показника близьких до 100% або 0. Множинні порівняння проводилися з поправкою Бонферроні. Статистично значущим вважалось значення p≤0,05 (5%) [213].

РОЗДІЛ 3

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ ХЕМОІНДУКОВАНИХ ПАРОКСИЗМІВ

В даному розділі роботи наведені результати власних дослідженнь, які відображають антипароксизмальну активність антиконвульсантів з різним механізмом дії, на тлі хемоіндукованих судом.

3.1 Оцінка протисудомної дії досліджуваних протиепілептичних препаратів на моделі коразолових судом

У цьому підрозділі наведені результати впливу протиепілептичних препаратів на коразолові судоми.

В групі контролю (n=10) уведення коразолу 100 мг/кг в/о, викликало виникнення у мишей гострого нападу клоніко-тонічних судом, інтенсивність яких оцінювали за 5-бальною шкалою (табл. 3.1). При застосуванні коразолу 100 мг/кг середня кількість балів судомного процесу становила 3,6±0,20 (0,7) (M± m (SD)), частота клонічних судом - 100±0 %, тонічних - 90±9,49 %, летальність -70,0±14,49 %.

Ефективність досліджуваної речовини оцінювали за здатністю запобігати клонічним і тонічним судомам, зменшувати кількість балів судомного процесу та впливати на летальність.

Наші дослідження показали, що частота клонічних судом суттєво зменшується з 100 % до 30 % при додаванні до коразолу вальпроату натрію (155 мг/кг) (p=0,001). При такому сполученні взагалі не спостерігається тонічних судом і летальних випадків, а середній бал судомного процесу зменшується на 77,8 % і становить 0,8±±0,22 (0,7) балів (р<0,001).

Карбамазепін, що практично не впливає на клонічні судоми, суттєво (р<0,001) зменшує частоту тонічних судом до 10 % (р<0,001), летальність у 2,3 рази, середній бал судомного процесу на 25 % (p<0,05).

*Таблиця 3.1*

**Вплив досліджуваних препаратів на параметри судом при введенні тваринам коразолу 100 мг/кг і/п (n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідження | Кіль-ть тварин з клонічними  судомами | Кіль-ть тварин з тонічними судомами | Летальність  Р±m | Загальна сума балів судомного стану  М±m |
| Коразол 100 мг/кг (контроль) | 10/10 | 9/10 | 70,0±14,49 | 3,6±0,20 |
| Карбамазепін 125 мг/кг в/о + коразол 100 мг/кг | 9/10 | 1/10\*\* | 30,0±14,49 | 2,7±0,38\* |
| Вальпроат натрію, 155 мг/кг в/о + коразол 100 мг/кг | 3/10\* | 0/10\*\* | 0±0\*\* | 0,8±0,22\*\* |
| Ламотриджин, 30 мг/кг в/о + коразол 100 мг/кг | 10/10 | 0/10\*\* | 100,0±0,0 | 4,0±0,0 |
| Топірамат, 304 мг/кг в/о + коразол 100 мг/кг | 10/10 | 0/10\*\* | 80,0±12,65 | 3,8±0,13 |
| Габапентин, 100 мг/кг в/о + коразол 100 мг/кг | 10/10 | 9/10 | 70,0±14,49 | 3,7±0,16 |

Примітки: \*- p<0,05; \*\* - р<0,001 порівняно з групою контролю

Рис. 3.1. Ефективність протисудомної дії досліджуваних антиконвульсантів на моделі коразолових судом по відношенню до контролю

Примітки: \*- p<0,05; \*\* - р<0,001 порівняно з групою контролю;

порівняння загальної суми балів судомного стану у % відносно 100% контролю

Ламотриджин, топірамат і габапентин викликають збільшення середнього балу судом на 11,1 %, 5,6 % і 2,8 % відповідно. Вони також не запобігають клонічним судомам і летальності.

Отже, оцінка протисудомної дії досліджуваних таблеток на моделі коразолових судом дозволяє проранжувати їх таким чином за збільшенням ефективності (рис. 3.1): ламотриджин < топірамат < габапентин < карбамазепін <вальпроат натрію.

3.2 Протисудомна дія досліджуваних препаратів на моделі бікукулінових судом

Результати спостережень щодо дослідження судомної активності у мишей на моделі бікукулінових судом (табл. 3.2, рис. 3.2) показали, що під впливом бікукуліну 20 мг/кг в/о (контрольна група, n=8) у всіх тварин групи розвивалися клонічні судоми, у 75 % виникали тонічні судоми, які призводили до летальності (75%). Середня кількість балів судомного процесу 3,5±0,32 (0,9) (M± m (SD)).

*Таблиця 3.2*

**Вплив досліджуваних препаратів на параметри судом на моделі бікукулінових судом (n=8)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідження | Кількість тварин з клонічними судомами | Кількість тварин з тонічними судомами | Летальність  Р±m | Загальна сума балів судомного синдрому  М±m |
| Бікукулін, 20 мг/кг і/п (контроль) | 8/8 | 6/8 | 75,0±15,31 | 3,5±0,32 |
| Карбамазепін 125 мг/кг в/о + бікукулін 20 мг/кг | 4/8\* | 0/8\*\* | 25,0±15,31\* | 1,8±0,53\* |
| Вальпроат натрію, 155 мг/кг в/о+ бікукулін 20 мг/кг | 8/8 | 6/8 | 75,0±15,31 | 3,5±0,32 |
| Ламотриджин, 30 мг/кг в/о + бікукулін 20 мг/кг | 6/8 | 4/8 | 50,0±17,68 | 2,8±0,49 |
| Топірамат, 304 мг/кг в/о + бікукулін 20 мг/кг | 8/8 | 4/8 | 62,5±17,12 | 3,25±0,35 |
| Габапентин, 100 мг/кг в/о +бікукулін 20 мг/кг | 3/8\*\* | 2/8\* | 25,0±15,31\* | 1,9±0,53\* |

Примітка: \*- p<0,05; \*\* - р<0,01 порівняно з групою контролю

На тлі дії антиконвульсантів, спостерігається пригнічення судомного синдрому у всіх препаратів, окрім вальпроату натрію, який не виявив жодної протисудомної активності - усі показники залишилися на тому ж рівні, що і в контрольній групі. Більш ефективним, але недостатньо потужним впливом проявив себе топірамат, який не вплинув на частоту клонічних судом, незначно знизив (р>0,05) частоту тонічних судом (50 %), летальність (62,5 %) та інтенсивність судом (3,25±0,35 балів). Трохи ефективнішим за топірамат, виявився ламотриджин, при використанні якого, знижуються (р>0,05) бали судомного синдрому на 20 %. Найбільшою протисудомною ефективністю характеризується карбамазепін та габапентин. Суттєво знижує (р<0,05) частоту клонічних судом, летальність та інтенсивність судом, відповідно на 70 %, 66,7 % та 47,5 %, габапентин. Карбамазепін не так суттєво знижує частоту тонічних судом, але більш потужний щодо зниження частоти клонічних судом на 52,4 % (р<0,05).

Рис. 3.2. Зменшення судомної активності мозку під впливом досліджуваних препаратів на моделі бікукулінових судом по відношенню до контролю

Примітки: \*- p<0,05; \*\* - р<0,01 порівняно з групою контролю;

порівняння загальної суми балів судомного стану у % відносно 100% контролю

3.3 Вплив досліджуваних препаратів на судоми, викликані введенням каїнової кислоти

Дослідження судом, викликаних введенням каїнової кислоти, не показали суттєвої протисудомної активності досліджуваних препаратів (табл. 3.3). В групі контролю (n=10), у тварин з ізольованим введенням каїнової кислоти, у всіх тварин (100 %) спостерігаються тільки клонічні судоми і летальний результат, бали судомного синдрому найвищі. Взагалі не змінюють ситуацію такі препарати, як топірамат і габапентин.

*Таблиця 3.3*

**Вплив досліджуваних препаратів на судоми викликаних введенням каїнової кислоти (n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідження | Кількість тварин з клонічними судомами | Кількість тварин з тонічними судомами | Леталь-  ність  Р±m | Загальна сума балів судомного синдрому  М±m |
| Каїнова кислота, 30 мг/кг і/п (контроль) | 10/10 | 0/10 | 100,0±0,0 | 4,0±0,0 |
| Карбамазепін 125мг/кг в/о + каїнова кислота, 30 мг/кг | 9/10 | 0/10 | 80,0±12,6 | 3,8±0,13 |
| Вальпроат натрію, 155 мг/кг в/о + каїнова кислота, 30 мг/кг | 10/10 | 0/10 | 90,0±9,5 | 3,9±0,09 |
| Ламотриджин, 30 мг/кг в/о + каїнова кислота, 30 мг/кг | 10/10 | 2/10 | 100,0±0,0 | 4,0±0,0 |
| Топірамат, 304 мг/кг в/о + каїнова кислота, 30 мг/кг | 10/10 | 0/10 | 100,0±0,0 | 4,0±0,0 |
| Габапентин, 100 мг/кг в/о + каїнова кислота, 30 мг/кг | 10/10 | 0/10 | 100,0±0,0 | 4,0±0,0 |

Незначно змінює ситуацію введення ламотриджину: спостерігаються судоми найвищої інтенсивності і усі тварини гинуть. Однак використання тільки цього препарату у двох тварин (20 %) викликає появу тонічних судом. Карбамазепін та вальпроат натрію незначно (р>0,05) знижують (на 5 % та 2,5 % відповідно) інтенсивність судомного синдрому та летальність (на 20 % і 10 % відповідно).

3.4 Оцінка протисудомної дії досліджуваних препаратів на моделі нікотинових судом

Під час досліджень вивчалась здатність протисудомних засобів попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину (табл. 3.4, рис. 3.3). У тварин контрольної групи (n=10) після введення нікотину спостерігалися клонічні судоми, у частини тонічні судоми (40 %) та летальність (40 %). Бальна оцінка судомного синдрому 2,8±0,31 (1,03) (M±m (SD)).

Введення топірамату, порівняно з групою контролю, викликає незначне зниження (р>0,05) інтенсивності судом (на 7,1 % знижується середній бал судомного синдрому) та вдвічі знижує летальність, не впливаючи на інші показники. Ламотриджин знижує вдвічі частоту тонічних судом і летальність, на 14,3% бальність судомного синдрому (р>0,05). Габапентин на 20 % знижує частоту клонічних судом , однак на 25 % підвищує частоту тонічних судом (р>0,05).

Карбамазепін на 10 % знижує частоту клонічних судом, на 25 % частоту тонічних судом і летальність, на 10,7 % - середній бал судомного синдрому (р>0,05). Найліпшою протисудомною дією та здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину відзначився вальпроат натрію, який на 10 % знижує частоту клонічних судом, на 75 % частоту тонічних судом і летальність, на 25 % - середній бал судомного синдрому (p=0,05).

Отже, за здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину препарати можна розмістити таким чином за збільшенням ефективності: топірамат < ламотриджин < габапентин < карбамазепін < вальпроат натрію.

*Таблиця 3.4*

**Вплив досліджуваних препаратів на моделі нікотинових судом (n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідження | Кількість тварин з клонічними судомами | Кількість тварин з тонічними судомами | Леталь-  ність  Р±m | Загальна сума балів судомного синдрому  М±m |
| Нікотин, 0,75 мг/кг і/п (контроль) | 10/10 | 4/10 | 40,0±15,5 | 2,8±0,31 |
| Карбамазепін 125 мг/кг в/о + нікотин, 0,75 мг/кг | 9/10 | 3/10 | 30,0±14,5 | 2,5±0,35 |
| Вальпроат натрію, 155мг/кг в/о+ нікотин, 0,75 мг/кг | 9/10 | 1/10 | 10,0±9,5 | 2,1±0,12\* |
| Ламотриджин, 30 мг/кг в/о + нікотин, 0,75 мг/кг | 10/10 | 2/10 | 20,0±12,6 | 2,4±0,25 |
| Топірамат, 304 в/о + нікотин, 0,75 мг/кг | 10/10 | 4/10 | 20,0±12,6 | 2,6±0,25 |
| Габапентин, 100 в/о + нікотин, 0,75 мг/кг | 8/10 | 5/10 | 30,0±14,5 | 2,5±0,35 |

Примітка: \*- p=0,05 порівняно з групою контролю

Рис. 3.3. Судомна активності мозку під впливом досліджуваних препаратів на моделі нікотинових судом по відношенню до контролю

Примітка: порівняння загальної суми балів судомного стану у % відносно 100% контролю

3.5 Оцінка протисудомної дії досліджуваних препаратів на моделі ареколінових судом

Після введення ареколіну мишам в дозі 17,5 мг/кг у тварин контрольної групи (n=10) виникали гіперсалівація та виражений тремор (100 %), тремор починався через 58,4±7,74 (24,5) сек. (M±m (SD)) і тривав протягом 12-18 хв. (табл. 3.5).

*Таблиця 3.5*

**Вплив досліджуваних антиконвульсантів на ареколінові судоми (n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідження | Частота тремору  Р±m | Частота слиновиділення  Р±m | Латентний період тремору, сек.  М±m | Тривалість тремору, хв.  М±m |
| Ареколін, 7,5 мг/кг (контроль) | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 58,4±7,74 | 14,5±0,81 |
| Карбамазепін 125мг/кг в/о+ ареколін, 7,5 мг/кг | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 85,1±4,9\* | 13,1±0,65 |
| Вальпроат натрію, 155 мг/кг в/о+ ареколін, 7,5 мг/кг | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 64,3±4,53 | 15,1±0,62 |
| Ламотриджин, 30 мг/кг в/о+ ареколін, 7,5 мг/кг | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 43,1±7,98 | 11,7±0,68\* |
| Топірамат, 304 мг/кг в/о+ ареколін, 7,5 мг/кг | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 38,6±4,74\* | 13,0±0,39 |
| Габапентин, 100 мг/кг в/о+ ареколін, 7,5 мг/кг | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 48,2±3,68 | 15,4±0,63 |

Примітка: \*- p<0,05 порівняно з групою контролю

Оцінювали здатність антиконвульсантів попереджувати вказані симптоми. Введення усіх досліджуваних антиконвульсантів не попереджує виникнення гіперсалівації та тремору. У всіх тварин досліджуваної групи, з’явилися ці симптоми. Ефект препаратів відрізняється лише тривалістю тремору і його латентним періодом (рис. 3. 4).

Рис. 3.4. Зміни тремору (у секундах, М±m) на моделі ареколінових судом під впливом досліджуваних препаратів

Примітка: \*- p<0,05 порівняно з групою контролю

Тривалість латентного періоду тремору у секундах збільшується порівняно з контролем при введенні карбамазепіну і вальпроату натрію, відповідно на 45,7 % (p<0,05) та 10,1%. Дія інших антиконвульсантів характеризується зменшенням латентного періоду: габапентин зменшує його на 17,5 %, ламотриджин – на 26,2 %, топірамат – 33,9 % (p<0,05 для останнього).

Тривалість тремору у хвилинах назначно збільшується (р>0,05), порівняно з контролем, від дії вальпроату натрію (на 4,1 %) та габапентину (на 6,2 %). Антиконвульсанти карбамазепін, ламотриджин і топірамат зменшують тривалість тремора. Найбільше серед досліджуваних антиконвульсантів здатен скорочувати тривалість тремору (на 19,3 %, p<0,05) ламотриджин.

В окремій серії дослідів, з метою пошуку ефективного та безпечного антиконвульсанту, проведено скринінг можливої протисудомної дії нової хімічної сполуки - N-(біцикло[2,2,1]гепт-5-ен-ендо-2-їлметил)-3-гідрокси-1,1-діоксотіоланіл-4-сульфоніламід. Дані цих дослідів показали, що ця речовина має досить виражений протисудомний ефект та транквілізуючу дію, що може бути перспективним для подальшого дослідження.

Узагальнюючи результати дослідів у даному розділі, ми бачимо, що антиконвульсанти мають різну протисудомну акивність.

Вальпроат натрію, який за своїми властивостями стимулює ГАМКергічні механізми, при коразолових судомах значно зменшував клонічні судоми та середній бал судомного процесу, а також не викликав тонічних судом та летальних випадків. Однак на моделі бікукулінових судом, він не проявив ніякої протисудомної активності. Він також незначно знижував летальність на тлі каїнової кислоти. Виявив найліпшу протисудомну дію та здатність попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину. Однак не попереджував виникнення гіперсалівації та тремору, при введенні ареколіну, а лише збільшував тривалість латентного періоду тремору порівняно з контролем на 10,1 %.

Карбамазепін, який за своїм механізмом дії посилює ГАМК -ергічні процеси та взаємодію з центральними аденозиновими рецепторами, не впливав на клонічні судоми при введенні коразолу, однак суттєво зменшував частоту тонічних судом та летальність. Він виявив найбільшу протисудомну активність на моделі бікукулінових судом та незначно знижував інтенсивність судомного синдрому і летальність на моделі каїнових судом. За здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину, карбамазепін виявився на другому місці. На моделі ареколінових судом, карбамазепін не попереджував виникнення гіперсалівації , але зменшував тривалість тремору.

Топірамат,механізм дії якого полягає в інгібуванні глутаматних рецепторів та в активації ГАМК рецепторів, не запобігав клонічним судомам і летальності при введенні коразолу та викликав збільшення середнього бала судом. Недостатньо потужним, але більш ефективним, він проявив себе на моделі бікукулінових судом, який незначно знизив частоту тонічних судом, летальність та інтенсивність судом. На моделі каїнових судом, топірамат не виявив протисудомної активності. Введення топірамату на тлі нікотину, викликало незначне зниження інтенсивності судом та вдвічі знижувало летальність, не впливаючи на інші показники. На тлі ареколінових судом топірамат лише зменшував термор.

Габапентин, який подібний до нейротрансміттеру ГАМК , але механізм дії якого відрізняється від інших засобів , які взаємодіють з ГАМК рецепторами при коразоловихсудомах, не запобігав клонічним судомам і летальності, та викликав збільшення середнього балу судом. Храктеризувався найбільшою протисудомною активністю при введенні бікукуліну та не мав антипароксизмальної активності при введенні каїнової кислоти. Габапентин на тлі нікотинових судом, знижував частоту клонічних судом , однак і підвищував частоту тонічних судом. На моделі ареколінових судом, застосування габапентину зменшувало латентного період тремору.

Ламотриджин, як блокатор вивільнення глутамату,не запобігав клонічним судомам і летальностіпри застосуванні коразолу. На моделі бікукуліновмих судом виявився ефективнішим за топірамат, при використанні якого достовірно знижувались бали судомного синдрому на 20%. Він не проявив протисудомної акивності при введенні каїнової кислоти, однак знижував вдвічі частоту тонічних судом, летальність та на 14,3% бальність судомного синдрому на моделі нікотинових судом. Він найбільше серед досліджуваних антиконвульсантів здатен скорочувати тривалість тремору при ареколінових судомах.

Згідно результатів, наведених у цьому розділі, опубліковані такі роботи:

1. Шастун Н.П. Вплив антиконвульсантів на судомну дію коразолу / Шастун Н.П. // Матеріали науково-практичної конференції студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів, 21-22 квітня 2011. – Суми. – 2011. – С. 63.
2. Патент на корисну модель 74602 N-(біцикло[2,2,1]гепт-5-ен-ендо-2-їлметил)-3-гідрокси-1,1-діоксотіалоніл-4-сульфоніламід, який виявляє аналгетичну та транквілізуючу дію/ Зленко О.Т, Мамчур В.Й., Шастун Н.П., Заровна І.С., Дульнєв П.Г., Іванов А.В., 2012. – с.1-4.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ПРОТИСУДОМНИХ ЗАСОБІВ НА ПСИХІЧНУ ТА ФІЗИЧНУ ПРАЦЕЗДАТНІСТЬ ТВАРИН

4.1. Визначення психічної працездатності

4.1.1 Дослідження впливу антиконвульсантів на когнітивні процеси в тесті УРПУ.

4.1.1.1 Здатність до навчання. Вплив антиконвульсантів на когнітивні процеси вивчали на моделі одноразового навчання - умовного рефлексу пасивного уникнення (УРПУ) без застосування амнезуючого фактору.

В 1-й серії експериментів, з метою вивчення дії препаратів на початкові фази обробки пам’ятного сліду (навчання), щурам вводили внутрішньоочеревинно досліджувані препарати у відповідних дозах за 60 хвилин до навчання, контрольній групі вводили дистильовану воду. Ефект досліджуваних препаратів оцінювали за їх здатністю збільшувати або зменшувати кількість тварин з УРПУ, яка була вироблена при формуванні пасивно-оборонного навику, через годину після введення препарату.

Наші дослідження показали, що внутрішньоочеревинне введення карбамазепіну достовірно зменшує латентний період заходу в темний відсік при відтворенні навички у порівнянні з контролем (р=0,002). Це свідчить про негативний вплив карбамазепіну на здатність до навчання тварин. Відсоток навчених тварин при введенні карбамазепіну до вироблення УРПУ становив лише 40 % (табл. 4.1).

Незважаючи на те, що частка навчених тварин до вироблення УРПУ при введенні габапентину склала 70 %, спостерігаються достовірні розбіжності латентного часу заходження в темний відсік при його застосуванні порівняно з контролем (р=0,011).

*Таблиця 4.1*

**Вплив антиконвульсантів на навчання тварин в тесті УРПУ без амнезуючого фактору**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Умови досліду | Кіль-ть тварин | % навчених | Латентний період, сек  Ме (25%; 75%) | | |
| Навчання | Відтворення | р# |
| Контроль | 10 | 90 | 11,0  (7,0; 18,0) | 180,0  (180,0; 180,0) | р=0,005 |
| Ламотриджин  (60 мг/кг, в/о) | 10 | 90 | 7,5  (6,0; 11,0) | 180,0  (180,0; 180,0) | р=0,005 |
| Карбамазепін  (200 мг/кг, в/о) | 10 | 40 | 47,0\*  (29,0; 68,0) | 12,5\*  (10,0; 180,0) | р=0,508 |
| Топірамат  (300 мг/кг, в/о) | 10 | 70 | 16,5  (12,0; 20,0) | 180,0  (16,0; 180,0) | р=0,022 |
| Габапентин  (150 мг/кг, в/о) | 10 | 70 | 19,5\*  (17,0; 34,0) | 180,0  (77,0; 180,0) | р=0,005 |
| Вальпроат натрію  (150 мг/кг, в/о) | 10 | 80 | 11,5  (7,0; 18,0) | 180,0  (180,0; 180,0) | р=0,005 |

Примітки: \*- p<0,05 порівняно з групою контролю;

# - p<0,05 порівняно з латентним періодом навчання

Достовірних відмінностей латентного часу заходження в темний відсік в порівнянні з контролем, при відтворенні в групах тварин, яким вводили ламотриджин, топірамат і вальпроат натрію, виявлено не було. Однак, слід зазначити, що у тварин яким вводили топірамат, ламотриджин, габапентин і вальпроат натрію латентний період заходу в темний відсік при відтворенні УРПУ значно порівняно з цими ж показниками при навчанні (достовірні розбіжності р<0,001), що свідчить про збереження у щурів навички пасивного уникнення. При введенні карбамазепіну достовірних розбіжностей латентного періоду відтворення порівняно з латентним періодом навчання не спостерігалося (р=0,422).

4.1.1.2 Консолідація пам’ятного сліду.Для судження про вплив препаратів на консолідацію пам’ятного сліду, тваринам дослідних груп після формування пасивно-оборонного навику, вводили досліджувані препарати у відповідних дозах. Ефект препаратів оцінювався за їх здатністю зменшувати кількість тварин, що втрачають УРПУ, при перевірці збереження виробленого навику через 1 годину після одноразового введення антиконвульсантів

При аналізі впливу досліджуваних препаратів на консолідацію пам’ятного сліду, представлених в таблиці 4.2 (рис. 4.1), можна бачити, що латентний період заходу в темний відсік у всіх групах (окрім габапентину; р=0,004) статистично значимо не відрізнявся (р>0,05). Однак слід зазначити, що відсоток навчених тварин при введенні карбамазепіну, залишається як і раніше нижче, ніж при введенні інших антиконвульсантів.

Також доведено достовірно значуще збільшення латентного часу заходження в темний відсік, при відтворенні УРПУ, з показниками, отриманими при навчанні (р<0,001), в групах тварин, які отримували ламотриджин, габапентин, вальпроат натрію, топірамат і карбамазепін.

Латентний період перебування тварини в світлому відсіку камери при тестуванні, є показником, що характеризує ступінь запам’ятовування щуром негативного досвіду - ураження електричним струмом, який вона придбала в темному відсіку камери під час першого її відвідування під час навчання. Спостереження показали, що введення тваринам ламотриджину, габапентину, вальпроату натрію, топірамату і карбамазепіну, після навчання, не вплинуло на пам’ять про негативний досвід, тобто латентний період перебування тварин в світлому відсіку не зменшився.

*Таблиця 4.2*

**Вплив антиконвульсантів на консолідацію пам’ятного сліду тварин в тесті УРПУ без амнезуючого фактору**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Умови досліду | Кіль-ть тварин | % навчених | Латентний період, сек (М±m) | | |
| Навчання | Відтворення | р# |
| Контроль | 10 | 100 | 9,3±2,02 | 170,9±9,1 | р<0,001 |
| Ламотриджин  (60 мг/кг, в/о) | 10 | 90 | 8,1±1,53 | 169,6±10,4 | р<0,001 |
| Карбамазепін  (200 мг/кг,в/о) | 10 | 70 | 7,9±1,13 | 128,7±26,13 | р<0,001 |
| Топірамат  (300 мг/кг, в/о) | 10 | 80 | 12,3±4,03 | 145,8±22,8 | р<0,001 |
| Габапентин  (150 мг/кг,в/о) | 10 | 90 | 22,2±3,5\* | 166,5±13,5 | р<0,001 |
| Вальпроат натрію  (150 мг/кг, в/о) | 10 | 80 | 7,8±1,19 | 163,1±11,5 | р<0,001 |

Примітки: \*- p<0,05 порівняно з групою контролю;

# - p<0,05 порівняно з латентним періодом навчання

4.1.1.3 Відтворення енграм пам’яті. У даній серії дослідів, для оцінки дії антиконвульсантів на процеси відтворення енграм пам’яті, тваринам через 72 години після вироблення УРПУ одноразово вводили протисудомні засоби, за 1 годину до перевірки збереження виробленого навику.



Рис. 4.1. Вплив антиконвульсантів на консолідацію пам’ятного сліду тварин в тесті УРПУ без амнезуючого фактору (М±m та 95 % ДІ)

Примітка: \*- p<0,001 порівняно з латентним періодом навчання

Наступним етапом експериментальних досліджень нами встановлено, що найменший вплив на відтворення енграм пам’яті має ламотриджин, при його введенні відсоток тварин зі збереженим навиком склав 90 % (р>0,05) (табл 4.3; рис. 4.2). Введення карбамазепіну 200 мг/кг істотно зменшувало кількість тварин зі збереженим навиком – 60 % (p=0,025), що вказує на його негативний вплив на відтворення енграм пам’яті.

*Таблиця 4.3*

**Вплив антиконвульсантів на відтворення енграм пам’яті тварин в тесті УРПУ без амнезуючого фактору**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат (мг/кг) | Кіль-ть тварин | Кількість навчених тварин | % тварин зі збереженим навиком | р  порівняно з контролем |
| Контроль | 10 | 10 | 100 | - |
| Карбамазепін (200мг/кг, в/о) | 10 | 6 | 60 | p=0,025 |
| Вальпроат натрію (150 мг/кг, в/о) | 10 | 7 | 70 | p=0,06 |
| Топірамат (300 мг/кг, в/о) | 10 | 7 | 70 | p=0,06 |
| Габапентин (150 мг/кг, в/о) | 10 | 8 | 80 | p=0,136 |
| Ламотриджин (60 мг/кг, в/о) | 10 | 9 | 90 | p=0,305 |

Вальпроат натрію, топірамат і габапентин знизили здатність до навчання тварин на 30% і 20 % (р>0,05) відповідно. Отримані результати свідчать, що найбільший негативний вплив на процеси відтворення енграм пам’яті, має карбамазепін, найменший - ламотриджин.

4.2 Зміни емоційно-рухової активності тварин під впливом антиконвульсантів в тесті «відкрите поле»

Емоційно-рухову активність та орієнтовно-дослідницьку реакцію тварин досліджували в тесті «відкрите поле», який дозволяє виявити тип дії досліджуваних препаратів на ЦНС.

Рис. 4.2. Вплив антиконвульсантів на відтворення енграм пам’яті тварин в тесті УРПУ без амнезуючого фактору (% тварин зі збереженим навиком)

Результати впливу досліджуваних антиконвульсантів на поведінку щурів у відкритому полі наведено у табл. 4.4 та на рис. 4.3.

У результаті проведених досліджень виявлено, що в групі контролю (n=10) поведінка тварин характеризувалася наступними показниками: рухова (горизонтальна) активність за кількістю пройдених квадратів 41,3±1,72 (М±m); вертикальна рухова активність («вертикальні стійки») – 8,7±0,59; кількість отворів («нірок») – 3,9±0,52; кількість умивань (актів грумінгу) – 1,3±0,3; число болюсів – 1±0,21.

Провівши аналіз результатів тестування досліджуваних тварин, слід відзначити депримуючу дію антиконвульсантів на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів. Як видно з табл. 4.4, найбільш виражена різниця у показниках горизонтальної рухової активності піддослідних щурів спостерігалась при введенні карбамазепіну, топірамату та вальпроату натрію (рис. 4.3, рис.4,4)

*Таблиця 4.4*

**Поведінка тварин при введенні антиконвульсантів за умов поміщення у «відкрите поле» у контрольній та в основній (n=10) групах щурів**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат, доза в мг/кг в/о | Показ-ники | Нірки | квадрати | стійки | грумiнг | дефека-  ція |
| Вальпроат натрію, 150 | M±m  % змін# | 1,2±0,29\*\*  -69,23 | 13,5±1,18\*\*  -67,31 | 4±0,36\*\*  -54,02 | 0,7±0,26  -46,15 | 0,6±0,16  -40,0 |
| Карбама-зепін, 200 | M±m  % змін# | 0,9±0,23\*\*  -79,92 | 4,8±0,61\*\*  -88,37 | 0,9±0,23\*\*  -89,65 | 0,5±0,16\*  -61,53 | 0,3±0,15\*  -70 |
| Ламот-риджин, 60 | M±m  % змін# | 0,7±0,21\*\*  -82,05 | 18,4±1,11\*\*  -55,44 | 0,9±0,37\*\*  -72,41 | 0,9±0,17  -30,76 | 0,4±0,16\*\*  -60 |
| Топірамат, 300 | M±m  % змін# | 1,9±0,23\*  -51,28 | 14,2±1,09\*\*  -65,61 | 3,1±0,43\*\*  -64,36 | 0,5±0,16\*  -61,53 | 1,3±0,97  +30 |
| Габапен-тин, 150 | M±m  % змін# | 2±0,21\*  -48,71 | 20,3±0,98\*\*  -50,84 | 2,4±0,30\*\*  -72,41 | 0,6±0,16  -53,84 | 0,3±0,21\*  -70 |
| Контроль | M±m | 3,9±0,52 | 41,3±1,72 | 8,7±0,59 | 1,3±0,3 | 1±0,21 |

Примітки: \* – р<0,05; \*\* – p<0,001 – порівняно з групою контролю;

# - % змін відносно контролю

Як свідчать наведені дані, горизонтальна рухова активність, визначена за кількістю перетнутих тваринами протягом тестування периферичних квадратів, при застосуванні карбамазепіну (200 мг/кг), зменшувалась на 88,4 % (p<0,001) порівняно з контролем, при застосуванні топірамату (300 мг/кг) - на 65,61 % (p<0,001), вальпроату натрію (150 мг/кг) - на 67,31 %.Найменший вплив на горизонтальну рухову активність мали ламотриджин та габапентин.

Рис. 4.3. Зміни поведінкових реакцій щурів при застосуванні вальпроату натрію, карбамазепіну та ламотриджину в тесті «відкрите поле» (у % відносно 100% контролю)

Примітки: \* – р<0,05; \*\* – p<0,001 – порівняно з групою контролю

У той же час, при введенні карбамазепіну, показник вертикальної рухової активності, який оцінювали за кількістю стійок тварин, коли вони опирались при цьому на бокові стінки, а також коли їх передні кінцівки знаходились у повітрі (без упирання на стінку), також мав чітко виражену тенденцію до зменшення і становив 89,7 % (p<0,001) порівняно з контролем. Введення ламотриджину та габапентину також мали досить негативний вплив на вертикальну рухову активність, знижуючи її показник у порівнянні з контролем на 72,41 % (p<0,001). Аналогічна ситуація спостерігалась і при дослідженні топірамату (300 мг/кг), однак показник верикальної рухової активності був менший ніж при використанні карбамазепіну, ламотриджину та габапентину і становив 64,3 % (p<0,001) у порівнянні з контролем. Достовірне зменшення кількості переміщень свідчить про виражене зменшення орієнтовної активності й підвищення емоційної напруги тварин. При введенні вальпроату натрію кількість вертикальних стійок зменшилась на 54,0 % (p<0,05), однак це майже у 2 рази менше ніж при дослідженні карбамазепіну.

Рис. 4.4.Зміни поведінкових реакцій щурів при застосуванні топірамату та габапентину в тесті «відкрите поле» (у % відносно 100% контролю)

Примітки: \* – р<0,05; \*\* – p<0,001 – порівняно з групою контролю

Наші дослідження також показали, що порівняно з групою контролю при введенні тваринам антиконвульсантів, пригнічується нірковий рефлекс: кількість нірок зменшується порівняно з контролем при застосуванні ламотриджину, 60 мг/кг - на 82,1 % (p<0,001), при застосуванні карбамазепіну 200 мг/кг - на 79,9 % (p<0,001), при застосуванні вальпроату натрію 150 мг/кг на 69,2 % (p<0,001), при застосуванні топірамату 300 мг/кг - на 51,3 % (р<0,05), при застосуванні габапентину 150 мг/кг - на 48,7 % (p<0,05).

Досить суттєво порівняно з контролем зменшується кількість умивань (p<0,05) при прийомі карбамазепіну і топірамату на 61,5 % (p<0,05), що свідчить про зниження комфортності стану тварин, підвищення страху, і відповідно, пригнічення їхнього емоційного стану.

Прийом антиконвульсантів призводить також до зниження, порівняно з групою контролю, актів дефекації: на 70 % (р<0,05) при використанні карбамазепіну і габапентину та на 60 % - ламотриджину.

Виражене достовірне зниження кількості болюсів, свідчить про негативний вплив препаратів, більшою мірою карбамазепіну та габапентину, на емоційний стан щурів, підвищення страху і стресу у дослідженні.

Порівнюючи зміни орієнтовно-дослідницької реакції тварин у тесті «відкрите поле» за збільшенням пригнічення емоційно-рухової активності, ми можемо розташувати досліджувані препарати у такий ряд: габапентин < вальпроат натрію < топірамат < ламотриджин < карбамазепін.

4.3 Вплив досліджуваних антиконвульсантів на фізичну працездатність

4.3.1 Вплив антиконвульсантів на координацію рухів тварин у ротород-тесті. Вивчення впливу досліджуваних препаратів на координацію рухів здійснювалося за допомогою ротород-тесту, під час якого оцінювалася спроможність тварин утримуватися на стрижні діаметром 6 см, що обертається зі швидкістю 8 об/хв. Вимірювали час (у сек), протягом якого тварина може втриматися на стрижні.

Результати оцінки координації рухів в групах дослідження при введенні різних препаратів наведено на рис. 4.5, у табл. 4.5.

Рис. 4.5. Латентний період падіння зі стрижня (M±m) при введенні досліджуваних антиконвульсантів (у сек. за даними ротород-тесту)

Примітка: \* – р<0,05 – порівняно з контрольною групою

Наші дослідження показали, що у групі контролю (n=6) латентний період падіння зі стрижня склав 217,5±10,0 сек (M±m). У ході досліджень встановлено, що після введення карбамазепіну (200 мг/кг ) латентний час падіння у ротород-тесті порівняно з групою контролю зменшився на 65,28 % (р<0,05). Менш потужною, але також суттєвою дією на координацію рухів характеризується використання габапентину (150 мг/кг), показник середнього латентного часу при його застосуванні зменшився на 49,1 % (р<0,05).

Ознакою нейротоксичного впливу препарату можна вважати неможливість тварини утримуватись на стрижні. За результатами проведених досліджень не виявлено відхилень у тварин дослідних груп при введенні ламотриджину (60 мг/кг) та топірамату (300 мг/кг), тобто введення цих препаратів за оптимальною схемою не викликає нейротоксичного ефекту, не погіршує координацію рухів.

Спостереження показали, що найбільший нейротоксичний ефект серед досліджуваних препаратів за даними ротород-тесту, проявляють карбамазепін (200 мг/кг) та габапентин (150 мг/кг).

Достовірних відмінностей між контролем і групами введення препаратів ламотриджину (197,2±7,2) і топірамату (180,3±14,2) виявлено не було (p>0,05).

*Таблиця 4.5*

**Зміни координації руху тварин при введенні антиконвульсантів у сек за даними ротород-тесту (n=6 у кожній групі порівняння)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Препарат, доза в мг/кг в/о | Статистичні показники | |
| M±m | 95% ДІ |
| Контроль | 217,5±10,0 | 191,8 – 243,2 |
| Карбамазепін, 200 | 75,5±6,3\* | 59,2 – 91,8 |
| Ламотриджин, 60 | 197,2±7,2 | 178,6 – 215,7 |
| Топірамат, 300 | 180,3±14,2 | 143,9 – 216,8 |
| Габапентин, 150 | 110,8±9,4\* | 86,6 – 135,1 |
| Вальпроат натрію, 150 | 183,2±6,1\* | 167,4 – 199,0 |

Примітка: \* – р<0,05 – порівняно з контрольною групою

4.3.2 Пошук міорелаксуючої дії антиконвульсантів в тесті «натягнутий дріт».Міорелаксуючу дію препаратів визначали за допомогою тесту «натягнутий дріт» у дослідах на щурах. Вплив антиконвульсантів на міорелаксацію щурів в групах контролю (n=10) та дослідження (n=10) наведено у табл. 4.6 та на рис. 4.6.

Інтактні тварини втримуються всіма чотирма лапами на дроті не менше 30 сек. За даними нашого дослідження, в групі контролю тривалість втримування на дроті в середньому складає 34±1,4 сек

Як свідчать наведені дані, при введенні тваринам карбамазепіну (200 мг/кг), тривалість втримування на дроті зменшилась на 43,23 % (р<0,05). Менш потужно, але досить суттєво на час втримання тварин на дроті, впливає вальпроат натрію (150 мг/кг), знижуючи показник на 38,2 % (р<0,05) у порівнянні з контролем.

Застосування топірамату викликало зменшення часу втримування на дроті лише на 17,35 % (р<0,05) у порівнянні з контролем.

*Таблиця 4.6*

**Час втримання тварин на дроті при введенні антиконвульсантів у сек за даними тесту «натягнутий дріт» (n=10 у групах порівняння)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Препарат, доза в мг/кг в/о | Статистичні показники | |
| M±m | 95% ДІ |
| Контроль | 34±1,4 | 30,9 – 42,2 |
| Карбамазепін, 200 | 19,3±1,2\* | 16,8 – 26,0 |
| Ламотриджин, 60 | 29,7±1,2\* | 27,4 – 35,9 |
| Топірамат, 300 | 28,1±2,0\* | 23,8 – 39,4 |
| Габапентин, 150 | 30,3±0,6\* | 29,0 – 33,7 |
| Вальпроат натрію, 150 | 21±0,8\* | 19,2 – 25,9 |

Примітка: \* – р<0,05 – порівняно з контрольною групою

Рис. 4.6. Зміни середніх значень часу (M±m) втримання на дроті тварин при введенні антиконвульсантів (у сек, n=10)

Примітка: \* – р<0,05 – порівняно з контрольною групою

Виявлено також достовірні відмінності між контролем і групами введення препаратів ламотриджину (29,7±1,2) та габапентину (30,3±0,6) (p<0,05).

Отримані результати дозволили встановити, що найбільш потужні міорелаксуючі властивості мають карбамазепін (200 мг/кг) та вальпроат натрію (150 мг/кг).

4.3.3. Вплив протисудомних засобів на тривалість плавання з вантажем. Дослідження впливу препаратів на фізичну працездатність проводили за допомогою плавального тесту. Визначали тривалість плавання білих мишей у воді при додатковому навантаженні – 10 % від маси тіла.

Досліджувані препарати тваринам вводили внутрішньоочеревинно, контрольній групі - фізіологічний розчин. Тестування проводили через 60 хв після введення сполук.

Результати дослідження впливу антиконвульсантів на фізичну працездатність мишей за даними тесту плавання з вантажем в групах контролю (n=10) та дослідження (n=10) наведено у табл. 4.7 та на рис. 4.7.

*Таблиця 4.7*

**Тривалість плавання мишей у сек з вантажем 1/10 маси тіла при введенні антиконвульсантів (n=10 у групах порівняння)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Препарат, доза в мг/кг в/о | Статистичні показники | |
| M±m | 95% ДІ |
| Контроль | 302,5±17,9 | 263,5 – 406,1 |
| Карбамазепін, 125 | 138,5±8,8\* | 119,5 – 189,1 |
| Ламотриджин, 30 | 240,5±22,0\* | 192,6 – 367,6 |
| Топірамат, 304 | 199±15,0\* | 166,3 – 285,8 |
| Габапентин, 100 | 236±13,6\* | 206,5 – 314,4 |
| Вальпроат натрію, 155 | 197,4±20,04\* | 153,8 – 313,1 |

Примітка: \* – р<0,05 – порівняно з контрольною групою

Наступним етапом експериментальних досліджень нами встановлено, що у групі контролю тривалість плавання мишей з вантажем 1/10 маси тіла в середньому складає 302,5±17,9 сек (р<0,05).

Спостереження показали, що в найбільшому ступені пригнічує фізичну працездатність мишей карбамазепін (125 мг/кг) - на 54,2 % зменшується середній час плавання порівняно з контролем і складає 138,5±8,8 сек (р<0,05). Значно також впливають на фізичну працездатність топірамат та вальпроат натрію, зменшуючи фізичну працездатність на 34,2 % та 34,75 % відповідно

Рис. 4.7. Зміни фізичної працездатності мишей при введенні антиконвульсантів у сек (M±m) за даними плавання з вантажем 1/10 маси тіла (n=10 у групах порівняння)

Примітка: \* – р<0,05 – порівняно з контрольною групою

Отримані результати дозволили встановити також, що при введенні ламотриджину (30 мг/кг) середня тривалість плавання зменшується на 20,5 % і складає 240,5±22,0 сек (р<0,05); при введенні топірамату (304 мг/кг) на 34,2 % і складає 199±15,0 сек (р<0,05); при введенні габапентину (100 мг/кг) на 22,0 % і складає 236±13,6 сек (р<0,05); при введенні вальпроату натрію (155 мг/кг) на 34,7 % і складає 197,4±20,04 сек (р<0,05).

Коефіцієнти варіації (СV,%) та відсоток зменшення (-%) середнього часу відносно середніх значень контрольної групи тестів по вивченню фізичної працездатності тварин наведено у табл. 4.8.

*Таблиця 4.8*

**Коефіцієнти варіації (СV,%) та відсоток зменшення (-%) середнього часу відносно контролю тестів по вивченню фізичної працездатності тварин**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат | «ротород» - тест | | тест – «плавання» | | тест «натягнутий дріт» | |
| СV,% | -% | СV,% | -% | СV,% | -% |
| Контроль | 11,2 | - | 18,8 | - | 13,1 | - |
| Карбамазепін | 20,5 | 65,3 | 20,0 | 54,2 | 18,9 | 43,2 |
| Ламотриджин | 9,0 | 9,3 | 28,9 | 20,5 | 11,5 | 12,6 |
| Топірамат | 19,3 | 17,0 | 23,9 | 34,2 | 22,1 | 17,4 |
| Габапентин | 20,9 | 49,0 | 18,2 | 22,0 | 6,2 | 10,9 |
| Вальпроат натрію | 8,2 | 15,8 | 32,1 | 34,7 | 12,7 | 38,2 |

Показано, що більшу варіабельність порівняно з іншими тестами має тест плавання, коливання коефіцієнту варіації від 18,9 % до 28,9 %. За даними інших тестів, результати мають низьку або середню варіабельність.

Відсоток зменшення часу тестів відносно контрольної групи показав, що найбільш потужними по впливу на фізичну працездатність тварин є карбамазепін, потім у порядку убування: вальпроат натрію, топірамат, габапентин, найменш вплив має ламотриджин.

4.4 Гіпногенна дія досліджуваних антиконвульсантів

Досліди проводилися на 60 дорослих білих щурах-самцях масою 180-200 г., які були випадково поділені на 6 груп по 10 тварин у кожній. Усі досліджувані препарати вводили внутрішньоочеревинно за 60 хвилин до в/о введення дози тіопенталу натрію (40 мг/кг), який викликає сон у 20-30 % тварин. Контрольна група отримувала воду для ін’єкцій в еквівалентному об’ємі.

У контрольній та піддослідній групах (n=10) реєстрували кількість тварин, що заснули (рис. 4.8), час настання до початку сну і тривалість сну.

Рис. 4.8. Питома вага тварин, що заснули під впливом тіопенталу натрію 40 мг/кг і досліджуваних препаратів (у %)

Примітка: \*- p<0,05 порівняно з групою контролю

Наші дослідження показали, що під впливом тіопенталу натрію 40 мг/кг у групі контролю 3 з 10-ти піддослідних (30 %) щурів заснули. При введенні антиконвульсантів частка тварин, що засинає, зменшується до 20 % тільки під впливом ламотриджину, під впливом інших антиконвульсантів – збільшується. В цій серії експериментальних досліджень були з’ясовано, що найбільш гіпогенну дію має карбамазепін, який викликає сон у 90 % тварин (p<0,05).

Результати дослідження, щодо гіпогенного впливу антиконвульсантів на тлі дії тіопенталу 40 мг/кг наведено у табл. 4.9.

*Таблиця 4.9*

**Гіпногенна дія досліджуваних антиконвульсантів при введенні тіопенталу натрію 40 мг/кг щурам (n=10)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Препарат,  доза в мг/кг, в/о | Тварини, що заснули  n (%) | Час до початку сну, сек (M±m) | Тривалість сну, хвилини (M±m) |
| Тіопентал натрію 40 (контроль) | 3 (30 %) | 146,0±4,05 | 130±1,96 |
| Вальпроат натрію, 150 | 6 (60 %) | 108±3,54\* | 145,5±2,62\* |
| Карбамазепін, 200 | 9 (90 %)\* | 107,8±2,50\* | 295,9±6,13\* |
| Ламотриджин, 60 | 2 (20 %) | 148,5±2,47 | 137±0,44\* |
| Топірамат, 300 | 5 (50 %) | 163,0±3,51\* | 262,8±9,77\* |
| Габапентин, 150 | 4 (40 %) | 111,8±3,42\* | 146±4,3\* |

Примітка: \* – р<0,01 – порівняно з групою контролю

З даних таблиці видно, що час до початку сну у групі контролю становить 146,0±4,05 (М±m) сек. При введенні вальпроату натрію 150 мг/кг він зменшується на 26,0 % (p<0,01) і складає 108±3,54 сек, при введенні карбамазепіну 200 мг/кг, на 26,1 % (p<0,01) і складає 107,8±2,50 сек, при введенні габапентину 150 мг/кг – на 23,4 % і складає 111,8±3,42 сек (p<0,01). Додавання ламотриджину 60 мг/кг та топірамату 300 мг/кг збільшує час очікування сну порівняно з контролем відповідно на 1,7 % та 11,6 % (p<0,01).

У ході досліджень виявлено, що тривалість сну у групі контролю становить 130±1,96 хвилин (М±m). При введенні антиконвульсантів вона збільшується: при введенні вальпроату натрію на 11,9 % (p<0,01), ламотриджину – на 5,4 %, габапентину – на 12,3 % (p<0,01).

Найсуттєвіше (p<0,001) збільшується тривалість сну при введенні карбамазепіну (200 мг/кг) – в 2,3 рази та топірамату (300 мг/кг) – в 2 рази.

Таким чином, ми бачимо що найбільш гіпногенну дію має карбамазепін, в меншій мірі – вальпроат натрію.

Висновки до розділу 4

Дослідження побічних ефектів використовуваних антиконвульсантів показало, що найбільш негативний вплив на психічну та фізичну працездатність чинив карбамазепін. Введення вказаного препарату призводило до зниження здатності до навчання у тесті УРПУ (40 % навчених тварин), консолідація пам’ятного сліду зберігалася у 70 %, а при відтворенні енграм пам’яті кількість тварин зі збереженими навиками становила 60 %. Пригнічення фізичної працездатності на фоні використання карбамазепіну проявлялося у зменшенні латентного часу падіння у ротород-тесті на 65,28 %, тривалості втримування на дроті – на 43,23 %, а також збільшення тривалості сну у 2,3 рази. Показано також, що карбамазепін має досить потужну депримуючу дію на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів.

Застосування топірамату позитивно впливало на збереження навички пасивного уникнення у щурів, однак знижувало кількість навчених тварин до 70 %, не вплинуло на пам’ять про негативний досвід після навчання (консолідація пам’ятного сліду), а також суттєво не впливав на відтворення енграм пам’яті.

Спостереження показали також негативний вплив топірамату на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів, який знижував горизонтальну рухову активність на 65,61 % (p<0,001) порівняно з контролем. У той же час показник зниження вертикальної рухової активності був менший, ніж при використанні карбамазепіну, ламотриджину та габапентину і складав 64,3 % (p<0,001) порівняно з контролем. Слід відзначити, що введення топірамату досить суттєво зменшувало кількість вмивань, що свідчить про зниження комфортності стану тварин, підвищення страху, й відповідно, пригнічення їхнього емоційного стану. Достовірних даних, щодо впливу топірамату на координацію рухів не було виявлено. Наші дослідження показали, що топірамат не має значної міорелаксуючої дії, але впливає на фізичну працездатність, зменшуючи тривалість плавання мишей з вантажем 1/10 маси тіла на 34,2 % (р<0,05) у порівнянні з контролем. Наші дослідження показали також, що топірамат суттєво збільшує тривалість сну, та посідає друге місце після карбамазепіну щодо гіпногенної дії.

Дослідження побічних ефектів ламотриджину показало, що він має найменший негативний вплив на навчання, консолідацію пам’ятного сліду та на відтворення енграм пам’яті. Введення вказаного препарату показало і найменший вплив на горизонтальну рухову активність, але досить негативно введення ламотриджину вплинуло на вертикальну активність, нірковий рефлекс та грумінг. Спостереження показали, що достовірного впливу на координацію ламотриджин не мав. Отримані результати дозволили встановити й найменший вплив досліджуваного антиконвульсанту на фізичну працездатність та гіпногенну дію.

Наші дослідження показали, що габапентин та вальпроат натрію не мають значного впливу на процеси пам’яті. При дослідженні їх впливу на орієнтовно-дослідницьку діяльність габапентин на рівні з ламотриджином, проявляв найменший негативний вплив на горизонтальну рухову акивність, а вальпроат натрію виявив найменший вплив на вертикальну рухову активність, що свідчить про незначну депримуючу дію. Спостереження також показали, що габапентин має менш потужний, ніж карбамазепін, але дуже суттєвий нейротоксичний ефект, показник середнього латентного часу при його застосуванні зменшувався на 49,1 % (р<0,05) у порівнянні з контролем. Наші дослідження показали в меншій мірі ніж при застосуванні карбамазепіну, але досить негативний вплив вальпроату натрію на фізичну працездатність, він проявляє потужні міорелаксуючі властивості та зменшує тривалість плавання з ваннтажем. Отримані результати дозволили також встановити, що габапентин не має вираженного гіпногенного ефекту.

Згідно результатів, наведених у цьому розділі, опубліковані такі роботи:

1. Опришко В.І. Дослідження впливу антиконвульсантів на емоційно-рухову активність у тесті “відкрите поле” / Шастун Н.П., // Матеріали VII Національного з’їзду фармацевтів України, 10-12 жовтня 2011. – Київ. – 2011. – С. 149-350.
2. Шастун Н.П. Вплив карбамазепіну та вальпроату натрію на поведінкові реакції у щурів / Шастун Н.П. // Запорізький медичний журнал. – 2013. – №5. – С. 64-66.
3. Шастун Н.П. Порівняльна оцінка впливу антиконвульсантів з ГАМК- та глутаматергічною дією на поведінкові реакції та локомоторну функцію у щурів в експерименті / Шастун Н.П., Опришко В.І. // Здобутки клінічної i експериментальної медицини. - 2015. - № 4. - С. 72-75.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ЗМІН МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АНТИКОНВУЛЬСАНТІВ В УМОВАХ КОРАЗОЛОВОГО КІНДЛІНГУ

5.1 Вплив досліджуваних препаратів на показники тіол-дисульфідної системи

Проведеними біохімічними дослідженнями встановлено, що моделювання хронічного судомного синдрому шляхом коразолового кіндлінгу, викликало порушення тіол-дисульфідної рівноваги в тканинах головного мозку піддослідних тварин. Про це свідчить зниження вмісту загальних SH-груп на 32,9 % та рівня відновленої форми глутатіону (GSH) в 2,23 рази відносно показників інтактних тварин. Слід зазначити, що паралельно відмічалося накопичення окисленого глутатіону (GSSG) – його концентрація зросла в 1,7 раз та гальмування ключового ферменту обміну цього метаболіту на 43,4 % порівняно з інтактними тваринами (табл. 5.1).

Проведення фармакотерапії досліджуваними препаратами виявило різні за вираженістю та направленістю ефекти. Найбільш виражений позитивний вплив на відновлення тіол-дисульфідної рівноваги спостерігався у групі тварин, яким вводили ламотриджин. Курсове призначення цього препарату попереджувало падіння рівня відновленої форми глутатіону на 48,1 % та загальної кількості SH-груп на 26,6 % відносно показників контрольної групи. Також ламотриджин викликав реактивування ГР, активність якої становила 13,5±0,68 мкмоль/(мг білка\*хв), тобто була вища на 64,6 % порівняно з контролем.

*Таблиця 5.1*

**Вплив досліджуваних препаратів на показники тіол-дисульфідної системи головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами**

**(М±m, n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Група тварин | SH-групи  мкмоль/г тканини | ГР, мкмоль/(мг білка\*хв) | Глутатіон відновлен.  мкмоль/г тканини | Глутатіон окислен.  мкмоль/г тканини |
| Інтактні | 57,3±2,8 | 14,5±0,82 | 4,73±0,23 | 0,033±0,008 |
| Коразолові судоми, 40 мг/кг (КС) (контроль) | 38,4±1,62 | 8,2±0,64 | 2,12±0,11 | 0,056±0,002 |
| КС+ топірамат, 300 мг/кг, в/о | 43,2±1,71\* | 11,4±0,71\* | 2,88±0,15\* | 0,043±0,001\* |
| КС+ламотриджин, 60 мг/кг, в/о | 48,6±2,18\* | 13,5±0,68\* | 3,14±0,22\* | 0,035±0,005\* |
| КС+ вальпроат натрію, 150 мг/кг, в/о | 40,4±1,38 | 7,4±0,91 | 1,93±0,75 | 0,059±0,003 |
| КС+ габапентин, 150 мг/кг, в/о | 41,2±3,48 | 8,7±0,77 | 2,67±0,23\* | 0,052±0,002 |
| КС+ карбамазепін, 200 мг/кг, в/о | 40,7±4,11 | 7,3±0,64 | 2,00±0,33 | 0,057±0,002 |

Примітка:\* - p<0,05 по відношенню до групи тварин з коразоловими припадками (контролю)

Важливо зазначити, що всі перераховані показники були статистично значимими (p<0,05). Введення топіромату піддослідним тваринам викликали подібні за направленістю, але менш виражені біохімічні ефекти. Так, вказаний препарат сприяв підтримці на достатньо високому рівні активності ГР - 11,4 ± 0,71 мкмоль/(мг білка\*хв), що було вище на 39,0 % (p<0,05) показника контрольної групи (табл. 5.1; рис. 5.1 – 5.4).

Результатом вказаної активності ферменту було підвищення вмісту GSH на 35,8 % (p<0,05), загальних SH-груп – на 12,5 % (p<0,05) та підвищення концентрації окисленої форми глутатіону на 23,2 % (p<0,05) відносно контрольних значень.

Рис. 5.1. Вплив досліджуваних препаратів на SH-групи (мкмоль/г тканини) експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

Рис. 5.2. Вплив досліджуваних препаратів на ГР, мкмоль/(мг білка\*хв) експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

мкмоль/г тканини

Рис. 5.3. Вплив досліджуваних препаратів на рівень відновленої форми глутатіону (мкмоль/г тканини) експериментальних тварин з коразоловими судомами (середні значення)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

мкмоль/г тканини

Рис. 5.4. Вплив досліджуваних препаратів на рівень окисленого глутатіону (мкмоль/г тканини) експериментальних тварин з коразоловими судомами (середні значення)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

Введення габапентину експериментальним тваринам не призводило до статистично значимих відмінностей у досліджуваних показниках, проте можна відзначити позитивний вплив цього препарату на стан системи глутатіону у тканинах головного мозку. Так, використання габапентину призводило до незначного відновлення тіол-дисульфідної рівноваги, про що свідчить підвищення рівня загальних SH-груп на 7,3 %, відновленого глутатіону на 25,9 %, падіння його окисленої форми на 7,1 %, при відміченому реактивуванні ГР на 6,1 %. Інші протисудомні препарати – вальпроат натрію та карбамазепін не чинили позитивного впливу на досліджувані показники. Можна відзначити лише їхній незначний вплив на підвищення рівня загальних SH-груп – на 5,2 % та 5,9 % відповідно. Динаміка інших показників вказує на відсутність у цих препаратів позитивно впливати на метаболізм глутатіону в головному мозку при моделюванні коразолових судомів. Призначення вальпроату натрію та карбамазепіну призводило до більш вираженого зсуву тіол-дисульфідної рівноваги у бік окислених груп, що проявлялося у підвищенні рівня окисленої форми глутатіону та гальмуванні активності ГР. Так, введення вальпроату натрію викликало зростання GSSG на 5,3 % відносно групи контролю та в 1,8 раз порівняно з інтактними тваринами. Відомо, що вальпроат натрію викликає активацію γ-глутамілтрансферази, знижує активність глутатіон-S-трансферази і рівень відновленого глутатіону [214]. Негативні прояви карбамазепіну були більш вираженими відносно гальмування активності ГР – активність цього ферменту знижувалася на майже 11,0 % щодо контрольних показників. Таким чином, призначення вальпроату натрію та карбамазепіну тваринам з коразоловими судомами викликає значне порушення антиоксидантних механізмів захисту та посилення прооксидантних ефектів у нейрональних клітинах.

Особливу увагу у розширенні уявлень про роль порушень тіол-дисульфідної рівноваги при епілептизації нейронів та механізмах їхньої загибелі, слід приділити системі оксиду азоту. Інтермедіати тіол-дисульфідної системи володіють транспортними властивостями у відношенні до NO, тим самим підвищуючи його біодоступність. Крім того, більшість тіолів – глутатіон, цистеїн, метіонін здатні значно обмежувати цитотоксичність оксиду азоту та його дериватів, збільшуючи шанси нейронів вижити в умовах гіпоксії. Нашими дослідженнями вперше встановлено, що коразоловий кіндлінг супроводжується зміщенням тіол-дисульфідної рівноваги за рахунок зниження її відновлених ітермедіатів, значного падіння рівня цитозольного глутатіону і придушення активності глутатіонредуктази. При інгібуванні глутатіонредуктази в умовах судомних нападів відбувається окислювальна модифікація низькомолекулярних тіолів, утворення гомоцистеїну і як наслідок - порушення транспорту NO з утворенням його цитотоксичних дериватів, які ще більше посилюють окиснювання тіолових сполук. Депривація тіольної антиоксидантної системи в нейроні призводить до дискоординації в транспортній системі NO і до зниження резистентності клітини до нітрозативного стресу – найбільш раннього нейродеструктивного механізму в умовах судомних нападів. Найбільш зловісну роль у нейродеструктивній дії нітрозативного стресу відіграє пероксинітрит – продукт взаємодії NO і гідроксил-радикалу на тлі дефіциту відновлених тіолів [215].

5.2 Вплив досліджуваних препаратів на показники системи оксиду азоту та розвиток нітрозативного стресу

Чисельними дослідженнями було показано безпосередню участь NO у деструкції нейрону при призначенні тваринам з порушеннями мозкового кровообігу селективних інгібіторів нейрональної та індуцибельної ізоформ NOS та у дослідах на тваринах з дефіцитом гена, який кодує i NOS [215, 216].

Нашими імуногістохімічними дослідженнями показано, що при моделюванні коразолових судом у сенсомоторній зоні кори головного мозку, збільшується експресія індуцибельної (у 1,7 разів) і, особливо, нейрональної (у 2 рази) NO-синтази (табл. 5.2; рис. 5.5, 5.6) на тлі дефіциту тіольних сполук – сумарних відновлених тіолів, відновленого глутатіону і зниження активності глутатіонредуктази (табл. 5.1).

Такі зрушення в системі NO / відновлені тіоли, призводить до зниження біодоступності NO і його перетворення в пероксинітрит, про що свідчило підвищення в цитозольної фракції гомогенату головного мозку нітротирозину в 2,7 разів. Наші дані не суперечать результатам інших дослідників, якими показано, що при коразолових судомах у щурів спостерігається гіперпродукція синтезу NO в головному мозку і підвищення активності NO-синтази. Підвищення активності NO-синтази при КС в умовах дефіциту L-аргініну та дискоординації тіол-дисульфідної системи призводить до посилення синтезу АФК [216].

*Таблиця 5.2*

**Вплив досліджуваних препаратів на експресію індуцибельної та нейрональної NOS, а також на вміст нітротирозину у головному мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m, n=10)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Група тварин | Щільність nNOS- позитивних клітин | Щільність iNOS- позитивних клітин | Нітротирозин, нмоль/г білку |
| Інтактні | 338,5±21,6 | 187,6±19,1 | 19,2±1,2 |
| Коразолові судоми, 40 мг/кг (КС) (контроль) | 695,5±33,8 | 312,4±20,5 | 51,6±3,1 |
| КС+ ламотриджин, 60 мг/кг, в/о | 389,5±22,3\* | 201,1±18,5\* | 21,2±1,8\* |
| КС+вальпроат натрію, 150 мг/кг, в/о | 451,8±47,2\* | 230,4±18,1\* | 33,7±2,6\* |
| КС+ топірамат, 300 мг/кг, в/о | 531,3±42,3\* | 210,2±11,4\* | 33,3±2,2\* |
| КС+ габапентин, 150 мг/кг, в/о | 651,3±42,3 | 280,2±21,4 | 43,3±3,4 |
| КС+ карбамазепін, 200 мг/кг, в/о | 697,5±57,1 | 300,7±28,2 | 48,7±4,2 |

Примітка:\* - p<0,05 по відношенню до групи тварин з коразоловими припадками (контролю)

Участь NO у пошкодженні і загибелі нейрона має свою специфіку і визначається ізоформами NOS, а також формою епілепсії. Досить повно вивчена експресія конституційної кальційзалежної nNOS, яка обумовлена трансмітерним аутокоїдозом на тлі дефіциту гальмівних еквівалентів ГАМК. Концетрація NO, що синтезується nNOS, не є чинником, який безпосередньо визначає загибель нейрона – її достатньо тільки для активації фосфоліпаз, посилення синтезу гідроксил-радикала, модуляції активності NMDA рецепторів. Наступним етапом є гіперпродукція NO за участю індуцибельної NOS активованої глії, макрофагів і нейтрофілів [217, 218].

Рис. 5.5. Вплив досліджуваних препаратів на експресію індуцибельної та нейрональної NOS експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

нмоль/г

білку

Рис. 5.6. Вплив досліджуваних препаратів на вміст нітротирозину у головному мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (середні значення)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

Профілактичне призначення тваринам паралельно з моделюванням коразолового кіндлінга карбамазепіну, топірамату, ламотриджину, вальпроату натрію і габапентину призводило до різної вираженості зниження експресії нейрональної і індуцібельної NO-синтази, про що свідчило зниження щільності nNOS- і iNOS-позитивних клітин в сенсомоторній зоні кори головного мозку щурів. Аналізуючи отримані результати, можна рандомізувати препарати по впливу на різні ізоформи NOS. Найбільш виражена дія відносно зниження експресії обох досліджуваних ізоформ NOS при КС спостерігається при введенні ламотриджину. Профілактичне введення цього препарату призводило до зниження експресії nNOS на 44,0 %, а кількість iNOS-позитивних клітин зменшувалася на 35,6 % порівняно з показниками контрольної групи (табл. 5.2; рис. 5.5). Введення вальпроату натрію також призводило до рівнозначного зниження експресії цих ізоформ NOS, проте, за силою препарат поступався аналогічній дії ламотриджину. Зниження експресії NOS в цій експериментальній групі становило 35,0 % та 26,2 % відповідно для nNOS та iNOS ізоформ відносно контролю. Введення топірамату призводило до більш вираженої депривації iNOS – щільність iNOS-позитивних клітин знижувалась на 32,7 %, а nNOS-позитивних клітин – на 23,6 %. Габапентин і, особливо, карбамазепін чинили помірну за вираженістю дію на експресію досліджуваних ізоформ NOS. Зниження експресії nNOS і iNOS під дією антиконвульсантів призводить до гальмування реакцій нітрозативного стресу, що проявлялося у зниженні рівня нітротирозину в цитозольній фракції головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами. За ступенем зниження маркера нітрозативного стресу – нітротирозину, досліджувані антиконвульсанти можна розташувати в наступній послідовності: ламотриджин > топірамат > вальпроат натрію> габапентин > карбамазепін. Зниження експресії nNOS і iNOS під дією агоністів ГАМК – вальпроату натрію і, частково, топірамату, можливо, пов’язане з механізм активації ГАМКb-рецептора протисудомними препаратами. Суть цього механізму полягає в наступному: ліганд потрапляє в простір між двома лопатями, розташованими на N-кінці ГАМКR1-субодиниці рецептора, після чого лопаті, що мають шарнірну область, змикаються і молекула агоніста потрапляє в цей простір. Рецептор змінює конформацію і протомер R2 активує через G-білок за допомогою комплексу субодиниць, керовані кальцієві і калієві канали в клітинах ендотелію, що сприяє проходженню цих іонів через клітинну мембрану. Активується аденілатциклаза, що синтезує цАМФ, та викликає ендотеліально-залежну релаксацію гладкої мускулатури, що знаходиться всередині стінок артерій. ГАМКb-рецептор, що складається з двох субодиниць R1 і R2 здатен знижувати експресію і активність нейрональної NO-синтази [219, 220]. Висока активність топірамату і, особливо, ламотриджину, за гальмуванням реакцій нітрозативного стресу в умовах модельних судом, пов’язана не тільки з придушенням експресії nNOS і iNOS, а й з відновленням тіол-дисульфідної рівноваги. Так, профілактичне введення ламотриджину і топірамату забезпечувало збереження відновлених еквівалентів тіол-дисульфідної системи (загальні тіоли, відновлений глутатіон) на тлі підвищення активності глутатіонредуктази в порівнянні з контрольними тваринами. Інтермедіати тіол-дисульфідної системи володіють транспортними властивостями відносно NO, тим самим підвищуючи його біодоступність, крім того, глутатіон, цистенін, метіонін здатні значно обмежувати цитотоксичність NO і його дериватів, збільшуючи шанс нейрона вижити при екстремальних станах. Вальпроат натрію, карбамазепін і габапентин не чинили статистично значущого позитивного впливу як на показники тіол-дисульфідної системи, так і були менш активними відносно обмеження проявів нітрозативного стресу у головному мозку щурів після моделювання коразолових судом.

Таким чином ми бачимо, що подібний факт, свідчить про активацію реакцій нітрозуючого стресу на тлі дефіциту відновлених еквівалентів глутатіону. Співвідношення оксиду азоту та тіол-дисульфідної системи є фактором, що визначає подальшу долю нейрона в умовах ішемічної нейродеструкціі, трансмітерну аутокоідоза і інших екстремальних станах, а саме тип його загибелі (І.Ф.Бєленічев). В умовах ендогенної нейроінтоксикації вже на ранніх термінах розвивається нітрозуючий стрес, приводячи до нітрозування тіолів, змінюючи тіол-дисульфідну рівновагу, що призводить до розвитку нейроапоптозу. Так, у групі контролю індекс співвідношення нітротирозину / відновлений глутатіон збільшився в 6 разів порівняно з групою інтакту (табл 5.3)

*Таблиця 5.3*

**Співвідношення нітротирозину / відновлений глутатіон та індекс нейродеструкції при коразоловому кіндлінгу (М±m, n=10)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Глутатіон відновлений  мкмоль/г тканини | Нітротирозин, нмоль/г білку | Індекс нейродеструкції  нітротирозин/  глутатіон |
| Інтактні | 4,73±0,23 | 19,2±1,2 |  |
| Коразолові судоми, 40 мг/кг (КС) (контроль) | 2,12±0,11 | 51,6±3,1 | 24,33 |
| КС+ топірамат, 300 мг/кг, в/о | 2,88±0,15\* | 33,3±2,2\* | 11,56 |
| КС+ламотриджин, 60 мг/кг, в/о | 3,14±0,22\* | 21,2±1,8\* | 6,75 |
| КС+вальпроат натрію, 150 мг/кг, в/о | 1,93±0,75 | 33,7±2,6\* | 17,46 |
| КС+ габапентин, 150 мг/кг, в/о | 2,67±0,23\* | 43,3±3,4 | 16,21 |
| КС+ карбамазепін, 200 мг/кг, в/о | 2,00±0,33 | 48,7±4,2 | 24,35 |

Примітка:\* - p<0,05 по відношенню до групи тварин з коразоловими судомами (контролю)

Найбільш наочно нейропротективний ефект препарату продемонстрований при розрахунку коефіцієнта нітротирозину / відновлений глутатіон. Ламотриджин і топірамат знижували індекс нейродеструкціі в 4 і 2 рази відповідно, на відміну від інших антиконвульсантів.

5.3 Вплив антиконвульсантів на механізмів апоптозу та морфометричні показники нейронів при моделюванні коразолових судом

Проведеними морфометричними дослідженнями показано, що коразолові судоми супроводжуються зниженням щільності нейронів сенсомоторної зони кори головного мозку, придушенням в них транскрипційних процесів (зниження РНК) і підвищенням щільності клітин з ознаками апоптозу на тлі вираженого дефіциту антиапоптичного білка bcl-2 (табл. 5.4; рис. 5.7 – 5.9). Так, встановлено, що хронічне введення коразолу призводить до зниження щільності нейронів з 1234 до 1087 клітин на мм2 – на 11,9 %.

*Таблиця 5.4*

**Вплив досліджуваних препаратів на характеристику нейронів IV-V шарів кори головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m, n=10)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Група тварин | Щільність нейронів, клітин/мм2 | Площа тіл нейронів, мкм2 | Вміст РНК в нейронах, ЕОП |
| Інтактні | 1232±21 | 70,8±0,52 | 9,62±0,07 |
| Коразолові судоми, 40 мг/кг (КС) (контроль) | 1087±8 | 68,5±0,31 | 8,12±0,08 |
| КС + ламотриджин, 60 мг/кг, в/о | 1192±26\* | 69,8±0,28\* | 8,89±0,10\* |
| КС + вальпроат натрію, 150 мг/кг, в/о | 1176±13\* | 68,1±0,44 | 9,11±0,11\* |
| КС + топірамат, 300 мг/кг, в/о | 1161±9\* | 68,4±0,53 | 8,12±0,03 |
| КС+ габапентин, 150 мг/кг, в/о | 1158±18\* | 71,4±0,81\* | 11,23±0,12 \* |
| КС+ карбамазепін, 200 мг/кг, в/о | 1097±11 | 68,1±0,37 | 8,11±0,11 |

Примітка:\* - p<0,05 по відношенню до групи тварин з коразоловими судомами (контролю)

У результаті впливу досліджуваних антиконвульсантів на складні молекулярно-біохімічні механізми нейродеструкціі, запущені введенням коразолу, спостерігалося зниження загибелі нейронів сенсомоторної кори. Введення профілактичним курсом ламотриджину, топірамату, вальпроату натрію і габапентину призводило до достовірного підвищення щільності нейронів сенсо-моторної кори (табл 5.5).

клітин/

мм2

Рис. 5.7. Вплив досліджуваних препаратів на щільність нейронів (клітин/мм2) IV-V шарів кори головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (середні значення)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

мкм2

Рис. 5.8. Вплив досліджуваних препаратів на площу тіл нейронів (мкм2) IV-V шарів кори головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (середні значення)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

ЕОП

Рис. 5.9. Вплив досліджуваних препаратів на вміст РНК в нейронах (ЕОП) IV-V шарів кори головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (середні значення)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

Лідером у цьому відношенні був ламотриджин, на другому місці – вальпроат натрію, за третє місце конкурували топірамат і габапентин. Карбамазепін чинив незначну дію відносно цього показника.

Досліджувані антиконвультсанти не тільки знижували загибель нейронів, а й зберігали їх функціональну активність, про що свідчило підвищення під їх впливом рівня РНК в нейронах кори. Так, введення коразолу, знижувало РНК в нейронах з 9,62 до 8,12. Вальпроат натрію і габапентин достовірно підвищували рівень РНК в нейронах сенсомоторної кори.

Нами вперше, на основі проведених досліджень, отримані дані про ініціювання апотозу при коразоловому кіндлінгу й антиапоптичну дію антиконвульсантів. Введення профілактичним курсом антиконвульсантів, призводило до зниження щільності апоптичних клітин і підвищення антиапоптичного білка bcl-2. Лідером антиапоптичної дії був ламотриджин, на другому місці – вальпроат натрію, за третє місце конкурували топірамат і габапентин. Варто відзначити, що ламотриджин перевершував вальпроат натрію по зниженню щільності апоптичних клітин, але поступався йому за ступенем підвищення щільності bcl-2-позитивних клітин.

Нейропротективна дія вальпроату натрію стосовно придушення нейроапоптозу, узгоджується з виявленим нами підвищенням експресії антиапоптичного білка bcl-2. Відомо, що вальпроат натрію здатний пригнічувати апоптоз за рахунок пригнічення експресії проапоптотичних молекул (каспаз-3, -8, -9, і Вах). Каспаза-3 є ключовим медіатором апоптозу нейронів і швидко активується при судомних нападах, ішемії, нейродегенеративних захворюваннях, депресії [217, 219, 220]. Нашими дослідженнями встановлено, що коразоловий кіндлінг призводить до підвищення щільності апоптично змінених нейронів сенсомотроної зони кори, яка корелює з депресією bcl-2.

Нейропротективна активність вальпроату натрію при епілепсії, на думку інших дослідників, може включати й інші молекулярні механізми. Вальпроат натрію може модулювати експресію генів-мішеней, регулюючи експресію транскрипційних факторів, використовуючи механізм гіперацелювання [201, 221]. Відомі факти підвищення під дією вальпроату натрію білка CREB, який регулює пам’ять, поведінку, впливає на ріст і виживання нейронів. Деякими дослідженнями показано, що CREB транскрипційним шляхом регулює експресію як Bcl-2, так і мозкового нейротрофічного фактору (BDNF) [174, 187, 222].

Нейропротективна дія топірамату при коразоловому кіндлінгу, може бути пояснена його антиоксидантною активністю.

*Таблиця 5.5*

**Вплив досліджуваних препаратів на показники апоптозу нейронів IV-V шарів кори головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m, n=10)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Групи тварин | Щільність bcl-2- позитивних клітин | Щільність апоптично змінених клітин на 1 мм2 |
| Інтактні | 274,2±32,4 | 74±3 |
| Коразолові судоми, 40 мг/кг (КС) (контроль) | 167,2±9,3 | 127±10 |
| КС + ламотриджин, 60 мг/кг, в/о | 207,2±17,2\* | 87±7\* |
| КС + вальпроат натрію, 150 мг/кг, в/о | 281,3±19,2\* | 80±5\* |
| КС + топірамат, 300 мг/кг, в/о | 188,2±10,8\* | 93±3\* |
| КС+ габапентин, 150 мг/кг, в/о | 186±10,5\* | 95±8\* |
| КС+ карбамазепін, 200 мг/кг, в/о | 168,5±19,4 | 121±11 |

Примітка:\* - p<0,05 по відношенню до групи тварин з коразоловими судомами (контролю)

Рис. 5.10. Вплив досліджуваних препаратів на показники апоптозу нейронів IV-V шарів кори головного мозку експериментальних тварин з коразоловими судомами (М±m)

Примітка:\* - p<0,05 порівняно з групою контролю

Нами виявлено, що антиоксидантна дію топірамату реалізується підвищенням активності глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів і підвищенням рівня відновлених тіолів. Подібний ефект топірамату не тільки обмежує шкідливу дію нітрозативного стресу на нейрони в умовах судомного нападу, але й нормалізує біодоступність NO. Іншими авторами виявлені у топірамата властивості скаведжера активних форм кисню та азоту [211, 215, 223]. Встановлено, що топірамат підвищує у мітохондріях активність комплексу I дихального ланцюга в нейронах кори і СА1 і СА3 зон гіпокампу при судомних станах [223, 224].

Нейропротективна дія габапентину пов’язана зі зниженням активності Na+-або K+-каналів, залучених до реалізації механізмів ексайтотоксичності [225]. Однак, найбільш важливим механізмом нейропротективної активності габапентину при судомних нападах є блокування потоку іонів кальцію в нейрони через α2δ-1 і α2δ-2 субодиниці потенціал-залежних кальцієвих каналів, що гальмує подальший каскад молекулярно-біохімічних механізмів нейродеструкціі - активації нейрональної та індуцибельної ізоформи NO-синтази, активації оксидативного і нітрозативного стресу, підвищення експресії прозапальних цитокінів [211, 226]. Є дані про позитивний вплив габапентину на експресію білка S100B і NSE в різних структурах головного мозку [8, 227]. Відомо і про помірний антиоксидантний ефект габапентину (зниження рівня малонового диальдегіду) при ішемічному і токсичному пошкодженні мозку [21, 33, 228 ].

Ламотриджин у цих дослідженнях проявляє найбільш високу нейропротективну активність, пов’язану з перериванням швидких ініціальних механізмів глутаматної ексайтотоксичності. Подібний механізм встановлений на культурах нейронів мозочка, СА1-зони гіпокампу при інкубації з токсичними дозами глутамату і каїнатом (≥ 100 мкм) [85, 229]. Результатами цих дослідів є дані, що демонструють 67 – 100 % виживаність клітин під дією ламотриджину. Дослідами in vitro встановлено що, сумісне внесення ламотриджину (10 мкм) з вальпроатом натрію призводить до потенціювання нейропротективної дії в умовах глутаматної ексайтотоксичності [93, 96, 230]. Застосування ламотриджину в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровобігу призводить до підвищення рівня ацетилювання гістонів Н3 і Н4, а також зниження р56, зростання вмісту мРНК. Ці зміни були пов’язані з позитивною регуляцією ацетилювання гістонів та активності c-fos промотора [96, 231]. Нами вперше встановлено, що ламотриджин, можливо, за рахунок позитивної регуляції ацетилювання гістонів підвищує активність промотора bcl-2 і вносить додатковий антиапоптичний ефект в нейропротективну дію при коразоловому кіндлінгу.

Висновки до розділу 5

Отже, наші дослідження показали, що найбільш виражену нейропротективну активність серед досліджуваних протисудомних препаратів на моделі коразолового кіндлінгу чинив ламотриджин. Курсове призначення цього препарату попереджувало падіння рівня відновленої форми глутатіону на 48,1%, загальної кількості SH-груп на 26,6% та сприяв реактивуванню глутатіонредуктази на 64,6% у порівнянні з контролем. Введення ламотриджину призводило до статистично значимого зниження експресії nNOS на 44,0%, кількість iNOS-позитивних клітин зменшувалася на 35,6%, а щільність апоптично змінених клітин – на 31,5%, на фоні підвищення числа bcl-2- позитивних клітин на 23,9%.

Згідно результатів, наведених у цьому розділі, опубліковані такі роботи:

1. Шастун Н.П. С[равнительная оценка влияния антиконвульсантов различных групп на когнитивные процессы в норме, морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры и нейроапоптоз в условиях коразолового киндлинга](http://pharmtox-j.org.ua/ru/node/522) / Шастун Н.П., Опрышко В.И., С.В. Павлов, Н.В. Бухтиярова // Фармакология и лекарственная токсикология. – 2015. – №3(44). – С. 40-49
2. Shastun N.Comparison of influence of lamotrigine and other anticonvulsants on nitric oxide and thioldisulfide systems in conditions of metrazole kindling/ Natalia P. Shastun, Valentina I. Opryshko , Nina V. Buchtiarova , Sergii V. Levich //Oxidants and Antioxidants in Medical – 2015. – Vol.4, Suppl. 2. – p. 79-84*.*
3. Шастун Н.П. Молекулярно-биохимические критерии прогноза и оценки безопасности проводимой противосудорожной терапии / Шастун Н.П., // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. - 2015. - Т. 3, № 4. - С. 535-542
4. Shastun N. Molekular and biochemical criteria of the safety evaluation during anticonvulsant therapy / Abstract book of the 10th World Congress on Controversies in Neurology (CONy), 17–20 March 2016. – Lisbon, Portugal. – 2016. – p.72

РОЗДІЛ 6

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ. ШЛЯХИ ІНДИВІДУАЛІЗАЦІЇ ПРОТИСУДОМНОЇ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ ТЕРАПІЇ В УМОВАХ ПІДВИЩЕНОЇ СУДОМНОЇ ГОТОВНОСТІ МОЗКУ

На сьогодні осовним методом лікування епілепсії є фармакотерапія специфічними протиепілептичними засобами. Головною метою протиепілептичного лікування, є підвищення якості життя хворого, що поєднує у собі не лише повний контроль над судомами, але й корекцію пов’язаних з ними психічних та фізичних порушень. Однак досить широкий спектр побічних ефектів, який мають антиконвульсанти, не дозволяють отримати бажаний результат лікування цього захворювання. Тому на сьогодні в епілептології однією серед найбільш атуальних проблем є вибір відповідного препарату з урахуванням його механізму дії, клініко-фармакологічного спектру та характеру побічних ефектів.

Патогенез епілепсії поєднує у собі, як зміни функціонального стану частини нейронів в ділянці епілептогенного пошкодження, сукупність яких складає епілептичне вогнище, так і особливості взаємодії популяції епілептичних нейронів. Основним патофізіологічним механізмом епілепсії є гіперсинхронізація діяльності нейронів, тобто одночасне охоплення збудженням великої кількості епілептичних і сусідніх з ними нейронів. Епілептизація нейронів пов`язана зі зміною трансмембранних іонів Na, K, Ca, Cl, що супроводжується генерацією потенціалів дії, гіперсинхронізація яких призводить до розвитку біоелектричного судомого пароксизму, який клінічно проявляється епілептичним нападом. У свою чергу, зміни трансмембранного іонного току обумовлені конформаційними порушеннями білкових структур, які складають основу клітинних рецепторів. Ці конформаційні порушення відбуваються під впливом збудливих та гальмівних нейромедіаторів.

Вказані синаптичні механізми є фармакологічними мішенями для дії антиконвульсантів. При цьому, протисудомна активність може бути пов’язана як з підвищенням гальмівних, так зі зниженням збудливих синаптичних процесів. У кінцевому підсумку, ефективність антиконвульсантів визначається співпадінням патогенетичної ланки розвитку судомного нападу з механізмом синаптичної дії протисудомного засобу.

З клінічної точки зору, основний принцип лікування епілепсії може бути сформульовано таким чином: максимум терапевтичної ефективності при мінімумі побічних проявів.

У результаті проведених експериментів було встановлено, що при судомах викликаних коразолом, який є неконкурентні антагоністи ГАМКА-рецепторів, введення вальпроату натрію суттєво зменшувало частоту клонічних судом - до 30% (p=0,001), та запобігало виникненню тонічних судом та летальних випадків.

На другому місці за антипароксизмальною ативністю, на тлі коразолових судом, був карбамазепін , який суттєво (р<0,001) зменшив частоту тонічних судом до 10% (р<0,001), летальність у 2,3 рази, та середній бал судомного процесу на 25% (p<0,05).

На відміну від вальпроату натрію та карбамазепіну, ламотриджин, топірамат і габапентин не запобігали клонічним судомам і летальності.

Аналіз протисудомної дії досліджуваних таблеток на моделі коразолових судом дозволяє проранжувати їх таким чином за збільшенням ефективності: ламотриджин < топірамат < габапентин < карбамазепін < вальпроат натрію.

Вальпроат натрію, на тлі дії бікукуліну, як конкурентного антагоніст ГАМК-рецепторів, не виявив жодної протисудомної активності. Згідно з літературними даними, основною гіпотезою механізму дії вальпроату натрію, є стимулювання ГАМК-ергічних механізмів за рахунок інгібування ферменту ГАМК-трансферази, що призводить до збільшення вмісту ГАМК в ЦНС [ 232].

У ході досліджень було виявлено, що найбільшою протисудомною активністю характеризувались карбамазепін та габапентин, вони суттєво знижували (р<0,05) частоту клонічних судом, летальність та інтенсивність судом. Якщо механізм дії карбамазепіну достатньо відомий, і полягає у посиленні ГАМК-ергічних процесів та взаємодії з центральними аденозиновими рецепторами, то механізм дії габапентину до останнього часу є недостатньо вивченим [185]. Однак із літературних джерел відомо, що в організмі габапентин сприяє збільшенню синтезу ГАМК, а також пригніченню вивільнення нейротрансміттерів, які відносяться до моноамінової групи [183].

Отже ці дані, зумовлюють більш потужну антипароксизмальну активність карбамазепіну та габапентину.

Відомо, що механізм дії ламотриджину пов’язаний із впливом на потенціалзалежні натрієві канали пресинаптичної мембрани, що призводить до зменшення виділення в синаптичну щілину медіаторів, у першу чергу глутамату — збуджуючого нейротрансміттеру, який відіграє велику роль у формуванні епілептичних розрядів в головному мозку [212].  Однак згідно з деякими літературними даними, ламотриджин має вплив і на зміст ГАМК нейромедіатору. [212, 213]. Нами виявлено, що на тлі бікукулінових судом, введення ламотриджину, знижувало бали судомного синдрому на 20% (р>0,05). Ці дані свідчать про те, що ГАМК-ергічний компонент механізму дії ламотриджину не має досить суттєвого значення.

Наші дослідження показали, що досліджувані антиконвульсанти не виявили суттєвої протисудомної активності при ввведенні каїнової кислоти, як блокатора рецепторів глутамату.

Нами встановлено, що найліпшою протисудомною дією та здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину відзначився вальпроат натрію, який на 10% знижує частоту клонічних судом, на 75% частоту тонічних судом і летальність, на 25% - середній бал судомного синдрому (p=0,05).

Аналіз антипароксизмальної активності антиконвульсантів на тлі нікотинових судом показав, що препарати можна розташувати в наступному порядку: топірамат < ламотриджин < габапентин < карбамазепін < вальпроат натрію.

Досліди також показали, що усі досліджувані антиконвульсанти не мають потужного впливу на холінергічні ефекти ареколіну. Усі досліджуваних препарати не попереджали появлення гіперсалівації та тремору, лише деякі мали здатність зменшувати тривалість тремору. Найбільше серед досліджуваних антиконвульсантів здатен скорочувати тривалість тремору (на 19,3%, p<0,05) ламотриджин.

Другим етапом дослідження антиконвульсантів було визначення їх впливу на психічну, та фізичну працездатність, нейротоксичність, адже згідно з літературними даними, майже усі антиконвульсанти можуть викликати небажані побічні ефекти, які можуть негативно впливати на якість життя та соціальну адаптацію хворого, іноді в більшій мірі ніж саме захворювання [214]. Характер побічних дій залежить від багатьох причин, у тому числі і від механізму дії антиконвульсантів, що є дуже важливим і на сьогоднішній день найменш вивченим [215]. Відомо, що, препарати, які збільшують ГАМК-ергічне гальмування частіше ніж інші, викликають у хворих порушення поведінкових реакцій, вони можуть призводити до розвитку снодійного та транквілізуючого ефектів, впливати на поведінку, викликати когнітивні розлади [233]. Не менш важливим механізмом дії антиконвульсантів, є пригнічення глутаматергічної нейромедіації. Глутамат є найбільш поширеним і значущим нейромедіатором збуджуючої дії в головному мозку людини [234]. Вважається, що протиепілептичні препарати, механізм дії яких зводиться до блокади глутаматергічних рецепторів, в більшій мірі характеризуються активуючою дією [235].

У ході дослідження впливу антиконвульсантів на навчання в тесті УРПУ без амнезуючого фактору було показано, що внутрішньоочеревинне введення карбамазепіну достовірно зменшувало латентний період заходу в темний відсік при відтворенні навички порівняно з контролем (р=0,002), що свідчить про негативний вплив карбамазепіну на навчання тварин. Відсоток навчених тварин при введенні карбамазепіну до вироблення УРПУ склав лише 40%.

Достовірних відмінностей латентного часу заходження в темний відсік в порівнянні з контролем при відтворенні в групах тварин, яким вводили ламотриджин, топірамат і вальпроат натрію, виявлено не було. Однак, слід зазначити, що у тварин, яким вводили топірамат, ламотриджин, габапентин і вальпроат натрію, латентний період заходу в темний відсік при відтворенні УРПУ значно зростав порівняно з цими ж показниками при навчанні (достовірні розбіжності р<0,001), що свідчить про збереження у щурів навички пасивного уникнення.

Дослідження впливу антиконвульсантів на консолідацію пам’ятного сліду не показало достовірно значимих змін латентного періоду заходу в темний відсік (окрім габапентину; р=0,004), однак відсоток навчених тварин при введенні карбамазепіну виявився найнижним ніж при введенні інших антиконвульсантів. Введенні тваринам ламотриджину, габапентину, вальпроату натрію і топірамату, після навчання, не вплинуло на пам’ять про негативний досвід.

Спостереження показали, що найменший вплив на відтворення еграм пам’яті має ламотриджин, при його введенні відсоток тварин зі збереженим навиком склав 90% (р>0,05). Найбільший негативний вплив мав карбамазепін, який істотно зменшував кількість тварин зі збереженим навиком - 60% (p=0,025).

Згідно отриманих даних, карбамазепін має і найбільшу депримуючу дію на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів. Він зменшував горизонтальну та вертикальну рухову активність, у тесті “відкрите поле” на 88,4% (p<0,001) та 89,7% (p<0,001) у порівнянні з контролем. Топірамат та вальпроат натрію теж виявляли значний депримуючий ефект на орієнтовно-дослідницьку діяльність, зменшуючи горизонтальну рухову активність на 65,61% (p<0,001) та на 67,31% (p<0,001) відповідно. Найменший вплив на горизонтальну рухову активність мали ламотриджин та габапентин. Однак введення ламотриджину та габапентину мали досить негативний вплив на вертикальну рухову активність, знижуючи її показник порівняно з контролем на 72,41% (p<0,001). Ламотриджнин також найсильніше пригнічував нірковий рефлекс, зменшуючи кількість заглядань у нірки на 82,1% (p<0,001) порівняно з контролем. Карбамазепін був на другому місці по негативному впливу на норковий рефлекс. Досить суттєво на пригнічення емоційного стану впливало введення карбамазепіну, топірамату та габапентину.

Досить негативним є вплив препаратів з протисудомною дією на координацію рухів, що у багатьох випадках призводить до відміни препарату.

За даними різних авторів, більш ніж 60% пацієнтів, вказують на наявність субєктивних скарг на побічні ефекти, найчастіше зі сторони ЦНС — головокружіння, втомлюваність, сонливість [143, 145].

Наші спостереження показали, що карбамазепін мав найпотужніший негативний вплив на координацію рухів щурів у ротород-тесті. Після його введення латентний час падіння у ротород-тесті порівняно з групою контролю зменшився на 65,28 % (р<0,05). Також суттєвою негативною дією на координацію рухів характеризується використання габапентину (150 мг/кг), показник середнього латентного часу при його застосуванні зменшився на 49,1 % (р<0,05). Достовірних відмінностей між контролем і групами введення препаратів ламотриджину (197,2±7,2) і топірамату (180,3±14,2) виявлено не було (p>0,05).

Серед фармакологічних ефектів антиконвульсантів, міорелаксуюча дія може стати досить вагомим фактором відміни протисудомного засобу, через вагоме зниження фізичної працездатності. Згідно з літературними даними, найпотужнішими міорелаксантними властивостями серед протисудомних засобів володіють похідні бензодіазепінів (феназепам, клоназепам) [236]. Однак чітких даних щодо міорелаксуючої дії нових антиконвульсантів немає.

Так наприклад, є дані, що габапентин, завдяки прямій дії на ГАМКВ-рецептори, також обумовлює протибольовий та міорелаксуючий ефект препарату [237]. Відомо також, що, препарати, які збільшують ГАМК-ергічне гальмування частіше ніж інші, можуть призводити до розвитку снодійного, мірелаксуючого, транквілізуючого ефектів [183, 238].

Наступним етапом експериментальних досліджень було встановлення міорелаксуючої дії антиконвульсантів у тесті «натягнутий дріт». Показано що при введенні щурам карбамазепіну тривалість втримування на дроті зменшилась на 43,23% (р<0,05). Менш потужно, але досить суттєво на час втримання тварин на дроті впливав вальпроат натрію, знижуючи показник на 38,2 % (р<0,05) порівняно з контролем. Найменший вплив виявили ламотриджин (29,7±1,2) та габапентину (30,3±0,6) (p<0,05).

Спостереження також показали, що у тесті «плавання з вантажем», в найбільшому ступені пригнічує фізичну працездатність мишей карбамазепін (125 мг/кг), який на 54,2 % зменшується середній час плавання порівняно з контролем і складає 138,5±8,8 сек (р<0,05). Значно також впливають на фізичну працездатність топірамат та вальпроат натрію, зменшуючи фізичну працездатність на 34,2 % та 34,75 % відповідно.

Отримані результати дозволили встановити також, що при введенні ламотриджину середня тривалість плавання зменшується на 20,5 % (р<0,05); при введенні топірамату на 34,2 % (р<0,05); при введенні габапентину на 22,0 % (р<0,05); при введенні вальпроату натрію на 34,7 % (р<0,05).

Відсоток зменшення часу тестів відносно контрольної групи показав, що найбільш потужними по впливу на фізичну працездатність тварин (“ротород — тест», міорелаксація, тест «плавання з вантажем») є карбамазепін, потім у порядку убування: вальпроат натрію, топірамат, габапентин, найменш впливовий - ламотриджин.

Як вище зазначалось, антиконвульсанти можуть призводити і до розвитку снодійного ефекту, який теж може значно знизити якість життя хворого. Згідно з літературними даними, на початку лікування та нарощування дози седативний ефект спостерігався при застосуванні фенобарбіталу, примідону, карбамазепіну (11%), етосуксиміду (13%), вальпроату (2%), фенітоїну, ламотриджину [47, 48, 49]. Вігабатрін викликає седативний ефект у 9%, а в поєднанні з вальпроєвої кислотою - у 10% дітей [52]. У цьому відношенні унікальним є топірамат, який поєднує у собі з одного боку, ГАМК – ергічний седативний механізм, а з іншого – антиглутаматергічний ефект активації, що пояснює деякі когнітивні розлади та сонливість на етапі нарощування дози, які нівелюють у більшості хворих на етапі стабілізації дози [121, 123].

Наші дослідження показали, що найсуттєвіше (p<0,001) збільшується тривалість сну при введенні карбамазепіну– в 2,3 рази та топірамату– в 2 рази. Час до початку сну при введенні вальпроату натрію зменшується на 26,0 % (p<0,01), при введенні габапентину – на 23,4 %(p<0,01), при введенні карбамазепіну на 26,1 % (p<0,01)

Додавання ламотриджину (60 мг/кг) та топірамату (300 мг/кг), збільшує час очікування сну порівняно з контролем відповідно на 1,7 % та 11,6 % (p<0,01). Таким чином, ми бачимо що найбільш гіпногенну дію має карбамазепін, найменшу – ламотриджин.

Наступний етап експериментальних досліджень був присвячений дослідженню впливу антиконвульсантів на молекулярно-біохімічні показники в умовах коразолового кіндлінгу, адже відомо, що епілептичні напади, які повторюються, супроводжуються стійкими порушеннями обміну речовин у головному мозку і значними дісгемічними порушеннями [121, 238, 239]. Локальна тканинна гіпоксія при судомах призводить до надмірного викиду глутамату, запуску ряду нейрохімічних реакцій з накопиченням надлишкової кількості вільних радикалів кисню, розвитку «оксидантного стресу», посилення ексайтотоксичних ефектів, перезбудження і пошкодження глутаматних рецепторів [91, 92].Так, при вивченні показників оксидантно-антиоксидантної системи в сироватці крові у хворих з епілептичними тоніко-клонічними судомами, була виявлена стимуляція вільно-радикального окислення з накопиченням продуктів перекисного окислення ліпідів [93]. Утворення активних форм кисню, стимулює синтез прозапальних цитокінів, які включаються в каскад апоптичних процесів при епілепсії.Епілептиформна активність супроводжується різким підвищенням вмісту вільних жирних кислот у корі мозку, а також зміною змісту деяких фосфоліпідів [94]. Як наслідок гідролізу мембранних ліпідів і вивільнення вільних жирних кислот та діацилгліцеролів, змінюються деякі властивості нейронних мембран, наприклад, мікров’язкість, провідність іонних каналів, активність мембранозв’язаних ферментів [94, 95]. У той же час пошкодження мембрани або метаболізму нейрона призводить до зміни його чутливості і підвищенню нейронної збудливості [95].

Нами було встановлено, що моделювання хронічного судомного синдрому шляхом коразолового кіндлінгу, викликало порушення тіол-дисульфідної рівноваги в тканинах головного мозку піддослідних тварин. Про це свідчить зниження вмісту загальних SH-груп на 32,9 % та рівня відновленої форми глутатіону (GSH) в 2,23 рази відносно показників інтактних тварин. Слід зазначити, що паралельно відмічалося накопичення окисленого глутатіону (GSSG) – його концентрація зросла в 1,7 раз та гальмування ключового ферменту обміну цього метаболіту на 43,4% порівняно з інтактними тваринами.

Найбільш виражений позитивний вплив на відновлення тіол-дисульфідної рівноваги спостерігався у групі тварин, яким вводили ламотриджин. Курсове призначення цього препарату попереджувало падіння рівня відновленої форми глутатіону на 48,1 % та загальної кількості SH-груп на 26,6 % відносно показників контрольної групи. Також ламотриджин викликав реактивування ГР, активність якої становила 13,5± 0,68 мкмоль/(мг білка\*хв.), тобто була вища на 64,6 % порівняно з контролем.

Введення топірамату сприяло підтримці на достатньо високому рівні активності ГР - 11,4 ± 0,71 мкмоль/(мг білка\*хв), що було вище на 39,0 % (p<0,05) показника контрольної групи.

Слід відзначити також позитивний вплив габапентину на стан системи глутатіону у тканинах головного мозку. Його використання призводило до незначного відновлення тіол-дисульфідної рівноваги, про що свідчить підвищення рівня загальних SH-груп на 7,3 %, відновленого глутатіону на 25,9 %, падіння його окисленої форми на 7,1 % при відміченому реактивуванні ГР на 6,1 %. Інші протисудомні препарати – вальпроат натрію та карбамазепін не чинили позитивного впливу на досліджувані показники.

Спостереження показали, що призначення вальпроату натрію та карбамазепіну тваринам з коразоловими судомами, викликає значне порушення антиоксидантних механізмів захисту та посилення прооксидантних ефектів у нейрональних клітинах.

Відомо, що особливу роль у порушенні тіол-дисульфідної рівноваги при епілептизації нейронів та механізмах їхньої загибелі відіграє система оксиду азоту [124, 240, 241]. Інтермедіати тіол-дисульфідної системи володіють транспортними властивостями у відношенні до NO, тим самим підвищуючи його біодоступність [242, 243]. Нашими дослідженнями вперше встановлено, що коразоловий кіндлінг супроводжується зміщенням тіол-дисульфідної рівноваги за рахунок зниження її відновлених ітермедіатів, значного падіння рівня цитозольного глутатіону і придушення активності глутатіонредуктази.

При моделюванні хронічного судомного синдрому нами було виявлено формування нітрозуючого стресу, і, як наслідок, накопичення його маркерних продуктів в головному мозку тварин у вигляді збільшення нітротирозину майже на 63% порівняно з інтактною групою тварин. У той же час, як зазначено вище, активність маркерів глутатіонової ланки тіол-дисульфідній системи знижувалася (глутатіон відновлений з 4,73 до 2,12 мкмоль / г тканини у порівнянні з інтактними тваринами). Подібний факт свідчить про активацію реакцій нітрозуючого стресу на тлі дефіциту відновлених еквівалентів глутатіону. Співвідношення оксиду азоту та тіол-дисульфідній системи є фактором, що визначає подальшу долю нейрона в умовах ішемічної нейродеструкціі, трансмітерну аутокоїдозу і інших екстремальних станах, а саме тип його загибелі (І.Ф.Бєленічев). В умовах ендогенної нейроінтоксикації вже на ранніх термінах розвивається нітрозуючий стрес, приводячи до нітрозування тіолів, змінюючи тіол-дисульфідну рівновагу, що призводить до розвитку нейроапоптозу. Так, в групі контролю індекс співвідношення нітротирозину / відновлений глутатіон збільшився в 6 разів у порівнянні з групою інтакту.

Профілактичне введення протягом 11 діб антиконвульсантів у різному ступені вираженості знижували вміст маркеру нітротирозуючого стресу-нітротирозину.

Найбільш значне зниження ніротирозину, спостерігалося при введенні ламотриджину (60 мг \ кг) - на 58,9%. Топірамат і вальпроат натрію практично однаково знижували рівень нітротирозину. Найменший вплив на гальмування реакції нітротирозуючого стресу в умовах коразолового кіндлінгу надавалигабапентин (150 мг \ кг) та карбамазепін (200 мг \ кг) - показник нітротирозину становив 43,3 ± 3,4 нмоль / г і 48,7 ± 4,2 нмоль / г відповідно.

Показано також, що висока активність топірамату і, особливо, ламотриджину по гальмуванню реакцій нітротирозуючого стресу в умовах модельних судом, пов’язана з підвищенням активності тіол-дисульфідної системи. Так, профілактичне введення ламотриджину і топіромату, забезпечувало безпеку відновлених еквівалентів тіол-дисульфідних системи порівняно з нелікованими тваринами. Ламотриджин підвищував відновлений глутатіон до 3,14 мкмоль / г тканини (р <0,05), а топірамат 2,88 мкмоль / г (р <0,05).

Введення вальпроату натрію, карбамазепіну і габапентину не мало достовірного впливу на показники тіол-дисульфідної системи головного мозку щурів на тлі коразолових судом. Найбільш наочно нейропротективний ефект препарату продемонстрований при розрахунку коефіцієнта нітротирозину / відновлений глутатіон. Ламотриджин і топірамат знижували індекс нейродеструкціі в 4 і 2 рази відповідно, на відміну від інших антиконвульсантів.

Нейропротективну дію топірамату при коразоловому кіндлінгу може бути пояснено його антиоксидантним механізмом. Нами виявлено, що антиоксидантна дія топірамату, реалізується підвищенням активності глутатіон-залежних антиоксидантних ферментів і підвищенням рівня відновлених тіолів. Подібний ефект топірамату не тільки обмежує шкідливу дію нітрозуючого стресу на нейрони в умовах судомного нападу, але і нормалізує біодоступність NO.

Тому доцільно поєднувати антиепілептичні препарати з препаратами, що впливають на окислювально-відновні процеси, нормалізуючими метаболізм ЦНС, підвищують енергозабезпечення тканин. З іншого боку, перспективним є пошук серед відомих антиконвульсантів препаратів, що володіють здатністю обмежувати явища окисного стресу і нормалізувати метаболізм нейронів при гіпоксії.

Спостереження також показали, що на тлі впливу досліджуваних антиконвульсантів на складні молекулярно-біохімічні механізми нейродеструкції, запущені введенням коразолу, спостерігається зниження загибелі нейронів сенсомоторної кори. Так, наприклад введення профілактичним курсом ламотриджину, топірамату, вальпроату натрію і габапентину призводило до достовірного підвищення щільності нейронів сенсомоторної кори. Лідером у цьому відношенні був ламотриджин, на другому місці - вальпроат натрію, за третє місце конкурували топірамат і габапентин. Карбамазепін чинив незначну дію відносно цього показника. Досліджувані антиконвультсанти не тільки знижували загибель нейронів, а й зберігали їх функціональну активність, про що свідчило підвищення під їх впливом рівня РНК в нейронах кори.

Нами вперше, на основі проведених досліджень, отримані дані про ініціювання апотозу при коразоловому кіндлінгу і антиапоптичну дію антиконвульсантів. Введення профілактичним курсом антиконвульсантів призводило до зниження щільності апоптичних клітин і підвищенню антиапоптичного білка bcl-2. Лідером антиапоптичної дії був ламотриджин, на другому місці – вальпроат натрію, за третє місце конкурували топірамат і габапентин. Варто відзначити, що ламотриджин перевершував вальпроат натрію по зниженню щільності апоптичних клітин, але поступався йому за ступенем підвищення щільності bcl-2-позитивних клітин.

Нейропротективна дія вальпроату натрію стосовно пригнічення нейроапоптозу, узгоджується з виявленим нами підвищенням експресії антиапоптичного білка bcl-2. Відомо, що вальпроат натрію здатний пригнічувати апоптоз за рахунок пригнічення експресії проапоптотичних молекул (каспаз-3, -8, -9, і Вах). Каспаза-3 є ключовим медіатором апоптозу нейронів і швидко активується при судомних станах, ішемії, нейродегенеративних захворюваннях, депресії [220, 226, 243, 244]. Нашими дослідженнями встановлено, що коразоловий кіндлінг призводить до підвищення щільності апоптично змінених нейронів сенсомотроної зони кори, яка корелює з депресією bcl-2.

Ламотриджин в даних дослідженнях проявляє найбільш високу нейропротективну активність, пов’язану з перериванням швидких ініціальних механізмів глутаматної ексайтотоксичності. Подібний механізм встановлений на культурах нейронів мозочка, СА1-зони гіпокампу при інкубації з токсичними дозами глутамату і каїнатом (≥ 100 мкм) [229]. Результатами цих дослідів є дані, що демонструють 67 - 100 % виживаності клітин під дією ламотриджину. Дослідами in vitro встановлено що, сумісне внесення ламотриджину (10 мкм) з вальпроатом натрію призводить до потенціювання нейропротективної дії в умовах глутаматної ексайтотоксичності [230]. Застосування ламотриджину в умовах експериментального гострого порушення мозкового кровообігу, призводить до підвищення рівня ацетилювання гістонів Н3 і Н4, а також зниження р56, зростання вмісту мРНК. Ці зміни були пов’язані з позитивною регуляцією ацетилювання гістонів та активності c-fos промотора [231]. Нами вперше встановлено, що ламотриджин, можливо, за рахунок позитивної регуляції ацетилювання гістонів, підвищує активність промотеру bcl-2 і вносить додатковий антиапоптичний ефект в нейропротективну дію при коразоловому кіндлінгу.

Висновки

Дисертаційне дослідження вперше вирішує теоретичне та практичне завдання підвищення безпечності лікування епілепсії шляхом встановлення ролі відновленого глутатіону, нітротирозину, їх співвідношення в молекулярно-біохімічних механізмах нейропротекції та нейротоксичності антиконвульсантів різних груп.

1. Антиконвульсанти з переважною ГАМК-ергічною дією мають більш виражену антипароксизмальну активність. Найбільшу протисудомну активність на моделі коразолових судом мали карбамазепін (зменшення частоти тонічних судом до 10%, летальності у 2,3 рази) та вальпроат натрію (зменшення частота клонічних судом до 30%), на моделі бікукулінових судом - габапентин (зниження частоти клонічних судом, летальності та інтенсивності судом відповідно на 70%, 66,7% та 47,5%). Найліпшою протисудомною дією та здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину відзначився вальпроат натрію, який на 10% знижує частоту клонічних судом та на 75% частоту тонічних судом.
2. На підставі досліджень доведено, що антиконвульсанти з глутаматергічною дією мають менш виражені побічні ефекти у відношенні до когнітивних функцій (здатність до навчання, консолідацію пам'ятного сліду, відтворення енграм пам'яті), антиконвульсанти з ГАМК-ергічною дією - більш негативний вплив на процеси пам'яті, здатність до навчання. Найбільш негативний вплив на психічну працездатність чинив карбамазепін. Введення вказаного препарату призводило до зниження здатності до навчання в тесті УРПУ (40% навчених тварин), консолідація пам’ятного сліду зберігалася в 70%, а при відтворенні енграм пам’яті кількість тварин зі збереженими навиками становила 60%.
3. Найбільш негативний вплив на фізичну працездатність та гіпногенну дію мали карбамазепін (зменшення латентного часу падіння в ротород-тесті порівняно з групою контролю на 65,28 % (р<0,05), зменшення тривалості втримування на дроті на 43,23 % (р<0,05), та плавання з вантажем на 54,2 % (р<0,05), викликає сон у 90 % тварин (p<0,05)), та вальпроат натрію (зменшення тривалості втримування на дроті на 38,2 % (р<0,05) , зменшення тривалості плавання з вантажем на 34,7 %, зменшується час до початку сну на 26,0 % (p<0,01)).
4. Епілептиформні судоми супроводжуються значною депривацією тіол-дисульфідної системи (зниження рівня відновленої форми глутатіону в 2,23 разу відносно показників інтактних тварин та зниження активності ГР на 43,44 %), активацією нітрозуючого стресу (підвищення нітротирозину в 2,7 разу), загибеллю нейронів сенсомоторної зони кори та активацією апоптозу, на тлі зниження антиапоптичного білка bcl-2 і пригніченням трансляційної активності нейронів, що призводить до пригнічення когнітивно-мнестичних функцій.
5. Встановлено, що в антиконвульсантів (переважно з домінуючим глутаматергічним механізмом дії), які проявляють додатковий нейропротективний ефект (знижують загибель нейронів сенсомоторної кори, підвищують у них концентрацію РНК, гальмують апоптоз, підвищують експресію bcl-2, нормалізують експресію nNOS та iNOS ), а також позитивно модулюють тіол-дисульфідну систему головного мозку та гальмують нітрозуючий стрес, найменш виражені негативні ефекти по відношенню до когнітивних функцій ЦНС.
6. Встановлена залежність індексу нітротирозин/глутатіон відновлений при дії антиконвульсантів на когнітивні процеси — чим вищий індекс (від 24,35 до 6,75), тим більш негативний вплив мають антиконвульсанти на когнітивні функції та менш виражений нейропротективний ефект.
7. Оцінка нейропротективної дії антиконвульсантів при коразоловому кіндлінгу дозволяє проранжувати їх таким чином за збільшенням ефективності: ламотриджин > вальпроат натрію > топірамат > габапентин > карбамазепін, а негативний вплив на когнітивні процеси ЦНС зменшується в ряду: карбамазепін > вальпроат натрію > габапентин > топірамат > ламотриджин.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для раціонального призначення терапії епілепсії та зменшення побічних ефектів антиконвульсантів необхідно враховувати співвідношення нітротирозину та тіол-дисульфідної системи.
2. Для зниження побічних реакцій збоку когнітивно-мнестичних функцій ГАМК-ергічних антиконвульсантів необхідно додатково призначати лікарські засоби, які регулюють тіол-дисульфідну систему головного мозку (селеназа, глутоксим, гептрал, тіатріазолін).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Swanborough N. Medication for epilepsy / N. Swanborough // Epilepsy society. – 2015. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.epilepsysociety.org.uk/medication-epilepsy
2. Пылаева О. А. Побочные эффекты и осложнения антиэпилептической терапии / О. А. Пылаева, К. В. Воронкова, А. С. Петрухин. // Фарматека. – 2004. – №9. – С. 33—41.
3. Staged an Anticonvulsant screening for chronic epilepsy. / [Y. Berdichevsky, Y. Saponjian, K. Park та ін.]. // Ann Clin Transl Neurol. – 2016. – V. 3. – P. 908–923.
4. Калинин В. В. Изменения личности и мнестико - интеллектуальный дефект у больных эпилепсией / В. В. Калинин. // Журнал неврологии и психиатрии. – 2004. – №2. – С. 64–73.
5. Fisher R. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) / R.S. Fisher. // Epilepsia. – 2014. – V. 55. – P. 475–482.
6. Современные принципы терапии эпилепсии / [К. В. Воронкова, О. А. Пылаева, Е. С. Косякова та ін.]. // «Журнал неврологии и психиатрии». – 2010. – №6.
7. Марценковський І. А. Протиепілептичні препарати та інші засоби лікування епілепсій у дітей з розладами спектра аутизму / І. А. Марценковський. // Укр. вісн. Психоневрол.. – 2014. – №3. – С. 121–126.
8. Vezzani A. The role of inflammation in epileptogenesis / A. Vezzani, A. Friedman, R. Dingledine. // Neuropharmacology. – 2013. – №69. – С. 16–24.
9. Yeh C. Risk of epilepsy after traumatic brain injury: A retrospective population-based cohort study. / C.C. Yeh. // J Neurol Neurosurg Psychiatry. – 2013. – V. 84. – P. 441–445.
10. Knoester P. D. Effectiveness of lamotrigine in clinical practice: results of a retrospective population-based study / P. D. Knoester, A. Keyser, W. O. Renier. // Epilepsy Res. – 2005. – V. 65. – P. 93–100.
11. Curia G. Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: Is prevention of damage antiepileptogenic? / G. Curia. // Current Medicinal Chemistry. – 2014. –V.74 – P. 663–688.
12. Мухин К. Эпилептические энцефалопатии и схожие синдромы у детей. / К. Мухин, А. Петрухин, А. Холин. – Москва: АртСервис Лтд, 2011. – 680 с.
13. Мар’єнко Л.Б. Про сучасний стан класифікації епілептичних нападів та епілепсії / Л.Б. Мар’єнко // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація. – 2013. – № 2. – С. 126-136.
14. Brodie M. J. Drag interactions in epilepsy / M. J. Brodie. // Epilepsia. – 1992. – V. 33. – P. 13–22.
15. Galanopoulou A. Epilepsy therapy development: Technical and methodologic issues in studies with animal models / A.S. Galanopoulou. // Epilepsia. – 2013. – V. 54. – P. 13–23.
16. Pearce P. Spike-wave discharges in adult Sprague Dawley rats and their implications for animal models of temporal lobe epilepsy / P.S. Pearce. // Epilepsy & Behavior. – 2014. – V. 32, № 8. – P. 121–131.
17. Mohanraj R. Pharmacological outcomes in newly diagnosed epilepsy. / R. Mohanraj, M. Brodie. // Epilepsy Behav. – 2005. – V. 6. – P. 382–387.
18. Блинов Д. В. Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболеваний ЦНС. Часть 2: Функции и механизмы повреждения гематоэнцефалического барьера. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. / Д. В. Блинов. – 2014. – №1. – С. 70–84.
19. Пономаренко Т. М. Система цитохрома Р450 в лёгких: роль в патогенезе заболеваний и фармакокинетике лекарственных средств / Т. М. Пономаренко, Д. А. Сычёв, А. О. Чикало. // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2012. – №1. – С. 25–28.
20. A definition and classification of status epilepticus - report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus / [E. Trinka, H. Cock, H. Hesdorffer та ін.]. // Epilepsia. – 2015. – V. 56, №10. – P. 156–192.
21. Benedetti M. Enzyme induction and inhibition by new antiepileptic drugs: a review of human studies / MS. Benedetti. // Fundam Clin Pharmacol. – 2000. – V. 14. – P. 301–311.
22. Jacoby A. Labels and lingo in epilepsy: a response to Dr Hatcher / A. Jacoby. // Seizure. – V. 23. – P. 34–86.
23. Pack A. Adverse effects of antiepileptic drugs on bone structure: epidemiology, mechanisms, and therapeutic implications / A. Pack, M. Morrell. // CNS Drugs. – 2001. – V. 15. – P. 633–642.
24. Wilne A. Modern Treatment of Drug-Resistant Epilepsy / A. Wilne // Neurology Reviews. – 2015. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.neurologyreviews.com/home/article/modern-treatment-of-drug-resistant-epilepsy/59210366894c4275fa43fed6d77c2bc1.html>
25. Астахова А. В. Побочные реакции, вызываемые противосудорожными средствами у детей / А. В. Астахова, Е. А. Ушкалова. // Безопасность лекарств. – 1997. – №2. – С. 5–12.
26. Копаниця М. В. Позасинаптичні рецептори нейротрансмітерів: поширення, механізми активації та фізіологічна роль / М. В. Копаниця. // Нейрофізіологія. – 1997. – №6. – С. 448–458.
27. Noble A. Should we stop saying “epileptic”? A comparison of the effect of the terms “epileptic” and “person with epilepsy” / A. Noble, A. Marson. // Epilepsy Behavior. – 2016. – V. 59. – P. 21–27.
28. Agarwal N. B. Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice / N. B. Agarwal, N. K. Agarwal, P. K. Mediratta. // Seizure. – 2011. – V. 20. – P. 257–262.
29. Schmidt do Prado-Lima P. A. Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats / P. A. Schmidt do Prado-Lima, M. F. Perrenoud, C. H. Kristensen. // J Psychiatry Neurosci. – 2011. – V. 36. – P. 250–255.
30. Nowakowska E. Memory improving and antidepressant effects of topiramate in rats / E. Nowakowska, K. Kus, A. Czubak. // J. Source. – 2009. – V. 59. – P. 487–492.
31. Velez-Ruiz N. Issues for women with epilepsy. / N. Velez-Ruiz, P. Pennell. // Neurologic Clinics. – 2016. – V. 34. – P. 411–425.
32. Arora T. Effect of carbamazepine and lamotrigine on cognitive function and oxidative stress in brain during chemical epileptogenesis in rats / T. Arora, A. K. Mehta, K. K. Sharma. // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2010. – V. 106. – P. 372–377.
33. Reeta K. H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of valproate, phenytoin, phenobarbitone and carbamazepine with curcumin in experimental models of epilepsy in rats / K. H. Reeta, J. Mehla, M. Pahuja. // Pharmacol Biochem Behav. – 2011. – V. 99. – P. 399–407.
34. Koepp M. J. Gender and drug effects on neuroimaging in epilepsy / M. J. Koepp. // Epilepsia. – 2011. – V. 52. – P. 35–37.
35. Vajda F. J. The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs / F. J. Vajda, M. J. Eadie. // Epileptic Disord. – 2014. – V. 16. – P. 395–408.
36. Srivastava A. K. Carbamazepine, but not valproate, displays pharmacoresistance in lamotrigine-resistant amygdala kindled rats / A. K. Srivastava, H. S. White. // Epilepsy Res. – 2013. – V. 104. – P. 26–34.
37. Herzog A. Differential impact of antiepileptic drugs on the effects of contraceptive methods on seizures: Interim findings of the epilepsy birth control registry. / A.G. Herzog. // Seizure. – 2015. – V. 28. – P. 71–75.
38. Berg A.T. The 2010 Revised Classification of Seizures and Epilepsy / A.T. Berg, J.J. Millichap // Continuum (Minneap Minn). – 2013. – V. 19. – P. 571-597.
39. Executive functions and psychiatric symptoms in drug-refractory juvenile myoclonic epilepsy / [J. Walsh, R. Thomas, C. Church та ін.]. // Epilepsy Behavior. – 2014. – V. 35. – P. 72–77.
40. Harbord M. J. Significant anticonvulsant side-effects in children and adolescents. / M. J. Harbord. // J Clin Neurosci. – 2000. – V. 7. – P. 213–216.
41. Salinsky M. C. Effects of topiramate and gabapentin on cognitive abilities in healthy volunteers / M. C. Salinsky, D. Storzbach, D. S. Spencer. // Neurology. – 2005. – V. 64. – P. 792.
42. Smith M. E. Distinct cognitive neurophysiologic profiles for lamotrigine and topiramate / M. E. Smith, A. Gevins, L. K. McEvoy. // Epilepsia. – 2006. – V. 47. – P. 554–695.
43. Loring D. W. Topiramate dose effects on cognition: a randomized double-blind study / D. W. Loring, D. J. Williamson, K. J. Meador. // Neurology. – 2011. – V. 76. – P. 125– 131.
44. Bertorelli R. Effects of four antiepileptic drugs on sleep and waking in the rat under both light and dark phases / R. Bertorelli, N. Ferri, M. Adami. // Pharmacol Biochem Behav. – 1996. – V. 53. – P. 559–565.
45. Сивкова С. Н. Эффективность и переносимость новых антиэпилептических препаратов в лечении фокальных форм эпилепсии у детей / С. Н. Сивкова, Ф. М. Зайкова, К. Ю. Мухин. // Рус. жур. дет. неврологии. – 2011. – №1. – С. 3–11.
46. Gedzelman E. R. Neurological and psychiatric sequelae of developmental exposure to antiepileptic drugs / E. R. Gedzelman, K. J. Meador. // Front Neurol. – 2012. – V. 3. – P. 182.
47. Brodie M. J. . Carbamazepine in the treatment of seizure disorders: efficacy, pharmacokinetics and adverse event profile. / M. J. Brodie, F. N. Johnson. // Rev Contemp Pharmacother. – 1997. – V. 8. – P. 87–122.
48. Hu Y. Comparison of the retention rates between carbamazepine and valproate as an initial monotherapy in Chinese patients with partial seizures: A ten-year follow-up, observational study. / Y. Hu, Y. Huang, Y. Lu. // Seizure-Eur J Epilepsia. – 2011. – V. 20. – P. 208–213.
49. Executive functioning profiles from the BRIEF across pediatric medical disorders: age and diagnosis factors / [L. Krivitzky, K. Walsh, E. Fisher та ін.]. // Child Neuropsychology. – 2015. – V. 22. – P. 1–19.
50. Громов Л.А. Рациональная фармакотерапия / Л.А. Громов / Рациональная фармакотерапия. – 2012. – № 1 (22). – С. 13-15.51.
51. Мелдрум Б. Нейромедиаторы и эпилепсия / Б. Мелдрум // Нейротрансмиттерные системы / Б. Мелдрум., 1982. – (М.: Медицина.). – С. 164–180.
52. Kavanaugh B. Parent-rated emotional and executive functioning in childhood epilepsy / B. Kavanaugh, V. Scarborough, C. Salorio. // Epilepsy Behavior. – 2015. – V. 42. – P. 22–28.
53. Nin M. S. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests / M. S. Nin, N. S. Couto-Pereira, M. F. Souza. // Eur J Pharmacol. – 2012. – V. 5. – P. 95–101.
54. Farber N. B. Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage— gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity / N. B. Farber, X. P. Jiang, C. Htinkel. // Mol. Psychiatry. – 2002. – V. 7. – P. 726— 733.
55. Schmidt D. Drug treatment of epilepsy in adults / D. Schmidt, S. C. Schachter. // BMJ. – 2014. – V. 348. – P. 148–254.
56. Characterization of acute adverse-effect profiles of selected antiepileptic drugs in the grip-strength test in mice / A. Zadroniak, Е. Wojda1, A. WlaŸ1. // Pharmacol Rep. – 2009. – V. 61. – P. 737–742.
57. Xu X. Ecological executive function characteristics and effects of executive function on social adaptive function in school-aged children with epilepsy / X. Xu, L. Wang, N. Zhou. // Chinese Medical Association. – 2015. – V. 96. – P. 517–521.
58. Cognitive effects of lacosamide as adjunctive therapy in refractory epilepsy / [D. IJff, H. Majoie, A. de Louw та ін.]. // Acta Neurologica Scandinavica. – 2015. – V. 131. – P.347–354.
59. Moseley B. The effects of lacosamide on depression and anxiety in patients with epilepsy / B. Moseley, D. Cole, O. Iwuora. // Epilepsy research. – 2015. – V. 110. – P. 115–118.
60. Rakitin A. Metabolic syndrome and anticonvulsants: A comparative study of valproic acid and carbamazepine / A. Rakitin, S. Kõks, S. Haldre. // Seizure. – 2016. – V. 30. – P. 11–16.
61. Bragatti J. A. Topiramate is effective for status epilepticus and seizure control in neuraminidase deficiency. / J. A. Bragatti, C. M. Torres, C. B. Netto. // Arq Neuropsiquiatr. – 2011. – V. 69. – P. 565–566.
62. Stojanova V. Oral topiramate as an add-on treatment for refractory status epilepticus. / V. Stojanova, A. O. Rossetti. // Acta Neurol Scand. – 2012. – V. 125. – P. 7–11.
63. Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. / N. B.Agarwal, N. K. Agarwal, P. K. Mediratta, K. K. Pharma. // Seizure. – 2011. – V. 20. – P. 257–262.
64. Effect of lamotrigine treatment on epileptogenesis and experimental study of rats / J.Nissinen, C. Lange, S. C. Stratton, A. Pikanen. // Epilepsy Res. – 2004. – V. 58. – P. 119–132.
65. Bromley R. L. . The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs / R. L. Bromley, G. E. Mawer, M. Briggs. // J Neurol Neurosurg Psychiatry. – 2013. – V. 84. – P. 637–643.
66. Lamotrigine as first–line drug in childhood absence epilepsy: a clinical and neurophysiological study. / [G. Coppola, F. Licciardi, N. Sciscoi та ін.]. // Brain Dev. – 2004. – V. 26. – P. 9–26.
67. Contraceptive practices of women with epilepsy: findings of the Epilepsy Birth Control Registry / [A. Herzog, H. Mandle, K. Cahill та ін.]. // Epilepsia. – 2016. – V. 57. – P. 630–637.
68. Klein P. Dietary treatment in adults with refractory epilepsy: a review / P. Klein, I. Tyrlikova, G. Mathews. // Neurology. – 2014. – V. 83. – P. 1978–1985.
69. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy / [R. Fisher, C. Acevedo, A. Arzimanoglou та ін.]. // Epilepsia. – 2014. – V. 55. – P. 475–489.
70. Adverse effects of antiepileptic drugs: a brief overview of important issues / [J. A. Cramer, S. Mintzer, J. Wheles та ін.]. // Expert Rev Neurother. – 2010. – V. 10. – P. 885–891.
71. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. / [M. J. Brodie, S. J. Barry, G. A. Bamagous та ін.]. // Neurology. – 2012. – V. 78. – P. 1548–1554.
72. Relationship between adverse effects of antiepileptic drugs, number of coprescribed drugs, and drug load in a large cohort of consecutive patients with drug-refractory epilepsy. / [M. P. Canevini, G. De Sarro, C. A. Galimberti та ін.]. // Epilepsia. – 2010. – V. 51. – P. 797–804.
73. Epilepsy, seizures, physical exercise, and sports: A report from the ILAE Task Force on Sports and Epilepsy. / [G. Capovilla, K. R. Kaufman, E. Perucca та ін.]. // Epilepsia. – 2016. – V. 57. – P. 97–104.
74. Focal epilepsies in adult patients attending two epilepsy centers: classification of drug-resistance, assessment of risk factors, and usefulness of “new” antiepileptic drugs / [I. Gilioli, A. Vignoli, E. Visani та ін.]. // Epilepsia. – 2012. – V. 53. – P. 733–740.
75. Sajobi T. Correlates of disability related to seizures in persons with epilepsy / T. Sajobi, N. Jette, K. Fiest. // Epilepsia. – 2015. – V. 56. – P. 1463–1469.
76. Herzog A. G. Valproate and polycystic ovarian syndrome: Final thoughts / A. G. Herzog, S. C. Sehacher. // Epilepsia. – 2001. – V. 42. – P. 311–315.
77. Khot S. Atherosclerotic risk among epileptic patients taking carbamazepine, phenytoin treatment: Brief review / S. Khot, M. Shaikh, L. Gupta. // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2013. – V. 4. – P. 154–185.
78. Griffith H. Older adults with epilepsy demonstrate cognitive impairments compared with patients with amnestic mild cognitive impairment / H. Griffith, R. Martin, J. Bambara. // Epilepsy Behavior. – 2014. – V. 8. – P. 161–168.
79. Cross J. M. Topiramate, carbamazepine and valproate monotherapy in children with newly diagnosed epilepsy. / J. M. Cross. // Epilepsia. – 2001. – V. 42. – P. 87.
80. The influence of seizure frequency on anterograde and remote memory in mesial temporal lobe epilepsy / [V. Voltzenlogel, J. Vignal, E. Hirsch та ін.]. // Seizure. – 2014. – V. 23. – P. 792–798.
81. Калинин В.В. Депакин: история и перспективы применения в психоневрологической практике / В.В. Калинин // Вісник епілептології. – 2010. – № 1 (31-32). – С. 31-40.
82. Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. / [L. Richter, C. De Graaf, W. Sieghart та ін.]. // Nat Chem Biol. – 2012. – V. 8. – P. 455–464.
83. Adverse antiepileptic drug effects: toward a clinically and neurobiologically relevant taxonomy / P.Perucca, J. Carter, V. Vahle, F. Gilliam. // Neurology. – 2014. – V. 72. – P. 1223–1129.
84. Андрианова Е. Руководство по диагностике и лечению эпилепсий у детей и взрослых. NICE, 2012 / Е. Андрианова. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://neuronews.com.ua/page/rukovodstvo-po-diagnostike-i-lecheniyu-epilepsij-u-detej-i-vzroslyh
85. Chen C. Assessing impact of real-world dosing irregularities with lamotrigine extended-release and immediate-release formulations by pharmacokinetic simulation / C. Chen, J. Wright, B. Gidal. // ​Therapeutic Drug Monitoring. – 2013. – V. 35. – P. 182–189.
86. Valproic acid induced pancreatitis and multiorgan failure in a child. Ped Emerg Care. / [A. Yaman, T. Kendirlit, C. Odek та ін.]. // Ped Emerg Care.. – 2013. – V. 29. – P. 659–661.
87. Battino D. Management of epilepsy during pregnancy. / D. Battino, T. Tomson. // Drugs. – 2007. – V. 67. – P. 2727–2746.
88. Thurman D. Sudden unexpected death in epilepsy: assessing the public health burden / D. Thurman, D. Hesdorffer, J. French. // Epilepsia. – 2014. – V. 55. – P. 1479–1485.
89. Self reported adverse effects of mono and polytherapy for epilepsy. / T.Andrew, K. Milinis, G. Baker, U. Wieshmann. // Seizure-Eur J Epilep. – 2012. – V. 21. – P. 610–613.
90. Sex related differences on valproic acid pharmacokinetics after oral single dose. / [M. Ibarra, M. Vazquez, P. Fagialino та ін.]. // J Pharmacokinet Pharmacodyn. – 2013. – V. 40. – P. 479–486.
91. Epilepsy: new advances. / S. L.Moshe, E. Perucca, P. Ryvlin, T. Tomson. // Lancet. – 2015. – V. 385. – P. 884–989.
92. Брюне Б. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути: обзор / Б. Брюне, К. Сандау, А. Кнетен. // Биохимия. – 1998. – №7. – С. 966–975.
93. Кислин М. С. Гипоксическое прекондиционирование модифицирует активность про- и антиоксидантних систем гиппокампа крыс / М. С. Кислин, С. А. Строев, Т. С. Глущенко. // Биомедицинская химия. – 2013. – №6. – С. 673–681.
94. Колесник Ю. М. Сигнальная роль активных форм кислорода в регуляции физиологических функций / Ю. М. Колесник, И. Ф. Беленичев, О. В. Ганчева. // Патологія. – 2005. – №1. – С. 4–10.
95. Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты / О. А. Толпыгина. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – №2. – С. 178–180.
96. Novel de novo SCN2A mutation in a child with migrating focal seizures of infancy / [R. Dhamija, E. Wirrell, G. Falcao та ін.]. // Pediatric neurology. – 2013. – V. 49. – P. 8–18.
97. Большаков А. П. Нейрохимия / А. П. Большаков. // Нейрохимия. – 2008. – №3. – С. 157–169.
98. Григорова І. А. Стан оксидантно-антиоксидантної системи у хворих з епілептичними тонко-клонічними судорогами / І. А. Григорова, А. К. Ісмаіл, Абудайа. // Український вісник психоневрології. – 2003. – №4. – С. 13–15.
99. Sloviter R. Apoptosis: a guide for perplexed / R. Sloviter. // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – V. 23. – P. 19–24.
100. Современные представления о механизмах патогенеза повреждений мозга и нейропротекторной терапии / [Ю. Г. Шанько, А. Л. Танин, А. Н. Наледько та ін.]. // ARS MEDICA. – 2009. – №3. – С. 97–105
101. Paschal A. Factors associated with medication adherence in patients with epilepsy and recommendations for improvement / A. Paschal, S. Rush, T. Sadler. // Epilepsy Behavior. – 2014. – V. 31. – P. 346–350.
102. Изменения показателей периферической крови и иммунного статуса больных хронической герпесвирусной инфекцией, неосложненной и с симптоматической фокальной эпилепсией. / С.Крыжановская, Н. Камзалакова, Н. Шнайдер, Ю. Панина. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2014. – №6. – С. 49–56.
103. Watkins J. C. The glutamate story. / J. C. Watkins, D. E. Jane. // Br J Pharmacol. – 2006. – V. 147. – P. 100–108.
104. Раевский К. С. Аллостерические модуляторы глутаматных рецепторов АМРА подтипа новый класс физиологически активных веществ / К. С. Раевский, К. О. Еремин. // Биомедицинская химия. – 2004. – №6. – С. 523–538.
105. Belenichev I. F. The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / I. F. Belenichev, S. V. Gorbacheva, N. V. Bukhtiyarova. // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 1. – P. 24–27.
106. Lasoñ W. Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: an update / W. Lasoñ, М. Dudra-Jastrzêbska, К. Rejdak [et al.] // Pharmacological Reports. – 2011. – V. 63. – P. 271-292.
107. Duncan R. Primary and secondary care attendance, anticonvulsant and antidepressant use and psychiatric contact 5-10 years after diagnosis in 188 patients with psychogenic non-epileptic seizures. / R. Duncan, C. Graham, M. Oto. // Neurology Neurosurgery Psychiatry. – 2014. – V. 85. – P. 954–958.
108. Mothet J. P. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions / J. P. Mothet, M. le Bail, J. M. Billard. // J. Neurochemical. – 2015. – V. 135. – P. 210–225.
109. Chen J. W. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults / J. W. Chen, C. G. Wasterlain. // Lancet Neurology. – 2006. – V. 5. – P. 246–256.
110. NMDA spike/plateau potentials in dendrites of thalamocortical neurons / S.Augustinaite, B. Kuhn, P. J. Helm, P. Heggelund. // J. Neurosci. – 2014. – V. 34. – P. 10892–10905.
111. An apoptotic model for nitrosative stress / J. P.Eu, L. Liu, M. Zeng, J. S. Stamler. // Biochemistry. – 2013. – V. 5. – P. 1040–1047.
112. Giulivi С. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase / С. Giulivi. // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – V. 34. – P. 397–408.
113. The anticonvulsant retigabine is a subtype selective modulator of GABAA receptors / [M. Treven, X. Koenig, E. Assadpour та ін.]. // Epilepsia. – 2015. – V. 56. – P. 647–657.
114. Croarkin P. E. Evidence for GABAergic inhibitory deficits in major depressive disorder / P. E. Croarkin, A. J. Levinson, Z. J. Daskalakis. // Neurosci. Biobehav. Rev. – 2011. – V. 35. – P. 818–825.
115. Zamponi G. Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases / G.W. Zamponi. // Nature Reviews Drug Discovery. – 2016. – V. 15. – P. 19–34.
116. GABA induces activity dependent delayed-onset uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions in neocortical neurons / M. C.Gravielle, R. Faris, S. J. Russek, D. H. Farb. // J. Biol. Chem. – 2005. – V.
     1. 280. – P. 209–296.
117. Functional regulation of GABAA receptors in nervous system pathologies / R. M.Hines, P. A. Davies, S. J. Moss, J. Maguire. // Curr. Opin. Neurobiol. – 2012. – V. 22. – P. 552–558.
118. Arain F. M. Decreased viability and absence-like epilepsy in mice lacking or deficient in the GABAA receptor alpha1 subunit / F. M. Arain, K. L. Boyd, M. J. Gallagher. // Epilepsia. – 2012. – V. 53. – P. 161–165.
119. Baho E. Neural activity and neurotransmission regulate the maturation of the innervation field of cortical GABAergic interneurons in an age-dependent manner / E. Baho, G. Di Cristo. // J. Neurosci. – 2012. – V. 32. – P. 911–918.
120. Башкатова В. Г. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата / В. Г. Башкатова, К. С. Раевкая. // Биохимия. – 1998. – №7. – С. 1020–1028.
121. Григорьев В. В. Видовые и функциональные различия NMDA рецепторов / В. В. Григорьев, В. А. Нематова. // Бюлл. экспер. биол. мед. – 1989. – №9. – С. 229–302.
122. Rogawski M. A. Low-affinity channel blocking (uncompetitive) NMDA receptor antagonists as therapeutic agents-toward an understanding of their favorable tolerability / M. A. Rogawski. // Amino Acids. – 2000. – V. 19. – P. 133–149.
123. Юрьев К.Л. Новейшие – третього поколения – противоэпилептические препараты / К.Л. Юрьев // Укр. мед. часопис. – 2012. – № 4 (90). – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.umj.com.ua/ article/32172/novejshie-tretego-pokoleniya-protivoepilepticheskie-preparaty
124. Ikonomidou C. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? / C. Ikonomidou, L. Turski. // Lancet Neurol. – 2002. – V. 1. – P. 383–386.
125. NMDA receptor antagonists sustain LTP and spatial memory: active processes mediate LTP decay / D. M.Villarreal, V. Do, Е. Haddad, B. E. Derrick. // Nat Neurosci. – 2002. – V. 5. – P. 48–52.
126. Striatal damage and oxidative stress induced by the mitochondrial toxin malonate are reduced in clorgyline-treated rats and MAO-A deficient mice / [W. F. Maragos, K. L. Young, C. S. Altman та ін.]. // Neurochem Res. – 2004. – V. 29. – P. 741–746.
127. Brigman J. L. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning / J. L. Brigman. // J Neurosci. – 2008. – V. 30. – P. 45–56.
128. Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus / [J. N. Gelinas, J. L. Banko, M. M. Peters та ін.]. // Learn Mem. – 2008. – V. 15. – P. 403–411.
129. Chetkovich D. M. NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase / D. M. Chetkovich, J. D. Sweatt. // J Neurochem. – 1993. – V. 61. – P. 1933–1942.
130. Липатова Л. Принципы лечения эпилепсии у пожилых пациентов. / Л. В. Липатова. // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2013. – №113. – С. 52–53.
131. Семьянов А.В. ГАМКергическое торможение в ЦНС: типы ГАМК рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия / А.В. Семьянов // Нейрофизиология. – 2002. – Т. 34, № 1. – С. 82-95.
132. Witko-Sarsat V. Advamed oxidation protein products as a novel markers of oxidative stress in ischemia / V. Witko-Sarsat, M. Friedlander. // J. Neurochem. – 2000. – V. 6. – P. 342–350.
133. Завалишин И. А. Оксидантный стресс — общий механизм повреждения при заболеваниях центральной нервной системы / И. А. Завалишин, М. Н. Захарова. // Ж. Неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 1996. – №2. – С. 111–114.
134. Oxidative stress and aging / [A. D. Romano, G. Serviddio, A. de Matthaeis та ін.]. // J. Nephrol. – 2010. – V. 15. – P. 29–36.
135. Neuro-protective effects of carbamazepine on sleep patterns and head and body shakes in kainic acid-treated rats / A. Alfaro-Rodríguez, R. González-Piña, E. Arch-Tirado [et al.] // Chem Biol Interact. — 2009. — Vol. 180 (3). — Р. 376—382.
136. Cahill-Smith S. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2 / S. Cahill-Smith, J. M. Li. // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2014. – V. 3. – P. 441–453.
137. Jones D. P. Redefining oxidative stress / D. P. Jones. // Antioxidants & Redox Signaling. – 2006. – V. 8. – P. 1865–1879.
138. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / [M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol та ін.]. // J. Biochem. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
139. Changes in the anti-oxidant system in adult epilepsy patients receiving anti-epileptic drugs / [M. Isik, Y. Demir, M. Kirici та ін.]. // Arch. Physiol. Biochem. – 2015. – V. 121. – P. 97–102.
140. Bruce A. J. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures / A. J. Bruce, M. Baudry. // Free Radical. Biol.Med. – 1995. – V. 18. – P. 993–1002.
141. Cengiz M. The effects of carbamazepine and valproic acid on the erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children / M. Cengiz, A. Yuksel, M. Seven. // Pharmacol. Res. – 2000. – V. 41. – P. 423–425.
142. Колесник Ю. М. Сигнальная роль активных форм кислорода в регуляции физиологических функций / Ю. М. Колесник, И. Ф. Беленичев, О. В. Ганчева. // Патология. – 2005. – №1. – С. 4–10.
143. Тиолдисульфидное равновесие — определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга / И. С.Чекман, Ю. М. Колесник, И. Ф. Беленичев, Л. И. Куреченко. // Журн. НАМН України. – 2013. – №1. – С. 3–11.
144. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxi dative stress related to genotoxicity / [R. M. Green, M. Graham, M. R. O\'Dono van та ін.]. // Mutagenesis. – 2006. – V. 21. – P. 383–390.
145. Galano A. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals / A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy. // RSC Advances. – 2011. – V. 1. – P. 1763–1771.
146. Costa L.G. Structural effects and neurofunctional seguelae of developmental exposure to psychotherapeutic drugs: experimental and clinical aspects / L.G. Costa, L. Steardo, V. Cuomo // Pharm. Rev. – 2004. – V. 56, № 1. – P. 103-147.
147. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редоксзависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова. // Успехи биол. наук. – 2014. – №54. – С. 299–348.
148. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy / [M. Mendez-Armenta, C. Nava-Ruiz, D. Juarez-Rebollar та ін.]. // Oxid Med. Cell Longevity. – 2014. – Vol. 2014. – P. 293–689.
149. Molecular profiling of temporal lobe epilepsy: comparison of data from human tissue samples and animal models / M.Majores, J. Eils, O. D. Wiestler, А. J. Becker. // Epilepsy Res. – 2004. – V. 60. – P. 173–178.
150. Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical / [C. Jacob, E. Battaglia, T. Burkholz та ін.]. // Chemical Research in Toxicology. – 2012. – V. 25. – P. 588–604.
151. Circu M. L. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis / M. L. Circu, T. Y. Aw. // Free Radical Biology and Medicine. – 2010. – V. 48. – P. 749–762.
152. Cai Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L. J. Yan. // Journal of Biochemical and Pharmacological Research. – 2013. – V. 1. – P. 15–26.
153. Затейщиков Д. А. Функциональное состояние эндотелия и продуктов окиси азота в организме крыс, адаптированных к периодической гипоксии / Д. А. Затейщиков. // Кардиология. – 2000. – №6. – С. 14–17.
154. Complexity of the cell-cell interactions in the innate immune response after cerebral ischemia. / M.Сuartero, I. Ballesteros, I. Lizasoain, M. Moro. // Brain Research. – 2015. – V. 1623. – P. 53–62.
155. Guldiken B. Ictal asystole mimicking seizure deterioration in temporal lobe epilepsy / B. Guldiken, E. Hartl. // Epileptic Disorders. – 2015. – V. 17. – P. 332–335.
156. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation / [A. E. Cardona, M. Li, L. Liu та ін.]. // J. Leukoc. Biol. – 2008. – V. 84. – P. 587–594.
157. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus / [M. G. De Simoni, C. Perego, T. Ravizza та ін.]. // Eur. J. Neurosci. – 2000. – V. 12. – P. 2623–2633.
158. Лукьянова Л. Д. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью / Л. Д. Лукьянова, А. М. Дудченко. // Вестн. РАМН. – 2007. – №2. – С. 3–13.
159. Mathews G.C. The dual roles of GABA in seizures and epilepsy generate more excitement / G.C. Mathews // Epilepsy Curr. – 2007. – V. 7. – P. 28-30.
160. Зозуля Ю.А. Роль оксида азота в эпилептогенезе (обзор литературы) / Ю.А. Зозуля, О.А. Лапоногов, Л.Н. Сенько // Журн. АМН Украины. – 2007. – Т. 13, № 2. – С. 201-215.
161. Крыжановский Г. Н. Гиппокамп, как детерминантная структура, генерирующая эпилептическую активность при коразоловом кидлинге / Г. Н. Крыжановский, А. А. Шандра, Р. Ф. Макулькин [и др.] // Бюл. эксп. биологии и медицины. — 1985. — № 5. — С. 527—532.
162. Киндлинг как модель формирования эпилептической активности / Г. Н. Крыжновский, А. А. Шандра, Л. С. Годлевский [и др.] // Успехи физиол. наук. — 1988. — Т. 19, № 4. — С. 12—32.
163. Хаузер В.А. Описательная эпидемиология эпилепсии. В кн.: Современная эпилептология: проблемы и решения / Под ред. Е.И. Гусева, А.Б. Гехт. М., 2015. C. 33–104.
164. Рудакова И.Г. Леветирацетам (кеппра) в лечении различных эпилептических синдромов у взрослых / И.Г. Рудакова, А.С. Котов, С.В. Котов [и др. ] // Журнал неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 2009. – Т. 109, № 10. – С. 25-29.
165. Adjunctive enteral phenobarbital for adult status epilepticus: a brief report. / [S. Tiamkao, K. Suttapan, S. Pranbul та ін.]. // Neuropsychiatric Disease and Treatment. – 2013. – V. 9. – P. 1829–1834.
166. Striano S. Reflex seizures and reflex epilepsies: old models for understanding mechanisms of epileptogenesis / S. Striano, A. Coppola. // Epilepsy research. – 2012. – V. 100. – P. 1–11.
167. Kawalec P. Pregabalin for the treatment of social anxiety disorder. / P. Kawalec, A. Cierniak. // Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2015. – V. 24. – P. 508–529.
168. Громов Л.А. Межполушарная психофармакология / Л.А. Громов, О.А. Евтушенко, И.Н. Танасова // Журнал АМН України. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 346-353.
169. Sajatovic M. Targeted self-management of epilepsy and mental illness for individuals with epilepsy and psychiatric comorbidity / M. Sajatovic. // Epilepsy Behavior. – 2016. – V. 64. – P. 152–159.
170. Бородкин Ю. С. Фармакологический анализ участия гиппокампо - ретикулярного комплекса в процессах памяти / Ю. С. Бородкин, В. А. Крауз // Журн. высш. нервн. деятельности. — 1973. — № 1. — С. 166—173.
171. Naseer M. I. Maternal epileptic seizure induced by Pentylenetetrazol: Apoptotic neurodegeneration and decreased GABAB1 receptor expression in prenatal rat brain / M. I. Naseer, L. Shupeng, M. O. Kim // Mol. Brain. — 2009. — Vol. 2 (1). — Р. 20—28
172. Литовченко Т. А. Применение препаратов нейрометаболического действия в комплексном лечении при эпилепсии / Т. А. Литовченко // Архив психиатрии. — 2001. — № 3 (26). — С. 52—54.
173. Capasso A. The involvement of prostaglandins and nitric oxide in the development of brain excitability: a relationship study / A. Capasso // Curr Med. Chem. — 2008. — V. 15 (24). — Р. 18—26.
174. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник [и др.]. — Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2009. — 262 с.
175. Effects of an educational program on self-management in patients with epilepsy. / [M. Aliasgharpour, N. Dehgahn Nayeri, M. Yadegary та ін.]. // Seizure. – 2013. – V. 22. – P. 48–52.
176. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. / [T. Glauser, E. Ben-Menachem, B. Bourgeois та ін.]. // Epilepsia. – 2013. – V. 54. – P. 551–563.
177. Kwan P. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs / P. Kwan, G. J. Sills, M. J. Brodie // Pharmacol. Therapeutics. — 2001. — V. 90. — P. 21—34.
178. Lateonset epilepsy with status myoclonicus: a diagnostic and management dilemma. / [A. Al-Awwad, B. Alsuleiman, Y. Ng та ін.]. // The Neurodiagnostic Journal. – 2014. – V. 54. – P. 7–19.
179. Brandt C. Antiepileptic efficacy of lamotrigine in Phenobarbital resistant and responsive epileptic rats: a pilot. / C. Brandt, W. Löscher. // Epilepsy research. – 2014. – V. 108. – P. 1145–1157.
180. Пути совершенствования фармакотерапии эпилепсии у детей: фокус на индивидуальные особенности биотрансформации лекарственных средств. / [Б. Кантемирова, А. Стародубцев, Д. Сычев та ін.]. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2012. – №3. – С. 14–18.
181. Lamotrigine adjunctive therapy among children and adolescents with primary generalized tonic-clonic seizures / E. Trevathan, S. P. Kerls, A. E. Hammer [et al.] // Pediatrics. — 2006. — Vol. 118 (2). — Р. 371—378.
182. Seizure attainment and mortality of mice in kainite-induced status epilepticus / [N. Ahmad, H. Yow, M. Makmor-Bakry та ін.]. // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – V. 5. – P. 145–147.
183. Lamotrigine monotherapy compared with carbamazepine, phenytoin, or valproate monotherapy in patients with epilepsy / L. Kaminow, J. R. Schimschock, A. E. Hammer [et al.] // Epilepsy Behav. — 2003. — № 4 (6). — Р. 659—666.
184. Gamble C. L. Lamotrigine versus carbamazepine monotherapy for epilepsy / C. L. Gamble, P. R. Williamson, A. G. Marson // Cochrane Database Syst Rev. — 2006. — Vol. 25(1). — Р. 744—752.
185. Lang D. G. Lamotrigine, phenytoin and carbamazepine interaction on the sodium current present in N4TG1 mouse neuroblastoma cells / D. G. Lang, C. M. Wang, B. R. Cooper // J. Phar. Exp. Ther. — 1993. — Vol. 266. — Р. 829—835.
186. Neocortical potassium currents are enchanced by the antiepileptic drug lamotrigine / C. Zona, V. Tancredi, P. Longone [et al.] // Epilepsia. — 2002. — V. 43. — Р. 685—690.
187. Cuadrado A. Synergistic interaction between felbamate and lamotrigine against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylentetrazole in mice / A. Cuadrado, J. Bravo // Eur J. Pharmacol. — 2003. — Vol. 465. — Р. 43—52.
188. Oxcarbamazepine: mechanisms of action / M. J. McLean, M. Schmutz, A. W. Wamil [et al.] // Epilepsia. — 1994. — V. 35 (3). — Р. 5—9.
189. Samaei A. An experimental design for finding of minimum dosage of carbamazepine and valproate in preventing of seizure attacks / A. Samaei, M. Nobahar, A. A. Vafaei // Pak J. Pharm Sci. — 2009. —Vol. 22 (2). — Р. 180—183.
190. Bring P. Does oxcarbazepine warrant therapeutic drug monitoring? A critical review / P. Bring, M. H. Ensom // Clin. Pharmacokinet. — 2008. — Vol. 47 (12). — Р. 767—778.
191. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : [методичні рекомендації] / О. В. Стефанов. — К. : Авіцена, 2002. — 527 с.
192. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. / [Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В]. — К. : Вища школа. Головне видавництво, 1983. — С. 383.
193. Науково - практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та робот і з ними / [Кожем’якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайретдінова Г.А.]. — К., 2002.—155 с.
194. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. — 2003. — № 2 (22). — С. 108—109.
195. Джагацпанян А. А. Экспериментальная характеристика нейротропного спектра некоторых антиэпилептических препаратов / А. А.Джагацпанян, Р. Г. Пароникян, И. М. Назарян // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003 — Т 66, № 6. — С. 20—23.
196. Topiramate and zonisamide prevent paradoxical intoxication induced by carbamazepine and phenytoin / S. Yamamura, T. Hamaguchi, K. Ohoyama [et al.] // Epilepsy Res. — 2009. — Vol. 84 (2—3). — Р. 172—186.
197. Lu Y. Efficacy of topiramate in adult patients with symptomatic epilepsy: an open-label, long-term, retrospective observation / Y. Lu, W. Yu, X. Wang // CNS Drugs. — 2009. — Vol. 23 (4). — Р. 351—359.
198. Effects of some convulsant agents on the protective activity of topiramate against maximal electroshock-induced seizures in mice / M. J. Swiader, J. J. Łuszczki, A. Zwolan [et al.] // Pharmacol Rep. — 2005. — Vol. 57 (3). — Р. 373—379.
199. Lauria-Horner B. A. Pregabalin: a new anxiolityc / B. A. Lauria-Horner, R. B. Pohi // Expert Opin. Investig. Drugs. — 2003. — № 12 (4). — Р. 663—672.
200. Воробьева О. В. Эффективность новейшего антиконвульсанта прегабалина в терапии эпилептических фокальных припадков / О. В. Воробьева // Consilium Medicum. — 2007. — Т. 9, № 8. — С. 35—41.
201. Nekrassov V. Additive effects of antiepileptic drugs and pentylenetetrazole on hearing / V. Nekrassov, M. Sitges // Neurosci Lett. — 2006. — Vol. 406 (3). — Р. 276—280.
202. Neuro-protective effects of carbamazepine on sleep patterns and head and body shakes in kainic acid-treated rats / A. Alfaro-Rodríguez, R. González-Piña, E. Arch-Tirado [et al.] // Chem Biol Interact. — 2009. — Vol. 180 (3). — Р. 376—382.
203. Topiramate and zonisamide prevent paradoxical intoxication induced by carbamazepine and phenytoin / S. Yamamura, T. Hamaguchi, K. Ohoyama [et al.] // Epilepsy Res. — 2009. — Vol. 84 (2—3). — Р. 172—186.
204. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів : [Методичні рекомендації] ; під ред. акад. Головенко М. А., проф. Громов Л. О. — К. : ДФЦ МОЗ України, 2003. — 46 с.
205. Effects of some convulsant agents on the protective activity of topiramate against maximal electroshock-induced seizures in mice / M. J. Swiader, J. J. Łuszczki, A. Zwolan [et al.] // Pharmacol Rep. — 2005. — Vol. 57 (3). — Р. 373—379.
206. Bures J. Cortical spreading depression as a memory disturbing factor / J. Bures, O. Buresude // J. comp. and phisiol. — 1963. — Vol. 56, № 2. — Р. 268—272.
207. Бородкин Ю. С. Нейрохимические и функциональные основы долговременной памяти / Ю. С. Бородкин, Ю. В. Зайцев. — Л .: Медицина, 1982. — 216 с.
208. Nekrassov V. Additive effects of antiepileptic drugs and pentylenetetrazole on hearing / V. Nekrassov, M. Sitges // Neurosci Lett. — 2006. — Vol. 406 (3). — Р. 276—280.
209. The influence of gender on the aggravation of absence seizures by carbamazepine in the low - dose pentylenetetrazol rat model / K. J. McLean, T. J. O'Brien, M. J. Cook [et al.] // Seizure. — 2004. — № 13 (4). — Р. 208—216.
210. Diphenyl diselenide and 2,3 - dimercaptopropanol increase the PTZ - induced chemical seizure and mortality in mice / V. B. Brito, V. Folmer, G. O. Puntel [et al.] // Brain Res Bull. — 2006. — Vol. 68 (6). — Р. 414—418.
211. Mandhane S. N. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s. c. PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice / S. N. Mandhane, K. Aavula, T. Rajamannar // Seizure. — 2007. — Vol. 16 (7). — Р. 636—644.
212. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. - Киев: Морион, 2001. - 408 с.
213. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / Реброва О. Ю. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
214. Iffland P. Intracellular and circulating neuronal antinuclear antibodies in human epilepsy. / P.H. Iffland. // Neurobiology of Disease. – 2013. – №59. – С. 206–212.
215. Sudha K. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy / K. Sudha, A. V. Rao. // Clin Chim Acta. – 2013. – V. 303. – P. 19–24.
216. Oxidative stress in children with neurocysticercosis. / [R. Prasad, Anil, O. P. Mishra та ін.]. // Pediat Infect Dis J. – 2012. – V. 31. – P. 1012–1015.
217. Rogawski M. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy / M.A. Rogawski. // Acta Neurologica Scandinavica. – 2013. – V. 127. – P. 9–18.
218. Lateonset epilepsy with status myoclonicus: a diagnostic and management dilemma. / [A. Al-Awwad, B. Alsuleiman, Y. Ng та ін.]. // The Neurodiagnostic Journal. – 2014. – V. 54. – P. 7–19
219. Loss of Caspase-3 sensitizes colon cancer cells to genotoxic stress via RIP1-dependent necrosis / [M. Brown, B. Leibowitz, D. Chen та ін.]. // Cell Death and Disease. – 2015. – V. 6. – P. 18–21.
220. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis / [M. Lu, D. Lawrence, S. Marsters та ін.]. // Science. – 2014. – V. 345. – P. 98–101.
221. Matsuura K. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer / K. Matsuura, K. Canfield, W. Feng. // Int Rev Cell Mol Biol. – 2016. – V. 327. – P. 43–87.
222. Auditory verbal hallucinations of epileptic origin. / [A. Serino, L. Heydrich, M. Kurian та ін.]. // Epilepsy Behavior. – 2014. – V. 31. – P. 181–185.
223. Striano P. Genetic heterogeneity in malignant partial seizures of infancy / P. Striano, G. Coppola. // Annals of Neurology. – 2014. – V. 75. – P. 324–376.
224. Synergistic effect of docosahexaenoic acid on anticonvulsant activity of valproic acid and lamotrigine in animal seizure models / [H. Gavzan, M. Sayyah, S. Sardari та ін.]. // Arch Pharmacol. – 2015. – V. 388. – P. 1029–1038.
225. Rosati A. Antiepileptic drug treatment in children with epilepsy / A. Rosati, S. Masi. // CNS Drug. – 2015. – V. 29. – P. 847–863.
226. Feldmann M. P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study / М. Feldmann, M.C. Asselin, J. Liu [et al.] // Lancet Neurol. – 2013. – V. 12, № 8. – Р. 777–785.
227. Johannessen Landmark C. Experience from therapeutic drug monitoring and gender aspects of gabapentin and pregabalin in clinical practice / C. Johannessen Landmark, G. Beiske, A. Baftiu. // Seizure. – 2015. – V. 28. – P. 88–91.
228. Bonnett L. Prognostic factors for time to treatment failure and time to 12 months of remission for patients with focal epilepsy: post-hoc, subgroup analyses of data from the SANAD trial / L. Bonnett, C.T. Smith, D. Smith [et al.] // Lancet Neurol. – 2012. – V. 11. – P. 331-342
229. Allendorfer J. Contributions of MRI towards our understanding of the response to psychosocial stress in epilepsy and psychogenic nonepileptic seizures. / J. Allendorfer, J. Szaflarski. // Epilepsy and Behavior. – 2014. – V. 35. – P. 19–25.
230. Potschka H. Pharmacological treatment strategies: Mechanisms of antiepileptic drugs / H. Potschka // Epileptology. – 2013. – V.1, № 1. – P. 31-37.
231. Ghodke-Puranic Y. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics / Y. Ghodke-Puranic, C.F. Thorn, J.K. Lamba [et al.] // Pharmacogenetics and genomics. – 2013. – V. 23, № 4. – P. 236-241.
232. Anticonvulsant activity of some xanthone derivatives / H. Marona, E. Pekala, L. Antkiewicz-Michaluk [et al.] // Bioorg Med Chem. — 2008. — Vol. 16 (15). — Р. 7234—7244.
233. Luszczki J. J. Biphasic characteristic of interactions between stiripentol and carbamazepine in the mouse maximal electroshock-induced seizure model : a three - dimensional isobolographic analysis / J. J. Luszczki, S. J. Czuczwar // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. — 2006. — Vol. 374 (1). — Р. 51—64.
234. Anticonvulsant activity of carbamazepine and diphenylhydantoin against maximal electroshock in mice chronically treated with aminophylline / P. Wla1, Z. Roli, Z. Kleinrok [et al.] // J. of Neural Transmission. — 1992. — Vol. 89, № 1—2. — Р. 41—48.
235. Effect of NG-nitro — L - arginine on the anticonvulsant and acute adverse effects of some newer antiepileptic drugs in the maximal electroshock-induced seizures and chimney test in mice. / J. J. Luszczki, M. Czuczwar, P. Gawlik [et al.] // Pharmacol Rep. — 2006. — Vol. 58 (6). — Р. 955—960.
236. Anticonvulsant properties of the novel nootropic agent nefiracetam in seizure models of mice and rats / Y. Kitano, C. Komiyama, M. Makino [et al.] // Epilepsia. — 2005. — Vol. 46 (6). — Р. 811—818.
237. Ethosuximide and valproate display high efficacy against lindane-induced seizures in mice / R. M. Kaminski, A. M. Tochman, A. Dekundy [et al.] // Toxicol Lett. — 2004. — Vol. 154 (1—2). — Р. 55—60.
238. Effect of topiramate on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs in two models of experimental epilepsy / K. K. Borowicz, J. J. Luszczki, A. M. Duda [et al.] // Epilepsia. — 2003. — Vol. 44 (5). — Р. 640—646.
239. Luszczki J. J. Interactions of MRZ 2/576 with felbamate, lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate in the mouse maximal electroshock-induced seizure model / J. J. Luszczki, W. Danysz, S. J. Czuczwar // Pharmacology. — 2008. — Vol. 81 (3). — Р. 259—265.
240. Luszczki J. J. N - (anilinomethyl) - p - isopropoxyphenylsuccinimide potentiates the anticonvulsant action of phenobarbital and valproate in the mouse maximal electroshock-induced seizure model / J. J. Luszczki, S. L. Kocharov, S. J. Czuczwar // Neurosci Res. — 2009. — Vol. 64 (3). — Р. 267—272.
241. Influence of imperatorin on the anticonvulsant activity and acute adverse - effect profile of lamotrigine in maximal electroshock - induced seizures and chimney test in mice / J. J. Luszczki, E. Wojda, G. Raszewski [et al.] // Pharmacol Rep. — 2008. — Vol. 60 (4). — Р. 566—573.
242. Hoffmann K. Increase in antiepileptic efficacy during prolonged treatment with valproic acid: role of inhibition of histone deacetylases? / K. Hoffmann, M. Czapp, W. Löscher // Epilepsy Res. — 2008. — Vol. 81 (2—3). — Р. 107—113.
243. The effects of group III mGluR ligands on pentylenetetrazol - induced kindling of seizures and hippocampal amino acids concentration / P. Maciejak, J. Szyndler, D. Turzyńska [et al.] // Brain Res. — 2009. — Vol. 17 (3). — Р. 897—903.
244. Rohracher A. The ILAE definition of drug resistant epilepsy and its clinical applicability compared with “older” established definitions / A. Rohracher, J. Dobesberger, C.A. Granbichler [et al.] // Journal of Epileptology. – 2015. – V. 23, № 1. – P. 39-44.