

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ВАРБАНЕЦЬ

Олена Іванівна

УДК 615.213:547.475.5.51:577.16.087

НЕЙРОТРОПНА ДІЯ НОВИХ ГЕРМАНІЙОРГАНІЧНИХ СПОЛУК
(експериментальне дослідження)

14.03.05 - фармакологія

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник:

Годован Владлена Володимирівна,
доктор медичних наук, професор

Одеса 2013

ЗМІСТ

	стор.
Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів ...	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ДОЦІЛЬНІСТЬ СТВОРЕННЯ НОВИХ НЕЙРОТРОПНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ГЕРМАНІЙОРГАНІЧНИХ СПОЛУК (огляд літератури)	13
1.1. Сучасний стан і підходи до розробки нових нейротропних препаратів	13
1.2. Роль нейрофармакологічних моделей в розробці і дослідженні сполук з нейротропною активністю	27
1.3. Передумови для пошуку і створення нових нейротропних лікарських засобів	36
1.4. Перспективи створення нових препаратів на основі похідних германію	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	45
2.1. Досліджувані сполуки	45
2.2. Загальнонейрофармакологічні методи дослідження	47
2.2.1. Вплив БАР на рухову активність тварин в умовах прямої актометрії та «відкритого поля»	48
2.2.2. Оцінка сумісного введення БАР і загальноприйнятих збуджуючих і депримуєчих засобів	48
2.2.3. Вплив БАР на м'язову координацію мишей у тесті «обертового стрижня»	49
2.2.4. Оцінка ноотропної дії БАР за методом «Водного	49

лабіринту Мориса»

2.2.5. Визначення антидепресантної активності БАР за методом «плавального тесту Порсолта»	50
2.3. Вивчення протисудомної активності сполук	51
2.3.1. Максимально електрошокові судоми	52
2.3.2. Судоми, викликані різними хемоконвульсантами	53
2.3.3. Модель аудіогенних судом	55
2.3.4. Модель 6-Гц-викликаних судом	56
2.3.5. Модель пентиленететразолового кіндлінгу	57
2.3.6. Модель електростимуляційного кіндлінгу	58
2.4. Приготування зрізів гіпокампу і реєстрація їх електричної активності	59
2.5. Ізоболографічний аналіз взаємодії сполук	62
2.6. Вивчення антипсихотичної дії сполук	64
2.7. Статистичні методи дослідження.....	67
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГАЛЬНОЇ НЕЙРОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ КСИЛАРАТНИХ СПОЛУК ГЕРМАНІЮ У ІНТАКТНИХ ТВАРИН	
3.1. Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на рухову активність щурів у тесті прямої актометрії	70
3.2. Вплив нових БАР на рухову активність тварин у тесті «відкритого поля»	71
3.3. Вплив сполук германію на підвищену рухову активність ..	72
3.4. Вплив нових БАР на гексеналовий сон тварин.....	76
3.5. Оцінка дії нових сполук на м'язовий тонус і координацію рухів тварин	79
3.6. Дослідження впливу нових БАР на пам'ять та здатність	80

тварин до орієнтації у просторі	
3.7. Визначення антидепресантної активності синтезованих сполук германію.....	81
РОЗДІЛ 4. ВСТАНОВЛЕННЯ ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЇ КСИЛАРАТНИХ ПОХІДНИХ ГЕРМАНІЮ.....	
4.1. Вплив БАР на прояви гострого судомного синдрому	85
4.1.1. Протисудомна активність нових сполук на моделі максимальних електрошокових судом	85
4.1.2. Протисудомна дія нових БАР на моделях судом, викликаних різними хемоконвульсантами.....	88
4.1.3. Протисудомна активність нових БАР за умов аудіогенних судом	91
4.1.4. Вплив ксигерму-3 на судомну активність за умов 6-Гц- викликаних судом	91
4.1.5. Оцінка протисудомної активності ксигерму-3 за умов NMDA-викликаних судом	93
4.1.5.1. Протисудомна дія ксигерму-3 при NMDA-викликаних клонічних судамах	93
4.1.5.2. Протисудомна активність ксигерму-3 при NMDA- викликаних тонічних судамах.....	94
4.2. Оцінка можливих небажаних ефектів ксигерму-3 за умов курсного введення на фоні судомної активності	102
4.3. Визначення ефективності ксигерму-3 за умов хронічної судомної активності	105
4.3.1. Вплив ксигерму-3 на судомну активність за умов електростимуляційного кіндлінгу.....	105
.....	105

4.3.2. Вплив ксигерму-3 на судомну активність за умов хімічного кіндлінгу.....	116
4.4. Ефекти ксигерму-3 на судомну активність зрізів гіпокампу. ..	119
4.4.1. Ефекти ксигерму-3 на 4-амінопіридин-викликану епілептиформну активність у зрізах гіпокампу.....	119
4.4.2. Вплив ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на епілептиформну активність у зрізах гіпокампа щурів, викликану низькою концентрацією кальцію і магнію.....	125
4.4.3. Вплив ксигерму-3 на епілетиформну активність, викликану низькою концентрацією магнію.....	130
4.5. Ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 з різними протиепілептичними препаратами.....	134
4.5.1. Взаємодія сполук за умов моделі максимальних електрошокових судом.....	134
4.5.2. Взаємодія сполук за умов 6-Гц-викликаних судом	139
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА АНТИПСИХОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КСИЛАРАТНИХ СПОЛУК ГЕРМАНІЮ У ТВАРИН	
.....	146
5.1. Ефекти нових БАР на прояви синдрому стереотипної поведінки у щурів.....	146
5.2. Вплив ксигерму-1 на амфетамін-посилені реакції самостимуляції у щурів.....	151

5.2.1. Вплив ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на реакції самостимуляції у щурів	151
5.2.2. Вплив ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на амфетамін-індуковане посилення реакції самостимуляції	152
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	157
ВИСНОВКИ.....	181
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	183

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ,
ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

NMDA – N–метіл–D–аспартат

БАР – біологічно активні речовини

БР – біполярні розлади

в/в – внутрішньовенний

в/мозк – внутрішньомозковий

в/очер – внутрішньоочеревинний

в/шл – внутрішньошлуночковий

ВП – викликані потенціали

ВППС –викликаний потенціал популяційного спайку

ГАМК– гамма–аміномасляна кислота

ГЕБ – гемато–енцефалічний бар'єр

ГПЗ – генератор патологічного збудження

ДМСМ – метил–1–6,7–диметоксі–4–етил–β–карболін–3–карбоксилат

ЕД₅₀ – ефективна доза, що викликає очікуваний ефект у 50 % тварин

ЕпА – епілептиформна активність

ЕС – епілептичний статус

ЗІ – захисний індекс

МЕС – максимальні електрошокові судоми

п/ш – підшкірно

ПЕП – протиепілептичні препарати

поп-ВППС – популяційний викликаний потенціал популяційного спайку

ПС – популяційний спайк

ПТЗ – пентиленететразол

СМ – самостимуляція мозку

ТД₅₀– доза, що викликає токсичний ефект у 50 % тварин

ТЕПК – тонічна екстензія передніх кінцівок

ЦНС – центральна нервова система

ВСТУП

Актуальність теми. Розповсюдженість хронічних захворювань центральної нервової системи (ЦНС), до яких належить епілепсія, паркінсонізм, хвороба Альцгеймера та ін., за останні роки набула загрозового масштабу в усіх країнах світу, що робить проблему дуже значимою для теоретичної та практичної медицини [1, 2]. Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), більш ніж 50 млн людей у світі страждають на епілепсію, біля 70 % з яких не отримують належну медичну допомогу. Крім того, у 20-30 % пацієнтів внаслідок фармакорезистентності епілептичні напади не піддаються контролю існуючими протиепілептичними препаратами (ПЕП), не дивлячись на своєчасно розпочате лікування та оптимальні дози відповідних препаратів [3-5]. Більшість з існуючих ПЕП, в тому числі і нових, під час тривалого застосування, мають ряд небажаних, перш за все нейротоксичних ефектів та ідіосинкротичних реакцій [6, 7]. Враховуючи все вище сказане, стає цілком зрозумілим об'єктивність і необхідність подальшого пошуку речовин з протисудомною дією, які були б придатні для створення на їх основі більш ефективних та безпечних лікарських засобів для фармакологічного контролю епілепсії, нейропатичного болю, біполярних розладів, тремору та інших захворювань ЦНС [8-11].

У цьому плані нашу увагу привернула досить нова і багатообіцяльна група біологічно активних речовин (БАР), створених на основі похідних природних метаболітів германію - *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманати (IV) літію, натрію та калію (відповідно ксигерм-1, ксигерм-2 і ксигерм-3). Вибір складових сполук для синтезу нових лікарських засобів (ЛЗ) не випадковий. На сьогоднішній день відомі такі властивості комплексних сполук германію як нейротропна, анальгезуюча, гепатопротекторна, детоксикаційна, гіпотензивна, бактерицидна, протипухлинна тощо [12-18]. Необхідно відзначити, що вони

мають широкий нейротропний спектр дії, який включає анксиолітичну, седативну, протисудомну, антидепресивну, адаптогенну та інші види активності [19-20]. Важливим для лікування судомних станів є і той факт, що їм притаманний мембраностабілізуючий ефект за рахунок стабілізації іонних каналів, фосфоліпідних компонентів клітинних мембран [21-23]. Значно впливають на специфічну активність комплексних сполук такі чинники, як природа біометалів і біолігандів, тип і фізико-хімічні властивості комплексів, а головне, синергізм або антагонізм складових компонентів [24-26]. Тому як біоліганди було обрано природні для організму метаболіти (іони калію, натрію, літію), які забезпечують його життєдіяльність, регулюючи перебіг порушених процесів, і добре відомі своїми фармакологічними ефектами [27-29]. На підставі вищевикладеного можна припустити, що новим ксиларатним сполукам германію (IV) притаманна нейротропна активність, фармакологічному вивченню якої і присвячено дану роботу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри загальної і клінічної фармакології Одеського національного медичного університету (ОНМедУ) МОЗ України «Пошук і комплексне вивчення фармакологічного профілю нових біологічно активних речовин метаболітного походження і ксенобіотиків» (№ держреєстрації 0110U06658). Дисертант є співвиконавцем зазначеної теми.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є встановлення, порівняльна оцінка нейротропних ефектів трьох нових комплексних сполук на основі *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманатів з літієм, натрієм, калієм і визначення їх перспективності як протиепілептичних та антипсихотичних лікарських засобів.

Для досягнення зазначеної мети розв'язувалися такі *задачі*:

1. Встановити загальний нейрофармакологічний профіль нових ксиларатних похідних германію на інтактних тваринах та залежність

«структура - дія».

2. Оцінити протисудомну активність нових БАР на різних моделях гострої епілептичної активності порівняно із стандартними протиепілептичними препаратами та виявити найбільш активну сполуку.

3. Дослідити вплив найбільш активної сполуки на моделях хронічної епілептичної активності (електростимуляційний та хімічний кіндлінг) порівняно із стандартними протиепілептичними препаратами.

4. З'ясувати особливості впливу найбільш активної сполуки на електричну активність нейронів зрізів гіпокампу порівняно з відомими протиепілептичними препаратами.

5. Провести ізоболографічний аналіз взаємодії найбільш активної сполуки з протисудомною дією та стандартних протиепілептичних препаратів за умов моделей максимальних електрошокових та 6-Гц-викликаних судом.

6. Оцінити антипсихотичну активність нових БАР та виявити найбільш активну речовину на моделях стереотипної поведінки порівняно з референс-препаратами (літію хлорид, галоперидол, вальпроат натрію) за умов самостійного та сумісного застосування.

7. Обґрунтувати перспективу досліджуваних БАР для створення на їх основі нових нейротропних лікарських засобів.

Об'єкт дослідження: пошук нових вискоелективних лікарських засобів для фармакотерапії патологічних процесів головного мозку, які виникають на тлі посиленої збудливості мозку.

Предмет дослідження: встановлення нейрофармакологічної активності нових комплексних сполук на основі біс(μ-ксиларато) дигідроксодигерманатів з літієм, натрієм та калієм.

Методи дослідження: нейрофармакологічні, електрофізіологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше доведено наявність протисудомної та антипсихотичної дії у нових комплексних сполук германію на основі *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманатів з літієм, натрієм та калієм (відповідно ксигерм-1, ксигерм-2 і ксигерм-3). Встановлено залежність вказаних ефектів від хімічної будови досліджуваних похідних германію та виявлено найбільш активну сполуку. Показано, що за величиною протисудомної дії на моделях як гострої, так і хронічної епілептичної активності має сполука ксигерм-3 - похідне германію з калієм. Вперше показано, що курсове введення даної БАР протягом 14 днів не призводило до зменшення протисудомної дії та не викликало розвиток толерантності. Введення ксигерму-3 затримувало розвиток хімічного та електростимуляційного кіндлінгу, а також зменшувало інтенсивність епілептичних нападів в умовах сформованого кіндлінгу. Вперше виявлено, що ксигерм-3 демонстрував протисудомну дію в умовах моделі фармакорезистентних судом, викликаних за допомогою 6-Гц-електричної стимуляції у мишей. Дослідження впливу ксигерму-3 на активність нейронів зрізів гіпокампу в умовах дії 4-амінопіридину та низького вмісту магнію та кальцію в омиваючому зрізі розчині виявило, що його протисудомна дія зумовлена активацією калієвих каналів. Ізоболографічний аналіз сумісного застосування ксигерму-3 і стандартних ПЕП виявив, що характер їх взаємодії залежав як від співвідношення доз речовин, так і моделі епілептичного синдрому та варіював від адиції до виразного потенціювання протисудомних ефектів. У жодній комбінації досліджуваних сполук не спостерігалось підсилення нейротоксичних ефектів. Вперше виявлено, що ксигерм-1 - похідне літію, викликав антипсихотичну дію в умовах різних моделей стереотипної поведінки, а також на моделі самостимуляції мозку у щурів. На вказаних моделях поведінкових порушень встановлено синергічний характер сумісного

застосування ксигерму-1 і вальпроату натрію, літію хлориду та карбамазепіну. За результатами досліджень отримано 2 патенти України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів. Проведене дослідження дозволило отримати нові дані про нейрофармакологічний профіль цілеспрямовано синтезованих комплексних сполук на основі біс(μ-ксиларато) дигідроксодигерманатів з літієм, натрієм та калієм. Обґрунтовано доцільність їх застосування за умов епілептичного та психотичного синдромів та інших порушень нервової системи, зумовлених патологічно посиленою збудливістю ЦНС. Найбільш активні сполуки представляють інтерес для поглибленого дослідження на предмет створення на їх основі нових препаратів відповідного профілю дії. Виявлення залежності «структура - дія» сприятиме цілеспрямованому синтезу нових сполук із заданою дією.

Результати дослідження впроваджено у навчальний процес кафедр фармакології Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, Кримського державного медичного університету імені С. І. Георгієвського, Луганського державного медичного університету, Національного фармацевтичного університету; фармакології, клінічної фармакології та фармакоєкономіки Дніпропетровської державної медичної академії; загальної та клінічної фармакології, кафедри фізіології ОНМедУ.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук наукової літератури за темою роботи, сформульовано мету і завдання дослідження, здійснено планування, опрацьовано моделі судомного синдрому та порушень поведінки, відповідно до яких самостійно виконано всі експериментальні дослідження; проведена статистична обробка отриманих даних, які оформлено у вигляді таблиць та рисунків; проаналізовано та узагальнено результати досліджень; опубліковано та апробовано основні дані, а також написано та оформлено дисертацію та автореферат.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були оприлюднені на міждисциплінарній науковій конференції «Адаптаційні стратегії живих систем» (Новий Світ, Крим, 2012); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Філатовські читання» (Одеса, 2012); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологія нейроендокринної системи», присвяченої 100-річчю від дня народження Я.Д. Кіршенבלата (Чернівці, 2012); науково-практичній конференції «ХІ читання ім. В.В. Підвисоцького» (Одеса, 2012); національному конгресі «Клінічна фармація: 20 років в Україні» (Харків, 2013); 30-му міжнародному протиепілептичному конгресі з епілепсії (Монреаль, 2013).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, з яких 5 статей в профільних наукових журналах, рекомендованих МОН України, 1 стаття у індексованому журналі, що входить до міжнародних наукометричних баз, 2 патенти України на корисну модель та 5 тез у міжнародних та вітчизняних виданнях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 216 сторінках комп'ютерного тексту, яка складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаної літератури. Робота ілюстрована 26 таблицями і 27 рисунками. Бібліографічний покажчик включає 322 джерела, з них 48 - кирилицею.

РОЗДІЛ 1
ДОЦІЛЬНІСТЬ СТВОРЕННЯ НОВИХ НЕЙРОТРОПНИХ
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ГЕРМАНІЙОРГАНІЧНИХ
СПОЛУК (огляд літератури)

1.1. Сучасний стан і підходи до розробки нових нейротропних препаратів

Захворювання центральної нервової системи (ЦНС) займають провідне місце у структурі захворюваності більшості країн світу. Зокрема слід підкреслити значення таких захворювань як епілепсія, хвороба Паркінсона, Альцгеймера і депресії, показники захворюваності яких мають неухильну тенденцію до збільшення [30]. Так, за оцінками експертів ВООЗ більш ніж 50 млн. людей страждають від епілепсії [31]. Епілепсія є складним захворюванням ЦНС із багатьма неврологічними та психічними порушеннями і характеризується, щонайменше, одним або більшим числом неспровокованих нападів. Незважаючи на істотний прогрес у розумінні патогенетичних механізмів судом і епілепсії [32, 33], клітинні механізми епілепсії у людей залишаються нез'ясованими [34, 35]. У зв'язку з відсутністю специфічних етіологічних і патогенетичних механізмів розвитку епілепсії, фармакотерапевтичні підходи спрямовані на пригнічення її провідних симптомів, тобто на контроль судомних і несудомних нападів шляхом постійного застосування протиепілептичних (протисудомних) препаратів [36]. Проте, більш ніж у 30% пацієнтів досягти контролю епілептичних нападів не вдається, незважаючи на адекватну терапію протиепілептичними препаратами [36-39].

Протягом останніх років значно зросла кількість нових протиепілептичних препаратів, які представлені на фармацевтичному ринку, однак число пацієнтів з фармакорезистентною епілепсією за цих умов не

змінилося. В арсеналі лікаря сьогодні є більш ніж 20 протиепілептичних препаратів, які включають препарати “першого” покоління, такі як фенітоїн, карбамазепін, етосуксимід, фенобарбітал, вальпроат, а також нові - протиепілептичні препарати “другого” покоління такі, як фелбамат, вігабатрин, ламотриджин, тіагабін, топірамат, габапентин, зонізамід та інші. До числа нових протиепілептичних препаратів, які застосовуються у клініці, відносяться леветирацетам, ретигабін та лакозамід, які знаходяться на стадії клінічних досліджень і, мабуть, будуть названі препаратами «третього» покоління [36, 40-44].

Вибір протиепілептичних препаратів ґрунтується на їх ефективності по відношенню до різних епілептичних нападів або синдромів, толерантності та безпечності. Епілептичні напади можуть бути генералізованими, які виникають одночасно в обох півкулях головного мозку або фокальними (парціальними), які починаються в одній або декількох ділянках мозку, частіше у скроневій частці. У пацієнтів форма епілепсій або епілептичних синдромів класифікується залежно від типів нападів, етіології, віку і змін електроенцефалограми. Епілепсії або епілептичні синдроми ділять на ідіоматичні, зумовлені генетичними змінами або симптоматичні. До відомих причин, які викликають епілепсії приблизно в однієї третини всіх пацієнтів відносять пухлини мозку, інфекційні процеси або травматичні ушкодження мозку, розвиток мальформації, цереброваскулярна патологія, фебрильні судоми або епілептичний статус (ЕС) [45].

Відомі на цей час протиепілептичні препарати залежно від переважного молекулярного механізму дії можна умовно розділити на наступні чотири групи. До препаратів першої групи відносять модулятори потенціал-залежних Na^+ або Ca^{2+} каналів: карбамазепін, ламотриджин, окскарбазепін, фенобарбітал, фенітоїн, топірамат та інші. Вони ефективні у відношенні до генералізованих тоніко-клонічних і фокальних нападів. Вважається, що ці протиепілептичні

препарати блокують тривале повторюване нейрональне порушення шляхом блокування потенціал-залежних Na^+ або Ca^{2+} каналів. Друга група протиепілептичних препаратів - підсилювачі ГАМК-ергічних гальмівних механізмів. Вона містить бензодіазепіни, габапентин, тіагабин, вігабатрин, вальпроати та інші. Останні застосовують для лікування як генералізованих, так і фокальних форм епілепсії. Бензодіазепіни використовують також для блокування ЕС. До третьої групи протиепілептичних препаратів відносять препарати, ефекти яких зумовлені гальмуванням синаптичного збудження, опосередкованого глутаматними іонотропними рецепторами. До четвертої групи відносять протиепілептичні препарати, що модулюють синаптичне виділення нейромедіаторів [46, 47].

Протиепілептичні препарати першого покоління, так звані «старі» препарати, R. McDonald [46] розподіляє на 3 групи. Перша група включає препарати, що пригнічують високочастотні спалахи судомних потенціалів, які самопідтримуються, внаслідок блокування потенціал-залежних Na^+ -каналів. Друга група - протиепілептичні препарати, що підсилюють ГАМК-ергічний гальмівний контроль. Третя група - протиепілептичні препарати, які гальмують повільні, пейсмейкер-викликані повторні спалахи нейронів шляхом блокування Т-кальцієвих іонних струмів. Висловлено припущення, що антиконвульсантні ефекти протиепілептичних препаратів із широким спектром протисудомної дії (вальпроати, карбамазепін, фенобарбітал) зумовлені не тільки блокуванням потенціал-залежних Na^+ -каналів, але і посиленням ГАМК-ергічних гальмівних механізмів [48]. Такі препарати як зонізамід і етосуксимід, ефективні проти абсансних нападів, діють, ймовірно, шляхом блокування кальцієвих каналів Т-типу. Разом з тим, наведені класифікації мають обмежене значення, оскільки у більшості протиепілептичних препаратів ефекти зумовлені одночасно декількома механізмами, що має важливе значення з позицій клінічної ефективності. Так, з позицій наведеної концептуальної класифікації R.

McDonald [46] важко зрозуміти чому вальпроати і бензодіазепіни, які мають різні механізми, дії, ефективні за умов абсансних форм епілепсії, і чому під час ЕС вальпроати не є ефективними, а ефективні тільки бензодіазепіни. Можливо, ці й інші відмінності ефектів зумовлені тим, що дана концепція не враховує додаткові клітинні і молекулярні механізми дії протиепілептичних препаратів першого покоління, які є важливими для розуміння відмінностей ефектів препаратів, що відносять до однієї групи. Наприклад, відомо, що дія таких трьох протиепілептичних препаратів як карбамазепін, фенітоїн і ламотриджин зумовлена, головним чином, їх ефектами на активність потенціал-залежних Na^+ -каналів, тобто на посилення швидкої інактивації каналів. Однак, клінічні дані демонструють, що якщо пацієнт є резистентним до дії одного із зазначених препаратів, то може бути досить чутливим до дії іншого із цих препаратів, що свідчить про те, що протиепілептичні ефекти препаратів зумовлені також іншими додатковими механізмами. Так, виявлено, що карбамазепін модулює активність потенціал-залежних кальцієвих каналів L-типу і збільшує виділення серотоніну [49, 50]. Крім того, карбамазепін є неселективним антагоністом аденозинових рецепторів і модулятором внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [51, 52, 53]. На відміну від карбамазепіну, фенітоїн, можливо, взаємодіє з різними типами α - субодиниць Na^+ -каналів [54]. Крім того, гальмівний ефект карбамазепіну на Ca^{2+} струм у пресинаптичних закінченнях зумовлює зменшення виділення збудливої амінокислоти і наступне зменшення амплітуди збудливих постсинаптичних потенціалів [55]. Можливо, відзначена диверсифікованість молекулярних механізмів дії карбамазепіну і фенітоїну теоретично припускає деякі кількісні відмінності у фармакотерапевтичній ефективності цих препаратів. З іншого боку, виявлено, що ламотриджин не впливає на ГАМК-ергічне гальмування або активність Ca^{2+} каналів T-типу, разом з тим препарат досить ефективний у клініці різних форм епілепсій [56]. В експериментальних дослідженнях також

показані відмінності ефектів ламотриджину і карбамазепіну. Так виявлено, що за умов моделі кіндлінгу карабамазепін прискорює розвиток кіндлінгових судом, тоді як ламотриджин ефективно пригнічує кіндлінг [57, 58]. Крім того, ламотриджин був ефективний за умов моделі абсансних нападів [59]. На відміну від нього, карбамазепін і фенітоїн суттєво підсилювали інтенсивність абсансних судом [60, 61]. Ці та інші дані вказують на те, що спектр протисудомної дії ламотриджину суттєво ширше у порівнянні до ефектів карбамазепіну і фенітоїну, і тим самим припускає інший профіль його активності на відміну від інших блокаторів Na^+ -каналів.

Такі нові протиепілептичні препарати як топірамат, вігабатрин, тіагабін, габапентин за допомогою різних механізмів підсилюють ГАМК-ергічне гальмування і одночасно мають модулюючий вплив на потенціал-залежні Na^+ - і Ca^{2+} -канали [62, 63, 64]. З'являється усе більше даних про те, що нові протиепілептичні препарати проявляють свою дію шляхом гальмування збудливої нейротрансмісії, опосередкованої AMPA/каїнатними і N-methyl-D-aspartat (NMDA) типами глутаматних рецепторів [65]. Разом з тим, аналіз даних свідчить, що багато із препаратів першого покоління також реалізують протиепілептичні ефекти шляхом гальмування глутаматергічної передачі.

Результати експериментальних і клінічних досліджень свідчать про те, що багато стандартних і нових протиепілептичних препаратів крім протисудомних ефектів мають більш широкий спектр дії і фармакотерапевтичний потенціал. Так, вальпроати, карбамазепін, ламотриджин і топірамат та деякі інші протиепілептичні препарати широко застосовуються у неврології і психіатрії для лікування невропатичної болі, мігрені, а також біполярних синдромів, шизофренії [51, 66, 67, 68]. Проводяться дослідження нейропротекторних і протипухлинних ефектів вальпроатів [69, 70, 71, 72]. Таким чином, наведені дані свідчать про те, що більша частина протиепілептичних препаратів першого і другого покоління

виявляють ефекти шляхом комбінації декількох механізмів дії. Схожістю механізмів дії протиепілептичних препаратів можна пояснити також, як їх клінічну ефективність, так і профіль побічних ефектів.

Основною метою досліджень в епілептології була розробка нових протиепілептичних препаратів з більш високою протисудомною ефективністю у порівнянні з існуючими препаратами [73]. Більшість протиепілептичних препаратів, що застосовуються у клініці, були виявлені в результаті скринінгових досліджень або шляхом наступної структурної модифікації відомих протиепілептичних препаратів, а не в результаті цілеспрямованої раціональної стратегії пошуку і синтезу нових протиепілептичних препаратів, яка базується на відкритті нових патофізіологічних механізмів судом або епілепсії. Єдиним виключенням є два ГАМК-міметика вігабатрин і тіагабін, які з'явилися внаслідок застосування раціональної цілеспрямованої стратегії "ГАМК-ергічної гіпотези" епілепсії, заснованої на ідеї про те, що порушення ГАМК-ергічних механізмів гальмівного контролю є провідною ланкою патогенезу різних форм епілепсій. Інші спроби пошуку нових протиепілептичних препаратів шляхом застосування раціонального підходу зазнали невдачі. Прикладом може бути підхід, заснований на глутамат-ергічній гіпотезі епілепсії. Збудливі амінокислоти (глутамат і аспартат) безсумнівно беруть участь у генерації судом [74]. Системне або внутрішньомозкове (в/мозк) введення глутамату викликало судомну активність [75-80]. Виявлено також, що в деяких пацієнтів епілептичні напади супроводжувалися значним збільшенням вмісту збудливих амінокислот у позаклітинній рідині [81]. Антагоністи збудливих амінокислот, особливо ті, які блокують іонотропні рецептори глутамату, за умов різних моделей судомної активності (хімічно-викликані, електроконвульсивні або аудиогенні судоми) виявляли протисудомні ефекти [82-86]. Іонотропні глутаматні рецептори поділяють на чутливі до NMDA і AMPA/каїнатні або нечутливі до NMDA [87]. NMDA

рецептори в основному збільшують провідність іонів Na^+ і Ca^{2+} , тоді як не-NMDA рецептори підсилюють тільки тік іонів Na^+ [88, 89]. Серед загальноприйнятих протиепілептичних препаратів тільки вальпроати і діазепам пригнічували судоми, викликані системним або в/мозк введенням NMDA, а фенобарбітал, фенітоїн, карбамазепін і етосуксимід, навіть у високих дозах були повністю неефективними. Таким чином, незважаючи на численні докази важливої ролі посиленої глутамат-ергічної нейротрансмісії у розвитку різних форм епілепсій [90], сполуки які гальмують зазначену гіперактивність шляхом блокування підтипів NMDA-глутаматних рецепторів, виявили незначну протисудомну активність і виражені побічні ефекти на стадії клінічних випробувань [43].

Огляд нових протиепілептичних препаратів, застосовуваних у клініці епілепсії та їх класифікація у відповідності до стратегічних підходів під час їх створення демонструє, що в основі розробки фелбамату, ламотриджину і топірамату є результати скринінгових досліджень. За цих умов, також, як і у препаратів першого покоління, за винятком бромідів і фенобарбіталу, їх протисудомні ефекти були виявлені в експерименті з використанням моделей максимальних електрошокових судом (МЕС) або коразолових (пентиленететразолових) судом у мишей і щурів, які довели, що клінічну ефективність можна передбачити за допомогою таких відносно простих експериментальних моделей [62].

Важливим напрямком створення нових протиепілептичних препаратів є структурна модифікація відомих молекул протиепілептичних препаратів, яка спрямована на посилення селективності впливу на відомі ключові молекулярні мішені. Метою під час розробки модифікацій відомих протиепілептичних препаратів було підвищення клінічної ефективності і поліпшення толерантності та безпечності в результаті зменшення токсичності і фармакокінетичних параметрів. За допомогою такого підходу були створені

нові генерації карбамазепіну - окскарбазепін, еслікарбазепін; вальпроату - вальпроцемід, вальноктамід, пропілісопропіл-ацетамід; габапентину - прегабалін; ламотриджину - JZP-4, фелбамату-флюофелбамат; леветирацетаму - бриварацетам, селетрицетам. Деякі із зазначених препаратів - дериватів застосовуються в клініці (окскарбазепін), інші аналоги проходять стадії доклінічних або клінічних досліджень [63].

Один з підходів у підвищенні ефективності протиепілептичних препаратів базується на поліпшенні фармакодинамічних параметрів з більш специфічним механізмом дії, на основі нових даних патофізіологічних досліджень. Основні механізми дії, що зумовлюють клінічну ефективність протиепілептичних препаратів, включають посилення ГАМК-ергічної або зниження глутамат-ергічної нейромедіації, модулювання роботи потенціал-залежних іонних каналів або модифікацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [51, 67]. Загальним результатом зазначених механізмів є зниження нейрональної збудливості. Більшість протиепілептичних препаратів взаємодіють із тими ж макромолекулярними мішенями, з якими взаємодіють ГАМК- або глутамат - рецептори та іонні канали, ферменти, внутрішньоклітинні білки.

Прикладами нових протиепілептичних препаратів, які підсилюють ГАМК-ергічну передачу є - інгібітор ГАМК-амінотрансферази - вігабатрин; блокатор зворотного захоплення ГАМК_A-рецепторів - прогабід і габаксадол. Однак клінічні дослідження зазначених ГАМК-міметиків виявили, що тільки вігабатрин і тіагабін виявилися ефективними за умов фокальної епілепсії у пацієнтів [91].

Ще один препарат - габапентин був синтезований як ГАМК-ергічна сполука, що має структурну подібність до ГАМК, але не взаємодіє з ГАМК-рецепторами і не впливає на її зворотне захоплення або на процеси руйнування ГАМК [92]. Габапентин і його модифікований аналог - прегабалін є лігандами

$\alpha 2\delta$ (1 і 2) субодиниць потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів, експресія яких відзначається у сенсорних нейронах після ушкодження мозку [93, 94]. Гальмування потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів у закінченнях пресинаптичних нейронів буде викликати гальмування виділення глутамата у збудливих синапсах і, як наслідок, зменшення збудливої нейротрансмісії [51]. Габапентин і прегабалін показали ефективність у лікуванні епілепсії, нейропатичного болю і мігрені [92-95]. Габапентин також ефективний за умов есенційного тремору, який асоціюється з дефіцитом ГАМК-ергічної передачі [96-98]. Разом з тим, істотним недоліком багатьох ГАМК-тропних препаратів є здатність до формування толерантності і залежності, які добре відомі із клінічних і експериментальних спостережень на прикладі бензодіазепінів і барбітуратів. Іншим недоліком деяких ГАМК-міметиків, наприклад, вігабатріна, є індукція психотичних реакцій. Відомо, що гіперактивація системи ГАМК є одним з патогенетичних механізмів розвитку афективних психозів [99].

Розробка нових протиепілептичних препаратів, яка базується на пошуку речовин, які модулюють Na^+ і Ca^{2+} канали, також як і відзначений раніше підхід на основі глутаматної гіпотези, поки не привели до значимих результатів. Так, ралітолін, селективний блокатор потенціал-залежних Na^+ каналів, не продемонстрував у процесі експериментальних і клінічних досліджень переваг у порівнянні із референс-препаратами - фенітоїном і карбамазепіном [100], що призупинило подальші дослідження. Відомі блокатори Ca^{2+} -каналів L-типу, які широко застосовуються в кардіології, неврології такі як верапаміл, ніфедипін, дилтіазем і флунаризин, не виявили значимих ефектів у пацієнтів з епілепсією [101]. Можливо, однією із причин цього є відносно мало виражена здатність цих препаратів проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Разом з тим, синтезовані нові блокатори різних типів Ca^{2+} -каналів із кращою проникністю через ГЕБ, які сьогодні досліджуються в експериментальних умовах [102].

Третьою мішенню пошуку нових протиепілептичних препаратів - модуляторів іонних каналів є K^+ -канали. Новий антиконвульсант ретігабін (D-23129) є єдиним протиепілептичним препаратом, механізм протисудомної дії якого пов'язаний з активацією K^+ -каналів [103, 104], які детермінують мембранний потенціал спокою, тривалість потенціалу дії та імпульсну активність нейронів. Уперше протисудомна дія деривата аналгетика флупертину (D-20443) була виявлена на моделях МЕС, пентиленететразолових, пеніцилінових судом і за умов моделі кіндлінгу [105]. У наступних дослідженнях виявлено, що ретігабін підсилює механізм ГАМК-ергічного контролю, а також блокує Na^+ і Ca^{2+} струми [106], що зумовлює широкий спектр його протисудомних ефектів за умов різних моделей *in vitro* та *in vivo* [107]. Клінічні дослідження виявили його ефективність, у тому числі у пацієнтів з фармакорезистентною епілепсією [108].

Таким чином, аналіз даних з розробки нових протиепілептичних препаратів, який базується на синтезі нових сполук, які мають більшу селективність дії на одну з мішеней патогенезу, свідчить, що такий підхід не є оптимальним відносно такого захворювання з численними механізмами розвитку, як епілепсія. Дія більшості клінічно ефективних протиепілептичних препаратів зумовлена комбінацією декількох таких механізмів, як блокада потенціал-залежних Na^+ -каналів, посилення ГАМК-ергічної системи і гальмування глутамат-ергічного збудження. Тому можливо більш успішним буде стратегічний підхід, спрямований на створення нових сполук із широким спектром дії, чим розробка сполук з більшою селективністю. Можливо, виправданою буде стратегія «зворотньої концепції»: «мішень - розробка сполуки», відповідно до якої здійснюється подальше дослідження тільки тих сполук, протисудомні ефекти яких діють за допомогою раніше невідомих механізмів. Із цією метою, можливо, буде доцільним «відхід» від використання під час скринінгу таких нових сполук традиційних, класичних моделей судом

як МЕС і пентилентетразолові та застосування нових моделей епілепсії. Той факт, що валідність та відповідність до клінічних форм захворювання моделей, які були використані для виявлення і розробки нових ПЕП, була встановлена і підтверджена за умов дослідження “старих” протиепілептичних препаратів, можливо, пояснює, чому жоден з нових протиепілептичних препаратів не має істотних переваг у ефективності і токсичності у порівнянні із “старими” протиепілептичними препаратами [109]. Сполуки, які ідентифіковані за допомогою моделі МЕС нагадують фенітоїн, дія якого зумовлена модуляцією активності потенціал-залежних Na^+ -каналів, тоді як сполуки, виявлені за допомогою пентилентетразолового-тесту часто виявляють бензодіазепіноподібну дію, тобто посилення гальмівного ефекту ГАМК [110]. Зрозуміла логіка застосування цих простих моделей для первинного скринінгу великої кількості нових сполук. Однак, відсутність ефекту за умов зазначених моделей, може призвести до неправильних висновків про відсутність протисудомної дії. Прикладом може бути новий протиепілептичний препарат леветирацетам, який не виявляв ніякого впливу на моделях МЕС і пентилентетразолових судом у гризунів [111, 112]. Леветирацетам не був ефективним за умов моделей, викликаних за допомогою таких конвульсантів, які модулюють ГАМК-бензодіазепін-рецепторний комплекс, як бікукуллін, пікротоксин, 3-меркаптопропіонова кислота, і показав мінімальні ефекти проти клонічних судом, викликаних за допомогою метил-1-6,7-диметоксі-4-етил- β -карболін-3-карбоксилату (ДМСМ). Аналогічно, леветирацетам не демонстрував ефектів по відношенню до клонічних судом, викликаних введенням у латеральні шлуночки мозку мишей CD_{97} дози агоністів іонотропних глутаматних рецепторів: NMDA, каїнової кислоти і АМРА. Ці результати принципово відрізнялися від виражених протисудомних ефектів, які демонстрували за умов даних моделей класичні протиепілептичні препарати. Тільки на моделях, які дозволяють дослідити судомний поріг за умов

застосування субмаксимальної дози різних конвульсантів, леветирацетам виявив виражену захисну дію у відношенні до аудіогенних судом у мишей [112]. Особливий інтерес представляють дані про те, що відсутність ефекту леветирацетаму на моделях МЕС і пентилентетразолових судом навіть дозою до 540,0 мг/кг значно контрастувало з досить вираженим захисним ефектом за умов електростимуляційного і хімічного кіндлінгу, викликаного введенням підпорогових доз пентилентетразолу [113]. Таким чином, за умов градуального розвитку, епілептичного процесу, який прогресує і є індукованим тими ж стимулами тільки підпороговою дозою, леветирацетам виявив потужну протисудомну дію. Доза ED_{50} препарату становила за умов електростимуляційного кіндлінгу 7,0 мг/кг, а за умов хімічного - 36,0 мг/кг [114]. Заслужують на увагу результати дослідження особливостей ефектів леветирацетаму за умов моделі хронічної епілепсії. Виявлено, що введення препарату дозами 27,0 і 54,0 мг/кг перед кожною кіндлінговою стимуляцією суттєво затримує розвиток поведінкових і електрографічних судом як за умов хімічного, так і електростимуляційного кіндлінгу [115]. Після припинення введення леветирацетаму і перерви протягом 5 днів, у відповідь на тестуючу кіндлінгову стимуляцію відзначалося значне скорочення тривалості електрографічних і поведінкових судом у тварин, що раніше отримували леветирацетам у порівнянні з контролем. Таким чином, ці дані свідчать про те, що леветирацетам, можливо, є першим протиепілептичним препаратом, який дійсно виявляє протиепілептогенну дію тобто гальмує розвиток епілептичного процесу, а не просто маскує виразність і прояви судом шляхом їх інгібування [116].

Леветирацетам також виявив виражені протисудомні ефекти на моделі 6-Гц-викликаних судом у мишей, яка є єдиною моделлю фармакорезистентних судом [117], незважаючи на відсутність ефекту на багатьох інших моделях епілепсії [111, 117]. Леветирацетам був також досить ефективний за умов

хронічних моделей ЕС, викликаного за допомогою пілокарпіну і каїнової кислоти [111]. Крім того, препарат пригнічував також генералізовану судомну активність у щурів лінії GAERS з генетичною абсансною епілепсією відносно низькою дозою 54,0 мг/кг [111]. Сьогодні леветирацетам (Кепра) успішно пройшов усі стадії клінічних досліджень і широко застосовується в клініці під час лікування різних форм епілепсії [118-120]. Крім того, леветирацетам застосовують у клінічній практиці для лікування нейропатичного болю і есенційного тремору [51, 119, 121, 122]. Останнім часом проводяться також клінічні дослідження із застосування леветирацетаму в якості препарату - альтернативи діазепаму в лікуванні ЕС [123]. Дослідження механізмів протисудомної дії леветирацетаму дозволило ідентифікувати нову мішень взаємодії препарату в пресинаптичному закінченні із синаптичним везикулярним білком 2A (SV2A), який відіграє істотну роль в секреції медіаторів. У результаті такої взаємодії пригнічується виділення глутамату, що корелювало з імовірністю протисудомної дії на моделі аудіогенних судом [124]. Леветирацетам також підсилював ГАМК-ергічне гальмування шляхом посилення струмів іонів Cl^- [125, 126], а також пригнічував виділення гліцину, що опосередковано пригнічувало активність NMDA-рецепторів глутамату [126]. Крім того, леветирацетам підсилював виділення ГАМК у синаптичну щілину [115]. Водночас проводилися дослідження протисудомних ефектів двох нових дериватів леветирацетаму - бриварацетаму (ucb 34714) і селетрацетаму (ucb 44212), у яких оптимізований унікальний механізм дії леветирацетаму. Бриварацетам має більш широкий спектр терапевтичних ефектів, що можливо зумовлене його здатністю гальмувати активність Na^+ -каналів [127]. Завершена I фаза його клінічних досліджень [120]. Таким чином, аналіз наведених даних свідчить про те, що під час дослідження протисудомних ефектів нових сполук не потрібно обмежуватися традиційними скринінговими моделями, а необхідно

якомога раніше використовувати альтернативні моделі, у тому числі хронічного епілептогенезу і моделі фармакорезистентних форм епілепсії.

Іншим вдалим прикладом реалізації стратегії спрямованого синтезу сполук із протисудомною активністю є лакозамід (SPM 927 або харкосерид - (R)-3-метоксипропионамід). Ця сполука одна із серії функціональних амінокислот, яка отримана в результаті специфічного синтезу як сполука-кандидат із протисудомним ефектом. Лакозамід дозами 1,0-30,0 мг/кг виявляв виражену протисудомну дію на різних моделях включаючи МЕС, кіндлінг, аудиогенні судоми і постстатусні моделі [117, 128-132]. Дослідження ефектів лакозаміду на розвиток кіндлінгу виявило, що вже дозою 10,0 мг/кг у день препарат крім протисудомної дії виявляв протиепілептогенну дію, затримуючи розвиток кіндлінгу [133]. На моделі фармакорезистентних «психомоторних судом», викликаних за допомогою стимуляції частотою 6 Гц, ЕД₅₀ лакозаміду склала 9,9 мг/кг [134]. Тоді як, інші протиепілептичні препарати - модулятори Na⁺-каналів - фенітоїн, ламотриджин, карбамазепін за умов цієї моделі демонстрували слабо виражену протисудомну дію дозами, що викликають значні нейротоксичні поведінкові ефекти. На моделях генералізованих клоніко-тонічних судом, викликаних за допомогою антагоністів ГАМК_A-рецепторів - бікукуліну і пікротоксину, лакозамід не був ефективний. Лакозамід був також неефективний і у відношенні клонічних судом, викликаних шляхом підшкірного (п/ш) введення пентилентетразолу, однак значно підвищував судомний поріг для мінімальних судом, викликаних за допомогою внутрішньовенного (в/в) введення метразолу [130, 135].

Дослідження механізмів протисудомної дії лакозаміду на моделях *in vivo* та *in vitro* виявили, що препарат має унікальну дію, яка полягає в селективному збільшенні тривалості повільної інактивації потенціал-залежних Na⁺-каналів [136, 137]. Це приводить до нормалізації порога деполяризації і редукації патологічно посиленого збудження нейронів, не впливаючи на їх

фізіологічну активність. Лакозамід також взаємодіє з одним із внутрішньонейрональних білків, так званим collapsin - response mediator protein 2 (CRMP-2), який відіграє певну роль у механізмах розвитку епілепсії [138, 139], нейропатичного болю [140, 141]. Крім того, лакозамід виявляв виражені антиноцицептивні ефекти на різних моделях болю [142, 143].

На закінчення необхідно відзначити, що традиційно метою фармакотерапевтичного лікування епілепсії є переважне гальмування ініціації судомних нападів і поширення епілептичної активності та не торкається процесів, які обумовлюють виникнення епілепсії. Результатом такого підходу є те, що жоден з протиепілептичних препаратів не здатний запобігти розвитку епілепсії, наприклад, після черепно-мозкової травми [71, 144-147]. Існує досить доказів того, що незважаючи на ранній початок лікування і блокування судомних проявів, протиепілептичні препарати не впливають на прогресування і перебіг епілептогенезу. Тому метою майбутніх досліджень повинна бути не тільки розробка нових препаратів, яких потребують пацієнти з фармакорезистентною епілепсією, але й не менш важливим завданням є розробка протиепілептогенних і хворобомодифікуючих препаратів, тобто препаратів, здатних запобігти розвитку і прогресуванню епілепсії, а не тільки пригнічувати прояви, симптоми епілепсії. Інший висновок випливає з аналізу вищенаведених даних літератури про те, що багато протиепілептичних препаратів застосовуються не тільки для лікування епілепсії, але й у терапії біполярних розладів, невропатичного болю, мігрені. Факт сприятливих ефектів протиепілептичних препаратів, які застосовуються за іншими показаннями, виявлений тільки у результаті їх первинного використання для лікування епілепсії, свідчить про те, що механізми, подібні кіндлінгу, можливо, беруть участь також у патогенезі не тільки епілепсії, але і синдромів болю та афективних розладів [148, 149]. Тому, ймовірно що розробка нових протиепілептичних препаратів буде також корисна в якості нових препаратів для лікування багатьох патогенетично подібних нейропатологічних синдромів, які характеризуються гіперактивністю певних структур ЦНС.

1.2. Роль нейрофармакологічних моделей в розробці та дослідженні сполук з нейротропною активністю

Створення і дослідження нових нейротропних лікарських засобів здійснюється шляхом обов'язкового проведення доклінічних досліджень за допомогою експериментальних моделей на тваринах з метою виявлення ефективності та безпечності нових сполук [150]. У літературі описані багато нейрофармакологічних моделей дослідження, зокрема епілепсії і епілептичних судом [117, 151, 152], які можна класифікувати за кількома критеріями: наприклад, моделі спонтанних судом і моделі, індуковані за допомогою хімічних або електричних стимулів; моделі з повторними і одиничними судомами; моделі гострих і хронічних судом; моделі осередкових і генералізованих судом; моделі судомних порогів і моделі, індуковані надпороговими стимулами, і інші [116, 153, 154]. Аналізу моделей використовуваних для дослідження експериментальних механізмів епілептогенезу та іктогенезу присвячений ряд оглядів літератури [150, 152, 155, 156].

У процесі пошуку і створення нових протиепілептичних препаратів використання експериментальних моделей судом і/або епілепсії на тваринах забезпечує досягнення декількох цілей. По перше, вони служать для виявлення нових сполук, які мають протисудомну дію. По друге, після виявлення протисудомної дії нової сполуки, експериментальні моделі придатні для оцінки специфічності дії сполуки проти певного виду судом або епілепсії, тобто дозволяють визначити її спектр протисудомної дії. По третє, специфічні моделі так званих, фармакорезистентних судом, використовуються з метою визначення терапевтичних можливостей, переваг нової сполуки для лікування пацієнтів з найбільш складними типами, які важко піддаються терапії, судом

або епілепсій. По четверте, моделі на тваринах використовуються для проведення оцінки ефективності протисудомної дії протягом хронічного застосування сполуки, наприклад, дослідити можливості розвитку толерантності. У зв'язку з тим, що така хронічна дисфункція мозку, як епілепсія зумовлює істотну зміну спектру побічних ефектів препаратів, то шляхом використання експериментальних моделей можна з'ясувати чи змінює епілептогенез побічні ефекти нової сполуки, їх потужність і можливість їх усунення або запобігання. Крім того, експериментальні моделі *in vivo* та *in vitro* сприяють з'ясуванню клітинних, молекулярних та інших механізмів, які забезпечують протисудомну дію нової сполуки. І нарешті, модельні дослідження на тваринах відіграють критичну роль у створенні, відкритті терапевтичних підходів, здатних запобігти або модифікувати розвиток епілепсії після черепно-мозкової травми, інсультів та інших мозкових нападів [117, 155].

Безумовно, не всі з існуючих моделей судом і/або епілепсії, а їх налічується більш ніж 100, можуть бути використані для досягнення всіх наведених вище цілей. Крім того, мета експерименту відіграє істотну роль у виборі відповідних моделей епілепсії. Наприклад, прості моделі судом такі як МЕС і пентеленететразолові судоми, дозволяють досліджувати протисудомну дію великої кількості нових сполук протягом короткого інтервалу часу і є кращими у порівнянні з більш складними моделями, які застосовуються для скринінгових досліджень. Так, одним із основних проявів і відмінностей епілепсії є наявність мимовільних або без видимих причин повторних нападів, то більшість моделей, які використовуються у дослідженні епілепсії, є скоріше моделями судом, чим моделями епілепсії. Тому такі моделі як МЕС та інші, коли судоми індукують за допомогою електричного струму або інших конвульсантів у здорових, неепілептичних тварин, не представляють собою модель епілепсії. З іншого боку, є справжні, валідні моделі епілепсії,

наприклад, тварини-мутанти або трансгенні тварини з наявністю спонтанних, повторних нападів (трансгенні миші, собаки - “епілептики”), які, безумовно мають значно більшу подібність і відповідність до епілепсії у пацієнтів, чим прості моделі судом. Löscher W. et al. [150, 155] звертає увагу на необхідність диференціації відмінностей між експериментальними моделями епілепсії та моделями епілептиформних судом, що має значення під час інтерпретації результатів досліджень, у тому числі ефектів протиепілептичних препаратів.

Як відомо, для первинного скринінгу нових сполук, які мають протисудомну дію найчастіше використовуються моделі МЕС і пентиленететразолових судом, запропоновані більш ніж 60 років тому [37, 150, 157-159]. Прийнято вважати, що тест МЕС є моделлю, яка відтворює генералізовані тоніко-клонічні судоми і дозволяє досліджувати відповідну групу протиепілептичних препаратів [157]. До останнього часу вважалося також, що модель МЕС є відповідною для оцінки ефективності протиепілептичних препаратів у плані гальмування фокальних (парціальних) нападів [157]. Однак результати досліджень останніх років виявили повну відсутність ефектів нових препаратів (ламотриджин, тіагабін, вігабатрин) за умов моделі МЕС і продемонстрували надалі ефективність зазначених препаратів у пацієнтів з парціальною епілепсією, що свідчить проти такого підходу. З іншого боку, така сполука, як γ -вініл-ГАМК, що є ефективною проти тоніко-клонічних судом, також не була виявлена за допомогою моделі МЕС. Крім того, тест МЕС дав кілька хибно-позитивних результатів декількох психотропних препаратів, що включають деякі антидепресанти і нейролептики [157].

Пентиленететразоловий (коразоловий або метразоловий) тест є специфічним предиктором протиепілептичних препаратів, які є ефективними за умов безсудомних нападів, що мають перебіг за типом абсансних або міоклонічних нападів [158]. Однак, за умов даної моделі були отримані як

хибно-позитивні (фенобарбітал, прогабін, вігабатрин, тіагабін), так і хибно-негативні результати (іміпрамін, топірамаат, ламотриджин) [51, 151, 158, 160, 161].

Наступним етапом після виявлення протисудомних ефектів нових сполук за умов простих скринінгових моделей (МЕС і пентиленететразолового тестів) є дослідження спектру протисудомної дії. Із цією метою найчастіше використовують модель кіндлінгу, яка є моделлю однієї з найбільш частих клінічних форм - скроневої епілепсії [162]. На відміну від наведених вище моделей МЕС і пентиленететразолових судом, які формували у здорових, неврологічно інтактних тварин, кіндлінг є хронічною моделлю, під час формування якої повторні електричні стимуляції завдяки імплантованим до гіпокампу або мигдалини електродам, індукують перманентні зростання судомної готовності та інші мозкові зміни, подібні до таких за умов скроневої епілепсії [162]. За умов кіндлінгової моделі скроневої епілепсії стимуляціями індукують спочатку фокальні судоми, а потім у міру продовження стимуляцій, виникають вторинно-генералізовані судоми більшої тяжкості та тривалості. Кіндлінг є єдиною загальноприйнятою моделлю хронічної епілепсії, яка є включеною до більшості програм дослідження протиепілептичних препаратів, у тому числі, залученою до числа обов'язкових моделей «Програми розробки протисудомних препаратів» Національним інститутом здоров'я США [63, 151]. Кіндлінг є єдиною моделлю, яка дозволила адекватно дослідити та показати клінічну ефективність нових протиепілептичних препаратів (ламотриджин, лакозамід, ретигабін) за умов парціальної епілепсії у пацієнтів.

Для визначення спектру і потужності протисудомних ефектів нових сполук по відношенню до різних типів епілептичних нападів використовують також моделі аудіогенних судом (щурі лінії Strasbourg, DBA/2 миші та ін.) [124, 150]. Разом з тим, дані моделі не дозволяють з'ясувати чи здатна нова

сполука виявляти більшу ефективність щодо гальмування судом у порівнянні із протиепілептичними препаратами, що застосовуються в клініці, особливо по відношенню до таких типів судом, які важко піддаються терапії.

Lösher W. першим підкреслив необхідність розробки і включення до програми досліджень нових протиепілептичних препаратів експериментальних моделей резистентної епілепсії [171]. Незважаючи на те, що з того часу пройшло більш ніж 20 років вибір таких моделей залишається досить обмеженим. Ґрунтуючись на визначенні резистентності до протиепілептичних препаратів у пацієнтів як стану “наявності судомної активності, яка не піддається корекції за допомогою одного або двох протиепілептичних препаратів у максимально припустимій дозі”, було запропоновано кілька моделей [164]. Однією з широко використовуваних сьогодні моделей судом або епілепсії *per se*, яка є резистентною до протиепілептичних препаратів, є модель 6-Гц-викликаних «психомоторних нападів» у мишей. Ця модель судом формується за допомогою електричної стимуляції низької частоти (6 Гц), прямокутними імпульсами, тривалістю 0,2 мс протягом 3с за допомогою транскорнеальних електродів. Судоми, що виникають за цих умов, є відповідними до «психомоторних нападів» у пацієнтів з лімбічною епілепсією [116]. Стимуляція за допомогою струму інтенсивністю 22 мА викликає судоми у 97 % тварин (CC_{97}), які успішно пригнічувалися всіма загальноприйнятими протиепілептичними препаратами без виявлення особливих відмінностей ефектів клінічно різних класів протиепілептичних препаратів за цих умов. Якщо ж силу струму збільшували у два рази - до 44 мА, то більшість протиепілептичних препаратів втрачали свою ефективність і тільки леветирацетам у великій дозі та вальпроати, а також нові протиепілептичні препарати такі як ретигабін, бриварацетам і лакозамід повністю блокували судоми [116, 129, 134]. Дані спостереження дозволили запропонувати модель 6-Гц-викликаних судом як відносно просту, легко відтворювану модель

фармакорезистентної епілепсії, яка включена до програми початкових скринінгових досліджень нових протиепілептичних препаратів [63, 150, 151].

Іншою моделлю фармакорезистентних судом є кіндлінг. Post R. M. et al. [165] виявили, що якщо у процесі формування кіндлінгу тваринам вводити невеликі дози ламотриджину, то це приводить до істотного зменшення протисудомного ефекту препарату на стадії кіндлінгу, що сформувався. Подібні дані отримані також за умов моделі хімічного кіндлінгу [166].

Ламотриджин-індукована резистентність кіндлінгових тварин зберігалась також і за умов застосування карбамазепіну, фенітоїну і топірамату, але одночасно судоми гальмувались під впливом вальпроатів, фелбамату і ретигабіну [167]. Висловлене припущення, що ламотриджин-резистентні кіндлінгові тварини можуть бути запропоновані в якості моделі фармакорезистентної епілепсії [150, 164]. Описана також толерантність до дії протиепілептичних препаратів, яка є зумовленою їх тривалим застосуванням, включаючи ламотриджин у кіндлінгових тварин [3]. Тому можливо також, що описана резистентність до інших протиепілептичних препаратів у тварин під впливом ламотриджину є наслідком перехресної толерантності між ламотриджином і протиепілептичними препаратами, механізм дії яких зумовлений модулюванням активності потенціал-залежних Na^+ -каналів.

Інший підхід до розробки моделей фармакорезистентної епілепсії полягає в лікуванні за допомогою протиепілептичних препаратів великої групи тварин з розвиненим кіндлінгом і наступному виділенні двох підгруп тварин: “що відповідають” і “що не відповідають” на терапію. Вперше цей підхід використали Löscher W. і Rundfeldt C. [168], які у великій групі кіндлінгових щурів виявили, що індивідуальні відповіді тварин на фенітоїн дуже відрізняються від повного гальмування судом до повної відсутності ефектів на фенітоїн. У результаті цих досліджень була виділена підгрупа тварин фармакорезистентних до фенітоїну. У наступних дослідженнях виявлено, що в

середньому в групі більш ніж у 200 щурів повні протисудомні ефекти на фенітоїн відзначались у 20 % тварин, був відсутній ефект також в іншій частині 20 % тварин, а в інших 60 % ефект варіював [169]. Дослідження ефектів більшості протиепілептичних препаратів на моделі фенітоїн-резистентних кіндлінгових щурів виявило, що крім нового препарату леветирацетаму, усі досліджувані протиепілептичні препарати продемонстрували значно більш слабкі ефекти або їх повну відсутність за умов цієї моделі. Таким чином, резистентність, виявлена в підгрупі кіндлінгових щурів до фенітоїну поширюється на всі старі і нові протиепілептичні препарати. Це відображають клінічні спостереження у пацієнтів зі скроневою епілепсією, які є резистентними до всіх протиепілептичних препаратів, включаючи нові розроблені препарати. Невизначеним залишається питання чи буде спостерігатися подібна закономірність для тварин інших ліній або це специфічна особливість тільки щурів лінії Вістар.

Дослідження на іншій групі, так званих пост-статусних моделей, викликаних за допомогою як електричної, так і хімічної стимуляції, також виявили істотне індивідуальне варіювання протисудомних ефектів протиепілептичних препаратів. За цих умов, приблизно у 40 % щурів лінії Вістар відзначався повний або виражений протисудомний ефект. У інших 40 % тварин ефект повністю був відсутній, і у 20 % тварин, що залишились не виявився достовірний результат. Подібне співвідношення тварин, що відповідають, і що не відповідають на терапію за допомогою фенобарбіталу, було отримано на щурах лінії Sprague-Dawley в умовах постстатусної моделі, що була викликана тривалою електричною стимуляцією мигдалини [170].

Моделі епілепсії, які дозволяють селекціонувати тварин, що відповідають на терапію і що не дають відповіді на протиепілептичні препарати, виявляються досить адекватними моделями для дослідження

механізмів резистентності до протиепілептичних препаратів. За умов вище зазначених моделей було виявлено, що у фармакорезистентних щурів у ендотеліальних клітинах ГЕБ мозку відзначалося істотне збільшення експресії білків сімейства Р-глікопротеїнів (Р-Gr), які відносяться до системи, що виводить із клітин лікарські речовини. Збільшений зміст Р-Gr описаний також у видаленій мозковій тканині пацієнтів зі скроневою епілепсією, що можливо є одним з механізмів, які зумовлюють низькі концентрації різних протиепілептичних препаратів у мозку, внаслідок посиленого “викачування” протиепілептичних препаратів із клітин [171]. Шандра О.А. та співавт. [166] запропонували використовувати модель хімічного кіндлінгу в якості адекватної моделі фармакорезистентних судом. Автори продемонстрували, що через два тижні після завершення формування кіндлінгу, у так званий посткіндлінговий період, відзначалося істотне зростання “інтенсивності” судом у тварин у порівнянні з періодом кіндлінгу і гострими судомами, а також драматичне збільшення їх резистентності до дії фенобарбіталу і фенітоїну. Ця модель відставленого в часі хімічного кіндлінгу досить ефективно застосовується сьогодні для дослідження нових сполук.

За умов використання більшості експериментальних моделей, ефекти досліджуваної речовини спостерігають після її введення однією дозою протягом фіксованого відрізка часу (наприклад, 30 хв) після введення. Однак, лікування пацієнтів з епілепсією є, як правило, тривалим, довічним, із щоденним застосуванням препаратів, яке може суттєво змінити ефективність протиепілептичних препаратів. При цьому можливий розвиток декількох варіантів. По-перше, протягом тривалого застосування можливе збільшення протисудомної ефективності деяких протиепілептичних препаратів, наприклад, фенобарбіталу (примідону) - внаслідок акумуляції; вальпроату натрію - причина невідома, і вігобатрину - внаслідок акумуляції ГАМК, через

гальмування її руйнування. Відповідно визначення ефективності таких препаратів протягом гострого їх введення та недооцінки впливу протиепілептичних препаратів протягом тривалого їх застосування у випадку дослідження нових препаратів може привести до неправильного висновку відносно необхідності подальших доклінічних та клінічних досліджень [172]. По-друге ефективність деяких протиепілептичних препаратів, наприклад, групи бензодіазепінів, суттєво знижується протягом їх тривалого застосування внаслідок розвитку адаптивних процесів у мозку (“функціональна толерантність”) [3].

Застосування “старих” протиепілептичних препаратів таких як фенобарбітал, карбамазепін або фенітоїн може супроводжуватися розвитком “метаболічної толерантності” внаслідок активації ферментів і прискорення виведення препаратів. В експерименті у щурів і мишей толерантність до протисудомної і побічної дії бензодіазепінів та інших ПЕП показана за умов різних моделей судом шляхом щоденного введення препаратів протягом 1-4 тижнів за умов підтримки необхідної концентрації препарату в плазмі крові [3]. Резюмуючи вище сказане, слід відзначити безсумнівну необхідність використання, по-перше, широкого спектру експериментальних моделей як гострої, так і хронічної епілепсії, а також обов’язкове дослідження ефектів нових сполук за умов їх довготривалого введення та порівняння терапевтичних та побічних ефектів протиепілептичних препаратів.

1.3. Передумови для пошуку і створення нових нейротропних лікарських засобів

Нейротропні препарати як і всі лікарські засоби, не позбавлені побічних ефектів, що проявляються у їх негативному впливі на нервову систему і психічну сферу, а також на внутрішні органи. Зокрема, антиконвульсанти також можуть змінювати згодом як електрофізіологічні показники, так і клінічну картину самої епілепсії. Деякі побічні ефекти зумовлені прямою фармакологічною дією препарату, інші – включенням нових патогенетичних ланок до епілептичної системи і вимагають інтенсивної терапії та повного припинення застосування препарату [173]. У найбільш тяжких випадках протиепілептичні препарати можуть створювати загрозу для життя пацієнтів. Побічні ефекти можуть розвиватись гостро або протягом багатьох років від початку лікування. Частота медикаментозних ускладнень під час антиепілептичної терапії становить 10-40 % [7, 174-179].

Небажані ефекти можна класифікувати залежно від частоти, інтенсивності симптомів, патофізіологічних механізмів, а також ушкодженнями тих чи інших органів та структур. Найбільш часто використовують модифікований варіант класифікації побічних та токсичних ефектів, запропонований експертами ВООЗ [180]. При цьому виділяють три основні групи побічних ефектів антиепілептичної терапії: реакції ідіосинкразії (алергійні реакції), дозозалежні і хронічні побічні ефекти. Алергійні реакції зумовлені також пошкодженням клітин під впливом протиепілептичних препаратів та їх метаболітів, а також імунними механізмами і виникають протягом перших місяців приймання препаратів [181]. До реакцій цього типу відносять агранулоцитоз, синдром Лайела і Стивенса-Джонсона, апластична анемія, токсичні гепатит і панкреатит, сироваткова хвороба, шкірний висип. Найчастіше викликають алергійні реакції такі протиепілептичні препарати як

карбамазепін і ламотриджин (у 10-20 % пацієнтів). Застосування інших антиконвульсантів (леветирацетаму, топірамату) пов'язане з низьким ризиком розвитку ідіосинкратичних реакцій [182]. Дозозалежні побічні ефекти зумовлені індивідуально високою дозою препарату і його токсичною концентрацією в крові, та зустрічаються нерідко на початку лікування значно частіше, чим реакції гіперчутливості і можуть зникати після корекції дози. Вважається, що основну роль відіграє не стільки пікова концентрація препарату в крові, скільки період підвищення концентрації [183]. До найбільш частих дозозалежних побічних ефектів можна віднести порушення з боку нервової системи (атаксія, диплопія, тремор, сонливість) та з боку шлунково-кишкового тракту (болі, блювота та ін.). Терапія протиепілептичними препаратами першої генерації особливо таких як карбамазепін, фенітоїн, фенобарбітал та бензодіазепіни завжди супроводжується високим ризиком розвитку седативних ефектів та порушенням координації [184]. Хронічні небажані ефекти виникають за умов тривалого застосування антиконвульсантів (кілька місяців або років). Їх прояви залежать значною мірою від механізму дії протиепілептичних препаратів і варіюють від зміни маси тіла до порушень пам'яті, змін крові та інших [185, 186, 187].

У зв'язку з викладеним, критичним показником майбутньої клінічної ефективності нового протисудомного препарату в процесі доклінічних досліджень є терапевтичний або захисний індекс (ЗІ), який відображає співвідношення протисудомного і токсичного ефектів [157, 189]. Такі нейротоксичні ефекти протиепілептичних препаратів як порушення координації, атаксія або сонливість звичайно досліджують за допомогою простих експериментальних моделей, наприклад «обертального стрижня» на інтактних здорових тваринах. Однак, валідність використання таких тварин для прогнозування можливих небажаних ефектів у пацієнтів з епілепсією є сумнівною, оскільки дисфункція мозку, яка зумовлена епілептогенним

процесом змінює переносимість протиепілептичних препаратів. Результати досліджень на моделях корнеального і амігдалярного кіндлінгу підтверджують це припущення та виявили, що тварини за умов епілептогенних змін мозку більш чутливі до поведінкових і когнітивних порушень, які зумовлені введенням як загальноприйнятих протиепілептичних препаратів, так і нових досліджуваних антагоністів NMDA-рецепторів [189, 190]. Подібні дані були отримані також на моделі щурів з генетичною схильністю до абсансних судом [189]. Виражені побічні ефекти селективних антагоністів NMDA-рецепторів були виявлені за умов моделі кіндлінгових судом і дозволили досить точно передбачити несподівані та істотні небажані ефекти препаратів у пацієнтів з епілепсією, які не проявлялись в дослідженнях на здорових добровольцях [153].

Таким чином, наведені дані свідчать про важливість дослідження побічних небажаних ефектів нових потенційних протисудомних сполук, особливо з новим або невідомим механізмом дії на етапі доклінічних досліджень обов'язково за умов моделей хронічної епілепсії. Для цієї мети однією з найбільш адекватних моделей є кіндлінгова модель [155, 162, 163].

В останні роки усе більше дослідників звертають увагу на той факт, що, незважаючи на впровадження нових протиепілептичних препаратів, ефективність фармакотерапевтичного лікування епілепсії суттєво не покращилась [5, 7, 36, 38, 177]. Однією із причин цього називається те, що в більшості випадків відкриття і розробка нових протиепілептичних препаратів здійснювалась за допомогою тих же загальноприйнятих експериментальних скринінгових моделей, особливо МЕС нападів, що виконували роль основного “фільтра” і відносно нечастим використанням моделей фармакорезистентних судом на початкових етапах досліджень [73]. Іншою причиною, яка обговорюється останнім часом, є те, що первинною мішенню дії досліджуваних антиконвульсантів у всіх скринінгових моделях є тип судом,

тобто клоніко-тонічних моторних судом, що тривають протягом дуже короткого часу, і повне ігнорування несудомних нападів, які вельми точно відповідають комплексно-парціальним судомам у пацієнтів із скроневою епілепсією. Таким чином, у процесі скринінгових досліджень потенційних протиепілептичних препаратів, нові антиконвульсанти, які могли б контролювати комплексні парціальні напади у пацієнтів більш ефективно, ніж існуючі протиепілептичні препарати, могли бути не помічені у процесі їх селекції [191]. Крім того, важливим є також те, що в процесі доклінічних досліджень основна увага приділяється силі протисудомної дії сполуки, а не її ефективності. Часто критерієм сили є ED_{50} однієї сполуки стосовно препарату порівняння; і чим менше ED_{50} , тим відповідно сила її дії більша, і це є важливим доказом для подальшого його дослідження. Однак антиепілептична ефективність, яка в остаточному підсумку визначає клінічну користь нового протиепілептичного препарату, повинна обов'язково враховуватися протягом доклінічних досліджень [73].

Таким чином, вище наведені дані свідчать, що практично всім сучасним протиепілептичним препаратам притаманні різноманітні побічні ефекти, які тою чи іншою мірою обмежують їх широке застосування. У зв'язку з цим сьогодні продовжується інтенсивний пошук природних та синтетичних сполук з протисудомною дією придатних для створення на її основі більш ефективних та безпечних лікарських засобів з використанням сучасних моделей епілепсії.

1.4. Перспективи створення нових препаратів на основі похідних германію

Останнім часом привертають увагу нові комплексні сполуки на основі природних метаболітів-біолігандів, у тому числі, і біометалів із заздалегідь заданими фармакологічними властивостями [192, 193], серед яких особливу

зацікавленість викликають принципово нові БАР – координаційні сполуки германію з різними біолігандами [15]. Механізм їх біологічної дії пов'язаний із особливостями будови атомів, які містять 32 електрони, з яких чотири знаходяться на зовнішній електронній орбіті [23]. Коли до такого атома наближається позитивно заряджений іон (або полярна молекула), один із зовнішніх германієвих електронів легко відокремлюється. У такому випадку будь-який вільний електрон, що знаходиться поблизу, прагнучиме заповнити цю втрату, а германій - відновити свою звичайну зовнішню орбіту. В організмі атом германію взаємодіє із зарядженими іонами, знижуючи їх електричний потенціал. При цьому відбувається не лише зменшення токсичності металу, але й посилення біоефекту всіх складових комплексної сполуки - як біоліганду, так і металу. Показано, що такі сполуки за силою ефектів можуть перевершувати вихідні компоненти, не проявляючи побічних реакцій та токсичної дії у широкому діапазоні добових доз - від 50 до 3000 мг [194, 195]. Враховуючи те, що германій подібно до інших мінералів, може існувати в багаточисельних формах, які зумовлюють його біологічні ефекти та безпечність для людини, виявлено його вельми широкий спектр дії [12, 196]. На сьогоднішній день відомі такі властивості комплексних сполук германію як нейротропна, анальгезуюча, детоксикаційна, гіпотензивна, фунгіцидна, бактерицидна, протівірусна, антималярійна, антирадіаційна, імуномодулююча, а також протипухлинна та ін. [17, 197-199]. Виявлено, що така різноплановість ефектів органічного германію може бути пояснена наявністю атомів кисню в структурі сполуки, який, взаємодіючи з позитивно зарядженими радикалами H^+ гідрогену, що утворюється за умов багатьох патологічних станів, відщеплює їх від органічних сполук тканин і клітин під час дегідратії, проявляючи таким чином протективну дію [199]. У клітинах, які не здатні використовувати кисень (наприклад, онкологічно змінені), ймовірно, наявність органічного германію

діє як кисневий «каталізатор» та чинить згубну дію, виявляючи, таким чином, терапевтичний ефект [198, 199].

На сьогоднішній день широко досліджується фармакокінетика та фармакодинаміка комплексних сполук германію з різними біолігандами, які синтезовані на кафедрі загальної хімії та полімерів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова під керівництвом проф. І.Й. Сейфулліної. У результаті проведених досліджень виявлено, що такі комплексні сполуки германію, як МІГУ-1 (з ніотиною кислотою), МІГУ-2 (з ніотинамідом), МІГУ-3 (з бурштиною кислотою) мають високу проєктивну активність за умов різних екстремальних кисневодефіцитних станів, зокрема таких, як гіпоксія замкнутого простору, гіпоксія на тлі перегріву, синдром тривалого розчавлювання, гостра церебральна ішемія, закрита черепно-мозкова травма, гостра інтоксикація динітрофенолами, токсичний лікарський гепатит, кардіодистрофія та ін. [13, 18, 200, 201, 203]. Крім того, ці сполуки продемонстрували анальгезуючу, протизапальну а також кардіовазотропну та детоксикуючу активність у експериментальних тварин [204, 205].

Протизапальний та гепатопротекторний ефекти були виявлені і у МІГУ-4 (сполука германію з ніотиною кислотою), МІГУ-5 (з ніотинамідом) та МІГУ-6 (з магнієм), які на тлі токсичного гепатиту реалізувались пригніченням пероксидації ліпідів, активації ферментів антирадикального захисту, запобіганням вмісту загального холестерину, зменшенню вмісту загальних фосфоліпідів, нормалізації коефіцієнту холестерин/фосфоліпід в мембранах еритроцитів і гепатоцитів. За силою мембранопротекторної дії ці сполуки розташовують таким чином МІГУ-4 > МІГУ-5 > МІГУ-6 [14, 206, 207]. Крім того, виявлено, що МІГУ-4, -5, -6 мають широкий нейротропний спектр дії, який включає анксиолітичну, седативну, протисудомну та адаптогенну види активності [19, 208, 209]. Як показано дослідженнями [208] за виразністю і широтою спектра протисудомної дії сполука МІГУ-5 значно перевищує

відповідні ефекти сполук МІГУ-4, і -6. Протисудомні ED_{50} на моделі МЕС для МІГУ-4, -5 та -6 відповідно складають: для щурів > 300 ; 78; і 191 мг/кг; для мишей > 300 ; 92 та і 164 мг/кг. На моделі пентиленететразолових судом ED_{50} для мишей складає > 200 ; 64,9; і 182 мг/кг відповідно. Захисний індекс (TD_{50}/ED_{50}) за цих умов для МІГУ-5 склав 1,7, що є відповідним такому для вальпроату натрію [19]. Ізоболографічний аналіз взаємодії сполуки МІГУ-5 із загальноприйнятими і новими протиепілептичними препаратами показав, що комбінації МІГУ-5 з фенітоїном, карбамазепіном і ламотриджином приводять до розвитку синергізму їх протисудомної дії, а в умовах сумісного застосування МІГУ-5 і вальпроату натрію, топірамату і габапентину відзначається просте підсумовування їх протисудомних ефектів. У жодній комбінації МІГУ-5 з протиепілептичними препаратами не відзначалося взаємодії за антагоністичним типом, а також посилення нейротоксичного ефекту препаратів у тесті «обертвого стрижня» [19, 208]. Дослідження довготривалого застосування МІГУ-5 курсом 14-ти днів дозою 45,0 мг/кг виявило, що ця сполука не змінює судомний поріг і не викликає розвитку толерантності, а припинення її введення не зумовлює виникнення синдрому віддачі. Щоденне введення МІГУ-5, перед тестуючою епілептогенною стимуляцією, затримує розвиток хімічного і електростимуляційного кіндлінгу, але має незначну протисудомну дію в умовах сформованого кіндлінгу [19]. Крім того, зниження, під впливом сполуки МІГУ-5, амплітуди популяційного спайка, який відображає моносинаптичну активацію пірамідних нейронів поля CA_1 гіпокампальних зрізів, а також додаткових популяційних спайків, зумовлених полісинаптичною активацією нейронів, дає можливість припустити, що МІГУ-5 потенціює як пряме, так і зворотне гальмування в системі колатералей Шафера [210].

Також виявлено, що в експериментальних умовах досліджувані комплексні сполуки германію під час їх системного введення демонструють

протипаркінсонічну дію, виразність якої залежить від способу моделювання паркінсонічного синдрому. Так, на моделі оксотреморин-викликаного тремору найбільш виразну дію має МІГУ-4, а на моделі резерпін-викликаного м'язової ригідності - МІГУ-6. Крім того, МІГУ-6 виявляв протипаркінсонічну дію на моделі каїнат-викликаного паркінсонічного синдрому, однак був менш ефективним на моделі 6-гідроксидофамін-викликаного синдрому [211].

Під час дослідження фармакокінетики комплексних сполук германію МІГУ -1, -2, -3, -4, -5, -6 встановлено, що всі вони швидко надходять у плазму та печінку щурів, пік концентрації германію визначається вже через 15 хв після їх внутрішньоочеревинного (в/очер) застосування, що може свідчити про їх здатність надходити у всі органи і тканини [15, 196]. За даними досліджень [193, 212] розподіл комплексних сполук германію в організмі щурів має особливості. Так, найбільший вміст германійорганічних сполук виявляється в нирках, найменший - у м'язах та жировій тканинах [212]. Швидкість елімінації таких сполук із органів і тканин залежить від їх хімічної структури і в основному відбувається нирками, причому час екскреції залежно від ліганду складає 48-96 год [213].

Під час дослідження токсичної дії біоорганічних сполук германію виявлено, що вони належать до класу малотоксичних речовин, що може бути пов'язано з порівняно високою інтенсивністю процесів їх біотрансформації та елімінації [214, 215]. За умов дослідження гострої токсичності під час в/очер введення виявлено, що ЛД₅₀ МІГУ-1 складає 1475; МІГУ-2 - 2100; МІГУ-3 - 2900; МІГУ-4 - 339; МІГУ-5 - 560; МІГУ-6 - 373 мг/кг. Результати досліджень токсичності за умов повторного введення, а також оцінки кумулятивних, місцевоподразнювальних і антигенних властивостей свідчать про низьку токсичність похідних оксіетилідендифосфонатогерманатів [214, 215].

Таким чином, наведені дані літератури свідчать про те, що перевагою класу германійорганічних сполук, поряд з широким спектром фармакологічної

дії є їх мало виражена токсичність та низька виразність побічних ефектів, що створює перспективи синтезу та пошуку нових речовин на основі германію і вивчення їх ефектів. А використання таких препаратів у раціональній політерапії епілепсії, можливо, дозволить досягти ефективніших терапевтичних результатів при відносно більш низьких дозуваннях синтетичних протиепілептичних препаратах і, відповідно, меншій виразності побічних ефектів.

Викладене стало передумовою для проведення досліджень щодо з'ясування нейротропних ефектів комплексних сполук на основі *біс*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманатів з літієм, натрієм та калієм (відповідно ксигерм-1, ксигерм-2 і ксигерм-3) та визначення їх перспективності для використання в якості протиепілептичних та психотропних засобів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Досліджувані сполуки

У проведених дослідженнях були використані нові комплексні сполуки германію - біс(μ -ксиларато)дигідроксодигерманати (IV) літію, натрію та калію $M_4[Ge_2(\mu\text{-Xylar})_2(OH)_2]\cdot 4H_2O$, $M = Li, Na, K$; H_5Xylar - ксиларова кислота (відповідно під робочими назвами ксигерм-1, ксигерм-2 і ксигерм-3) (рис. 2.1, 2.2, 2.3), які було розроблено та синтезовано співробітниками кафедри загальної хімії і полімерів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова під керівництвом професора І.Й. Сейфулліної [15, 216]:

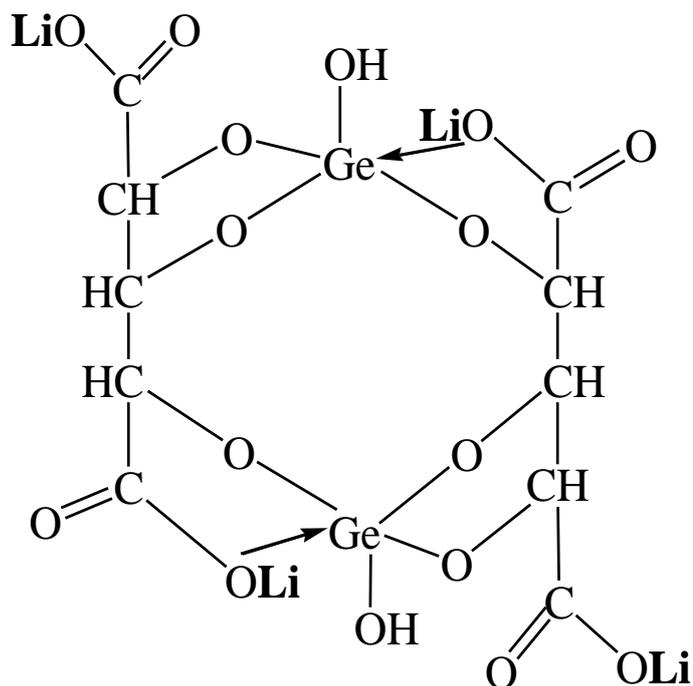


Рис. 2.1. Структурна формула біс(μ -ксиларато)дигідроксодигерманату (IV)



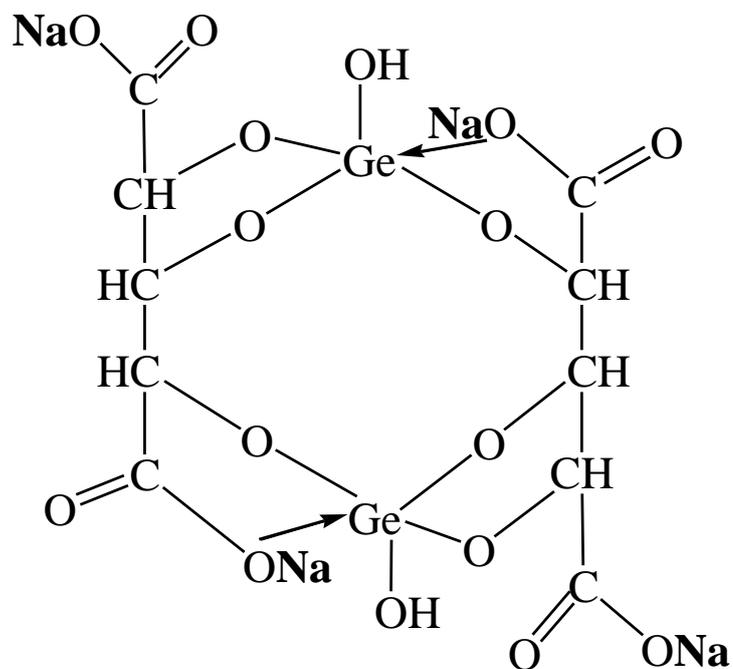


Рис. 2.2. Структурна формула *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманату (IV) натрію - $\text{Na}_4[\text{Ge}_2(\mu\text{-Xylar})_2(\text{OH})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Рис. 2.3. Структурна формула *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманату (IV) калію - $\text{K}_4[\text{Ge}_2(\mu\text{-Xylar})_2(\text{OH})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Усі сполуки – білі кристалічні порошки, без специфічного запаху, добре розчинні у воді з молярною масою, яка дорівнює для ксигерму-1, -2, -3 відповідно 705,2; 723,2 і 757,2 г/моль та вмістом германію 20,59; 20,08 і 19,18 %.

Під час дослідження загального нейрофармакологічного профілю нових сполук використовували 1/10, 1/20, 1/40 і 1/80 від доз, які визивали токсичні ефекти у 50 % тварин (ТД₅₀) (табл. 2.1) та були визначені за умов моделі «обертового стрижня» і відповідають дозам референс-препаратів. Вибір доз референс-препаратів ґрунтувався на даних літератури [37, 63, 190], в яких використовували зазначені дози для дослідження їх ефектів на поведінкові і функціональні показники у тварин, що дає можливість порівняти отримані нами дані з результатами інших авторів.

Таблиця 2.1

Дози комплексних сполук германію, які використані в роботі

Сполуки	Дози (мг/кг)			
	1/10 ТД ₅₀	1/20 ТД ₅₀	1/40 ТД ₅₀	1/80 ТД ₅₀
Ксигерм-1	2100,0	1050,0	525,0	265,0
Ксигерм-2	1680,0	840,0	420,0	210,0
Ксигерм-3	1120,0	560,0	280,0	140,0

2.2. Загальнонейрофармакологічні методи дослідження

Експериментальні дослідження проводили на 280 щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г та 210 білих мишах-самцях лінії СВА масою 18-26 г, які утримувалися у стандартних умовах експериментально-біологічної клініки ОНМедУ. З метою виключення впливу циркадних ритмів на ефекти препаратів усі експериментальні досліди проводилися в один і той самий час доби.

Досліди проводили згідно вимог GLP та комісії біоетики ОНМедУ (протокол №23а від 22 червня 2012 р.).

2.2.1. Вплив БАР на рухову активність тварин в умовах прямої актометрії та «відкритого поля»

Дослідження впливу нових комплексних сполук германію на загальну рухову активність здійснювали методом прямої актометрії [217]. Актометр – закритий бокс розміром 45x45x45 см із затемненим оглядовим склом, що має рухливу підлогу – платформу із закріпленим під ним сейсмодатчиком, коливання якого реєструвалися через підсилювач біопотенціалів ПБП 2/03 за допомогою програмного реверсного лічильника Ф 5264 і виводилися на друкувальний пристрій «Opteka» за допомогою транскриптора Ф 5255. Рухова активність реєструвалася кожні 15 хв протягом однієї години після введення сполуки, а потім визначалися середні показники.

Модель «відкритого поля» дозволяє досліджувати горизонтальну, вертикальну рухову активність, а також дослідницьку (число заглядань у «нірки»), та емоційні реакції (число болюсів, грумінг) [218]. Перед початком дослідження щура поміщали в скляний конус і через 30 с повільно зсаджували в центр відкритого поля і спостерігали протягом 2 хв. Фіксувалося число пересічених квадратів, вертикальних стійок, заглядань в отвори, а також число болюсів і грумінгів (умивань морди передніми лапами).

2.2.2. Оцінка сумісного введення БАР і загальноприйнятих збуджуючих і депримуєчих засобів

Спільне введення нових сполук і збуджуючих засобів (фенамін) досліджували на мишах за допомогою прямої актометрії і «відкритого поля» [218]. При цьому БАР вводили за 30 хв, а фенамін (амфетаміну сульфат, табл.

0,01 г, «Фармсинтез», Росія; 1,0 мг/кг) - за 10 хв до дослідження рухової активності.

Дослідження ефектів нових БАР в умовах введення депримуєчих (гексенал) засобів здійснювали в експериментах на мишах за методикою прямої актометрії [217]. Ксигерм-1, -2, -3 вводили за 30 хв, а гексенал (фл. 1,0 г, «Київ-медпрепарати», Україна; 20,0 мг/кг) за 15 хв до проведення актометрії. Оцінка впливу нових сполук на тривалість гексеналового сну здійснювали на мишах. Гексенал вводили дозою 50,0 мг/кг через 30 хв після введення БАР.

Реєстрували початок сну (втрата рефлексу перевертання) і момент пробудження (відновлення зазначеного рефлексу). Досліджували також число тварин, які засинали, після введення гексеналу меншою дозою - 30,0 мг/кг.

2.2.3. Вплив БАР на м'язову координацію мишей у тесті «обертового стрижня»

Оцінку впливу нових сполук на координацію рухів мишей здійснювали за допомогою тесту "обертового стрижня". Останній представляє собою стрижень діаметром 3 см зі швидкістю обертання 6 обертів за хвилину. Одночасно на стрижні знаходилось 8 мишей, відділених одна від одної перегородками. В експериментальну і контрольну групу відбиралися тварини, здатні утриматися на ньому протягом 2-х хв. Враховували число тварин, нездатних утриматися протягом 2-х хв на обертовому стрижні.

2.2.4. Оцінка ноотропної дії БАР за методом «водного лабіринту Мориса»

Прилад, запропонований вперше автором методу Р. Морисом (1984) [220], для оцінки просторової орієнтації і пам'яті (круглий басейн, заповнений непрозорою водою, в яку занурена невелика «безпечна платформа», невидима

твариною), надалі знайшов широке використання в різного роду нейрофармакологічних дослідженнях, пов'язаних з вивченням механізмів просторової орієнтації, пам'яті та виявлення способів медикаментозної дії на них. У літературі описано багато варіантів режиму експерименту на лабіринті Мориса. У даній роботі використовували модифікований варіант тесту Мориса за R. D'Hooge [219]. Експериментальна установка була представлена пластиковим басейном (70 x 55 x 60 см), який наповнювали водою висотою 25 см, тем-пературою 27-28 °С, забарвленою молоком. В один кут цього басейну поміщали безпечну платформу 7x7см, приховану на 2 см під воду, невидиму для тварин. Експеримент проводили за протоколом без попереднього ознайомлення тварини з установкою.

У день експерименту тварину поміщали в далекий від платформи кут, і реєстрували час знаходження нею платформи. Якщо протягом 60 с тварина платформу не знаходила, її поміщали туди вручну і залишали на 10 с. Для кожного щура проводили 5 повторних пред'явлень з інтервалом 15 хв. Через 10 днів тестування сліду пам'яті проводили за тією ж схемою, що і в 1-й дослідний день. Ноотропну активність, а саме вплив БАР на здатність до навчання і довготривалу пам'ять, оцінювали в 1-й і 10-й день відповідно, за зниженням латентного часу знаходження прихованої платформи [221].

2.2.5. Визначення антидепресантної активності БАР за методом «плавального тесту Порсолта»

Вивчення плавальної поведінки здійснювалося за методом, який був запропонований R. Porsolt [222]. Басейн для дослідження плавальної поведінки являв собою скляний циліндр висотою 45 см, діаметром 30 см, наповнений на 2/3 водою температурою 37°C. Метод полягав у спостереженні характеру плавання тварин протягом 6 хв після їх розміщення у басейні. Відразу після їх розміщення у воді протягом 2-4 хв у щурів виникали орієнтовно-дослідницькі

реакції, а також спроби вибратися з води, що являло собою, відповідно до представлень [223], поведінку, зумовлену зовнішніми стимулами або активно-адаптивну поведінку.

Протягом наступного періоду спостереження у тварин реєструвалися елементи плавальної поведінки пасивно-адаптивного характеру: плавання уздовж стінки, плавання колами удалині від стінки, “топання” води в центрі басейну - безладне перебирання лапами, не спрямоване на вихід з води, “топання” води, дотримуючись стінки, нерухоме занурення під воду з головою і “зависання” - нерухоме положення тварини без занурення. При оцінці пасивно-адаптивної плавальної поведінки визначали показник варіабельності - відсоткове відношення числа тварин, у яких спостерігалось 3 і більш пасивно-адаптивних поведінкових актів, до загального числа тварин у групі. Крім цього, визначали показник максимальної варіабельності - відсоткове відношення числа тварин, у яких спостерігалися усі 6 пасивно-адаптивних поведінкових акти, до загального числа тварин у групі. Поведінку, зумовлену зовнішніми стимулами, у тварин не оцінювали.

У завершальному тесті дослідження визначали інтенсивність зовнішнього подразнення, що викликало у тварини, переключення на активно-адаптивну поведінку та цілеспрямований завершений руховий акт. Для цього в басейн із водою опускали мотузку діаметром 1 см, фіксовану на Г-подібному кронштейні висотою 65 см. Ступінь контакту з мотузкою, яка була необхідна для виходу тварини з води, виражали в балах. А саме, тварина здійснює вихід з води після: 1) того як помітила мотузку (візуальний контакт) - 0 балів, 2) контакту з мотузкою кінчиком морди-1 бал, 3) контакту з мотузкою кінчиком морди і передніх лап -2 бали, 4) контакту з мотузкою кінчиком морди й усіма кінцівками -3 бали, 5) при контакті з мотузкою мордою, передніми і задніми кінцівками щур не здійснює вихід з води - 4 бали.

2.3. Вивчення протисудомної активності сполук

У роботі використовувалися моделі гострої і хронічної судомної активності, рекомендовані Міжнародною протиепілептичною лігою як скринінгові моделі для дослідження протисудомної дії: максимальних електрошокових судом (МЕС), 6-Гц судом і хімічно викликаних судом (пентиленететразол, пікротоксин, бікукулін, стрихнін, NMDA, каїнова кислота, пілокарпін, 4-амінопіридин), а також кіндлінгові моделі [116, 117, 151-162, 226, 227]. Протисудомну активність нових сполук проводили порівняно до стандартних протиепілептичних препаратів, які виявляють антиконвульсантний ефект на відповідних моделях судом: карбамазепін, леветирацетам, фенобарбітал, ламотриджин, вігабатрин виробництва «Sigma» (США), вальпроат натрію (конвулекс), діазепам (розчин для ін'єкцій 0,5 % по 2 мл, «Органіка», Росія).

2.3.1. Максимально електрошокові судоми

Тест МЕС викликають шляхом застосування надпорогової електричної стимуляції. Виявлено, що даний тест є ефективним для ідентифікації сполук, що пригнічують парціальні форми епілепсії, а також речовин, здатних обмежити поширення генералізованих клоніко-тонічних судом [157, 159, 228, 229].

На рогівку тварин попередньо перед аплікацією рогівкових електродів наносили 0,2 % лідокаїну гідрохлориду і 0,9 % розчину натрію хлориду. МЕС викликали шляхом транскорнеальної стимуляції надпороговим електричним струмом з фіксованими параметрами (50 Гц, 50,0 мА, 0,2 с - для мишей і 50 Гц, 150 мА, 0,2 с - для щурів), генерованим стимулятором ("Grass S-48", США). Реєстрували число тварин з наявністю або відсутністю тонічної екстензії задніх кінцівок. У всіх тварин контрольної групи (вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину) спостерігався розвиток тонічної екстензії задніх

кінцівок. Протисудомний ефект уважався досягнутим, якщо досліджувана речовина запобігала виникненню тонічної екстензії задніх кінцівок.

Для визначення порога МЕС також використовували транскорнеальну стимуляцію, використовуючи електричний струм з фіксованим опором і синусоїдними імпульсами (50 Гц, 0,2 с). Інтенсивність стимулів варіювали в діапазоні 0,06 log у напрямку збільшення або зменшення залежно від наявності або відсутності тонічної екстензії задніх кінцівок – найважливішого компоненту судом. Тварин для експериментальних досліджень використовували тільки одноразово. На цій моделі також визначали збереження антиконвульсантного ефекту найбільш активної протисудомної речовини (ксигерму-3), яка призначалась протягом 14 днів дозою 570,0 мг/кг. Для встановлення можливого механізму дії БАР використовували зворотній агоніст бензодіазепінових рецепторів FG 7142 («Sigma», США) дозою 40,0 мг/кг порівняно з діазепамом, який вводили дозами 5,0-20,0 мг/кг в/очер.

2.3.2. Судоми, викликані різними хемоконвульсантами

Хемоконвульсант пентиленететразол (ПТЗ, «Sigma», США) викликає поведінкові судоми, які суттєво відрізняються від МЕС [158-161]. ПТЗ розчиняли у 0,9 % розчині NaCl і вводили підшкірно (п/ш) дозами 70,0-100,0 мг/кг в об'ємі 0,01 мл/г маси тіла. Для індукції пентиленететразолових судом спочатку були визначені дози епілептогену, що викликають судоми в 97% мишей за допомогою методу Літчфільда-Вілкоксона [230, 231]. За умов п/ш введення ПТЗ ця доза для мишей становила 85,0 мг/кг. Після введення пентиленететразолу, зазначеною дозою, у мишей відмічалися такі стадії судомних реакцій, що виражались у балах: 1 - однократні або повторні міоклонічні здригання, 2 - повторні клонічні судоми передніх і/або задніх кінцівок тривалістю більше 3с без падіння тварини, 3 - генералізовані судоми з падінням тварини на бік, 4 - падіння з тонічними судомами передніх кінцівок, 5

- падіння з наступним розвитком тонічних судом передніх і задніх кінцівок [158, 158]. У тварин контрольної групи, із введенням або без введення фізіологічного розчину, судоми інтенсивністю до 3-х балів відзначалися в 9-10 тварин у групі, що включає 10 мишей. Число тварин з більш інтенсивними судомами варіювало. Для дослідження ефектів тестованих препаратів пентиленететразол вводили п/ш і проводили спостереження протягом 30 хв після введення ПТЗ. Тварини, у яких не відзначалися розвиток клонічних судом тривалістю 3 с (2 бали) або більш інтенсивні судомні реакції протягом 30 хв спостереження, вважались захищеними від судом [158, 161].

Для дослідження здатності речовин впливати на судомний поріг використовують в/в введення пентиленететразолу [160, 232]. З цією метою 0,5 % розчин ПТЗ у гепаринізованому розчині вводили у хвостову вену мишей зі швидкістю 0,34 мл/хв. Досліджувані речовини вводили в інтервали, відповідні до часу їх максимальної ефективності перед уведенням пентиленететразолу. Визначали латентний період перших судом тулуба і час появи клонічних судом передніх кінцівок.

Антагоністи ГАМК_A-рецепторів бікукулін, блокатор хлорних каналів пікротоксин, антагоніст гліцинових рецепторів стрихнін, агоніст NMDA глутаматних рецепторів, а також 4-амінопіридин (4-АМП) є потенційними індукторами судом. Пікротоксин («Sigma», США), бікукулін («Sigma», США) розчиняли у 0,9 % розчині NaCl і вводили в/очер в об'ємі 0,01 мл/г маси тіла мишам. Також як і пентиленететразол, хемоконвульсанти пікротоксин, бікукулін, стрихнін («Sigma», США), 4-АМП («Sigma», США) вводили мишам дозами, що викликали судоми в 97 % тварин і становили 2,7; 2,5, 1,2, 0,01 мг/кг відповідно. Як критерії протисудомної дії БАР, на моделях пікротоксин- і бікукулін-викликаних судом була прийнята відсутність клонічних судом інтенсивністю 2 бали (описаних для пентиленететразолу), а на моделі стрихнін-індукованих судом - відсутність у тварин тонічних судомних реакцій протягом 30 хв після введення епілептогенів.

Активация рецепторів N-метил-D-аспартату (NMDA) у ЦНС бере участь у численних процесах нейрональної сигналізації і передачі порушення. Виявлено, що антагоністи NMDA-рецепторів блокують або гальмують судомну активність у щурів і мишей, що свідчить про участь активації NMDA-рецепторів в епілептогенезі [88, 89, 90, 233]. Агоніст збудливих амінокислот-NMDA вводили в шлуночок головного мозку (в/шл) [234, 235]. У відносно низьких дозах NMDA спричинює розвиток інтенсивних клонічних судом, а при збільшенні дози NMDA розвиваються тонічні екстензії. Для індукції клонічних і тонічних судом у 97 % мишей використовували NMDA відповідно дозою 0,2 нг/5 мкл і 3,0 нг/5 мкл [235]. Також щурам вводили каїнову кислоту («Sigma», США) п/ш дозою 13,2 мг/кг, що викликало судоми у 97 % тварин. З метою зменшення гіперсекреції і салівації щурам вводили попередньо метилскополамін («Sigma», США) дозою 1,0 мг/кг п/ш за 30 хв до ін'єкції пілокарпіну гідрохлориду («Sigma», США). Останній застосовували дозою 380,0 мг/кг в/очер, яка викликала судоми інтенсивністю 3-5 балів у 97 % тварин [236]. Після введення сполук тварин спостерігали протягом 2-х год і реєстрували судоми за шкалою Racine [237]: 0 - відсутність судом, 1 бал - стереотипні рухи, миготіння повік або міофасціальний клонус, 2 бали - кивання голови або обертальні фасціальні клонуси, 3 бали - міоклонічні здригування передніх кінцівок, 4 бали - клонуси передніх кінцівок з підйомом на задні кінцівки, 5 балів - генералізовані клонічні судоми з падінням на бік.

2.3.3. Модель аудіогенних судом

Досліди проведено на мишах лінії СВА масою 8-10 г, віком 22-24 дні. Тварин розміщали в індивідуальний пластиковий циліндр, діаметром 19 см, висотою 18 см з кришкою, що щільно закривалася, в якому знаходився електричний дзвінок, що генерував стимул 110 дБ (12 кГц) протягом 60 с [124, 238]. Тяжкість судомних реакцій виражали в балах, прийнявши таку

класифікацію [238]: 0 - відсутність проявів, 1 - біг по колу тривалістю менше 10 с, 2 - біг по колу тривалістю більше 10 с, 3 - клонічні судоми, 4 - екстензія передніх кінцівок/флексія задніх кінцівок, 5 - тонічні судоми, 6 - зупинка дихання.

2.3.4. Модель 6-Гц-викликаних судом

Короткочасна низькочастотна електрична стимуляція мозку викликає психомоторні судоми у мишей, що моделюють відповідні напади у пацієнтів з парціальною епілепсією. Вважається, що препарати, здатні захистити від даного типу судом, можуть бути ефективними протягом фармакорезистентних форм парціальної епілепсії [116].

Ця модель судомних реакцій у мишей запропонована як модель фармакорезистентних судом, стійких до дії класичних і нових ПЕП [3, 5, 58, 116, 164, 167]. Модель 6-Гц-викликаних судом викликали за допомогою транскорнеальної стимуляції електричним струмом (частотою 6 Гц, силою 32 мА і тривалістю 0,2 мс прямокутними стимулами протягом 3 с). Як генеруючий стимулятор використовували “Grass S 48” (США), попередньо наносячи на рогівку 0,2 % лідокаїн і 0,9 % розчин натрію хлориду («Київ-медпрепарати», Україна). Типові судоми характеризуються мінімальними клонічними судомами, які мають місце після стереотипних автоматизмів. Вважають, що останні відповідають аурі пацієнтів з парціальною епілепсією [30, 116]. Реєстрували число мишей з наявністю або відсутністю судом, число завмирань, клонусів передніх кінцівок, тремтінням вібрис або тонуусу хвоста і загальну тривалість судом. Тварини у яких не реєструвались побічні поведінкові порушення вважались захищеними. Усі препарати порівняння вводили в/очер об'ємом 0,2 мл на 20 г маси тіла (карбамазепін («Sigma», США)

і вальпроат натрію («Конвулекс» розчин для ін'єкцій, ампл. 100 мг/мл по 5 мл, Герот Фармацевтика ГмбХ, Австрія) - за 15 хв, ламотриджин («Sigma», США) - за 30 хв, габапентин («Sigma», США) - за 60 хв, фенітоїн («Sigma», США) і топірамат («Sigma», США) - за 120 хв до тестування). Час тестування ґрунтувався на даних про пік їх протисудомної активності, описаної в літературі [116]. Тваринам контрольної групи в/очер вводили аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Контрольна група включала не менше 10-ти тварин.

2.3.5. Модель пентиленететразолового кіндлінгу

Незважаючи на наявність багатьох протиепілептичних препаратів, які демонструють протисудомну дію, залишається висока потреба в препаратах, здатних взаємодіяти з патогенетичними механізмами, що лежать в основі розвитку епілепсії [3, 47, 73, 107]. Кіндлінг є однією з найважливіших моделей адекватних цій меті та дозволяє оцінювати протиепілептогенний і протисудомний потенціал речовин [113, 155, 162]. За умов моделі кіндлінгу судоми викликають за допомогою спочатку субконвульсивних електричних або хімічних стимулів, кульмінацією яких є генералізовані напади. Зниження інтенсивності судом з максимальних (5 балів) до 3 балів без істотного впливу на тривалість судомного післярозряду вказує на те, що досліджуваний препарат може бути ефективним проти вторинно-генералізованих судом, при цьому не впливаючи на фокальні судоми. Більш виражена протисудомна дія (з 5 до 1 балу і менше), що сполучається з гальмуванням судомного післярозряду дозволяє припустити його ефективність відносно осередкових форм епілепсії [145, 151].

Кіндлінг у мишей і щурів викликали шляхом щоденного в/очер введення пентиленететразолу підпороговою дозою 30,0 мг/кг до формування генералізованих клонічних судомних нападів. Судоми виражали в балах, прийнявши таку шкалу [239]: 0 балів - відсутність судом, 1 бал - міоклонічні

здригування голови, 2 бали - клонічні судоми передніх кінцівок, 3 бали - піднімання на задні лапи (поза “кенгуру”) або повторні (більше 4 с) клонічні судоми, 4 бали - клоніко-тонічні судоми з падінням тварини на бік, 5 балів - багаторазові повторні клоніко-тонічні судомні напади або смертельні судоми. Досліджувані комплексні сполуки германію вводили за 30 хв до введення тестованої дози пентиленететразолу. Кіндлінгова модель дозволяє досліджувати ефекти БАР як на сформовані кіндлінгові судоми, так і на розвиток кіндлінгу. В останньому випадку досліджувані БАР вводили перед кожною ін'єкцією пентиленететразолу.

2.3.6. Модель електростимуляційного кіндлінгу

Операційна підготовка тварин до формування амігдалярного кіндлінгу включала імплантацію ніхромових електродів діаметром 0,25 мм у скляній ізоляції, за винятком кінчика, у структури мозку за наступними координатами стереотаксичного атласу G. Paxinos and C. Watson [240] білатерально в латеральне гіпоталамічне ядро (AP = 2,5 мм назад від брегми, L = 1,8 мм латерально від сагітального шва, H = 8,5 мм від поверхні черепа). Вживлення електродів у мозок щурам здійснювали під гексеналовим («Київ-медпрепарати», Україна) наркозом (20,0 мг/кг) за допомогою стереотаксичного апарату Ковача (Угорщина). Щурів фіксували в стереотаксичному апараті, робили розріз м'яких тканин голови і за допомогою бормашини свердлили трепанаційні отвори у кістках черепа. Після введення електродів їх фіксували до кісток черепа зубним цементом і швидкотвердіючою зубною пластмасою. Індиферентний електрод закріплювали на черепі щура. Після закінчення експериментів проводили морфологічний контроль локалізації кінчиків електродів.

Модель кореального кіндлінгу у щурів, яка розроблена як альтернативна модель фокального електростимуляційного кіндлінгу, на сьогоднішній день

входить до Програми розробки протисудомних речовин Національним інститутом здоров'я (США) [63, 151]. Разом з тим, відносно велика маса тіла щурів обмежує використання на початкових етапах скринінгу нових сполук, тому що часто синтезується лише їх незначна кількість [241]. Останні автори опублікували неінвазивну модель корнеального кіндлінгу у мишей лінії NMRI і охарактеризували її як досить чутливу і валідну скринінгову модель для оцінки ефективності та побічних ефектів нових сполук [241]. Надалі Н. Potscka, W. Löscher [242] підтвердили їх дані і виявили, що модель корнеального кіндлінгу в мишей може служити рівноцінною моделлю замість фокального електростимуляційного кіндлінгу щонайменше на початкових етапах скринінгу нових сполук.

Кіндлінг у мишей викликали за допомогою транскорнеальної стимуляції (3 мА, 50 Гц, 3 с). Спочатку електростимуляції здійснювали 2 рази на день з інтервалом у 6 год. Як правило, для досягнення першого судомного нападу інтенсивністю у 3 бали, необхідна була стимуляція протягом 5-ти днів, потім електростимуляції тривали одноразово або двічі на день до досягнення судом інтенсивністю 3-4 бали послідовно протягом 10-12 днів. Інтенсивність судом виражали в балах, прийнявши таку класифікацію: 1 бал - міофасціальні здригування, 2 - те саме плюс клонуси голови, жування; 3 - те саме плюс клонічні судоми однієї з передніх кінцівок, 4 - те саме плюс білатеральний клонус кінцівок і піднімання на задні лапи (поза «кенгуру»), 5 - те саме плюс падіння на бік, 6 балів - тонічна екстензія задніх кінцівок [237]. Кіндлінг вважали за сформований після реєстрації чотирьох послідовних генералізованих нападів. Запобігання генералізованих судом під впливом досліджуваних сполук використовувалося як критерій протисудомної дії цих сполук.

2.4. Приготування зрізів гіпокампу і реєстрація їх електричної активності

Мишей декапітували в умовах глибокого ефірного наркозу, використовуючи етамінал натрію, і видаляли шкіру, що покривала тім'яну частину черепа. Уздовж сагітального шва черепа очними ножицями робили розріз, видаляли кістки черепа і швидко відокремлювали мозок. За допомогою невеликого леза, закріпленого в утримувачі, робили розріз тканин мозку, що проходив під кутом 30% до середньої лінії. Ліва половина розрізаного на дві частини мозку видалялася. На перетині частини мозку, що залишилася, ідентифікували гіпокамп, кору півкуль відсували і від гіпокампу паралельно первісному розрізу відсікали кілька шарів тканини. У результаті отримували 2-3 поперечних зрізи гіпокампу, які в міру виготовлення переносили в камеру для інкубації і дослідження. Оптимальними є зрізи гіпокампу товщиною 0,2-0,3 мм. Життєздатність зрізів гіпокампу значною мірою залежала від тривалості часу між декапітацією і вміщенням зрізу в інкубаційну камеру. Час виготовлення зрізу за описаною методикою становив близько 1,0-1,5 хв. Тривалість життя зрізів залежала також від ступеня пошкодження тканини, умов інкубації й у середньому становила 6-7 год. Реєстрацію викликаних потенціалів (ВП) починали через одну годину після приготування зрізу і продовжували протягом 5-6 год.

Відведення електричної активності зрізів гіпокампу здійснювали за допомогою скляних мікроелектродів, що самозаповнюються, які виготовлялися безпосередньо перед дослідом. Електроди заповнювали розчином Yamamoto [243] і поміщали в шар пірамідних нейронів поля CA₁. У період реєстрації сумарної активності їхній опір становив 1-5 МОм при діаметрі кінчика електрода 0,1 мм. Для стимуляції використовували скляні біполярні електроди з опором близько 2 МОм. Як індиферентний електрод використовували хлорований срібний дріт, який поміщали в реєстраційну камеру. Перфузуюче середовище подавалося в робочий об'єм камери під дією перепаду висот між умістищем, де воно знаходилось, і власне камерою. Швидкість потоку становила 0,5-1 мл/хв і регулювалася дроселюванням з'єднувальної трубки з

використанням перистальтичного насоса НП-3. Об'єм камери і сполучної трубки становив 3 мл і зміна середовища в камері відбувалася протягом приблизно 3 хв. У середину камери вміщували нейлонову сітку, натягнуту за допомогою двох концентричних титанових кілець. Підігрів системи здійснювали спіраллю, намотаною на скляну з'єднувальну трубку і приєднаною до універсального джерела живлення. Вимірювання температури проводили за допомогою термоопору МТ-04, увімкненого за мостовою схемою з індикацією на стрілочному гальванометрі.

Як перфузуюче середовище використовували сольовий розчин Yamamoto [243]. Перед використанням розчин насичували газовою сумішшю 95 % O_2 і 5,0% CO_2 до рівня рН середовища 7.2-7.4. Спочатку зрізи гіпокампу поміщали в розчин кімнатної температури, а потім омиваючий розчин підігрівали до 33-34 °С. Подальше підвищення температури перфузуючого середовища погіршувало життєдіяльність зрізу, тоді як зниження температури не мало істотного впливу на стан зрізу.

У період реєстрації сумарної електричної активності зріз фіксували до сітки стимулюючими електродами. При цьому рівень розчину підтримувався на 0,2-0,3 мм вище поверхні зрізу. Для дослідження електричної активності зрізів гіпокампу використовували біполярне подразнення тканини. Електроди поміщали в радіальний шар, де проходять колатералі Шафера, які представляють собою аксони нейронів поля СА3, що йдуть до нейронів СА₁. Електричний імпульс подавався на стимулюючі електроди через ізольовану радіочастотну приставку.

Фокальний потенціал гіпокампу являє собою позитивну хвилю з накладанням на неї негативного відхилення - популяційного спайка, що відбиває синхронний розряд пірамідних нейронів. Популяційний спайк є показником реактивності пірамідних нейронів. Досліди починали з дослідження змін ВП під впливом поступово наростаючого стимулюючого струму (від 2 до 50 мкА). З цією метою застосовували серії різних стимулів (3

стимули в серії, частота 0,3 Гц, інтервал між серіями 10 с). Потім параметри стимуляції підбирали таким чином, щоб викликати появу одного популяційного спайка, амплітуда якого залишалася б незмінною протягом декількох серій контрольних тестувань (частота стимуляції 0,1 Гц, 10 імпульсів у серії, інтервал між серіями 5 хв). Другим етапом дослідження було визначення характеру змін фокальних відповідей на дію досліджуваних БАР. З цією метою до омиваючого розчину додавали спочатку 4-амінопіридин («Sigma», США) [244] і досліджували активність протягом 15-20 хв, а потім додавали розчини нових БАР, фенітоїну («Sigma», США), карбамазепіну («Sigma», США), вальпроату натрію («Конвулекс» розчин для ін'єкцій, амплітуда 100 мг/мл по 5 мл, Герот Фармацевтика ГмбХ, Австрія), кромакаліну («Sigma», США), приготовлені на середовищі, що використовується для інкубації. Електричну активність зрізів гіпокампу реєстрували протягом 40-60 хв. Час підведення речовин варіював залежно від того, як швидко розбудовувалися зміни контрольної відповіді під впливом підведеної речовини. Потім досліджуваний розчин заміняли на контрольний і відмивали препарат доти, поки амплітуда викликаної відповіді не ставала рівною висхідному контрольному рівню. Час, протягом якого амплітуда ВП верталася до контрольного рівня, називався часом відмиву.

Комп'ютерну обробку даних здійснювали за допомогою АЦП Lab PC і оригінальної програми, розробленої за допомогою пакета Lab View [245].

2.5. Ізоболографічний аналіз взаємодії сполук

Факт зміни сили і характеру дії ліків при їх спільному застосуванні відомий досить давно. Також давно з'явилася і термінологія, що описує ці зміни. Нині про сумачію впливу йдеться, якщо дія комбінації речовин дорівнює сумі їх ефектів при роздільному введенні, про потенціювання - якщо дія комбінації речовин перевищує суму їх роздільних ефектів, і про антагонізм

- якщо ефект суміші менше, ніж сума ефектів її компонентів. Існують різні підходи до дослідження ефектів препаратів за умов їх спільного введення. Наприклад, дослідження судомних порогів за умов їх роздільного і комбінованого введення або дослідженні впливу протиепілептичних препаратів на латентний період або тяжкість судомних реакцій [64].

Іншим, більш сучасним підходом є ізоболографічний аналіз. Для графічного подання дії комбінацій фармакологічно активних речовин використовується метод ізобольних діаграм. Він полягає в наступному: на осі координат відкладаються в однаковому масштабі рівні частки речовин X і Y від тих, що дають реєстрований ефект, прийнятий у цьому випадку за 100 %. За формою отриманої кривої видається можливим судити про характер взаємодії речовин. У деяких випадках при дослідженні комбінації не двох, а трьох речовин, вдаються до побудови тривимірних ізобол [246].

Комбінована дія двох речовин з однаковим типом дії часто описується парами доз, які забезпечують фіксований ефект звичайно 50 %, які також називаються ED_{50} ізоболами. Однак на додаток до шкал доз у таких схемах у багатьох випадках пропонуються і шкали ефектів, щоб за можливості показати ефект певних доз, наприклад ED_{30} . На практиці незалежна ізобола для 50 %-го ефекту проходить через точку, утворену ED_{30} речовин A і B в ED_{50} ізоболах. Таким чином, ED_{30} є точкою перегину незалежної ізоболі в ED_{50} ізоболограмах [246].

Під час математичного опису результатів взаємодії декількох фармакологічних агентів необхідно враховувати, що підсумовування ефектів може відбуватися відповідно до двох основних механізмів. По-перше, фармакологічні агенти можуть діяти паралельно в тому самому місці, і тоді в опису залежності доза-ефект суміші мають бути введені змінні, що описують взаємний вплив речовин. По-друге, фармакологічні агенти можуть чинити дію на різні ланки в ланцюгу реакцій, які приводять до формування ефекту. У цьому випадку вплив другого агента містить у собі результати впливу першого

як фонові значення. Математичні залежності, отримувані під час опису обох типів взаємодії, мають бути адаптовані до експериментальних даних за допомогою нелінійного регресивного аналізу або аналізу методом максимальної псевдоподібності. Такий аналіз може проводитися тільки на підставі форми і властивостей ізобольної кривої, і при цьому давати повні і добре інтерпретовані результати, незважаючи на наявність розкиду експериментальних даних, невідомих параметрів впливу лігандів на рецепторну систему і статистичної помилки. Нині ізоболографічний аналіз застосовується для дослідження комбінованої дії фізіологічно активних речовин або впливу речовини на організм у присутності різних зовнішніх факторів, таких як, наприклад, радіоактивне опромінення. За даними С. Deckers et al. [247], ізоболографічний аналіз є найоптимальнішим методом для дослідження типів взаємодії протиепілептичних препаратів. Для нових сполук, що мають протисудомну дію, це має важливе значення ще й тому, що нові препарати, особливо на початку їх випробування, застосовуються лише як додаткові засоби до основної протисудомної терапії, що проводиться.

Ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 з протиепілептичними препаратами здійснювали відповідно до методики, описаної Tallarida R.J. et al. [248, 249]. Для з'ясування типу взаємодії використовували 3 фіксовані співвідношення доз компонентів 1:3, 1:1 і 3:1 на моделі 6-Гц-індукованих судом. Для графічного подання типу взаємодії ксигерму-3 з протиепілептичними препаратами використовували метод ізобольних діаграм, який полягає в наступному: на осі координат, в однаковому масштабі, відкладаються рівні частки речовин X і Y, що дають відповідний реєстрований ефект, прийнятий за 100 %. Лінія, що з'єднує 50 % ефекти кожної з пар досліджуваних препаратів, відображає ефекти в умовах їх роздільного введення на моделі 6-Гц-викликаних судом. Якщо експериментально встановлені точки, що відображають комбіновану дію двох речовин у фіксованих співвідношеннях, розташовуються на цій лінії, то це відповідає

сумації їх дії, якщо значно нижче або вище цієї лінії, то вони відбивають, відповідно, потенціювання або антагонізм. Крім того, визначали індекс взаємодії для різних фіксованих співвідношень між двома речовинами, який представляв співвідношення $ED_{50 \text{ експ.}} / ED_{50 \text{ теорет.}}$. Цей індекс відображає ступінь і силу взаємодії двох речовин. Якщо він менше 0,7, то це вказує на потенціювання, якщо дорівнює 1,0 - сумацію їх дії, а якщо більше 1,3, то речовини X і Y проявляють антагоністичну взаємодію [248].

2.6. Вивчення антипсихотичної дії сполук

Синдром стереотипної поведінки у тварин розглядається як еквівалентна за рядом патогенетичних механізмів модель параноїчної форми шизофренії [250]. Така обставина дозволяє використовувати даний синдром як експериментальну модель для дослідження ефектів існуючих психофармакологічних препаратів, так і скринінгу нових сполук, які мають антипсихотичну активність [250].

У наших дослідженнях ми використовували дві моделі синдрому стереотипної поведінки: амфетамінову та шляхом формування генераторів патологічного збудження (ГПЗ) у розтральній частині головки обох хвостатих ядер [251]. Для відтворення першої моделі вводили амфетаміну сульфат («Фармсинтез», Росія) дозою 10,0 мг/кг в/очер. ГПЗ формували шляхом введення пікротоксину («Sigma», США) білатерально за допомогою заздалегідь імплантованих мікроканюль. Канюлі вживляли під гексеналовим наркозом дозою 20,0 мг/кг за координатами стереотаксичного атласу (AP 2,0-2,2; L 2,5-2,8; H 3,8-4,5) [240]. Після введення амфетаміну сульфату і конвульсанту тварин розміщали в індивідуальній клітці. Стереотипію оцінювали візуально. Інтенсивність стереотипної поведінки виражали в балах за прийнятою шкалою [250, 251]: 0 - відсутність поведінкових та локомоторних проявів, 1 - локомоторні компоненти поведінки, 2 - довготривалі жувальні

рухи, 3 - пошукові рухи морди, 4 - пошукові рухи, які супроводжувались інтенсивним обнюхуванням простору клітки, 5 - облизування та гризіння полу та стінок клітки. Вираженість ефектів досліджуваних речовин оцінювали, розраховуючи індекс ефективності (ІЕ) за формулою $IE = (C_1 - C_2) \times T$, де C_1 - вихідна виразність стереотипної поведінки, C_2 - інтенсивність стереотипії після введення БАР, T - час (у хв) протягом якого спостерігалось C_2 [250]. Усі сполуки вводили об'ємом 0,25 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. В якості референс-препаратів використовували нормотимік літію хлорид («Фармсинтез», Росія) і антипсихотик галоперидол (розчин для ін'єкцій 5 мг/1 мл в амп.; «Gedeon Richter», Угорщина), які вводили в/очер дозами 100,0-500,0 мг/кг і 0,2-1,0 мг/кг відповідно. Виведення тварин із дослідження проводили шляхом передозування гексеналу дозою 150,0 мг/кг (фл. 1,0 г, «Київ-медпрепарати», Україна).

Модель самостимуляції мозку (СМ) є однією з широко використовуваних моделей, яка дозволяє об'єктивно дослідити мотиваційні стани у тварин та адекватно оцінити вплив препаратів як посилюючих, так і гальмуючих підкріплюючий ефект [252, 253]. Суть формування моделі полягає в тому, що тварини через вживлені в мозок електроди, прагнуть до повторного подразнення власного мозку [253]. Дана поведінкова парадигма ґрунтується на відкритті Олдса і Мілнера [252], які показали, що щури шляхом повторного натискання на педаль викликають стимуляцію специфічних компонентів мозкової системи підкріплення чи винагороди. Результати досліджень підтвердили адекватність моделі СМ для дослідження ефектів препаратів як посилюючих, так і гальмуючих підкріплюючий ефект [254]. Показано, що психостимулятори викликають полегшення поведінкових реакцій СМ [255], що вказує на гіперактивність мозкової системи винагороди. Вважають, що ці ефекти певною мірою відповідають симптомам підвищеного настрою і гедонічних мотивацій, які спостерігаються у пацієнтів з біполярними розладами [256, 257]. Вживлення електродів у мозок щурам здійснювали під

гексеналовим наркозом (20,0 мг/кг) за допомогою стереотаксичного апарату. Білатерально в латеральне гіпоталамічне ядро вживляли ніхромові монополярні електроди діаметром 0,25 мм у скляній ізоляції за винятком кінчика за наступними координатами: AP = 2,5 мм назад від брегми, L = 1,8 мм латерально від сагітального шва, H = 8,5 мм від поверхні черепа згідно атласу Paxinos, Watson [240]. Індиферентний електрод з ніхромового дроту закріплювали на черепі щура. Електроди фіксували на черепі тварини за допомогою самотвердіючої пластмаси. Після закінчення експериментів проводили морфологічний контроль локалізації кінчиків електродів. Через 7-10 днів після операції щурів навчали натискати на педаль для здійснення електричного подразнення мозку у відповідності до методики [252]. Кожне натискання на педаль забезпечувало включення стимулятора постійного струму (прямокутні імпульси негативної полярності, тривалістю 0,1 мс з частотою 100 Гц, протягом 0,5 с, порогові значення струму у режимі «фіксованих пачок»). Для повторного подразнення тварина була змушена знову натискати на педаль. Частота і тривалість натискань реєструвалася автоматично. Виразність ефектів самостимуляції оцінювали шляхом аналізу частоти натискання на педаль і порогу самоподразнення [255]. Дослідження ефектів тестованих сполук починали, коли значення середнього порогу самостимуляції варіювали менш ніж на 10 % протягом трьох послідовних сеансів СМ.

У першій серії експериментів досліджували вплив ксигерму-1, літію хлориду («Фармсинтез», Росія), вальпроату натрію («Конвулекс» розчин для ін'єкцій, амп. 100 мг/мл по 5 мл, Герот Фармацевтика ГмбХ, Австрія), а також поєднаного застосування ксигерму-1 і вальпроату натрію на виразність реакції СМ. З цією метою тваринам (по 6 щурів у кожній групі) вводили ксигерм-1 дозами 265,0; 525,0; 1050,0 і 2100,0 мг/кг, вальпроат натрію 30,0; 100,0; 200,0 і 300,0 мг/кг, літію хлорид 25,0; 50,0; 100,0 і 200,0 мг/кг. Усі сполуки вводили в/очер. У другій серії експерименту досліджували вплив ксигерму-1, літію

хлориду, вальпроату натрію на амфетамін-індуковане посилення реакції самостимуляції. Реєстрацію реакції СМ починали за 5 хв після введення 0,5 мг/кг амфетаміну сульфату (табл. 0,01 г, «Фармсинтез», Росія; 1,0 мг/кг). Порівнювали показники до і після дослідження сполук. Їх вплив на величину порога і частоту СМ визначали за методом ANOVA, достовірність відмінностей - з використанням t-критерію Фішера. Виведення тварин з експерименту здійснювали шляхом передозування гексеналу дозою 150,0 мг/кг («Дарниця», Україна).

2.7. Статистичні методи дослідження

Статистичний аналіз отриманих даних здійснювали відповідно до алгоритмів, представлених Tallarida et al. [248, 249]. Застосовували такі тести: для інтервальних шкал 1-варіантну АНОВу з пост-хок тестом Ньюмана-Кулза [258], для одинарних шкал - ранговий метод Вілкоксона [230, 231], тест Крушквал-Валіса [259] з пост-хок тестом Манн-Уїтні [260].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за методикою середньої арифметичної і середньої квадратичної помилки за критерієм достовірності Стьюдента [261]:

$$M = \sum x_{1,n} / n \quad (2.1)$$

$$m = \pm \sqrt{\sum (x_n - M^2) / (n-1) n} \quad (2.2)$$

Довірчий інтервал у всіх дослідах розраховували при рівні значимості $P \leq 0,05$, що гарантує достовірність результату з імовірністю 0,95.

Розрахунок середньоєфективної дози ED₅₀ здійснювали за допомогою комп'ютерної програми пробіт-аналізу Літчфілда і Вілкоксона [230, 231], використовуючи результати досліджень різних доз БАР не менше, ніж у трьох групах мишей по 10 тварин у групі.

$ED_{50\text{теорет}}$ і його стандартну помилку середнього (SEM) розраховували з рівнянь, описаних Tallarida et al [258, 259]. $ED_{50\text{ теорет}}$ можна виразити в такий спосіб:

$$(ED_{50})_{\text{теорет}} = f_1 \times (ED_{50})_{\text{препарат1}} + f_2 \times (ED_{50})_{\text{препарат2}}, \quad (2.3)$$

де f_1 - співвідношення препарату 1 у загальній кількості суміші, f_2 - відповідно, співвідношення препарату 2. Для співвідношень суміші повинна виконуватися умова: $f_1 + f_2 = 1$.

Співвідношення можуть бути виражені у відсотках, тоді, наприклад, для співвідношення 1:3 рівняння матиме такий вигляд:

$$25 \% \text{ від } (ED_{50})_{\text{теорет}} + 75 \% \text{ від } (ED_{50})_{\text{препарату2}} = 100 \% (ED_{50})_{\text{теорет}}, \quad (2.4)$$

Очевидно, що $f_1 = 1/4 \leftrightarrow 0,25$ і $f_2 = 3/4 \leftrightarrow 0,75$. Дотримуючись рівнянь Tallarida et al. [258, 259], можна розрахувати:

$$V(ED_{50})_{\text{теорет}} = (f_1)^2 \times V(ED_{50})_{\text{препарат1}} + (1-f_1) \times V(ED_{50})_{\text{препарат2}}, \quad (2.5)$$

де V - відповідно середньоквадратичне відхилення (СКВ) кожного препарату. Зі СКВ можна розрахувати SEM відповідно:

$$[SEM(ED_{50})_{\text{теорет}}]^2 = V(ED_{50})_{\text{теорет}}, \quad (2.6)$$

або інакше записавши:

$$SEM(ED_{50})_{\text{теорет}} = \text{sqrt}[V (ED_{50})_{\text{теорет}}], \quad (2.7)$$

Де SEM - стандартна помилка середнього відповідного значення ED_{50} , і sqrt - квадратний корінь виразу в дужках. Залежність $SEM(ED_{50})$ від ED_{50} можна описати таким рівнянням:

$$SEM(ED_{50}) = 2,3 \times (ED_{50}) \times SEM[\log_{10}(ED_{50})] \quad (2.8)$$

Для обробки використовували стандартні пакети програм "Статистична аналітична система (SAS)" (Primer Biostatics, США).

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГАЛЬНОЇ НЕЙРОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ
КСИЛАРАТНИХ СПОЛУК ГЕРМАНІЮ У ІНТАКТНИХ ТВАРИН3.1. Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на загальну рухову активність у тесті
прямої актометрії

З метою визначення можливої нейротропної дії нових ксиларатних сполук германію (IV) - ксигерму-1, -2, -3 у першій серії експериментів нами досліджувався вплив цих сполук на загальну рухову активність мишей за допомогою тесту прямої актометрії. Тварини як контрольної, так і дослідних груп після розміщення їх в актометрі вільно переміщалися платформою приладу, піднімалися на задні лапи, обнюхували і розглядали простір камери. Досліджувані показники, що були зареєстровані у мишей, наведені у табл. 3.1. Як видно з даних таблиці, протягом однієї години спостереження після введення досліджуваних сполук, ксигерм-2 у всіх досліджуваних дозах достовірно не впливав на рухову активність мишей. Сполука ксигерм-3 викликала зниження рухової активності в усіх проміжках часу спостереження дозами 560,0 і 1120,0 мг/кг. За цих умов максимальне зниження, більше ніж на 64 %, спостерігалось на 60-й хв за умов введення 1120,0 мг/кг ксигерму-3 (див. табл. 3.1). Дозами 265,0 і 525,0 мг/кг ксигерм-1 не впливав на рухову активність мишей. Збільшення дози ксигерму-1 до 1050,0 мг/кг привело до посилення рухової активності в кожному часовому проміжку. За цих умов максимум підвищення активності - на 28 % спостерігалось під час введення ксигерму-1 дозою 2100,0 мг/кг на 45-й хв і тривало протягом наступних інтервалів спостереження (див. табл. 3.1).

Таким чином, ксигерм -1, 2, 3 дозами, що становлять 1/80 і 1/40 ТД₅₀, не мали достовірного впливу на загальну рухову активність у тесті актометрії. Найбільш виражені ефекти сполук були на 45-й хв після їх введення дозами

1/20 і 1/10 ТД₅₀. За цих умов максимально пригнічувальний ефект на рухову активність мав ксигерм-3 дозою 1120,0 мг/кг, що становить 1/10 ТД₅₀.

Таблиця 3.1

Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на рухову активність мишей за умов прямої актометрії (число рухів однієї миші за 1 хв), $M \pm m$, $n=10$

Досліджувані сполуки, мг/кг		Часові проміжки, хв			
		15	30	45	60
Контроль		14,2 ± 1,4	13,6 ± 1,3	12,8 ± 0,6	11,2 ± 0,4
Ксигерм-1	265,0	14,4 ± 1,3	13,9 ± 0,4	13,1 ± 0,4	12,4 ± 0,7
	525,0	14,8 ± 0,5	14,2 ± 1,3	13,6 ± 0,3	13,1 ± 0,4
	1050,0	15,1 ± 0,6	14,6 ± 0,4	14,2 ± 0,4	14,0 ± 0,3
	2100,0	15,6 ± 0,7	15,9 ± 0,4	16,5 ± 0,7*	16,2 ± 0,4*
Ксигерм -2	210,0	14,1 ± 0,4	13,4 ± 0,6	12,6 ± 0,8	11,3 ± 0,7
	420,0	13,9 ± 0,8	12,9 ± 0,7	12,2 ± 0,4	11,0 ± 0,4
	840,0	13,7 ± 0,6	12,8 ± 0,4	11,8 ± 0,6	10,8 ± 0,7
	1680,0	13,5 ± 0,4	12,6 ± 0,5	11,6 ± 0,3	10,5 ± 0,6
Ксигерм -3	140,0	13,9 ± 0,7	13,1 ± 1,0	12,2 ± 0,4	10,1 ± 0,3*
	280,0	13,4 ± 0,6	12,3 ± 0,7	11,4 ± 0,6	9,2 ± 0,4*
	560,0	11,9 ± 0,4	10,3 ± 0,4	10,4 ± 0,3	8,1 ± 0,6*
	1120,0	10,2 ± 0,9*	10,1 ± 0,6*	9,6 ± 0,4*	7,2 ± 0,7*

Примітка: У всіх далі табл. * - достовірність порівняно до контролю ($P \leq 0,05$)

3.2. Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на рухову активність у тесті «відкритого поля»

У другій серії експериментів досліджували орієнтовно-дослідницьку поведінку тварин під впливом нових комплексних сполук германію.

Реєстрували показники горизонтальної і вертикальної рухової активності, дослідницьку поведінку (число зазірань в отвори), а також емоційні реакції (число болюсів, грумінг).

Як видно з показників табл. 3.2. сполука ксигерм-2 у досліджуваних дозах не проявила істотний вплив на поведінку тварин у «відкритому полі». Ксигерм-3 максимальною дозою 1120,0 мг/кг достовірно зменшував число пересічених зовнішніх квадратів на 33,7 %. Також під впливом ксигерму-3 відзначалося дозозалежне зменшення загального числа пересічених квадратів і загальної кількості стійок відповідно на 32,4 і 60,0 % (див. табл. 3.2).

При введенні ксигерму-1 дозами 1050,0 і 2100,0 мг/кг відзначалося незначне збільшення показників горизонтальної і вертикальної рухової активності у мишей: число пересічених квадратів зросло на 4,0 і 6,7 % відповідно, число стійок - на 6,0 і 12,0 % та заглядань в отвори на 16,0 і 30,0 % порівняно з тваринами контрольної групи (див. табл. 3.2).

Таким чином, усі три нові сполуки дозозалежно впливали на поведінку тварин в умовах «відкритого поля». Під впливом ксигерму-1 відзначалося посилення вертикального і горизонтального компонентів рухової активності. Усі досліджувані показники дослідницької активності, також виявили зв'язок з показниками горизонтальної і вертикальної рухової активності і найбільше знижувалися під впливом ксигерму-3 у максимальній досліджувальній дозі 1120,0 мг/кг.

3.3. Вплив сполук германію на підвищену рухову активність

У наступній серії досліджень були оцінені ефекти дії нових сполук за умов підвищеної рухової активності щурів, викликані за допомогою фенаміну (амфетамін сульфат, табл. 0,01 г, «Фармсинтез», Росія; 1,0 мг/кг).

Введення фенаміну дозою 1,0 мг/кг в/очер викликало стимуляцію загальної рухової активності щурів з максимальною активністю на 60 хв.

Таблиця 3.2

Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на поведінку тварин у тесті «відкрите поле», $M \pm m$, $n=10$

	Дози препаратів, мг/кг	Пересічені зовнішні квадрати	Пересічені внутрішні квадрати	Загальне число пересічених квадратів	Число стійок з опорою	Число стійок без опори	Загальне число стійок	Число заглядань в «нори»	Число епізодів грумінгу	Число болюсів
Контроль		$7,4 \pm 1,1$	$5,2 \pm 0,3$	$12,6 \pm 1,2$	$1,9 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
Ксигерм-1	265,0	$7,4 \pm 1,2$	$5,2 \pm 0,6$	$12,7 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,9$	$3,3 \pm 0,9$	$0,6 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,4$
	525,0	$7,6 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,9$	$12,7 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,8$	$0,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,8$
	1050,0	$7,7 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,3$
	2100,0	$7,9 \pm 0,9$	$5,5 \pm 0,7$	$13,4 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,9$
Ксигерм-2	210,0	$7,3 \pm 0,8$	$5,1 \pm 0,7$	$12,4 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,9$
	420,0	$7,2 \pm 0,9$	$5,0 \pm 0,2$	$12,1 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$
	840,0	$6,9 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,4$	$11,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,8$	$0,4 \pm 0,8$
	1680,0	$6,7 \pm 0,7$	$4,3 \pm 0,8$	$11,2 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,9$	$0,6 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,6$
Ксигерм-3	140,0	$7,0 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,2$	$11,8 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,4$
	280,0	$6,3 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,3$	$11,0 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1^*$	$0,5 \pm 0,1$
	560,0	$5,9 \pm 0,3^*$	$4,3 \pm 0,3$	$10,2 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,07^*$	$0,4 \pm 0,1$
	1120,0	$4,9 \pm 0,4^*$	$3,0 \pm 0,2^*$	$8,5 \pm 0,8^*$	$1,2 \pm 0,2^*$	$0,9 \pm 0,2^*$	$1,3 \pm 0,5^*$	$0,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,05^*$	$0,3 \pm 0,07^*$

За цих умов горизонтальна і вертикальна рухова активність збільшувалася на 47,1 і 54,1 %, відповідно (табл. 3.3). Дослідницька активність підвищувалася на 61,1 %, число епізодів грумінгу також збільшилося на 36,4 %. Ефекти введення ксигерму-1, -2, -3 спільно з фенаміном (1,0 мг/кг) порівнювали з показниками контрольних тварин і тварин, яким вводили тільки фенамін.

За умов введення ксигерму-1 максимальною досліджуваною дозою 2100,0 мг/кг протягом усього періоду спостереження не відмічалось достовірних змін вертикальної горизонтальної рухової активності як порівняно з контрольними тваринами, так і на фоні введення фенаміну (див. табл. 3.3).

Введення ксигерму-2 дозою 1680,0 мг/кг до 60-ї хв викликало незначне зниження загального числа пересічених квадратів і стійок на 17,7 і 13,7%, відповідно, порівняно з тваринами, яким вводили тільки фенамін (див. табл. 3.3). Разом з тим ці показники були на 23,7 і 37,0 % більше, порівняно з контрольними тваринами. Дослідницька активність під впливом ксигерму-2 також зменшилася на 16,0 % порівняно з групою щурів, яким вводили тільки фенамін, але була більшою на 23,5 % порівняно з показниками у контролі. Таким чином, введення ксигерму-2 максимальною досліджуваною дозою 1680,0 мг/кг достовірно не впливало на активізуючу дію фенаміну, демонструючи незначне зниження досліджуваних показників фенамін-індукованого збудження, які, разом з тим залишалися вище, ніж у групі контрольних щурів.

Введення ксигерму-3 дозою 1120,0 мг/кг на 60-й хв викликало зниження загального числа пересічених квадратів і стійок на 51,0 і 67,6 % відповідно, порівняно з тваринами, яким був уведений тільки фенамін. Разом з тим, ці показники були на 27,6 і 50,0 % менше стосовно контрольних тварин (див. табл. 3.3). Число епізодів грумінгу також зменшувалося на 61,5 % стосовно групи тварин із введенням фенаміну і на 47,4 % стосовно контрольних тварин. Таким чином, введення ксигерму-3 призводило до значного зниження ефектів фенаміну, достовірно зменшуючи прояви горизонтальної і вертикальної рухової активності, епізодів грумінгу, не пригнічуючи при цьому дослідницької

активності (див. табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Ефекти сумісного введення фенаміну та БАР на рухову активність щурів у тесті «відкрите поле», $M \pm m$, $n=10$

Досліджувані показники	Конт роль	Фенамін (1,0 мг/кг)				Фенамін (1,0 мг/кг) + ксигерм-1 (2100,0 мг/кг)				Фенамін (1,0 мг/кг) + ксигерм-2 (1680,0 мг/кг)				Фенамін (1,0 мг/кг) + ксигерм-3 (1120,0 мг/кг)			
Число щурів	10	10				10				10				10			
Час спостереження		15`	30`	45`	60`	15`	30`	45`	60`	15`	30`	45`	60`	15`	30`	45`	60`
Пересічені зовнішні квадрати	8,7 ± 1,8	11,3 ± 1,4	12,4 ± 1,2*	13,6 ± 2,7*	15,2 ± 2,1*	11,7 ± 2,8	12,9 ± 3,1	13,1 ± 3,4	14,2 ± 4,1	10,3 ± 2,1	10,9 ± 2,2	11,5 ± 2,4	12,1 ± 2,9	9,2 ± 2,1	8,7 ± 2,1	7,6 ± 1,9*	7,2 ± 1,8*
Пересічені внутрішні квадрати	7,6 ± 0,4	8,1 ± 0,4	8,9 ± 0,6	9,4 ± 1,7*	11,3 ± 1,8*	8,4 ± 2,1	8,6 ± 2,2	9,5 ± 2,4	9,1 ± 2,6	7,4 ± 1,7	7,9 ± 1,8	8,2 ± 1,9	8,8 ± 2,0	6,7 ± 1,5	6,2 ± 1,4	5,7 ± 1,3	5,4 ± 1,3*
Загальне число пересічених квадратів	17,4 ± 1,7	19,2 ± 1,7	21,7 ± 1,4*	23,1 ± 0,7*	25,7 ± 2,9*	19,1 ± 4,3	21,5 ± 5,7	22,6 ± 6,1*	23,3 ± 6,5	17,7 ± 3,9	18,8 ± 3,8	19,7 ± 4,2	20,9 ± 4,9*	15,9 ± 3,1	15,9 ± 2,8	12,3 ± 2,9*	12,6 ± 2,6*
Число стійок с опорою	3,2 ± 0,4	3,9 ± 0,9	4,5 ± 0,7	4,9 ± 0,2*	5,2 ± 0,7*	3,2 ± 0,7	3,4 ± 0,8	3,6 ± 1,0	3,8 ± 1,1	2,9 ± 0,6	3,1 ± 0,7	3,4 ± 0,7	3,6 ± 0,8	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,1*	1,6 ± 0,4*	1,4 ± 0,3*
Число стійок без опори	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,4	2,9 ± 0,2*	3,2 ± 0,4*	3,7 ± 0,9*	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,6	2,6 ± 0,7	2,8 ± 0,8	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,7 ± 0,6	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	1,0 ± 0,2*
Загальне число стійок	4,8 ± 0,7	5,4 ± 0,4	5,8 ± 0,9	6,6 ± 0,7*	7,4 ± 0,7*	5,5 ± 1,2	5,7 ± 1,4	5,9 ± 1,6	6,0 ± 1,8	4,9 ± 0,9	5,3 ± 1,1	5,8 ± 1,1	6,3 ± 1,3*	3,6 ± 0,8	3,2 ± 0,7	2,8 ± 0,7*	2,4 ± 0,6*
Число заглядань в «нори»	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,7	2,7 ± 0,4	3,1 ± 0,9*	3,4 ± 1,2*	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,6	2,2 ± 0,7	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Число епізодів грумінгу	1,9 ± 0,8	2,0 ± 0,3	2,1 ± 0,7	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2*	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,6	2,4 ± 0,7	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,5	2,2 ± 0,5	1,7 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,3*	1,0 ± 0,2*
Число болюсів	1,4 ± 0,7	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,7*	1,6 ± 0,4*	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2*	0,7 ± 0,1*

3.4. Вплив нових БАР на гексеналовий сон тварин

Завданням наступної серії дослідів було дослідити здатність нових комплексних сполук германію впливати на дію стандартних пригнічувальних засобів на моделі гексенал-викликаного сну.

Встановлено, що ксигерм-1, -2, -3 не виявили самостійної здатності викликати сон, однак можливо було припустити, що нові сполуки можуть потенціювати снотворну дію барбітуратів. Як препарат, що викликає сон, був обраний гексенал-похідне барбітурової кислоти. Ефект дії барбітуратів полягає у стабілізації ГАМК-рецепторного комплексу і зниженні швидкості переходу до десенситизованого стану. Гексенал виявляє властивості ГАМК-міметика, що дозволяє припускати можливі механізми дії ксигерму-1, -2, -3. Потенціювання дії снодійного оцінювали за здатністю досліджуваної сполуки збільшувати кількість заснулих мишей після введення гексеналу в/очер.

Ксигерм-1 дозою 525,0 мг/кг при спільному введенні з гексеналом викликав сон у 34,1 % мишей, що менше контрольного показника на 7,6 % (табл. 3.4). Введення ксигерму-1 дозою 1050,0 мг/кг на тлі гексеналу викликало настання сну у 36,3 % тварин, що нижче контрольного показника на 5,4 %. Дозою 2100,0 мг/кг ксигерм-1 разом з гексеналом викликав сон у 40,2 % мишей, що майже дорівнює контрольному показнику. Таким чином, ксигерм-1 достовірно не впливав на число заснулих тварин.

Застосування ксигерму-2 дозою 420,0 мг/кг на фоні гексеналу викликало сон у 33,4 % мишей, що було в 1,2 рази менше, ніж у тварин контрольної групи та у 2,9 рази менше, чим у групі з гексеналом (див. табл. 3.4). Дозою 840,0 мг/кг ксигерм-2 при спільному введенні з гексеналом викликав сон у 37,7 % тварин, що було в 1,1 рази менше, ніж у контрольній групі, а дозою 1680,0 мг/кг ксигерм-2 викликав сон у 41,3 %, що майже майже дорівнювало контрольному показнику. Таким чином, ксигерм-2 також незначно змінював число заснулих тварин тільки.

Сумісне введення ксигерму-3 (280,0 мг/кг) і гексеналу викликало сон у 58,3 % тварин, що перевищувало контрольний показник в 1,3 рази. Дозою 560,0 мг/кг ксигерм-3 на фоні гексеналу викликав сон у 66,7 % мишей, що перевищувало відповідний показник у контролі в 1,5 рази, а дозою 1120,0 мг/кг викликав сон у 83,3 % тварин, що більше контрольного показника в 2,1 рази. Таким чином, ксигерм-3 дозами 280,0; 560,0 і 1120,0 мг/кг збільшував число заснувших тварин, зумовлене введенням гексеналу (див. табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на число заснувших тварин після введення гексеналу (20,0 мг/кг)

Сполуки (мг/кг)		Число тварин у групі	Відсоток заснувших тварин (%)
Контроль		12	41,7
Гексенал	20,0	12	100
Ксигерм-1+ гексенал	525,0	12	34,1
	1050,0	12	36,3
	2100,0	12	40,2
Ксигерм-2 + гексенал	420,0	14	33,4
	840,0	14	37,7
	1680,0	12	41,3
Ксигерм-3 + гексенал	280,0	12	58,3*
	560,0	12	66,7*
	1120,0	12	83,3*

Таким чином, нові сполуки виявили дозозалежний вплив на гексеналовий сон. Найбільше збільшення відсотка заснулих тварин спостерігалось за умов введення ксигерму-3 дозами 560,0 і 1120,0 мг/кг.

У наступній серії експериментів нашою метою було дослідити здатність нових сполук пролонгувати гексеналовий сон. Гексенал вводили в/очер дозою 50,0 мг/кг через 30 хв після введення досліджуваних сполук (експериментальна група) і через 30 хв після введення фізіологічного розчину (контрольна група).

Введення ксигерму-1 дозою 525,0 мг/кг зменшувало латентний період на 6,3 % і збільшувало тривалість сну на 8,5 % (табл. 3.5). Дозою 1050,0 мг/кг ксигерм-1 викликав зменшення латентного періоду засинання на 9,7 % і збільшував тривалість на 10,6 %. У максимальній дослідженій дозі (2100,0 мг/кг) ксигерм-1 зменшував латентний період засипання на 12,3 %, подовжував гексеналовий сон на 14,9 %. Таким чином, введення ксигерму-1 у всіх досліджених дозах достовірно не впливало на латентний період засипання і тривалість гексеналового сну.

Введення ксигерму-2 дозою 420,0 мг/кг зменшувало латентний період засинання на 17,7 %, збільшувало тривалість гексеналового сну на 0,3 %. Дозою 840,0 мг/кг ксигерм-2 зменшував латентний період настання сну на 20,3%, збільшував тривалість гексеналового сну на 0,9 % (див. табл. 3.5). У максимальній дослідженій дозі - 1680,0 мг/кг ксигерм-2 зменшував латентний період засинання на 30,4 %, збільшував тривалість гексеналового сну на 4,3 %. Таким чином, ксигерм-2 в усіх досліджених дозах зменшував латентний період засинання, пролонгував гексеналовий сон.

Введення ксигерму-3 (280,0 мг/кг) зменшувало латентний період засинання на 27,8 %, але практично не впливало на тривалість гексеналового сну. А введення ксигерму-3 дозою 560,0 мг/кг зменшувало латентний період настання сну на 29,1 % і збільшувало тривалість сну на 5,9 % (див. табл. 3.5). У максимальній дослідженій дозі (1120,0 мг/кг) ксигерм-3 зменшував латентний період засинання на 46,8 %, збільшував тривалість сну вже на 65,7 %. Таким чином, ксигерм-3 у всіх досліджуваних дозах достовірно зменшував латентний

період засинання. Разом з тим, ксигерм-3 дозозалежно збільшував тривалість гексеналового сну (див. табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вплив ксигерму-1, -2, -3 на тривалість гексеналового (50 мг/кг) сну

($M \pm m$, $n=10$)

Сполуки (мг/кг)		Латентний період засинання, хв	Тривалість сну, хвилини (\pm)	Число тварин у групі
Контроль		$7,9 \pm 0,5$	$30,4 \pm 3,5$	24
Ксигерм-1	525,0	$7,4 \pm 0,4$	$32,9 \pm 3,6$	12
	1050,0	$7,1 \pm 0,5$	$33,6 \pm 3,5$	14
	2100,0	$6,9 \pm 0,4$	$34,9 \pm 2,5$	12
Ксигерм-2	420,0	$6,5 \pm 0,2$	$30,5 \pm 0,3$	12
	840,0	$6,3 \pm 0,4$	$30,7 \pm 0,2$	14
	1680,0	$5,5 \pm 0,3^*$	$31,7 \pm 5,6$	12
Ксигерм-3	280,0	$6,1 \pm 0,4^*$	$33,7 \pm 0,5$	14
	560,0	$5,6 \pm 0,5^*$	$36,2 \pm 3,5$	12
	1120,0	$4,2 \pm 0,3^{**}$	$50,4 \pm 4,6^*$	14

3.5. Оцінка дії нових сполук на м'язовий тонус і координацію рухів тварин

Завданням наступної серії експериментів було дослідження ефектів ксигерму-1, 2, 3 на м'язову координацію мишей у тесті "обертового стрижня". Як показано у табл. 3.6, у жодній з досліджуваних доз нові ксиларатні сполуки

германію не викликали міорелаксатної дії і не впливали на координацію рухів тварин.

Таблиця 3.6

Ефекти ксигерму-1, -2, -3 на м'язову координацію в тесті "обертового стрижня" у мишей

	Дози БАР, мг/кг	Число мишей (%) з порушенням координації
Контроль		0
Ксигерм-1	265,0	0
	525,0	0
	1050,0	14
	2100,0	16
Ксигерм-2	210,0	0
	420,0	0
	840,0	10
	1680,0	15
Ксигерм-3	140,0	0
	280,0	0
	560,0	8
	1120,0	17

3.6. Дослідження впливу нових БАР на пам'ять та здатність тварин до орієнтації у просторі

У наступній серії експериментів для оцінки впливу досліджуваних сполук на когнітивні функції щурів був використаний тест водного лабіринту Мориса, заснований на здатності тварин до просторової орієнтації, що дає можливість використовуючи тестування на 1-у та через 10 діб після навчання оцінити відповідно короткострокову та довготривалу просторову пам'ять.

Проведені дослідження показали, що сполуки ксигерму-1, -2, -3 на 1-у добу після введення не виявляли значного впливу на латентний період знаходження платформи тваринами. За умов тестування на 10-у добу введення ксигерму-1 дозою 2100,0 мг/кг дозволяв тваринам швидше розпізнавати сектор, в якому знаходилася рятувальна платформа. Група тварин після введення ксигерму-2 дозою 1680,0 мг/кг також не погіршув навчання та просторову пам'ять щурів порівняно з контрольною групою (рис. 3.1). Після введення ксигерму-3 спостерігалось достовірне подовження латентного періоду знаходження щурами платформи (див. рис. 3.1).

3.7. Визначення антидепресантної активності синтезованих сполук германію

Задачею цієї серії дослідів з'явилося дослідження особливостей плавальної поведінки щурів за умов введення ксигерму-1, -2, -3. При розміщенні в басейн із водою щурів контрольної групи (n=10) поведінка характеризувалася тим, що у 4 з них відзначалося по одному пасивно-адаптивному плавальному акту (плавання уздовж стінки, "топання" води в центрі басейну, або "топання" води дотримуючись стінки басейну). Число пасивно-адаптивних плавальних актів у інших тварин перевищувало 3 елементи. Однак, усіх 6 форм пасивно-адаптивної поведінки не відзначалося у жодної тварини. Середнє число пасивно-адаптивних актів у щурів контрольної групи складало $(2,23 \pm 0,34)$, і показник варіабельності за цих умов дорівнював 50 % (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Дослідження впливу ксигерму-1, -2, -3 на пасивно-адаптивну плавальну поведінку щурів

Умови досліді	Число пасивно-адаптивних актів, $M \pm m$	Показник варіабельності, %	Показник максимальної варіабельності, %

Контрольна група	$2,23 \pm 0,34$	50	0
Ксигерм-1 (2100,0 мг/кг)	$4,54 \pm 0,35^*$	92*	23*
Ксигерм-2 (1680,0 мг/кг)	$2,00 \pm 0,30$	40	0
Ксигерм-3 (1120,0 мг/кг)	$1,90 \pm 0,28$	30	0

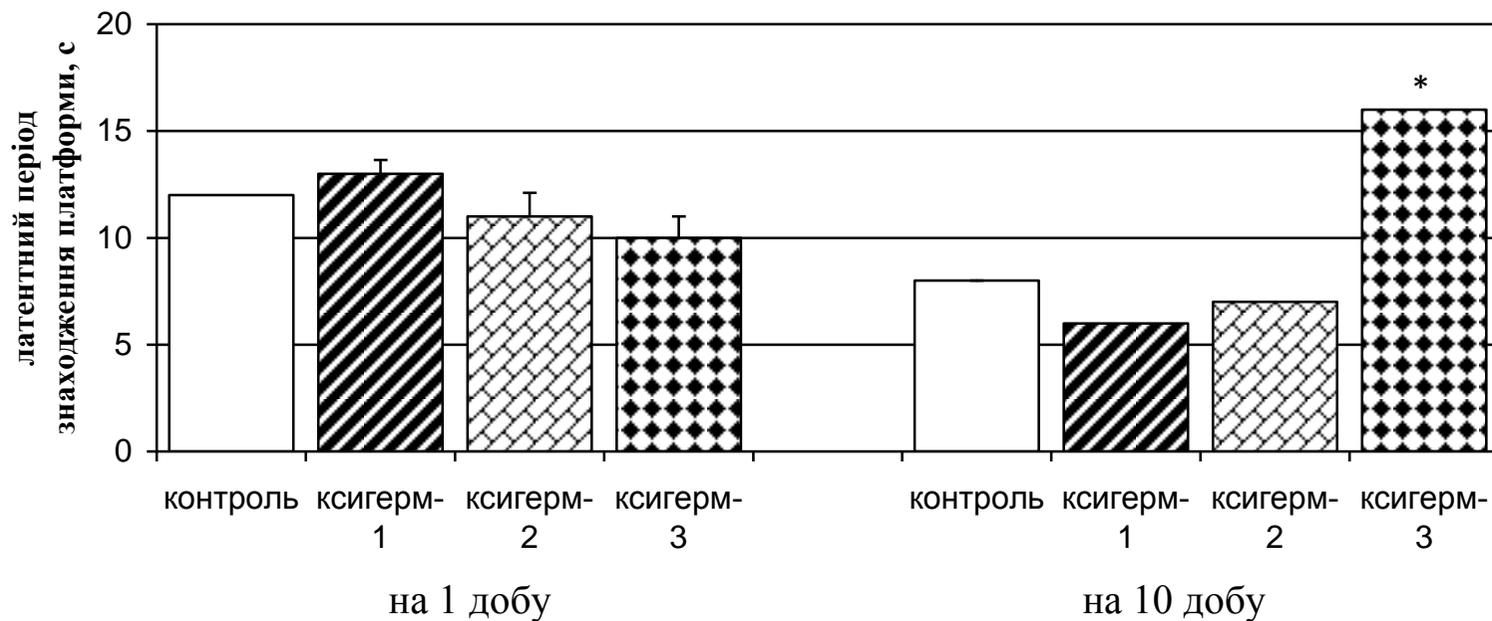


Рис. 3.1. Вплив ксигерму -1, -2, -3 на процеси пам'яті та здатність до навчання на 1-шу та 10-ту добу у водному лабіринті Мориса.

За віссю абсцис - дози препаратів (мг/кг):  - ксигерм-1 (2100,0 мг/кг),  - ксигерм-2 (1680, 0 мг/кг),  - ксигерм-3 (1120 мг/кг). За віссю ординат - латентний період знаходження платформи, с.

У всіх далі рис. * - достовірність порівняно до контролю ($P \leq 0,05$).

Серед тварин дослідної групи тільки у одного щура з уведеним ксигермом-1 дозою 2100,0 мг/кг відзначалися 2 пасивно-адаптивних плавальних акти, у інших щурів дослідної групи число пасивно-адаптивних плавальних актів перевищувало 3. При цьому, середнє число пасивно-адаптивних актів у щурів дослідної групи вдвічі перевищувало відповідний показник у щурів контрольної групи ($P < 0,05$). Показники варіабельності і максимальної варіабельності склали, відповідно, 92 і 23 %, що також істотно ($P < 0,05$) перевищувало аналогічні дані, які ми одержали в контрольних спостереженнях (див. табл. 3.7).

У випадку введення ксигерму-2 дозою 1680,0 мг/кг інтактним щурам середнє число пасивно-адаптивних плавальних актів складало ($1,90 \pm 0,28$), що істотно не розрізнялося з аналогічними контрольними показниками. Показники варіабельності і максимальної варіабельності в обох досліджуваних групах щурів також не розрізнялися істотно ($P > 0,05$; див. табл. 3.7).

Середнє число пасивно-адаптивних плавальних актів у щурів, яким вводили ксигерм-3 дозою 1120,0 мг/кг, дорівнювало ($2,00 \pm 0,30$), що істотно не відрізнялося від аналогічного контрольного показника. Показники варіабельності і максимальної варіабельності у щурів за цих умов були, відповідно, 40 % і 0 %, і істотно не розрізнялися з відповідними даними, які відзначалися у щурів контрольної групи ($P > 0,05$; див. табл. 3.7).

За умов оцінки впливу ксигерму-1, -2, -3 на механізми навчання і пам'яті у тесті активного уникнення проведені дослідження виявили, що введення нових сполук істотно не прискорювало навчання, а збільшення дози ксигерму-2 і -3 зумовлювало погіршення формування умовного рефлексу за цих умов. Цей ефект пов'язаний зі зміною сприйняття і оцінки психотравмуючої ситуації і є одним із проявів транквілізуючої дії [232].

Результати досліджень даного розділу знайшли відображення:

1. Варбанець О. І. Дослідження нейротропної дії нових ксиларатних комплексів германію (IV) з літієм, натрієм та калієм / О. І. Варбанець // Клінічна фармація – 20 років в Україні: націон. фармац. конгрес України, 21–22 берез. 2013 р. : тези доп. – Харків, 2013. – С. 37–38.

РОЗДІЛ 4

ВСТАНОВЛЕННЯ ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЇ КСИЛАРАТНИХ ПОХІДНИХ ГЕРМАНІЮ

4.1. Вплив БАР на прояви гострого судомного синдрому

4.1.1. Протисудомна активність нових сполук на моделі максимальних електрошокових судом

Результати досліджень на моделі МЕС виявили, що з трьох досліджених сполук $M_4[Ge_2(\mu\text{-Xylar})_2(OH)_2]\cdot 4H_2O$, $M = Li, Na, K$ (ксигерм-1, ксигерм-2 і ксигерм-3, відповідно), виражену протисудомну активність демонструє лише сполука ксигерм-3. Так, наведені в табл. 4.1 дані свідчать про те, що ксигерм-3 був ефективний як у мишей, так і в щурів за умов моделі МЕС із застосуванням надпорогової стимуляції, яка традиційно використовується для скринінгу нових синтезованих сполук [157, 159]. Досліди виявили, що час найбільшої ефективності цієї сполуки складав у мишей 15 хв після в/очер і 10 хв після в/ш введення та у щурів – 10 хв після в/очер введення і 30 хв після в/ш введення. За цих умов середньоєфективні дози (ED_{50}) ксигерму-3 відповідно склали 396,0 (319,0-410,0) і 570,0 (400,0-584,0) мг/кг. Захисний індекс (ЗІ), який визначався відношенням TD_{50} в тесті зі «стрижнем, що обертається», і ED_{50} [73, 189, 228], склав 3,1 та більше, чим 5,1 у мишей і щурів відповідно. Як наведено у табл. 4.1, показник ЗІ для ксигерму-3 був більшим, ніж для вальпроату натрію (1,6 та 2,2 у мишей і щурів відповідно), але декілька меншим, ніж для карбамазепіну (4,5 і 5,4 відповідно).

Завданням наступної серії дослідів було визначення мінімальних доз ксигерму-1, -2, -3, що мали протисудомну дію на моделі МЕС. Поріг МЕС у мишей визначали за допомогою транскорнеальної стимуляції постійним електричним струмом синусоїдними стимулами (50 Гц, 0,2 с). Інтенсивність стимулів варіювали методом up-down, за умов якого силу струму збільшували

або знижували на 0,06 log інтервалу залежно від того, викликала вона чи ні екстензію задніх кінцівок.

Таблиця 4.1

Вплив ксигерму-1, -2, -3, карбамазепіну і вальпроату натрію на МЕС
у мишей та щурів

Сполуки, препарати	Ефекти у мишей		Ефекти у щурів	
	ЕД ₅₀ , мг/кг	ТД ₅₀ , мг/кг	ЕД ₅₀ , мг/кг	ТД ₅₀ , мг/кг
Ксигерм-1	>1050,0	1645,0 (1430,0-1860,0)	>1400,0	1800,0
Ксигерм-2	>1000,0	1535,0 (1240,0-1830,0)	>1050,0	1680,0
Ксигерм-3	396,0 (319,0-410,0)	>2000,0	570,0 (410,0-584,0)	1740,0 (1500,0- 2200,0)
Карбамазепін	9,2 (8,4-10,6)	49,5 (37,1-61,2)	4,8 (2,4-5,3)	21,8 (17,6-29,2)
Вальпроат натрію	294,0 (480,0-670,0)	481,0 (420,0-680,0)	396,0 (370,0-440,0)	870,0 (716,0-920,0)

Примітка: У всіх далі табл. * - достовірність порівняно до контролю ($P \leq 0,05$)

Для кожної дози брали 20 тварин для розрахунків порогової сили струму, що викликає у 50 % мишей тонічну екстензію задніх кінцівок з довірчим інтервалом 95 % за допомогою методу R. Kimball et al [157, 229]. Наведені дані свідчать про те, що ксигерм-1, і -2 не виявили достовірну протисудомну дію за цих умов, а ксигерм-3 ефективно підвищував судомний поріг вже дозою 100,0 мг/кг (табл. 4.2). Доза, що підвищує судомний поріг на 50 %, була розрахована за допомогою методу лінійної регресії і склала 174,0 мг/кг [261]. Захисний індекс склав 10,3, що істотно вище, ніж для діазепаму і в 2 рази менше, ніж для карбамазепіну (див. табл. 4.2).

Вплив ксигерму-1, -2, -3 та протисудомних препаратів на поріг МЕС (тонічних екстензій задніх кінцівок) та рухові порушення у мишей

Сполуки, препарати	Доза, мг/кг, в/очер	Судомний поріг (СП ₅₀ , мА)	Доза, що підвищує судомний поріг на 50 % (ДСП ₅₀ , мг/кг)	Доза, що викликає порушення рухів у 50 % тварин (ТД ₅₀ , мг/кг)	ЗІ ДСП ₅₀ /ТД ₅₀
Ксигерм-1	210,0	10,2 (9,8-10,6)	> 580,0	> 3100,0	< 0,2
	420,0	10,8 (9,9-11,7)			
	630,0	11,4 (10,2-12,6)			
	1260,0	11,8 (10,6-13,0)			
Ксигерм-2	120,0	10,6 (9,9-11,3)	> 310,0	> 2300,0	< 0,1
	240,0	11,2 (10,4-12,0)			
	360,0	11,9 (10,8 -13,0)			
	720,0	12,1 (11,4-12,8)			
Ксигерм-3	50,0	12,6 (11,0-12,8)	174,0	1800,0 (1500,0-2500,0)	10,3
	100,0	15,8 (14,6-16,7)			
	250,0	18,9 (16,0 -24,0)			
	500,0	23,7 (21,2-26,4)			
Карбамазепін			1,8	36,0 (27,0-40,0)	20,0
Вальпроат натрію			72,0	432,0 (390,0-483,0)	6,0
Діазепам			2,6	4,8 (3,8-5,9)	1,8

Виявлено також, що ксигерм-3 підвищував судомний поріг для різних типів судом, викликаних за допомогою в/в введення пентиленететразолу у мишей (табл. 4.4). Доза, що підвищує судомний поріг на 50 % перших міоклонічних здригань, у мишей склала 384,7 мг/кг. Сполука ксигерм-3 була ефективніше відносно судомного порогу для індукції перших генералізованих клонічних і тонічних судом - 190,0 і 240,0 мг/кг відповідно.

Таблиця 4.4

Вплив ксигерму-3 на поріг виникнення різних типів судом, викликаних внутрішньовенним введенням пентиленететразолу у мишей, $M \pm m$, $n=10$

Сполука	Доза, мг/кг	Міоклонічні судоми, с	Клонічні судоми, с	Тонічні судоми, с
Контроль	-	35,0 ± 6,1	38,7 ± 6,0	74,2 ± 9,4
Ксигерм-1	265,0	35,8 ± 3,2	38,9 ± 6,1	75,1 ± 8,2
	525,0	39,4 ± 10,4	44,6 ± 8,4	79,2 ± 12,4
	1050,0	46,2 ± 16,5	51,2 ± 8,2	84,1 ± 8,2
ДСП ₅₀ , мг/кг		1012,4	104,2	92,0
Ксигерм-2	210,0	36,4 ± 3,2	39,1 ± 3,2	78,4 ± 6,2
	420,0	41,2 ± 8,4	44,5 ± 6,2	89,2 ± 8,4
	840,0	49,2 ± 12,2	58,2 ± 6,2	96,0 ± 12,4
ДСП ₅₀ , мг/кг		824,8	112,6	124,0
Ксигерм-3	100,0	38,3 ± 5,0	40,2 ± 6,5	86,6 ± 11,0
	200,0	46,7 ± 12,6	94,6 ± 18,4*	160,0 ± 14,1*
	400,0	63,8 ± 26,5*	150,0 ± 22,4*	210,0 ± 16,2*
ДСП ₅₀ , мг/кг		384,7	190,0	240,0

Завданням наступної серії дослідів було дослідження впливу ксигерму-3 на моделях судомної активності у щурів, викликані за допомогою агоністів збудливих амінокислот каїнової кислоти і холіноміметика пілокаріпіну, а також порівняти його з ефектами різних протиепілептичних препаратів. Ксигерм-3 ефективно знижував важкість пілокарпін-викликаних судом з 4,0 балів у контролі до 2,5 балів, а також зменшував число тварин із вторинно-генералізованими судомами. ЕД₅₀ ксигерму-3 за цих умов становила 328,0 мг/кг (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Середньоєфективні дози ксигерму-3, загальноприйнятих і нових протиепілептичних препаратів на судомну активність у щурів, викликану за допомогою пілокарпіну і каїнової кислоти

Сполука, препарат	Конвульсант, ЕД ₅₀ (мг/кг)	
	Пілокарпін	Каїнова кислота
Ксигерм-3	328,0 (230,0 - 453,0)	554,0 (290,0 - 627,0)
Вальпроат натрію	314,0 (112,0 - 420,0)	> 700,0
Карбамазепін	> 60,0	> 85,0
Фенітоїн	> 200,0	> 350,0
Вігабатрин	842,0 (675,0 - 987,0)	> 1300,0
Ламотриджин	> 40	> 40,0

ЕД₅₀ ксигерму-3 за цих умов становила 328,0 мг/кг (табл. 4.5). У відносно великій середньоєфективній дозі - 554,0 мг/кг ксигерм-3 суттєво зменшував важкість судом, викликаних за допомогою каїнової кислоти, а

також проявляв виражені захисні ефекти проти вторинно-генералізованих судомних реакцій. Референс-препарати, що взаємодіють з ГАМК-бензодіазепін-рецепторним комплексом (вальпроат натрію і вігабатрин («Sigma», США) значно знижували важкість судом, викликаних за допомогою пілокарпіну і були мало ефективні відносно судом, індукованих каїновою кислотою (див. табл. 4.5) Разом з тим, ксигерм-3, вальпроат натрію і вігабатрин не запобігали виникненню судом інтенсивністю 1 бал. Водночас, карбамазепін, включаючи дозу 60,0 мг/кг, і ламотриджин дозою 200,0 мг/кг були не ефективні по відношенню до пілокарпін-викликаних судом (див. табл. 4.5). Крім того, фенітоїн дозою 100,0 мг/кг і 200,0 мг/кг збільшував тяжкість судом і летальність тварин.

4.1.3. Протисудомна активність нових БАР за умов аудіогенних судом

Дослідження показали, що ксигерм - 1 і -2 не впливали на аудіогенні судоми у мишей навіть у відносно великих дозах (2100,0 мг/кг і 1680,0 мг/кг відповідно). На відміну від них, ксигерм-3 ефективно зменшував тяжкість клонічних судом вже дозою, меншою, чим 150,0 мг/кг в/очер (рис. 4.1). ЕД₅₀ для пригнічення клонічних аудіогенних судом становив (140,0 -210,0) 178,0 мг/кг.

4.1.4. Вплив ксигерму-3 на судомну активність за умов 6-Гц-викликаних судом

Завданням цієї серії досліджень була оцінка ефектів нових БАР на моделі фармакорезистентної судомної активності, викликаній за допомогою транскорнеальної електростимуляції струмом частотою 6 Гц. Показано, що збільшення сили струму від 14 до 23 мА приводить до збільшення числа тварин, у яких розвивалися психомоторні судоми, що характеризуються

появою завмирань, тремтінням вібрис, клонічних судом передніх кінцівок або тону́су хвоста (Straub-tail).

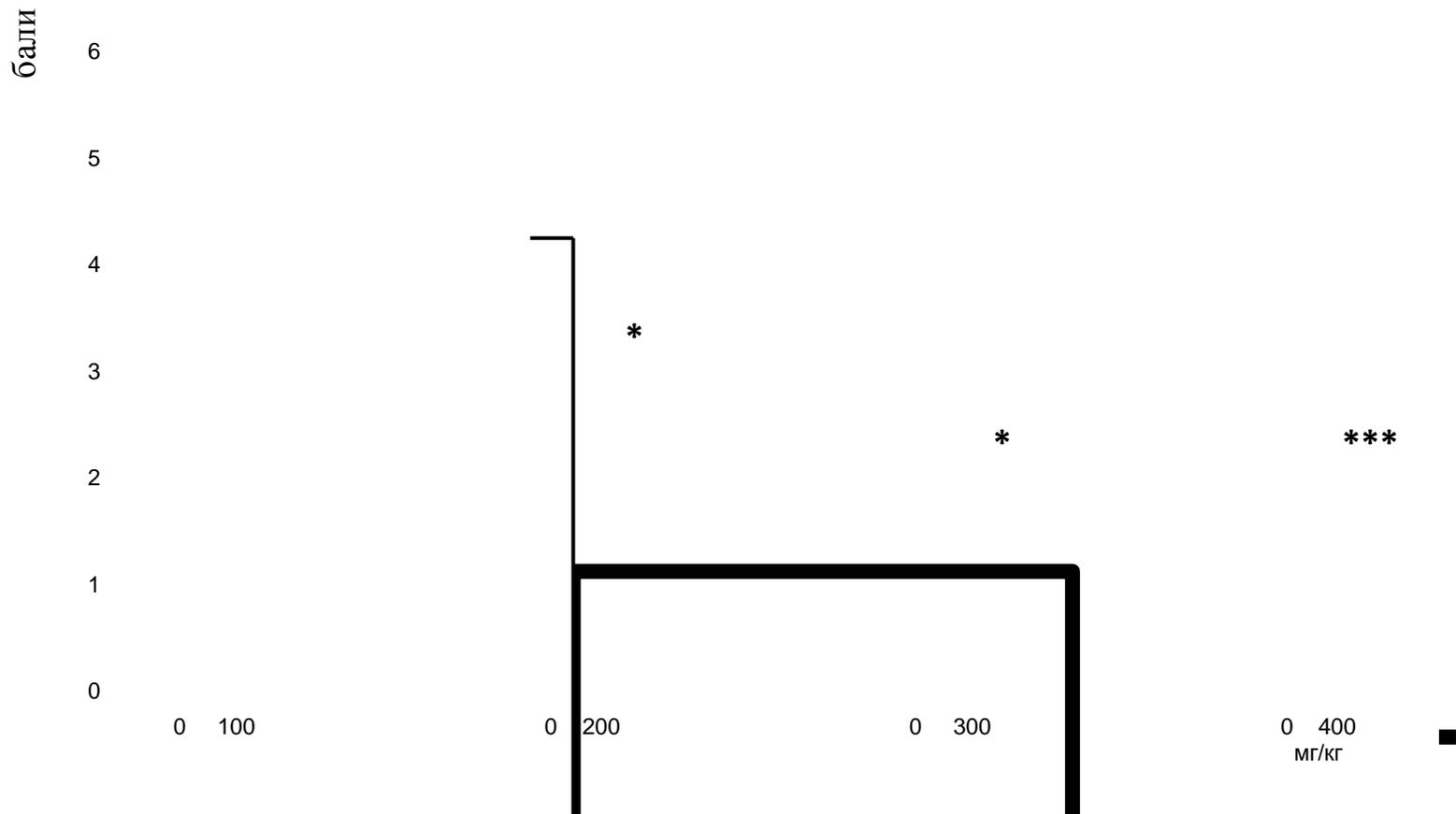


Рис. 4.1. Вплив ксигерму-3 на інтенсивність аудіогенних судомних реакцій у мишей.

За віссю абсцис - дози ксигерму (мг/кг), за віссю ординат - тяжкість судом (бали), світлі стовпчики - контроль, заштриховані - дослід.

Примітка: У всіх далі рис. * - достовірність порівняно до контролю ($P \leq 0,05$), *** - $P \leq 0,001$.

Для оцінки протисудомних ефектів нових БАР і препаратів порівняння використовували стимули інтенсивністю 32 мА, що викликали судоми в 100% тварин. Дослідження виявили, що ксигерм-1 і ксигерм-2 не мали протисудомної дії за умов цієї моделі. Ксигерм-3 демонстрував дозозалежну протисудомну дію, що проявляється в повному захисті частини тварин від судом, індукованих за допомогою струму інтенсивністю 32 мА. ЕД₅₀ ксигерму-3 за цих умов склала 114,7 мг/кг, а захисний індекс - 1,3. Препарати порівняння, такі як карбамазепін і вальпроат натрію і вігабатрин також виявили дозозалежну протисудомну дію за цих умов. При цьому найбільше значення захисного індексу відзначалося для вальпроату натрію (ЗІ = 1,2). Проте фенітоїн і ламотриджин, які є досить ефективними на інших моделях судом, не мали протисудомної дії в умовах цієї моделі судомної активності.

Таким чином, дослідження показали, що за умов 6-Гц-викликаних судом, які представляють модель, досить резистентну до дії багатьох протисудомних препаратів як першої, так і другої генерації, ксигерм-3 виявляв протисудомний ефект, який був схожий з дією вальпроату натрію та відрізнявся від фенітоїну і ламотриджину.

4.1.5. Оцінка протисудомної активності ксигерму-3 за умов NMDA-викликаних судом

4.1.5.1. Протисудомна дія ксигерму-3 при NMDA-викликаних клонічних судамах

Під час формування цієї моделі через 5-15 с після в/шл введення NMDA відносно невеликою дозою 0,2 нг/5 мкл з'явилися періоди короткочасного «завмирання», посиленого дихання, екзофтальм і підвищення тону м'язів хвоста. Протягом наступних 10-30 с спостерігався розвиток клонічних судом кінцівок, стрибки і кругові обертання. Подібні зміни відзначалися в 95-100 % тварин.

За цих умов введення ксигерму-3 дозою 1000,0 мг/кг не викликало виражені захисні ефекти - тільки в 2 з 10 тварин були відсутні клонічні судоми, викликані NMDA. Подальше збільшення дози ксигерму-3 викликало слабо виражене зростання протисудомної дії і 50 % захист тварин спостерігався тільки в умовах введення ксигерму-3 дозою 2000,0 мг/кг (рис. 4.2). За цих умов після введення ксигерму-3 такою дозою у тварин відзначалася легка атаксія без втрати позних рефлексів, однак клонічні судоми зберігалися. ED_{50} для ксигерма-3 становила 2180,6 мг/кг із помилкою $S_{ED_{50}}$ - 283,9.

При оцінці впливу препаратів порівняння протисудомні ефекти фенітоїну відзначалися вже в дозі 25,0 мг/кг. За цих умов в 2 з 8 тварин клонічні судоми були відсутні (рис. 4.3, А). Збільшення дози фенітоїну викликало подальше зростання важкості протисудомної дії і дозою 100,0 мг/кг захисні ефекти відзначались у 7 з 10 тварин (рис. 4.3, А). ED_{50} для фенітоїну становила 87,8 мг/кг (рис. 4.3, Б).

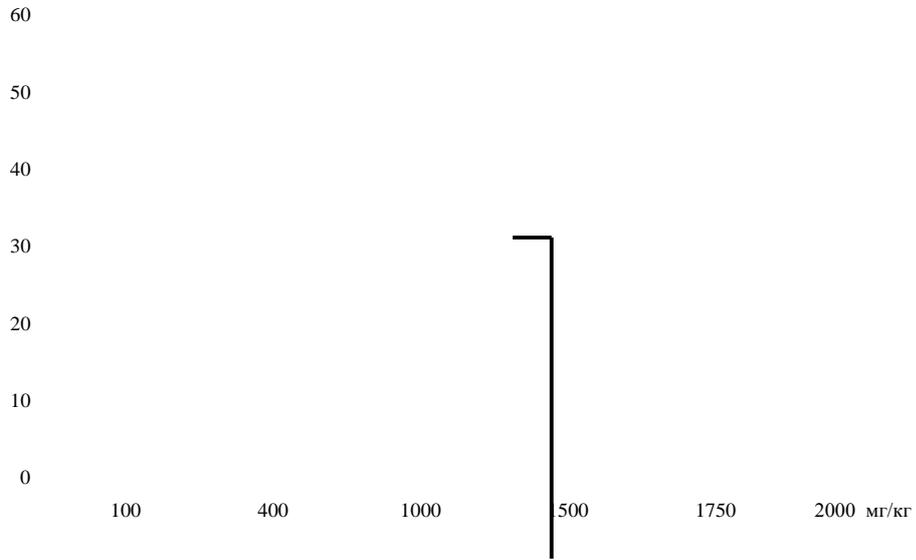
Виражені протисудомні ефекти діазепаму відзначалися під час введення його дозами 0,6 мг/кг - в 5 з 10 тваринних судоми були відсутні (рис. 4.4). Збільшення дози діазепаму викликало захисні ефекти в більшій кількості тварин і в умовах введення діазепаму дозою 1,2 мг/кг тільки у 1 з 10 щурів реєструвалися судоми (рис. 4.4.). ED_{50} діазепаму становила 0,6 мг/кг із помилкою 0,14.

4.1.5.2. Протисудомна активність ксигерму-3 при NMDA-викликаних тонічних судамах

Введення NMDA більшою дозою (3,0 нг/5 мкл) викликало вже через 10-20 с посилені стрибки, обертові рухи, біг по колу, а також різноманітні обертання, писк, екзофтальм. Через 1-5 хв після ін'єкції NMDA розвивались екстензія з наступним тривалим згинанням передніх і задніх кінцівок, втратою рівноваги і падінням тварин на бік. Періоди тонічної екстензії передніх

кінцівок (ТЕПК) були короткочасними - від 1 до 5 с. Повторні судоми, а також періоди ТЕПК виникали багаторазово, однак не призводили до загибелі тварин.

А



Б

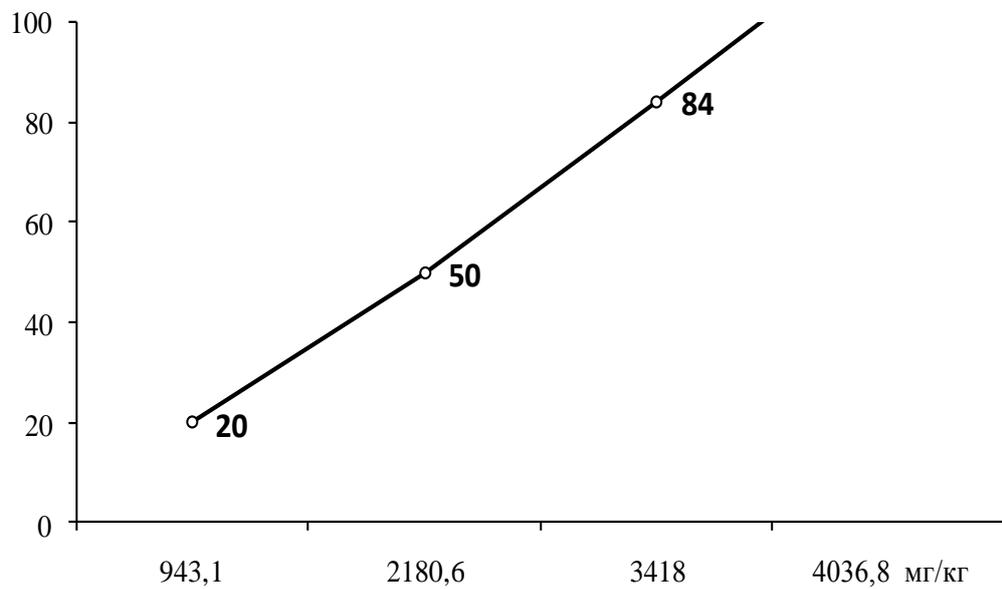


Рис. 4.2. Вплив ксигерму-3 на NMDA-викликані клонічні судоми

За віссю абсцис - дози ксигерму-3, мг/кг (введені - А, розраховані - Б),
за віссю ординат - відсоток захищених тварин (А, Б).

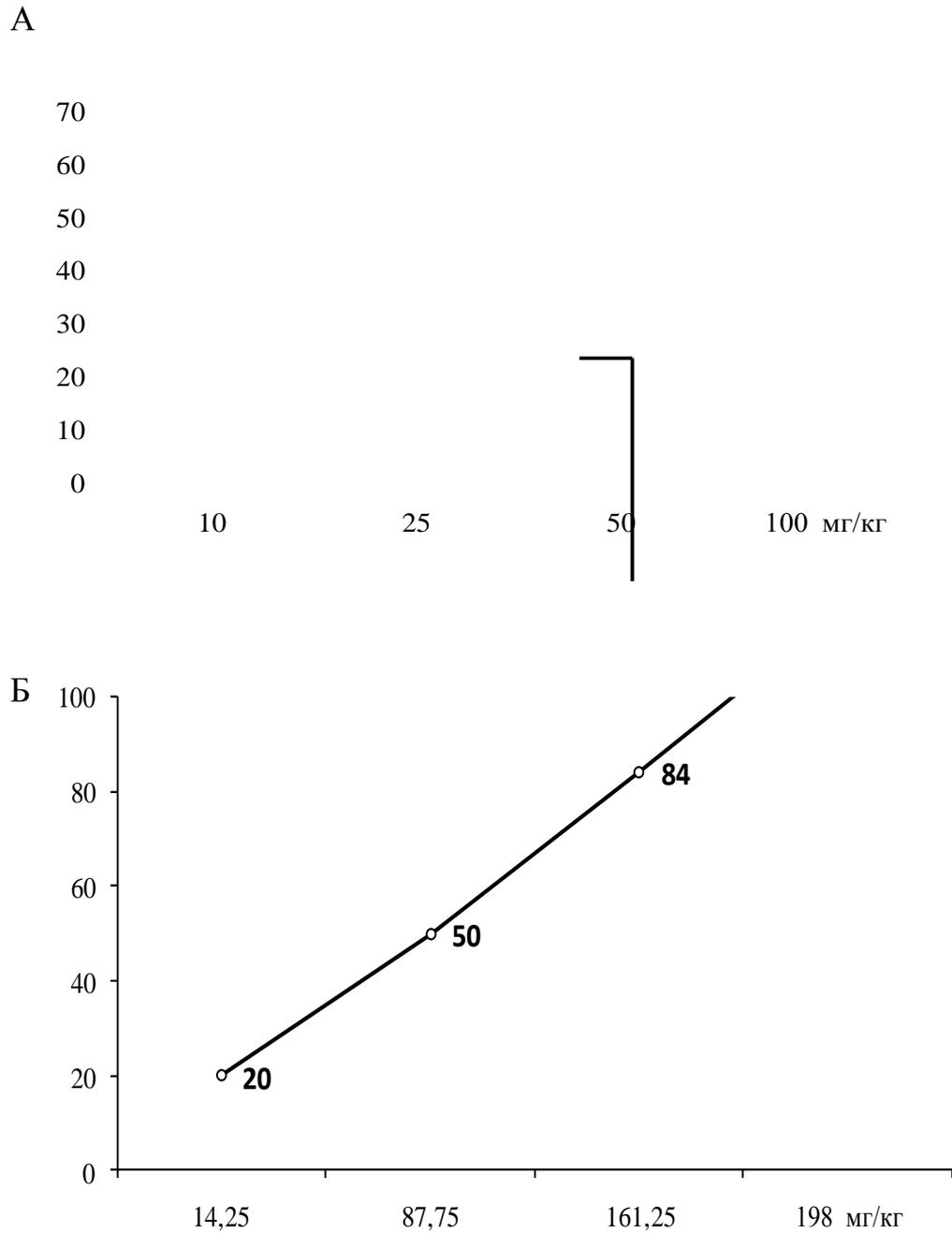


Рис. 4.3. Вплив фенітоїну на NMDA-викликані клонічні судоми передніх кінцівок

За віссю абсцис - дози фенітоїну, мг/кг (введені - А, розраховані - Б), за віссю ординат - відсоток захищених тварин (А, Б).

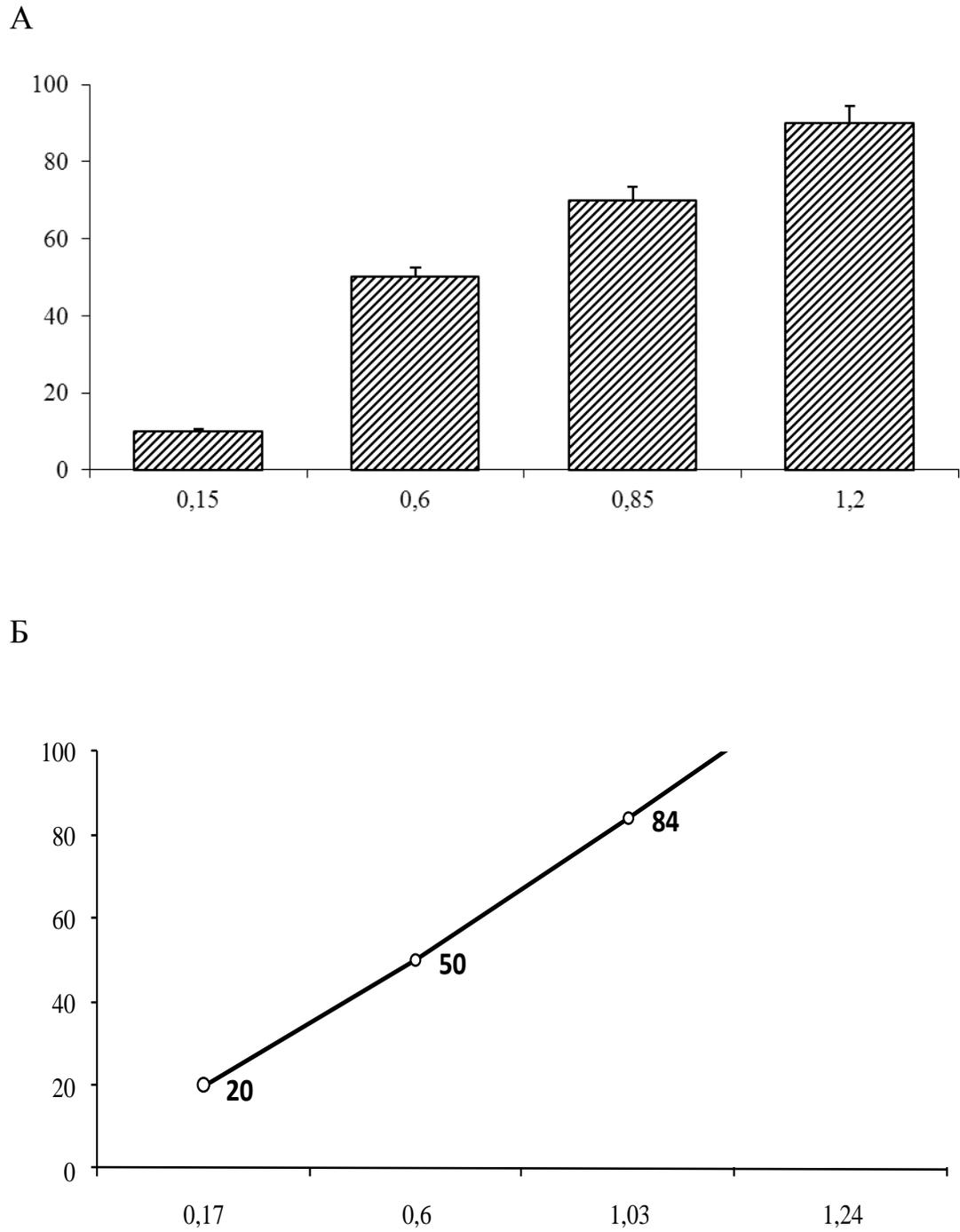


Рис. 4.4. Вплив діазепаму на NMDA-викликані клонічні судоми.

За віссю абсцис - дози діазепаму, мг/кг (введені - А, розраховані - Б),
за віссю осі ординат - відсоток захищених тварин (А, Б)

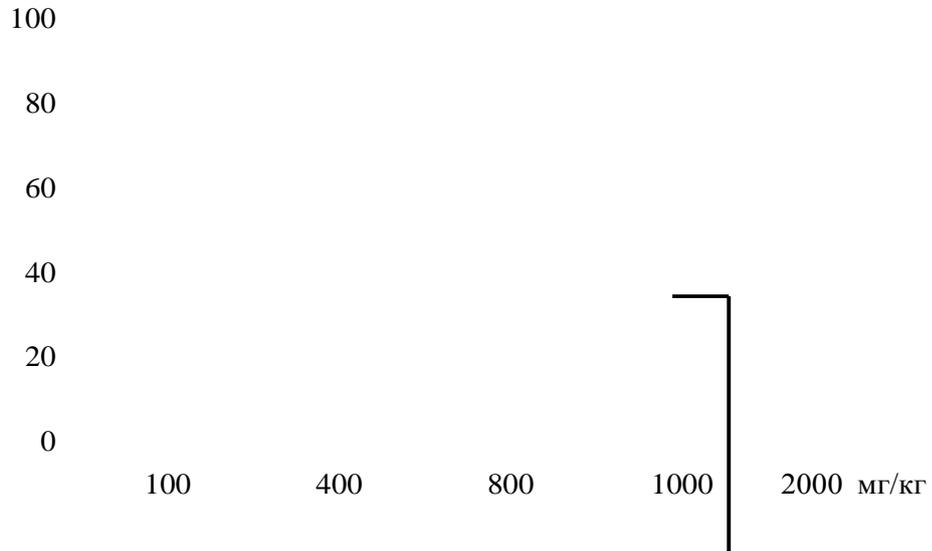
Дослідження впливу ксигерму-3 на NMDA-викликану тонічну екстензію передніх кінцівок виявило, що в діапазоні доз від 100,0 до 800,0 мг/кг не більше, ніж в 3 з 10 тварин відзначалася захисна дія проти тонічних судом (рис. 4.5). Збільшення дози ксигерму-3 з 800,0 до 2000,0 мг/кг приводило до зростання числа захищених тварин до 8 з 10 (рис. 4.5, А), в інших двох щурів короточасні (2-4 с) тонічні судоми передніх кінцівок все-таки реєструвалися. ЕД₅₀ ксигерму-3 становила 876,0 мг/кг (рис. 4.5, Б) з помилкою 223,9.

Фенітоїн дозою 10,0 мг/кг викликав захист від тонічних судом в 4-х з 10 тварин (рис. 4.6). Введення фенітоїну більш великими дозами викликало подальше збільшення протисудомних ефектів дозою 100,0 мг/кг фенітоїн повністю запобігав тонічним судомам у всіх тварин (рис. 4.6, А). За цих умов відзначалися виражені клонічні судоми задніх кінцівок і падіння на бік. ЕД₅₀ фенітоїну за цих умов склала 28,4 мг/кг (рис. 4.6, Б).

Істотна кількість тварин, захищених від тонічних судом виявилась після введення діазепаму дозою 0,06 мг/кг (рис. 4.7, А). За цих умов судоми реєструвалися у 6 з 9 тварин, а в дозі діазепаму 0,6 мг/кг у 8 з 10 тварин тонічні судоми були відсутні і збереглися виражені клонічні судоми. ЕД₅₀ діазепаму за цих умов становила 0,23 мг/кг із помилкою 0,087 (рис. 4.7, Б).

Таким чином, дослідження виявили, що ксигерм-3 не захищав тварин від судом, індукованих введенням агоністу іонотропних рецепторів збудливих амінокислот NMDA. Водночас, фенітоїн і діазепам виявляли виражені протисудомні ефекти за умов NMDA-викликаних клонічних і тонічних судом.

А



Б

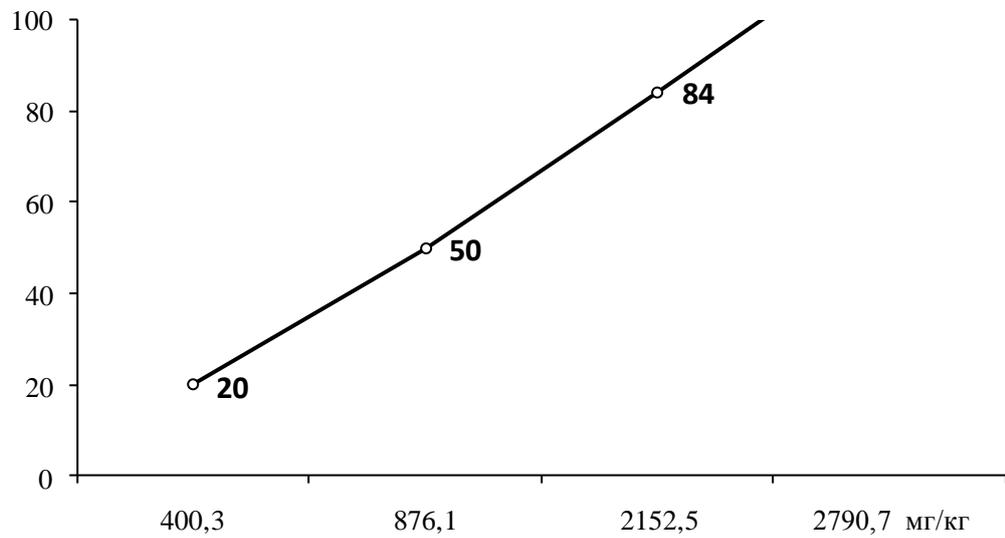


Рис. 4.5. Вплив ксигерму-3 на NMDA-викликані тонічні судоми

За віссю абсцис - дози ксигерму-3, мг/кг (введені - А, розраховані - Б),
за віссю ординат - відсоток захищених тварин (А, Б)

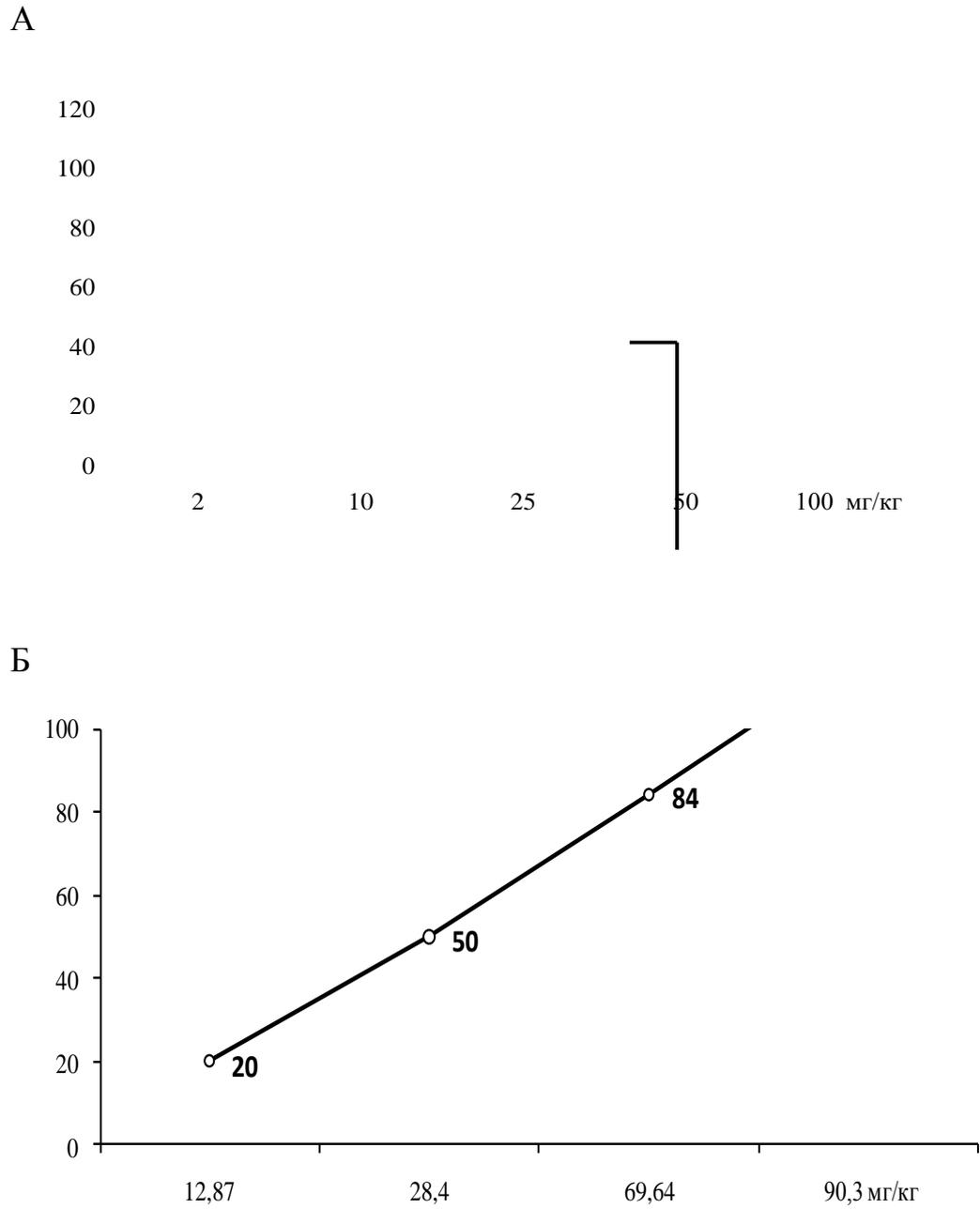


Рис. 4.6. Вплив фенітоїну на NMDA-викликані тонічні судоми

За віссю абсцис - дози фенітоїну, мг/кг (введені - А, розраховані - Б), за віссю ординат - відсоток захищених тварин (А, Б)

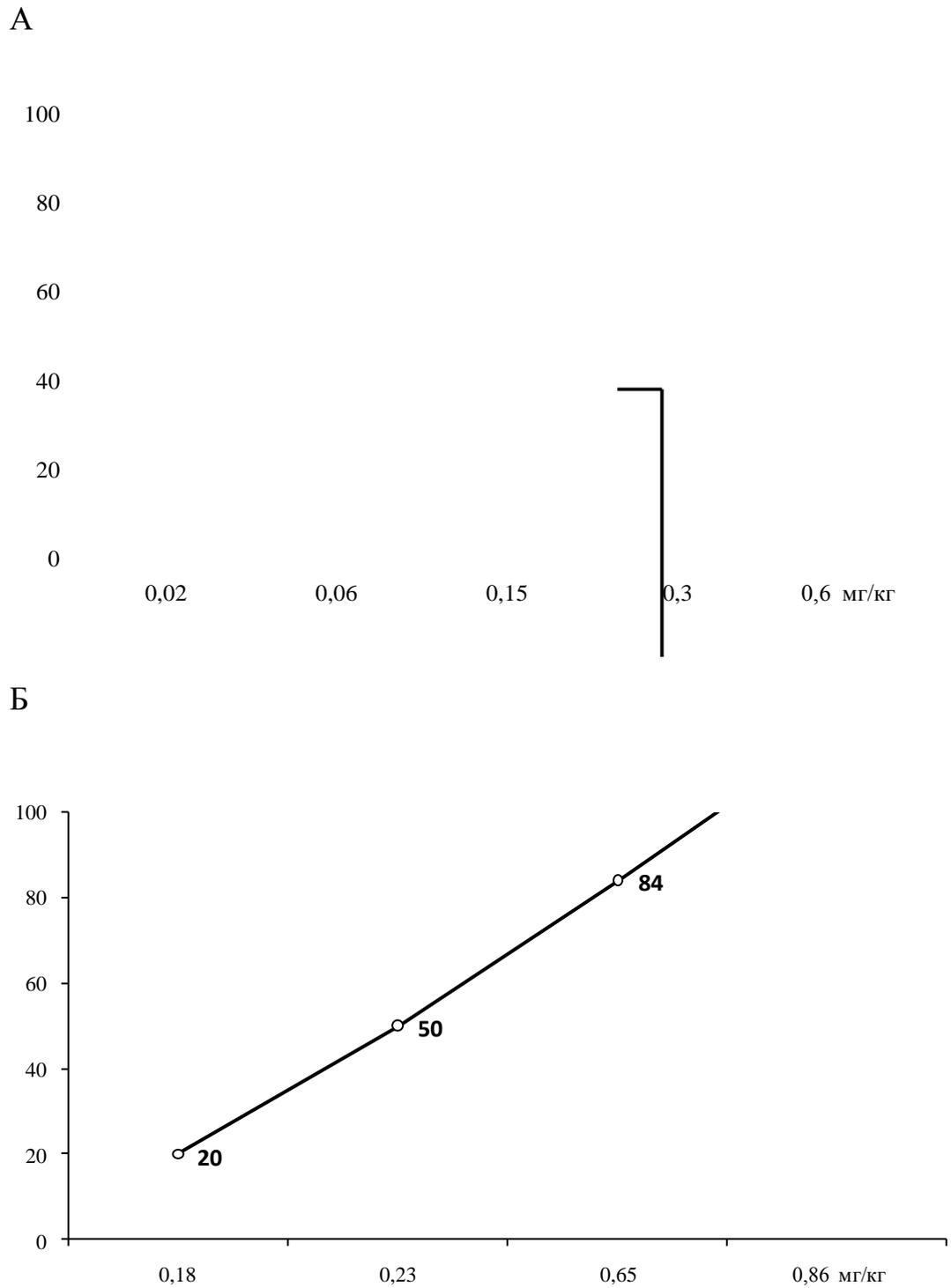


Рис. 4.7. Вплив діазепаму на NMDA-викликані тонічні судоми

За віссю абсцис - дози діазепаму, мг/кг (введені - А, розраховані - Б),
за віссю ординат - відсоток захищених тварин (А, Б)

4.2. Оцінка можливих небажаних ефектів ксигерму-3 за умов курсового введення на фоні судомної активності

Одним з недоліків існуючих протиепілептичних препаратів є можливість розвитку толерантності й істотного зниження тяжкості протисудомних ефектів. Тому важливим є дослідження протисудомних ефектів нових сполук за умов їх тривалого введення. Для виявлення розвитку толерантності до протисудомної дії ефективним є визначення порога МЕС, як досить чутливого і точно зумовленого методу [172].

Даний тест дозволяє виявити протисудомні та проконвульсивні ефекти досліджуваних речовин, а також їх застосування після припинення введення протиепілептичних препаратів.

Дослідження виявили, що протисудомний ефект зберігається протягом 14 днів щоденного введення ксигерму-3 дозою 570,0 мг/кг (рис. 4.8). Після припинення введення ксигерму-3 і дослідження через 7 днів порога МЕС не відзначалося розвитку ефекту гіперзбудливості - так званого феномена «віддачі». За цих умов не відзначалося також збереження протисудомних ефектів ксигерму-3 (рис. 4.8). Величини порога МЕС у тварин дослідної і контрольної груп суттєво не відрізнялися.

Введення мишам контрольної групи зворотнього агоністу бензодіазепінових рецепторів FG 7142 дозою 40,0 мг/кг через 2 дні після введення протягом 14 днів фізіологічного розчину не викликало судомної активності. У тварин дослідної групи, що одержувала протягом 14 днів діазепам дозами 5,0-20,0 мг/кг в/очер, введення FG 7142 викликало розвиток клонічних судом усіх кінцівок тулуба і голови (рис. 4.9, А). Водночас FG 7142 не викликав ніяких судомних проявів у мишей, що одержували протягом 14 днів ксигерму-3 дозами (200,0-600,0 мг/кг) (рис. 4.9, Б).

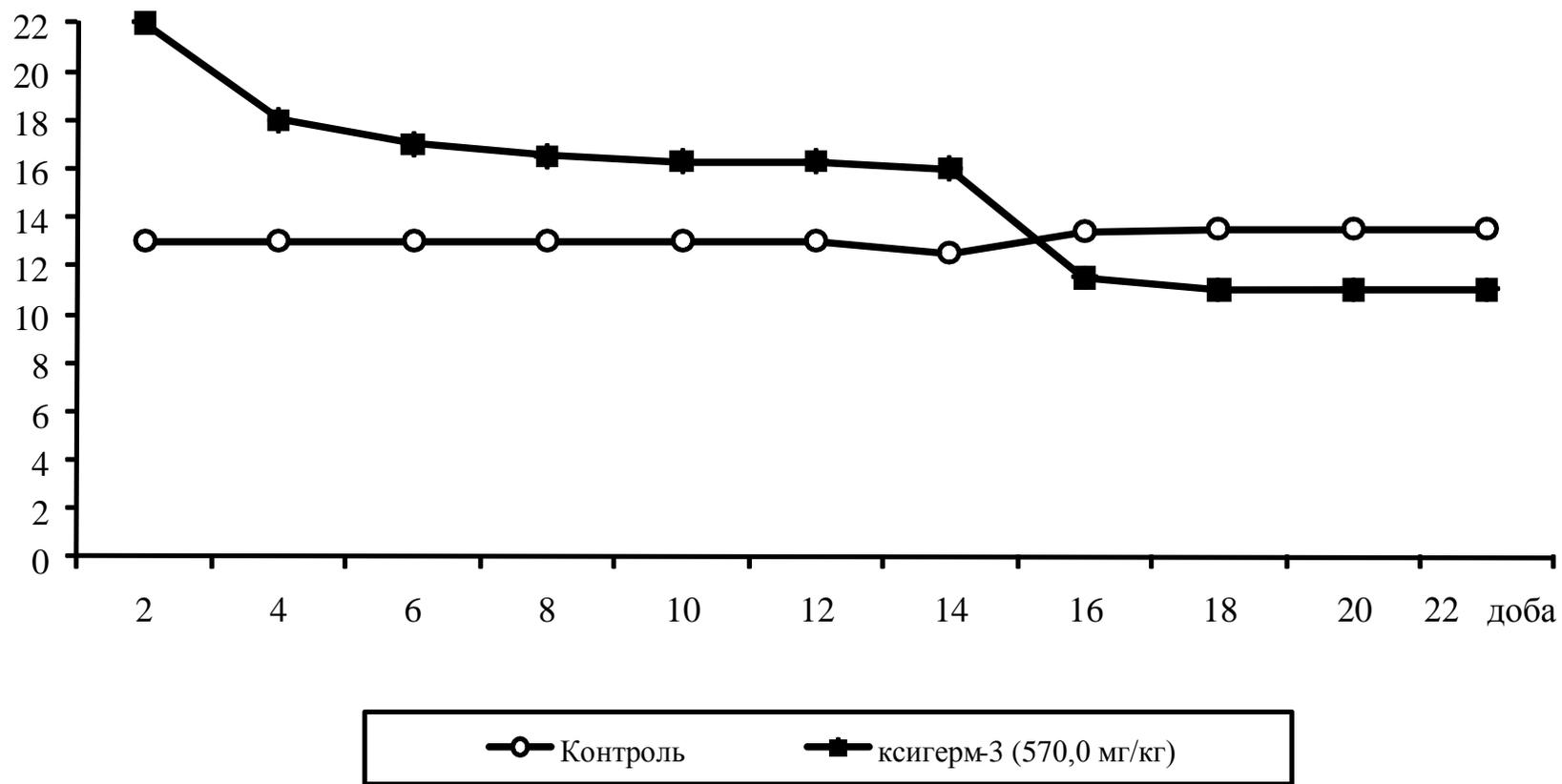


Рис. 4.8. Вплив щоденного протягом 14 днів введення ксигерму-3 (570,0 мг/кг) на поріг максимальних електрошокових судом у мишей

За віссю абсцис - дні введення, за віссю ординат поріг МЕС, мА

А



Б

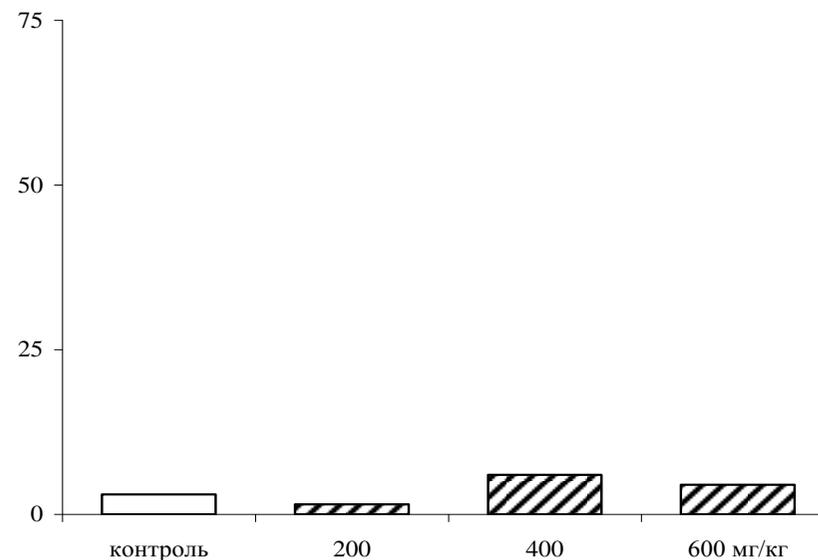


Рис. 4.9. Вплив ксигерму-3 і діазепаму на проконвульсивні ефекти FG 7142 у мишей.

За віссю абсцис - дози діазепаму (А) і ксигерму-3 (Б), за віссю ординат - % підвищення судомної активності.

Примітка: 1. Діазепам і ксигерм-3 вводили двічі на добу протягом 14 днів в/очер, FG7142 - дозою 40,0 мг/кг, в/очер.

4.3. Визначення ефективності ксигерму-3 за умов хронічної судомної активності

4.3.1. Вплив ксигерму-3 на судомну активність за умов електростимуляційного кіндлінгу

Раніше нами було показано, що досліджувані в роботі сполуки виявили протисудомну активність на моделях гострих судом. Очевидна необхідність дослідження впливу цих сполук на прояви хронічної судомної активності. Тому метою наших наступних досліджень була оцінка протисудомної дії ксигерму-3 на моделях хронічної епілептичної активності, за умов сформованого кіндлінгу, та кіндлінгу, що розвивається.

Завданням даної серії експериментів було дослідження ефектів нових сполук на судомну активність у мишей за умов кореального кіндлінгу, що розвивається. В якості препаратів порівняння використовували вальпроат натрію і леветирацетам.

Наведені в табл. 4.6. дані свідчать про те, що ксигерм-1 і ксигерм-2 не виявляли істотного впливу на інтенсивність судомних реакцій за умов кіндлінгу. На відміну від них, ксигерм-3 виявляв дозозалежну дію і дозою 300,0 мг/кг, значно зменшував тяжкість і тривалість ($P < 0,05$) судомних реакцій у кіндлінгових тварин (табл. 4.6). Протекторна ED_{50} для повного запобігання судом становила 228,95 мг/кг. Вальпроат натрію і леветирацетам також дозозалежно зменшували інтенсивність і тривалість кіндлінгових судом і виявляли протисудомні ефекти (див. табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Вплив ксигерму-1, -2, -3, вальпроату натрію і леветирацетаму на інтенсивність судом у мишей за умов кіндлінгу, що розвивається ($M \pm m$, $n=10$)

Сполуки, препарати	Час дослідження, год	Дози, мг/кг	Тяжкість судом, бали	Тривалість судом, с
Контроль	0,5		$4,7 \pm 0,3$	$26,2 \pm 0,4$
Ксигерм-1	0,5	100,0	$4,8 \pm 0,4$	$25,8 \pm 0,4$
		300,0	$4,2 \pm 0,2$	$24,6 \pm 0,3$
		900,0	$4,0 \pm 0,5$	$24,1 \pm 0,4$
Ксигерм-2	0,5	80,0	$4,9 \pm 0,3$	$25,7 \pm 0,3$
		160,0	$4,4 \pm 0,2$	$24,8 \pm 0,3$
		480,0	$4,2 \pm 0,3$	$24,0 \pm 0,2$
Ксигерм-3	0,5	100,0	$4,0 \pm 0,5$	$23,7 \pm 0,4$
		150,0	$3,2 \pm 0,2^*$	$22,9 \pm 0,3$
		300,0	$1,5 \pm 0,3^*$	$16,8 \pm 0,4^*$
Вальпроат натрію	0,5	50,0	$4,9 \pm 0,1$	$25,2 \pm 0,3$
		100,0	$3,2 \pm 0,6^*$	$16,0 \pm 0,4^*$
		300,0	$1,5 \pm 0,4^*$	$10,2 \pm 0,3^*$
Леветирацетам	1,0	5,0	$2,3 \pm 0,3^*$	$15,7 \pm 0,2^*$
		10,0	$1,2 \pm 0,2^*$	$11,4 \pm 0,3^*$
		15,0	$0,7 \pm 0,2^*$	$10,2 \pm 0,4^*$

Завданням наступної серії дослідів було дослідження впливу ксигерму-3 на розвиток корнеального кіндлінгу у мишей. Із цією метою перед кожною

тестуючою стимуляцією тваринам вводили ксигерм-3 дозою 30,0; 60,0 і 180,0 мг/кг, а також препарат порівняння леветирацетам - 10,0; 15,0 і 30,0 мг/кг. Досліди показали, що ксигерм-3 дозою 30,0 мг/кг незначно впливав на динаміку розвитку корнеального кіндлінгу (табл. 4.7). Більш виражені ефекти відзначалися під час збільшення дози до 60,0 і 180,0 мг/кг (див. табл. 4.7). Так, у групі тварин, що отримували ксигерм-3 дозою 30,0 мг/кг кількість стимуляцій, що необхідна для досягнення певної стадії судом була відносно такою ж, як у тварин контрольної групи. Число стимуляцій, необхідне для розвитку судом інтенсивністю 1-2 бали за умов введення ксигерму-3 дозою 60,0 мг/кг було $7,6 \pm 0,2$, тоді як у контролі $3,5 \pm 0,5$ стимуляцій (див. табл. 4.7).

Для розвитку генералізованих судом інтенсивністю 3-4 бали або 5-6 балів у групі мишей, що отримували ксигерм-3 дозою 60,0 мг/кг також була потрібна значно більша кількість стимуляцій, чим у контролі (див. табл. 4.7). Під впливом ксигерму-3 дозою 180,0 мг/кг відзначалась значна затримка розвитку кіндлінгу, яка може бути зіставлена з протиепілептичним ефектом леветирацетама дозою 30,0 мг/кг (табл 4.7). Таким чином, ксигерм-3 дозою 60,0 і 180,0 мг/кг суттєво затримував розвиток судомних реакцій за умов корнеального кіндлінгу у мишей.

Під час дослідження тривалості існування стану підвищеної судомної готовності, тобто стану кіндлінгу через 10 днів після завершення формування кіндлінгу виявлено, що в контрольній групі перша стимуляція викликала судоми інтенсивністю 3 бали у 28 % мишей.

Середня тяжкість судом становила $2,3 \pm 1,2$ порівняно з $3,9 \pm 0,6$ балами до перерви у стимуляціях. У групі мишей, що отримували ксигерм-3 дозами 60,0 і 180,0 мг/кг число тварин із судомами становило 29 % і 27 % і їх середня тяжкість $3,8 \pm 0,5$ і $4,0 \pm 0,4$ бали відповідно. Середня тривалість судом у групі, що отримувала ксигерм-3 була відносно такою ж, як в контролі ($24,7 \pm 0,16$ і $26,2 \pm 0,42$ с).

Вплив щоденного введення ксигерму-3 на розвиток корнеального кіндлінгу у мишей ($M \pm m$, $n=10$)

Сполуки, мг/кг		Число стимуляцій необхідне для розвитку судом інтенсивністю		
		1-2 бали	3-4 бали	5-6 балів
Контроль		$3,5 \pm 0,5$	$11,2 \pm 0,8$	$14,7 \pm 1,2$
Ксигерм-3	30,0	$4,8 \pm 0,4$	$12,4 \pm 0,6$	$15,5 \pm 0,8$
	60,0	$7,6 \pm 0,2^*$	$15,6 \pm 0,7$	$17,8 \pm 0,9^*$
	180,0	$9,2 \pm 0,3$	$17,1 \pm 0,8$	$19,2 \pm 1,1^*$
Леветирацета м	10,0	$6,1 \pm 0,4^*$	$13,8 \pm 0,7^*$	$16,2 \pm 0,9^*$
	15,0	$8,2 \pm 0,3^*$	$15,2 \pm 0,5^*$	$17,8 \pm 0,7^*$
	30,0	$9,4 \pm 0,2^*$	$16,9 \pm 0,6^*$	$20,9 \pm 0,8^*$

У групі мишей, що отримували леветирацетам перша стимуляція викликала судоми лише у 12 % тварин, а їх середня інтенсивність була значно меншою і становила $1,2 \pm 0,3$ бали ($P < 0,05$). Характерною рисою у всіх групах, у тому числі і контролі, була висока летальність, що досягала 50 %, і була значно більшою, ніж летальність мишей у процесі формування кіндлінгу (до 16 %). Повторна стимуляція у мишей, які вижили, викликала судоми інтенсивністю не більше 3 балів. Введення ксигерму-3 дозою 180,0 мг/кг викликало редукцію судом до 1,8 бали. Таким чином, судомна активність у відстроченому періоді кіндлінгу суттєво не відрізнялась чутливістю до дії ксигерму-3.

Розрахунок індексу безпеки ксигерму-3 у порівнянні до вальпроату і леветирацетаму за умов моделі кореального кіндлінгу у мишей продемонстрував наявність широкого спектру безпеки для ксигерму-3 - 116 і

леветирацетаму - 198 у порівнянні з індексом, який дорівнює 2 для вальпроату натрію (рис. 4.10).

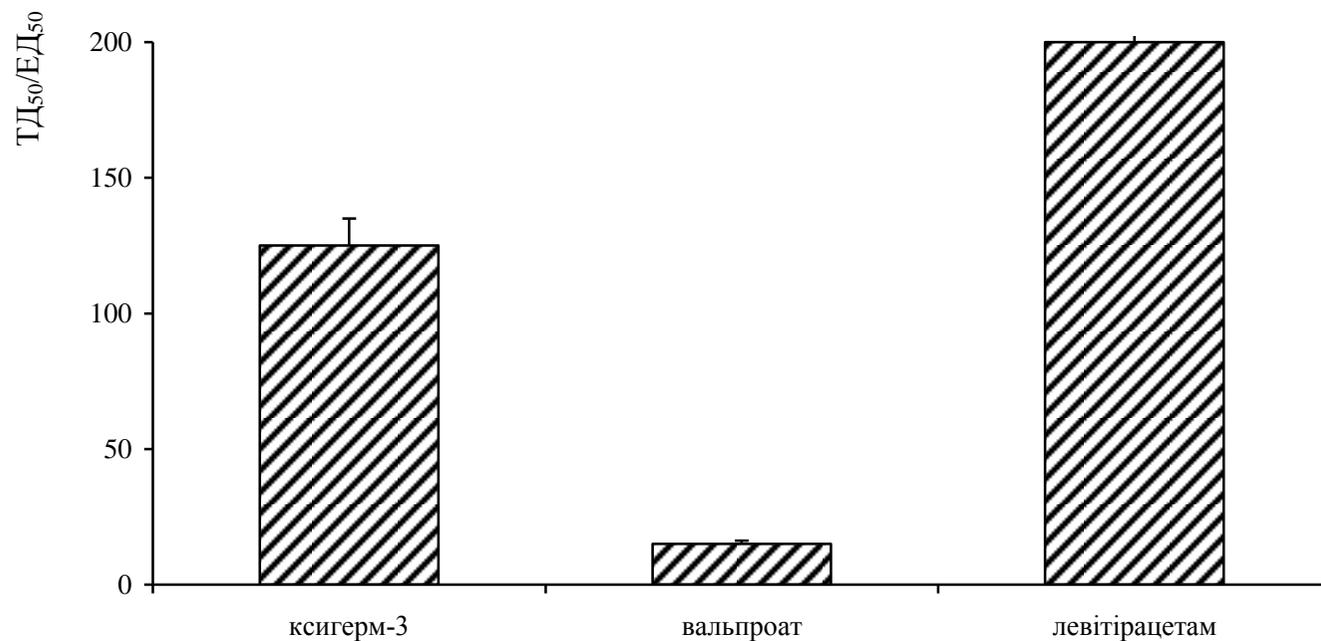


Рис.4.10. Індекс безпеки ксигерму-3, вальпроату і левітірацетаму у мишей з корнеальним кіндлінгом

За віссю абсцис - досліджувані препарати, мг/кг; за віссю ординат - спектр безпеки (ТД₅₀/ЕД₅₀).

Примітка: спектр безпеки являє собою часткове відділення ТД₅₀, яка отримана в тесті «обертового стрижня» і ефективною дозою ЕД₅₀, що викликає зниження тяжкості судом у кіндлінгових мишей на 50 %

Завданням наступної серії експериментів було дослідження ефектів ксигерму-3 на сформовані судоми у щурів за умов амігдалярного кіндлінгу, еквівалентного комплексним парціальним судомам із вторинною генералізацією у пацієнтів [155, 237, 239]. Виявлено, що ксигерм-3 викликав дозозалежну протисудомну дію по відношенню до різних показників судом у кіндлінгових щурів, викликаючи істотне зниження як тяжкості судом, так і тривалості післярозряду (рис. 4.11).

Надпорогова електростимуляція мигдалини електричним струмом інтенсивністю 500 мкА викликала судоми інтенсивністю 5 балів (рис. 4.11. А, світлі стовпчики) послідовно протягом 3 днів. Попереднє введення ксигерму-3 дозою 200,0 мг/кг викликало достовірне зменшення тяжкості судом до 3 балів ($P < 0,05$) і тривалості судомного післярозряду (рис. 4.11., Б).

Зменшення тривалості судомного післярозряду після введення ксигерму-3 дозою 300,0 мг/кг до 50 с свідчить про те, що під впливом ксигерму-3 підвищується не тільки судомний поріг, але і пригнічується поширення судомного розряду.

Під час оцінки впливу ксигерму-3 на розвиток амігдалярного кіндлінгу у тварин контрольної групи середня величина сили струму, що викликає судомний післярозряд, становила $204,0 \pm 58,0$ мкА, у тварин, що одержували ксигерм-3 дозою 200,0 мг/кг - $198,0 \pm 24,0$ мкА і дозою 300,0 мг/кг - $198,0 \pm 40,0$ мкА відповідно. Аналіз даних за допомогою тесту ANOVA не виявив достовірних відмінностей між групами.

Щоденне введення ксигерму-3 дозою 200,0 мг/кг суттєво гальмувало розвиток амігдалярного кіндлінгу у щурів, що проявлялось у значно меншій тяжкості судом і тривалості судомних післярозрядів у порівнянні з контролем (рис. 4.12, А, Б). Введення препаратів і електростимуляції продовжувалось протягом 24 днів. До цього часу у всіх тварин контрольної групи спостерігався розвиток генералізованих клоніко-тонічних судомних нападів інтенсивністю 5 балів.

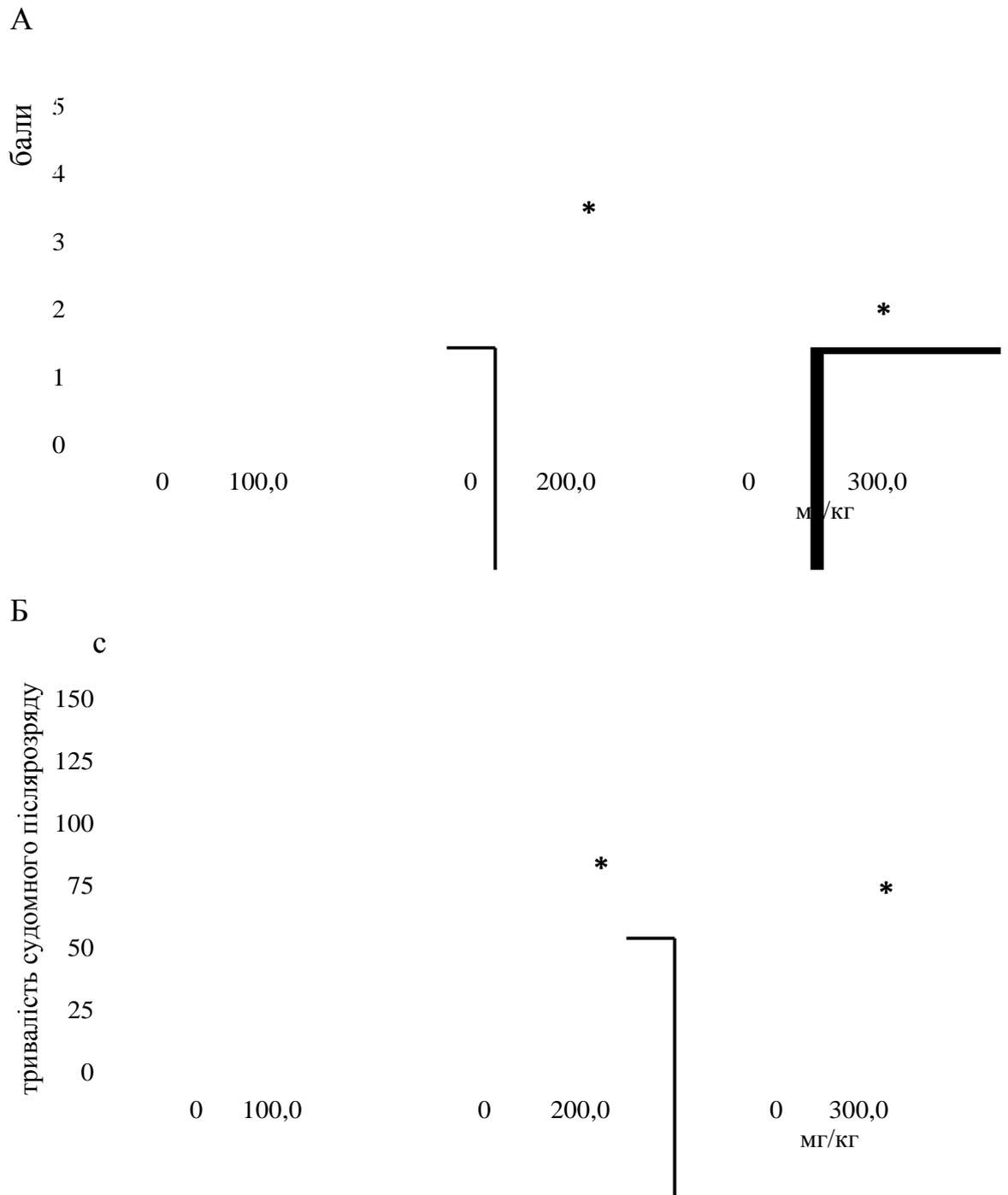


Рис. 4.11. Вплив ксигерму-3 на судомну активність у кіндлінгових щурів з розвинутими судомами інтенсивністю 5 балів.

За віссю абсцис - дози ксигерму-3, мг/кг, за віссю ординат - важкість судом (А), бали; тривалість судомного післярозряду (Б), с; світлі стовпчики - контроль, заштриховані - дослід.

У групі тварин, яким вводили ксигерм-3 дозою 200,0 мг/кг у двох з 10 щурів і в 3 з 10 щурів у групі, що отримувала ксигерм-3 дозою 300,0 мг/кг розвитку кіндлінгових судом зазначеної інтенсивності (5 балів) не спостерігалось. Протягом усього періоду дослідження тривалість судомних післярозрядів була значно меншою в групах, що отримували ксигерм-3 у порівнянні з контрольною групою (рис. 4.12, Б).

У тварин контрольної групи для розвитку судомних нападів інтенсивністю 5 балів у середньому необхідно було $9,4 \pm 0,6$ стимуляцій (табл. 4.8). У групі щурів, що отримували ксигерм-3 була потрібна значно більша кількість стимуляцій.

Так, тваринам, яким вводили ксигерм-3 дозою 200,0 мг/кг для досягнення судом інтенсивністю 5 балів необхідно було в середньому $16,2 \pm 1,2$ стимуляцій, а тим, що отримували ксигерм-3 дозою 300,0 мг/кг - $15,8 \pm 1,4$ стимуляцій, що було достовірно більше у порівнянні із числом стимуляцій у тварин контрольної групи ($P < 0,05$) (табл. 4.8).

Кумулятивна тривалість судомних післярозрядів, яка необхідна для розвитку судом інтенсивністю 5 балів, являла собою суму тривалості післярозрядів у кожного щура, що зумовлювало розвиток першого нападу тяжкістю 5 балів. У контрольній групі показник кумулятивного післярозряду судом інтенсивністю 5 балів становив у середньому 227 с, у групі, що отримувала ксигерм-3 дозою 200,0 мг/кг цей показник був на 68 % більше в порівнянні з контролем (див. табл. 4.8).

У тварин, що отримували ксигерм-3 дозою 300,0 мг/кг тривалість кумулятивних післярозрядів, необхідних для досягнення судом інтенсивністю 4 бали була близько 69,0 с, що на 37,7 % менше у порівнянні з відповідним показником у контролі (182,6 с). Це зумовлене тим, що тварини, які отримували ксигерм-3 мали значно меншу індивідуальну тривалість судомних післярозрядів, що супроводжують судоми значно меншої тривалості, а не тому, що тваринам була потрібна менша кількість стимуляцій для досягнення судом інтенсивністю 4 бали (табл. 4.8).

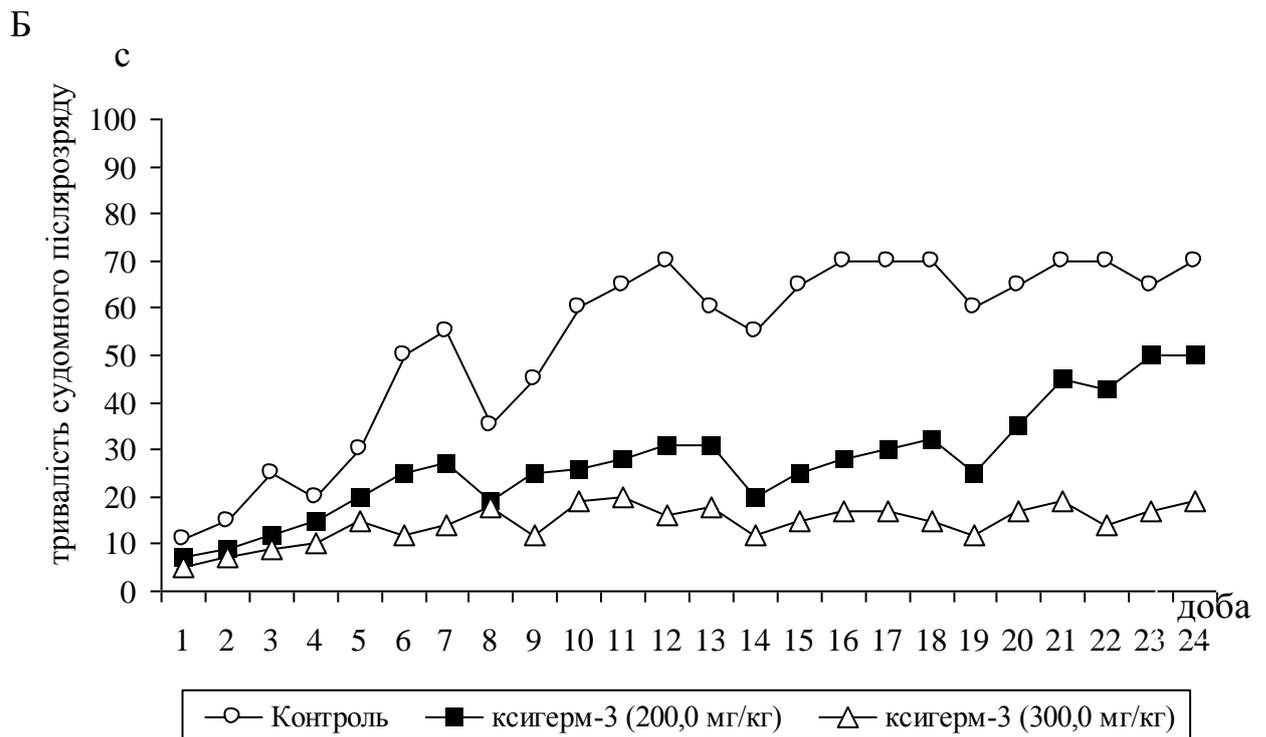
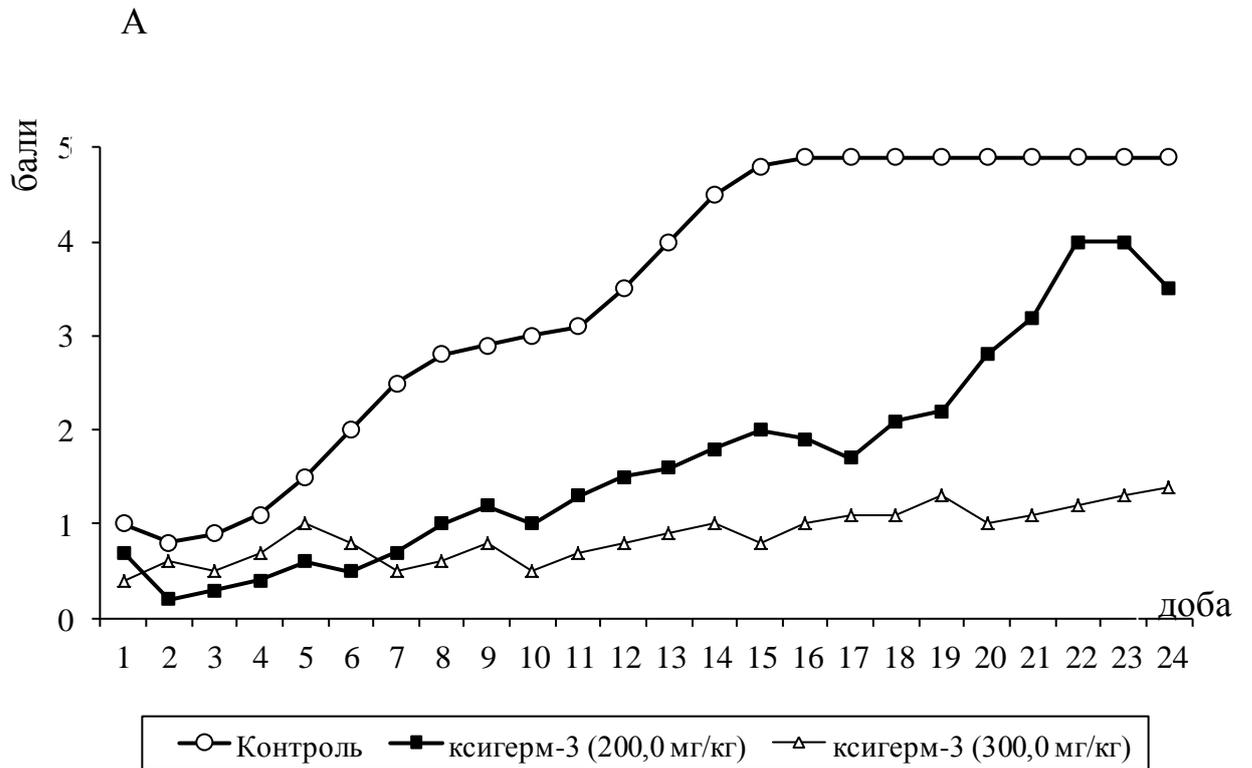


Рис. 4.12. Вплив різних доз ксигерму-3 на розвиток електростимуляційного кіндлінгу у щурів

За віссю абсцис - дні стимуляцій, за віссю ординат - тяжкість судом (А), бали; тривалість судомного післярозряду (Б), с

Якщо ж з даних табл. 4.8 виключити показники тварин, у яких судомі не досягали інтенсивності 5 балів, то відмінності між групами будуть ще більш значними ($P < 0,05$).

Дослідження динаміки кіндлінгових судом через 1 місяць після припинення стимуляцій і введення ксигерму-3 виявило, що інтенсивність судомних реакцій і тривалість судомного післярозряду суттєво не різнилися у тварин, що отримували ксигерм-3 (300,0 мг/кг) у порівнянні з контролем (рис. 4.13).

Як видно з рис. 4.13, у тварин контрольної групи генералізовані кіндлінгові судомі інтенсивністю 5 балів виникали у відповідь на другу тестуючу стимуляцію, а у тварин, що раніше отримували ксигерм-3 дозою 300,0 мг/кг, судомі досягали інтенсивності 5 балів у відповідь на четверту електростимуляцію (рис. 4.13, А), тобто більш повільно, ніж у тварин контрольної групи. Тривалість судомного післярозряду у щурів, що раніше отримували ксигерм-3 також була меншою, ніж у контролі (рис. 4.13, Б).

Таблиця 4.8

Вплив ксигерму-3 на розвиток амігдаларного кіндлінгу у щурів ($M \pm m$)

Групи	Число стимуляцій, необхідне для досягнення судом				Загальна тривалість післярозрядів, с			
	2 бала	3 бала	4 бала	5 балів	2 бала	3 бала	4 бала	5 балів
Контроль (n = 10)	4,3 ± 0,4	7,8 ± 0,6	8,2 ± 0,7	9,4 ± 0,6	30,1 ± 6,2	132,4 ± 23,8	182,6 ± 24,2	226,7 ± 27,2
Ксигерм-3, 200,0 мг/кг (n=9)	6,8 ± 0,8	10,7 ± 0,8	11,2 ± 0,8	16,2 ± 1,2	39,4 ± 11,2	108,6 ± 22,4	118,9 ± 24,9	382,4 ± 60,9*
Ксигерм-3, 300,0 мг/кг (n=10)	5,4 ± 0,9	10,2 ± 0,9	10,5 ± 0,8	15,8 ± 1,4	38,2 ± 13,2	62,4 ± 14,3*	68,8 ± 15,2*	205,1 ± 64,8

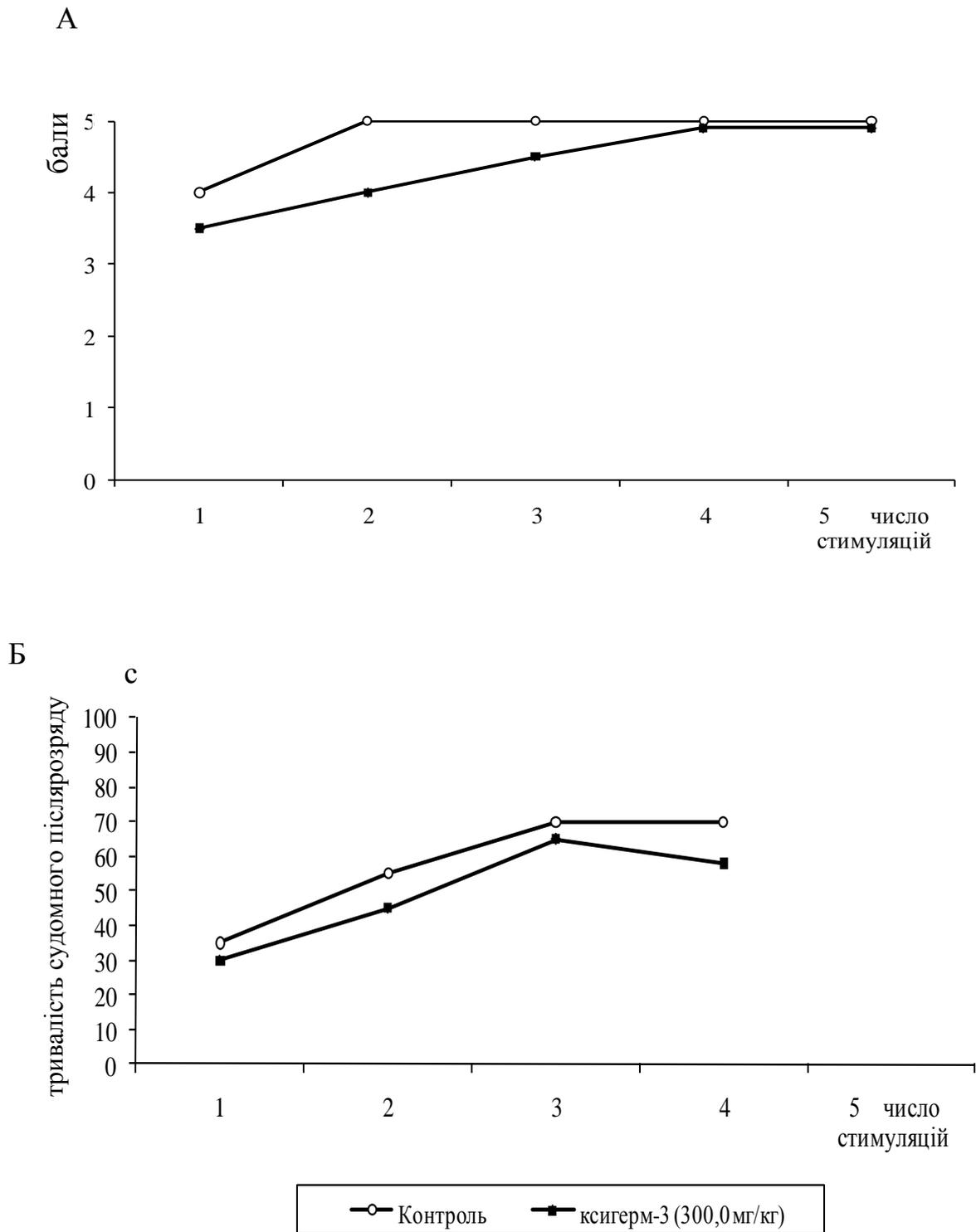


Рис. 4.13. Розвиток судомних реакцій у тварин через 1 місяць після припинення електричних стимуляцій мигдалини
 За віссю абсцис - число стимуляцій, за віссю ординат - тяжкість судом (А), бали; тривалість судомного післярозряду (Б), с

4.3.2. Вплив ксигерму-3 на судомну активність за умов хімічного кіндлінгу

Результати досліджень протисудомної дії ксигерму-3 на розвинутий пентилентетразоловий кіндлінг виявили, що ксигерм-3 дозою 570,0 мг/кг (еквівалент ED_{50} на моделі МЕС) істотно зменшував середню тяжкість судом з 4,9 балів в контролі до 3,6 балів у досліді ($P < 0,05$) (табл. 4.9). Під час введення ксигерму-3 дозою 1100,0 мг/кг відзначався подібний ефект, як і під час введення вальпроату натрію (450,0 мг/кг) або леветирацетаму (30,0 мг/кг).

Таблиця 4.9

Вплив ксигерму-3 та класичних протиепілептичних препаратів на інтенсивність судомних реакцій за умов сформованого пентилентетразолового кіндлінгу у мишей ($M \pm m$, $n=10$)

Сполуки, препарати	Доза (мг/кг, в/очер)	Інтенсивність судом (бали)	
		Контроль	Дослід
Ксигерм-3	250,0	4,8 ± 0,2	4,1 ± 0,3
	570,0	4,9 ± 0,3	3,6 ± 0,1*
	1100,0	4,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2*
Карбамазепін	9,0	4,4 ± 0,3	4,2 ± 0,2
	18,0	4,6 ± 0,2	4,4 ± 0,3
	36,0	4,8 ± 0,1	3,8 ± 0,2*
Вальпроат натрію	150,0	4,6 ± 0,2	3,8 ± 0,3
	295,0	4,8 ± 0,3	2,2 ± 0,2*
	450,0	4,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1*
Леветирацетам	15,0	4,6 ± 0,3	3,1 ± 0,2*
	30,0	4,8 ± 0,2	2,0 ± 0,3*
	60,0	4,4 ± 0,2	0,8 ± 0,1*

У наступній серії дослідів оцінювали вплив ксигерму-3 на розвиток судомної активності за умов пентиленететразолового - кіндлінгу. Для цього, починаючи з першого дня введення пентиленететразолу, за 30 хв перед введенням конвульсанту тваринам вводили ксигерм-3 дозою 570,0 мг/кг. У групі порівняння вводили леветирацетам (30,0 мг/кг). Експерименти виявили, що у тварин, що отримували ксигерм-3, відзначалась статистично достовірно менша інтенсивність судомних реакцій порівняно з контролем, починаючи з 6-го введення тестуючої дози пентиленететразолу (рис. 4.14). Генералізовані клоніко-тонічні напади у мишей, яким ввели ксигерм-3, а також леветирацетам, викликати не вдавалось протягом 21-ї доби введення пентиленететразолу.

Разом з тим, після припинення введення досліджуваних сполук протягом 10-ти днів, наступне перше введення тестуючої дози пентиленететразолу викликало швидке зростання інтенсивності судомних реакцій у тварин, які раніше отримували ксигерм-3, тоді як у групі мишей, що отримували леветирацетам, відзначалося збереження протиепілептичного ефекту протягом цього часу і лише надалі відбувалося зростання тяжкості судом, які не відрізняються істотно від контролю (рис. 4.14).

Таким чином, дослідження показали, що ксигерм-3 має протисудомну дію, як на моделі розвинутого пентиленететразолового кіндлінгу, так і затримує розвиток судомних реакцій за умов його формування. Разом з тим, як і більшість протиепілептичних препаратів, ксигерм-3 не виявляє протиепілептогенної дії, оскільки припинення введення ксигерму-3 супроводжувалося швидким зростанням інтенсивності судомних реакцій за умов пентиленететразолового кіндлінгу.

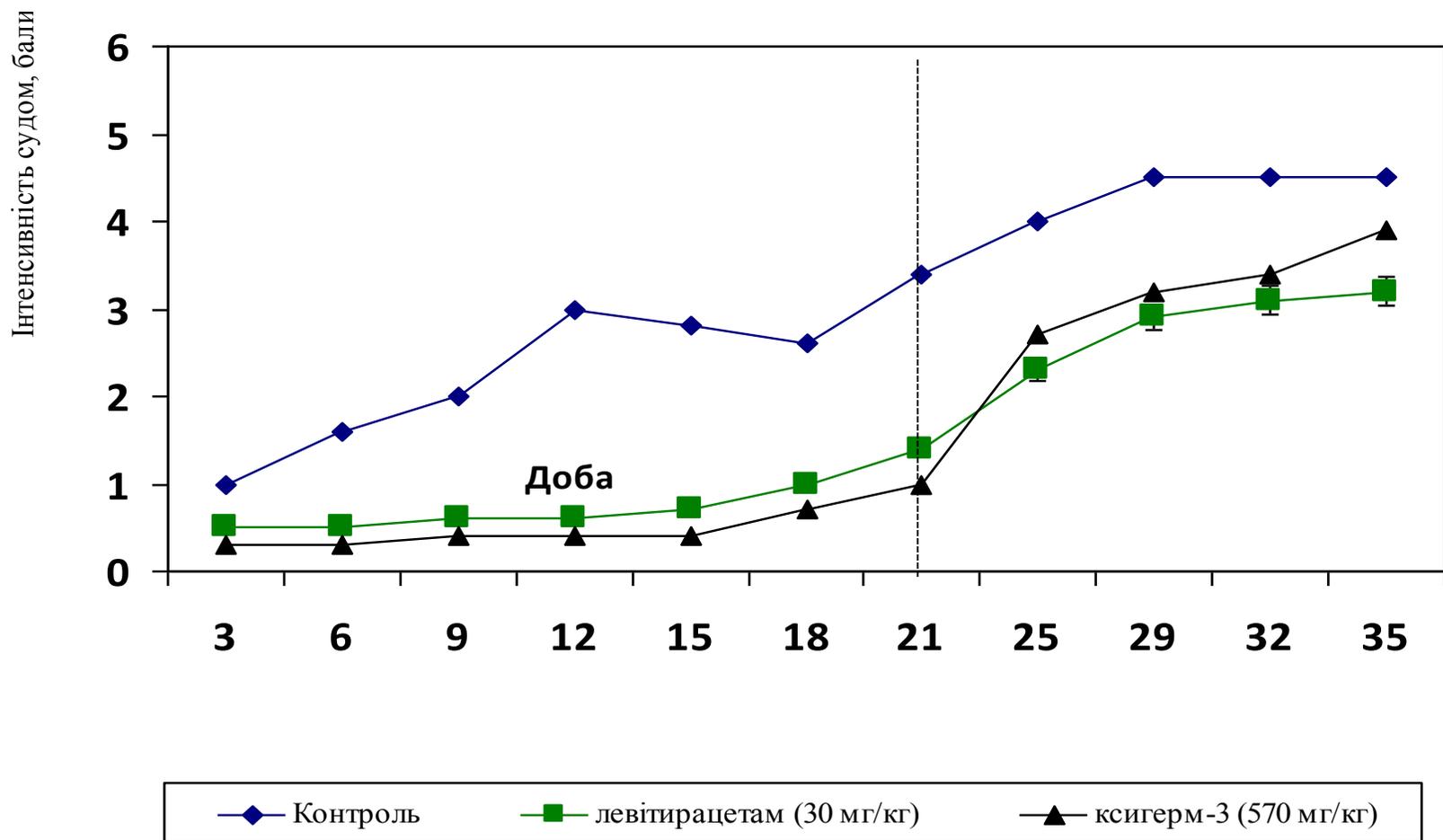


Рис. 4.14. Вплив щоденного введення ксигерму-3 і левітирацетаму на розвиток пентилентетразолового кіндлінгу.

В усіх групах після 21-ї ін'єкції введення препаратів було припинено протягом 10 днів (вертикальна пунктирна лінія), а потім продовжені тестуючі стимуляції пентилентетразолу без введення досліджуваних препаратів.

4.4. Ефекти ксигерму-3 на судомну активність зрізів гіпокампу

4.4.1. Ефекти ксигерму-3 на 4-амінопіридин-викликану епілептиформну активність у зрізах гіпокампу

Завданням цієї серії експериментів було дослідження впливу ксигерму-3 на різні електрофізіологічні показники, індуковані під впливом блокатора калієвих каналів 4-амінопіридину у зрізах гіпокампу. Особливість дії 4-амінопіридину полягає в тому, що за цих умов збуджуюча і гальмівна синаптична активність залишаються не тільки інтактними, але навіть трохи посилені. Ефекти ксигерму-3 порівнювали із впливом протиепілептичних препаратів з різними механізмами протисудомної дії - карбамазепіном, вальпроатом натрію, фенітоїном.

Виявлено, що додавання в омиваючий розчин 50 μM 4-амінопіридину викликало появу спонтанних типових спалахів інтеріктальної епілептиформної активності у полі СА3 гіпокампу. Voskuyl та Albus [262] довели, що подібні інтеріктальні розряди, викликані впливом 4-амінопіридину генеруються у полях СА2/СА3 та поширюються до нейронів поля СА1.

Характерна ЕпА, яка викликана за допомогою 4-амінопіридину представлена на рис. 4.15. За 25 хв після дії 4-амінопіридину частота розрядів варіювала від 0,8 до 51,6 у 1 хв, що в середньому становило $23,2 \pm 2,4$, амплітуда розрядів варіювала від 0,28 до 2,56 мВ, середня амплітуда становила $0,38 \pm 0,6$ мВ. Вплив препаратів на амплітудно-частотні характеристики ЕпА, викликані за допомогою 4-АМП представлені в Табл. 4.10.

Ксигерм-3 досить ефективно пригнічував спалахи інтеріктальної епілептиформної активності у 6 з 8 зрізів гіпокампу протягом 10-15 хв. Фенітоїн і карбамазепін пригнічували пароксизмальні розряди у 4 з 7 і у 3 з 5 зрізах відповідно.

Вплив ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на амплітудно-частотні показники 4-амінопіридин-викликаних розрядів у зрізах гіпокампу

Препарати	Концентрація, μM	Амплітуда			Частота розрядів		
		↓	↑	-	↓	↑	-
Ксигерм-3	700,0	6/8		2/8	6/8		2/8
Вальпроат натрію	800,0	1/6	2/6	3/6	2/6	4/6	
Карбамазепін	60,0	4/7	1/7	2/7	4/7	2/7	1/7
Фенітоїн	50,0	3/5		2/5	3/5	1/5	1/5

- Примітки: 1. ↓ - істотне зниження амплітуди або частоти розрядів;
 2. ↑ - істотне зростання амплітуди або частоти розрядів;
 3. « - » відсутність статистично значимих змін.

Вальпроат натрію у досліджуваній концентрації викликав зниження амплітуди розрядів тільки у 1 з 6 гіпокампульних зрізів. У тих зрізах, де розряди не пригнічувалися під впливом вальпроату натрію відзначалася або відсутність змін амплітуди протягом 30-40 хв спостереження, або спостерігалася тенденція до збільшення амплітуди розрядів. Крім того, під впливом вальпроату натрію відзначалося зростання частоти розрядів у більшості досліджуваних зрізів (4/6).

Завданням наступної серії експериментів було дослідження впливу ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на викликану сумарну активність у зрізах гіпокампу за умов дії 4-амінопіридину. Досліди з відведенням сумарної викликаної активності виявили, що синаптичні та нейронні системи гіпокампу зберігають свої основні електрофізіологічні властивості в умовах зрізів гіпокампу. Так, у відповідь на електричну стимуляцію колатералей Шафера у пірамідному шарі поля CA1 реєструвався викликаний потенціал (ВП), що складався з початкового швидкого позитивно-негативного відхилення з

латентним періодом 1,5-2 мс, що вважається показником проведення волокнами, тобто пресинаптичний компонент відповідної реакції, і повільної позитивної хвилі з накладеним на неї швидким негативним відхилення - популяційним спайком (ПС). Передній фронт позитивної хвилі являє собою популяційний викликаний потенціал популяційного спайку (поп-ВППС).

Найбільш стабільним компонентом ВП є ПС з латентним періодом 3-5 мс, що являє собою синхронний розряд, пірамідних нейронів і його амплітуда служить об'єктивним, досить чутливим показником реактивності нейронів. Під час зростання сили стимулюючого струму відзначається швидкий зріст амплітуди ПС і скорочення його латентності. Під час дослідження впливу різного роду фармакологічних впливів звичайно реєструють їх вплив на латентний період, амплітуду ПС, тривалість ВППС. Було виявлено, що під впливом 4-АМП у концентрації 50 μM відзначалася тенденція до скорочення латентності протягом 30 хв інкубації. Цей результат був досить несподіваним, особливо з урахуванням того факту, що 4-амінопіридин індукує збудження і можна було б очікувати більш значного скорочення латентності ПС.

Під впливом ксигерму-3 через 40 хв відзначалося збільшення латентності до $132,2 \pm 2,8$ % порівняно з контролем. Цей ефект частково або повністю був відсутній за умов додавання в середовище інкубації 4-амінопіридину.

Під впливом фенітоїну і вальпроату натрію відзначалося зростання латентного періоду порівняно з контролем до $107,3 \pm 2,0$ і $104,9 \pm 1,6$ % відповідно, однак, за умов застосування 4-амінопіридину відзначалося скорочення латентності порівняно з контролем до $94,1 \pm 2,6$ і $98,4 \pm 1,6$ % відповідно. Карбамазепін був єдиним препаратом, під впливом якого відбувалося скорочення латентного періоду як за умов підведення 4-амінопіридину, так і без нього.

Вивчення впливу досліджуваних сполук на амплітуду ПС продемонстровано на рис. 4.16. Виявлено, що підведення 4-амінопіридину у

концентрації 50 μM у проточну рідину викликало значне збільшення амплітуди ПС і популяційного ВППС із появою багатьох додаткових ПС.

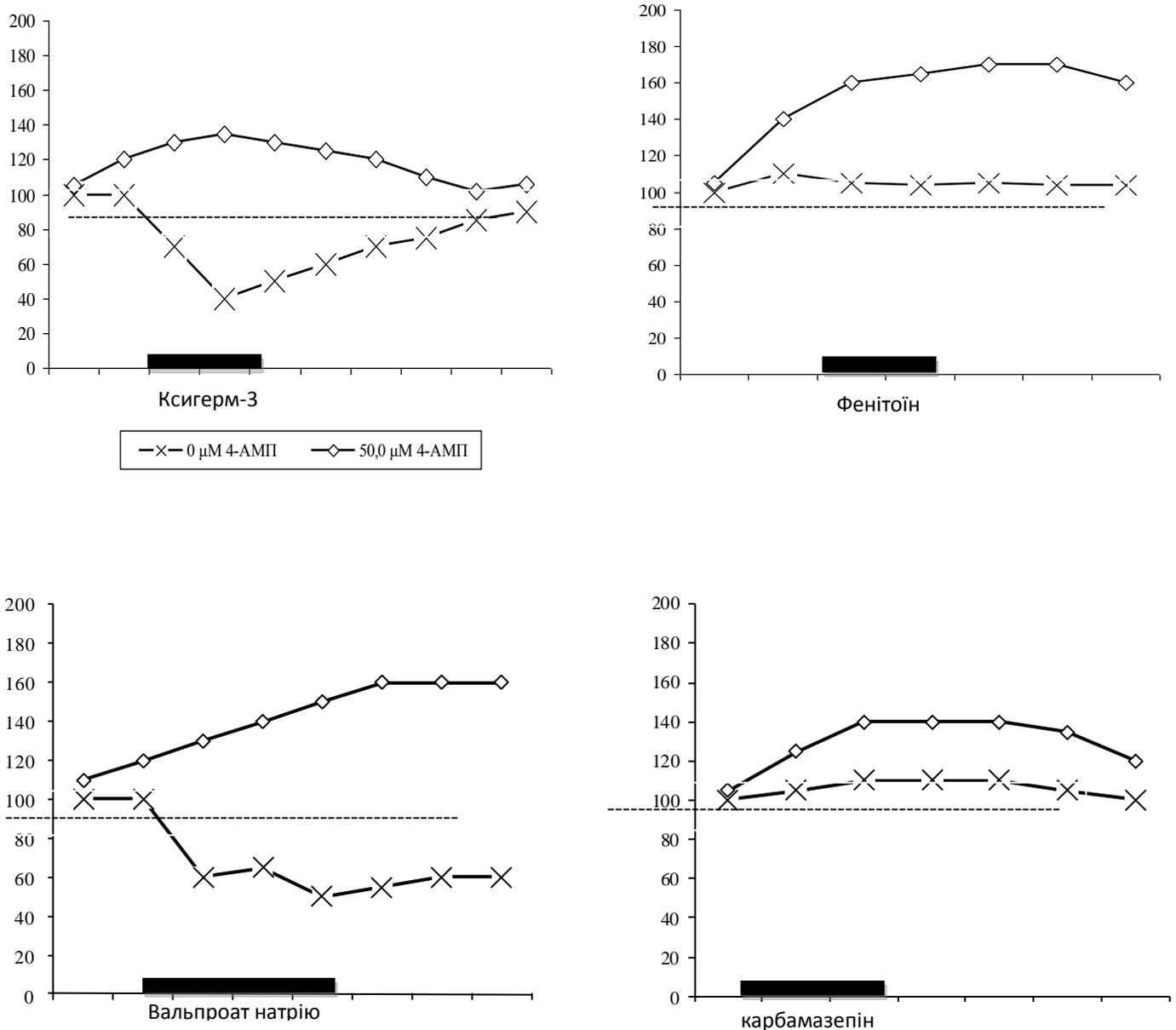


Рис. 4.16. Вплив ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на амплітуду викликаних популяційних спайків у полі CA1 за умов підведення в середовище 4-амінопіридину

За віссю абсцис - концентрація досліджуваних сполук, μM , за віссю ординат - амплітуда популяційних спайків, %

Концентрація ксигерму-3 0,7 μM , вальпроат натрію - 0,8 μM , фенітоїну - 50 μM , карбамазепіну - 60 μM . Кожна крапка на кривій представляє $M \pm m$ для 5-6 зрізів.

Під впливом досліджуваних сполук відзначалося зменшення амплітуди насамперед таких додаткових потенціалів. Ксигерм-3 у концентрації 0,7 μM протягом 30-40 хв викликав зниження амплітуди ПС на 40-60 % за умов підведення контрольної проточної рідини. Водночас цей гальмівний ефект був менш виражений за умов значного збільшення амплітуди ПС, індукованого за допомогою 4-амінопіридину. Вальпроат натрію у концентрації 0,8 μM викликала незначне зниження амплітуди ПС. Фенітоїн і меншою мірою карбамазепін викликали незначне підвищення амплітуди ПС, індуковане під впливом 4-амінопіридину (рис. 4.16). Під впливом 4-АМП найбільшою мірою змінювалася тривалість генерації популяційного ВППС.

На рис. 4.17 наведені тривалість поп-ВППС у зоні CA1 до, протягом і після підведення досліджуваних препаратів без додавання і після підведення в інкубаційне середовище рідини з 4-амінопіридину. В умовах контролю жодна з досліджуваних сполук суттєво не впливала на тривалість поп-ВППС. Після підведення 4-амінопіридину відзначалося досить значне зростання тривалості ВППС, у деяких випадках до 400 %. Ксигерм-3 викликав значне скорочення тривалості ВППС, індуковане під впливом 4-амінопіридину.

Менш значуще обмеження приросту тривалості поп-ВППС викликало підведення карбамазепіну і фенітоїну. Вальпроат натрію не мав впливу на його тривалість. Ефект ксигерму-3 був стійкий до відмиву, тоді як вплив карбамазепіну зникав після відмиву.

Таким чином, проведені дослідження показали, що ксигерм-3 впливав як на інтеріктальну, так і на викликану епілептиформну активність у гіпокампальних зрізах, індуковану за допомогою 4-амінопіридину. За умов даної моделі найбільшою мірою зменшувалась амплітуда поп-ВППС, а також тривалість викликаних популяційних післярозрядів. За цих умов вальпроат виявляв невиражені ефекти, слабо впливаючи на амплітуду першого ПС.

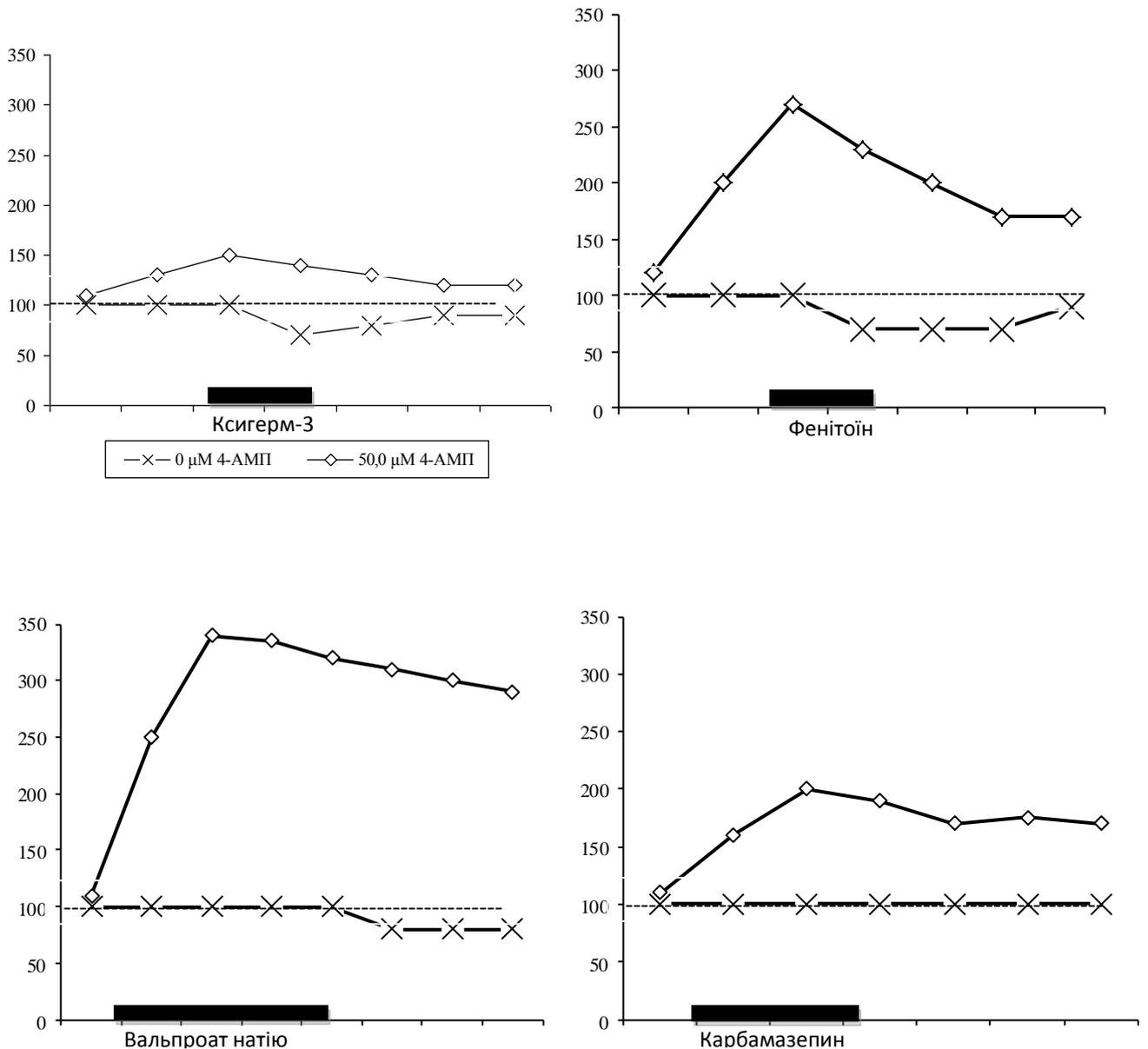


Рис. 4.17. Вплив ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на тривалість викликаних ВППС у полі CA1 за умов підведення в середовище 4-амінопіридину

За віссю абсцис - концентрація досліджуваних сполук, μM , за віссю ординат - амплітуда популяційних спайків, %.

Концентрація ксигерму-3 $0,7 \mu\text{M}$, вальпроату - $0,8 \mu\text{M}$, фенітоїну - $50 \mu\text{M}$, карбамазепіну - $60 \mu\text{M}$. Кожна крапка на кривій представляє $M \pm m$ для 5-6 зрізів

Загалом порядок активності досліджуваних протиепілептичних препаратів і ксигерму-3 був приблизно наступний: ксигерм-3 = карбамазепін > фенітоїн > вальпроат натрію.

Таким чином, результати досліджень за умов *in vitro* загалом свідчать про те, що механізм протисудомної активності ксигерму-3 суттєво відрізняється від інших стандартних протиепілептичних препаратів.

4.4.2. Вплив ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на епілептиформну активність у зрізах гіпокампу щурів, викликану низькою концентрацією кальцію

Метою даного розділу досліджень було з'ясування можливих механізмів протиепілептичної активності ксигерму-3. У зв'язку з тим, що деякі патерни епілептиформної активності, індукованою низькою концентрацією Ca^{2+} не блокувалися за допомогою загальноприйнятих протиепілептичних препаратів було важливим оцінити ефекти ксигерму-3 за умов даних моделей. Видалення іону Ca^{2+} із позасинаптичного середовища зумовлює блокування синаптичної передачі і тільки речовини, що впливають на позасинаптичні ділянки здатні виявити ефекти. З іншого боку, епілептичні ефекти низької концентрації Mg^{2+} зумовлені усуненням блокувального ефекту Mg^{2+} на NMDA-рецептор-регульовані іонні канали, збільшенням глутаматергічної передачі і підвищенням нейрональної збудливості [263]. Виникаюча ЕПА у полі CA1 гіпокампу характеризується повторними швидкими розрядами частотою 10-60 у хв. Крім того, вибір зазначених двох моделей *in vitro* був також зумовлений необхідністю подальшого підтвердження даних про те, що ксигерм-3 є сполукою із широким спектром протиепілептичної дії.

Під час дослідження зрізів гіпокампу відведення потенціалів здійснювалося від пірамідного шару поля CA1, а стимулювалися колатералі Шафера. Стимуляція проводилася із частотою 0,1 Гц, тривалістю 0,2 мс і напругою від 2,0 до 50,0 мВ. Після відбору зрізів гіпокампу зі стійким

позаклітинним популяційним спайком амплітудою не менш 3,0 мВ сольовий розчин Ямомото був замінений на модифікований розчин для індукції ЕпА. Для цього CaCl_2 був вилучений з омиваючого розчину і концентрацію KCl збільшили до 5 μM . Типові епілептиформні розряди з'явилися протягом 30-60 хв перфузії модифікованим розчином. Підведення досліджуваних речовин проводили після встановлення стійкої ЕпА з постійною частотою, амплітудою і тривалістю розрядів (рис. 4.18, А, Б). Час підведення речовини становив 30-60 хв, залежно від того, як швидко розвивались зміни амплітуди і частоти розрядів під впливом підведеної речовини. Пригнічення ЕпА визначалося за повним зникненням розрядів протягом 15 хв. Потім досліджуваний розчин заміняли на контрольний, і відмив препарат до появи спалахів ЕпА.

Контрольні досліди виявили, що викликана шляхом зниження концентрації кальцію ЕпА стійко генерувалася протягом декількох годин, що відповідає раніше описаним результатам [263, 264].

Вплив ксигерму-3 досліджували в концентрації від 500 μM до 1,0 μM на 21 зрізі гіпокампу. Вихідна частота і амплітуда епілептиформних розрядів складала $2,8 \pm 0,2$ у 1 хв і $2,7 \pm 0,4$ мВ відповідно. Ксигерм-3 залежно від концентрації викликав зменшення частоти епілептиформних розрядів.

Так, на рис. 4.18 відображено, що ксигерм-3 викликав блокування ЕпА в концентрації 500 μM . Якщо ж підводили ксигерм-3 у концентрації 100 μM , то істотних змін у параметрах ЕпА не відзначалося. Частота розрядів зменшувалася при підведенні ксигерму-3 у концентрації від 500 μM протягом 60 хв ($P < 0,05$). Ксигерм-3 у концентрації 1,5 μM не викликав повного пригнічення ЕпА, однак, частота розрядів знижувалася на $28,0 \pm 4,0$ % протягом 50 хв перфузії. У концентрації 1,8 μM відзначалося повне блокування генерації ЕпА протягом $14,0 \pm 3,2$ хв.

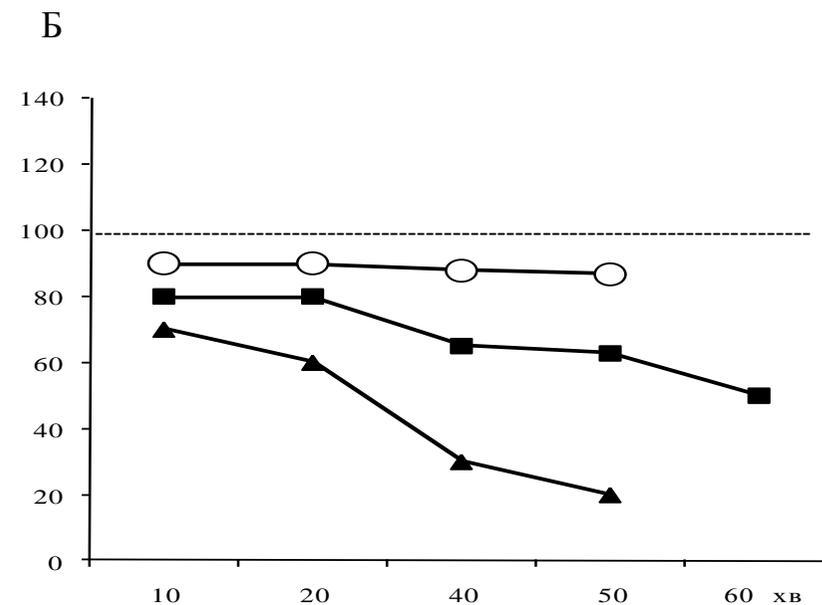
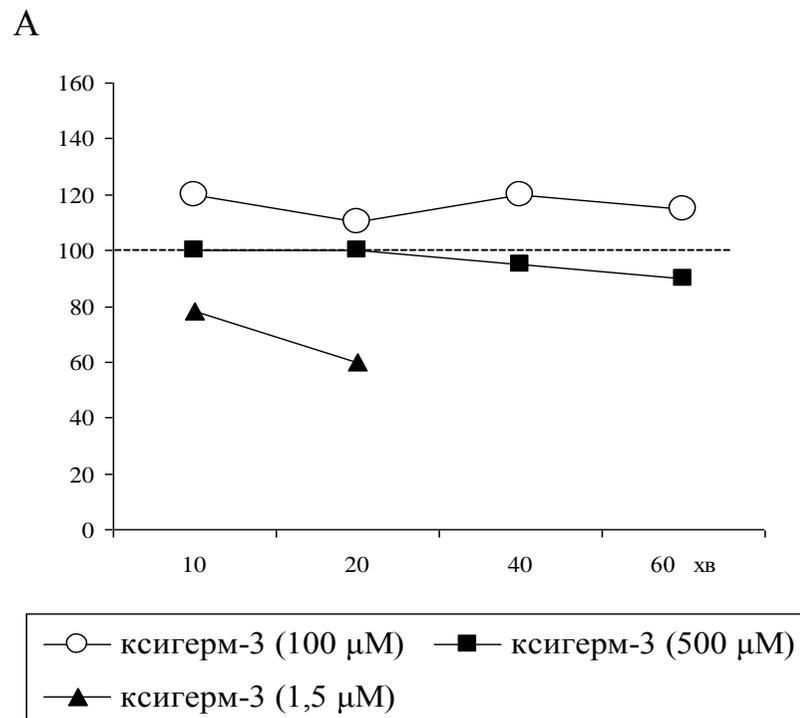


Рис. 4.18. Вплив ксигерму-3 на епілептиформну активність у зрізах гіпокампу, викликану видаленням кальцію.

За віссю абсцис - час (хв), за віссю ординат - амплітуда, % (А), частота розрядів, % (Б)

Кожна крапка на кривій - $M \pm m$ для 5-6 зрізів

Після відмиву зрізів ЕпА відновлювалась. Навіть після підведення ксигерму-3 у концентрації 2,0 μM протягом 60 хв часткове відновлення ЕпА спостерігалось у всіх досліджуваних препаратах гіпокампу. Ксигерм-3 не виявляв істотного впливу на амплітуду епілептиформних розрядів.

У концентрації 100,0-500,0 μM амплітуда суттєво не змінювалась у порівнянні з висхідним рівнем до підведення ксигерму-3 у середовище. Під час збільшення концентрації ксигерму-3 до 1,0 μM і більше відмічалось значне зниження амплітуди вже за 10 хв (рис. 4.18, А), а також частоти розрядів.

Порівняльне дослідження ефектів карбамазепіну в концентраціях 10,0-100,0 μM проведено на 16 і 15 зрізах гіпокампу відповідно (табл. 4.11). Генерація викликані низьким вмістом кальцію ЕпА починалась за 25-30 хв, частота розрядів становила в середньому $3,4 \pm 0,2$ за 1 хв і амплітуда $2,8 \pm 0,2$ мВ. Фенітоїн і карбамазепін викликали дозозалежне зниження амплітуди судомних розрядів. Вплив препаратів на частоту розрядів мало двохфазний характер. Так, відразу ж після підведення препаратів відзначалось зростання частоти розрядів, яке досягало 200,0-220,0 %, а потім за 20-25 хв після відмивання карбамазепіну і за 30-40 хв після підведення фенітоїну відзначалося зменшення частоти розрядів і їх зникнення. Так, карбамазепін у концентрації 100 μM пригнічував розряди протягом $27,0 \pm 4,9$ хв у всіх 5 препаратах гіпокампу (див. табл. 4.11).

Фенітоїн у концентрації 50,0-100,0 μM викликав зниження амплітуди і частоти розрядів протягом 90 хв, після початкового зростання частоти розрядів. Найбільше зростання частоти розрядів відзначалось на 35-40 хв і досягало 250 %. У концентрації 100 μM фенітоїн викликав повне блокування ЕпА у 3-х зрізах з 5 протягом $68,0 \pm 10,2$ хв.

Для порівняння ефектів ксигерму-3, карбамазепіну і фенітоїну на ЕпА, викликану низькою концентрацією кальцію, були використані їх граничні концентрації, що викликають повне пригнічення судомних розрядів в окремих зрізах гіпокампу, які наведені на рис. 4.19

Вплив ксигерму-3, карбамазепіну, фенітоїну і кромакаліну на епілетиформну активність у зрізах гіпокампу щурів, викликану низькою концентрацією кальцію ($M \pm m$, $n=4-5$)

Сполуки	Концентрація, μM	Число зрізів із блокованою ЕпА/ загальне число зрізів	Час пригнічення ЕпА, хв
Ксигерм-3	100,0	0/4	немає ефекту
	500,0	3/4	$24,0 \pm 2,8$
	1000,0	4/4	$26,0 \pm 3,2$
	1500,0	4/4	$17,0 \pm 3,1$
	2000,0	5/5	$15,0 \pm 2,8$
Карбамазепін	10,0	0/4	немає повного ефекту
	25,0	0/4	немає повного ефекту
	50,9	2/4	$58,0 \pm 10,8$
	100,0	5/5	$27,0 \pm 4,9$
Фенітоїн	10,0	0/4	немає повного ефекту
	25,0	1/4	немає повного ефекту
	50,0	1/5	$72,0 \pm 10,4$
	100,0	3/5	$68,0 \pm 10,2$
Кромакалін	50,0	0/4	немає повного ефекту
	100,0	0/5	немає повного ефекту
	300,0	1/5	$12,0 \pm 3,4$

Ксигерм-3 викликав лише незначне зниження амплітуди розрядів, тоді як карбамазепін і фенітоїн викликали істотне і прогресуюче зниження амплітуди судомних розрядів (рис. 4.19, А). Ксигерм-3 виявляв гальмівну дію на частоту розрядів, а карбамазепін і фенітоїн спочатку викликали зростання числа судомних розрядів (на тлі зниження їх амплітуди) та лише після зростання часу підведення препаратів відзначалося зниження і частоти розрядів (рис. 4.19, Б).

Додатково були досліджені ефекти специфічного активатора калієвих каналів кромакаліну на даній моделі. Тільки у відносно високій концентрації кромакалін викликав істотне зниження частоти розрядів на $17,0 \pm 5,0$ % ($P < 0,05$). При цьому амплітуда розрядів не змінювалася.

4.4.3. Вплив ксигерму-3 на епілетиформну активність, викликану низькою концентрацією магнію

Видалення Mg^{2+} з позаклітинного середовища викликає послаблення магній-опосередкованого блокування NMDA-рецепторів підтипу глутамат-ергічних рецепторів. Таке посилення збудливості синаптичної передачі викликає порушення балансу процесів збудження і гальмування в пірамідних нейронах гіпокампу [263].

Раніше було показано, що в результаті таких змін у полях СА3 і СА1 гіпокампульних зрізів відзначалося виникнення спонтанної ЕпА [156, 265-267]. У наших експериментах видалення магнію з омиваючого розчину приводило до появи за $26,0 \pm 4,0$ хв епілетиформних розрядів у полі СА1. Патерн характеризувався виникненням інтеріктальних розрядів амплітудою $1,1 \pm 0,3$ мВ, тривалістю близько 100,0 мс, що представляють собою популяційні спайки, суперпозиційовані на позитивний компонент фокальних потенціалів. Частота розрядів дуже варіювала в різних зрізах від 12,0 до 45,0 у хв, проте була відносно стійка в кожному препараті.

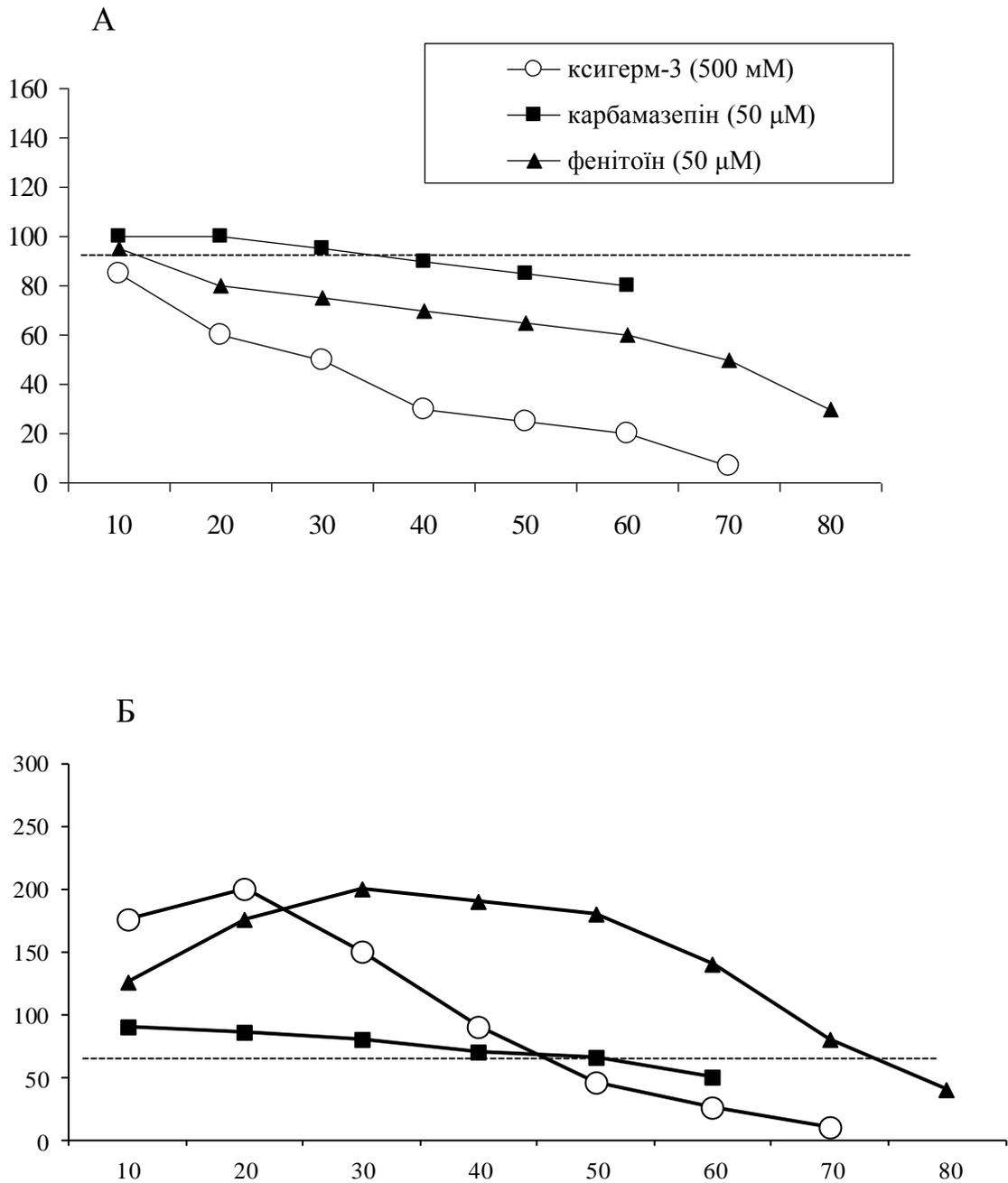


Рис. 4.19. Порівняння ефектів граничних концентрацій кисгерму-3, карбамазепіну і фенітоїну на епілептиформну активність, викликану низькою концентрацією кальцію (в % щодо висхідного рівня, прийнятого за 100 %)

За віссю абсцис - час (хв), за віссю ординат - амплітуда, % (А), частота розрядів, % (Б). Кожна крапка на кривій - $M \pm m$ для 5-6 зрізів

Дослідження ефектів ксигерму-3 і препаратів порівняння (вальпроат кальцію, кромакалін і кетамін) здійснювали на стадії стійкої ЕпА. Ксигерм-3 повністю і зворотньо дозозалежно блокував ЕпА. Так, у концентрації 500 μM ксигерм-3 пригнічував розряди у всіх зрізах протягом $18,6 \pm 1,2$ хв, а в меншій концентрації 250 μM - протягом $29,5 \pm 4,2$ хв. У концентрації 100 μM ксигерм-3 не повністю пригнічував епілептиформні розряди, а лише викликав зниження частоти генерації розрядів на $42 \pm 14,6$ % протягом 15 хв інкубації, і на $80,0 \pm 12,1$ % через 30 хв (рис. 4.20, Б). Амплітуда потенціалів за цих умов мало змінювалась. Дозозалежний характер ефектів ксигерму-3 показаний на рис. 4.20, В.

Дослідження впливу вальпроату натрію проведено у концентрації 1,0-4,0 μM на 8 препаратах. Виявлено, що типова ЕпА виникала за $35,0 \pm 3,6$ хв після видалення магнію із середовища, амплітуда розрядів становила в середньому $16,2 \pm 0,4$ у хв, амплітуда $2,0 \pm 0,38$ мВ. Вальпроат натрію дозозалежно викликав пригнічення спонтанної ЕпА (табл. 4.12). Так, у концентрації 1,0 μM відзначалося лише зниження частоти розрядів на $35,0 \pm 3,4$ % протягом 35 хв, а за умов підведення більшої концентрації 2,0 і 4,0 μM повністю блокувалась генерація епілептиформних розрядів протягом $28,0 \pm 4,2$ і $21,0 \pm 3,8$ хв відповідно.

Кромакалін, що активує іонні калієві канали і є блокатором збудливої нейротрансмісії кетаміну, також гальмував ЕпА (табл. 4.12).

Таким чином, проведені дослідження зміни електричної активності зрізів гіпокампу досліджуваних тварин виявили, що ксигерм-3 ефективно і дозозалежно пригнічував ЕпА, викликану низькою концентрацією Mg^{2+} .

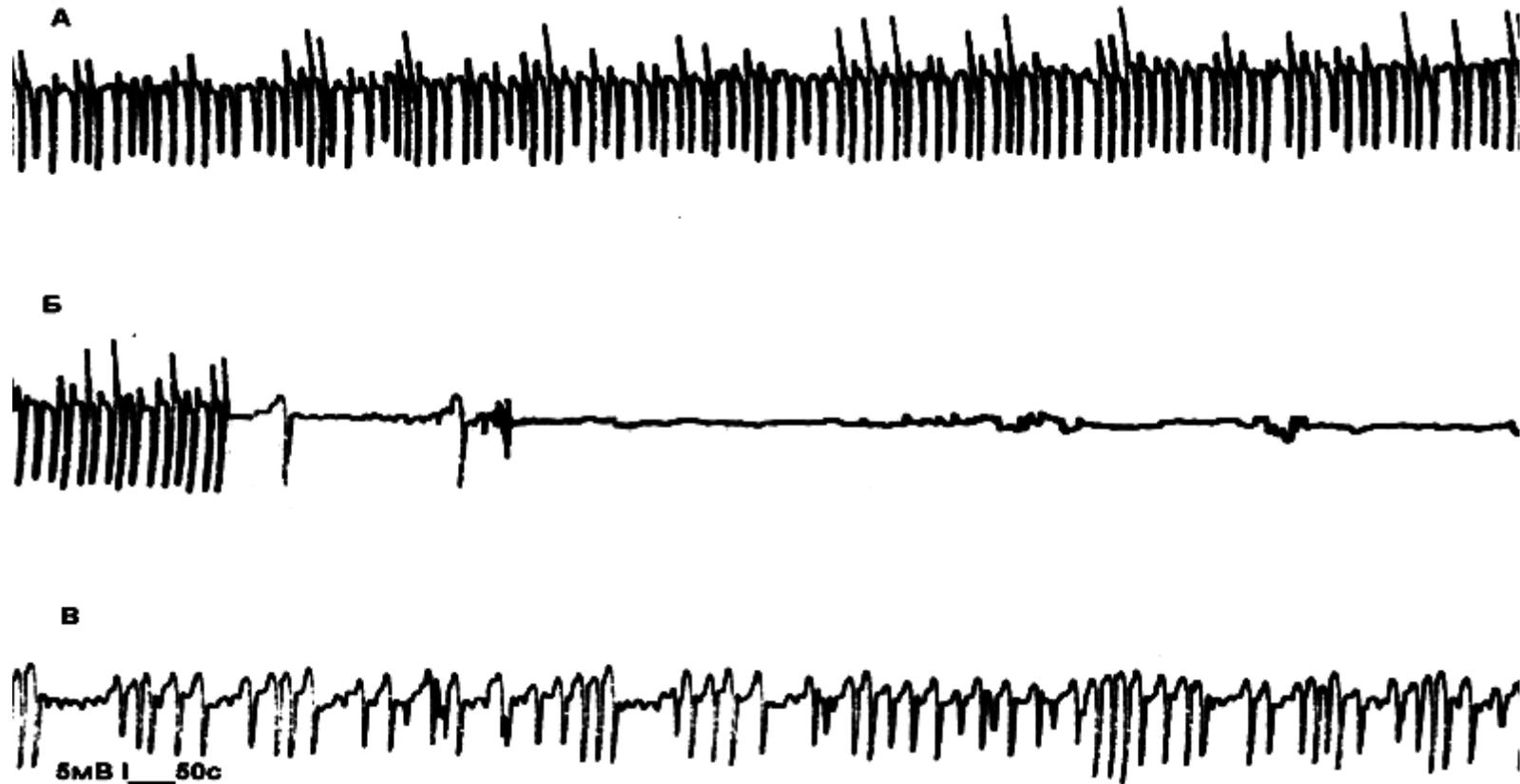


Рис. 4.20. Порівняння ефектів ксигерму-3 у різних концентраціях на епілептиформну активність, викликану низькою концентрацією магнію.

За віссю абсцис - час (с), за віссю ординат - амплітуда, мВ

А - концентрація ксигерму-3-100,0 μM ; Б -250 μM ; В - 500,0 μM

Вплив ксигерму-3 і антиконвульсантов на епілептиформну активність,
викликану видаленням магнію у зрізах гіпокампу ($M \pm m$, $n=3-5$)

Сполуки, препарати	Концентрація, μM	Число зрізів із блокованої ЕпА/загальне число зрізів	Час пригнічення ЕпА, хв
Ксигерм-3	100,0	0/3	немає повного ефекту
	150,9	3/5	$29,5 \pm 4,2$
	500,0	5/5	$18,6 \pm 1,2$
	1000,0	4/4	$9,3 \pm 1,0$
Вальпроат натрію	1000,0	0/3	немає повного ефекту
	2000,0	3/4	$28,0 \pm 4,2$
	4000,0	4/4	$21,0 \pm 3,8$
Кромакалін	300,0	3/4	$24,0 \pm 1,8$
Кетамін	10,0 -20,0	4/4	$17,0 \pm 4,0$

4.5. Ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 з різними протиепілептичними препаратами

4.5.1. Взаємодія сполук за умов моделі максимальних електрошокових судом

Завданням наступної серії експериментів було дослідити взаємодію ксигерму-3 з різними протиепілептичними препаратами на моделі МЕС у мишей за допомогою ізоболографічного аналізу. Із цією метою використовували три фіксовані комбінації препаратів 1:1, 1:3 і 3:1.

Ізоболографічний аналіз отриманих даних виявив просту сумачію протисудомних ефектів між ксигермом-3 і вальпроатом натрію, карбамазепіном та фенобарбіталом (табл. 4.13). Індекс взаємодії в зазначених комбінаціях препаратів варіював від 0,7 до 1,2, що підтверджує їх адитивний характер взаємодії.

Як приклад такої взаємодії представлені ізоболограми комбінованого застосування ксигерму-3 і вальпроату натрію на рис. 4.14. Комбіноване застосування ксигерму-3 і ламотриджину виявило антагоністичну і синергічну взаємодію (див. табл. 4.13). Перший варіант взаємодії відзначався за умов застосування ксигерму-3 у відносно низькій дозі комбінованої з високою дозою ламотриджину (співвідношення 1:3). За цих умов індекс взаємодії склав 1,4. Другий варіант взаємодії виявлено за умов застосування високої дози ксигерму-3 і низької ламотриджину (співвідношення 3:1). За цих умов індекс взаємодії рівний 0,6 (рис. 4.21).

На відміну від цих даних, в умовах комбінованого застосування ксигерму-3 і леветирацетаму у всіх співвідношеннях відзначався синергізм у їх взаємодії та індекс варіював від 0,6 до 0,7 (див. табл. 4.13).

Результати дослідження впливу ксигерму-3 на порушення координації, викликане протиепілептичними препаратами у тесті «обертowego стрижня», наведено в табл. 4.13. Вони свідчать про те, що у співвідношенні доз 1:1 у жодній з комбінацій препаратів під впливом ксигерму-3 не відбувалося посилення нейротоксичних ефектів протиепілептичних препаратів.

Таким чином, проведене дослідження виявило, що ксигерм-3 посилював протисудомну дію різних класів протиепілептичних препаратів, при цьому не мав впливу на їх нейротоксичну дію.

Таблиця 4.13

Вплив ксигерму-3 на протисудомні ефекти протиепілептичних препаратів на моделі максимальних електрошокових судом у мишей ($M \pm m$, $n=10$)

Комбінації сполук	Співвідношення	ЕД ₅₀ експер. (мг/кг)	ЕД ₅₀ теорет. (мг/кг)	α
Ксигерм-3 + вальпроат натрію	1:3	456,3 ± 7,2	480,0 ± 9,2	0,95
	1:1	428,5 ± 8,7	410,2 ± 5,2	1,0
	3:1	416,2 ± 6,4	390,4 ± 6,7	1,0
Ксигерм-3 + карбамазепін	1:3	192,7 ± 4,8	165,4 ± 5,8	1,2
	1:1	205,4 ± 5,6	231,2 ± 8,2	0,9
	3:1	372,6 ± 2,8	394,5 ± 8,7	0,9
Ксигерм-3 + фенобарбитал	1:3	264,3 ± 7,1	280,5 ± 7,2	0,7
	1:1	238,5 ± 4,9	264,6 ± 6,3	0,9
	3:1	321,4 ± 7,8	378,2 ± 9,2	0,8
Ксигерм-3 + ламотриджин	1:3	185,4 ± 3,6	131,3 ± 4,9	1,4
	1:1	214,7 ± 2,8	293,1 ± 7,4	0,7
	3:1	291,6 ± 3,7	450,1 ± 9,7	0,6
Ксигерм-3 + леветирацетам	1:3	371,3 ± 3,9	510,2 ± 7,4	0,7
	1:1	438,2 ± 5,7	678,1 ± 8,4	0,6
	3:1	627,8 ± 4,5	843,2 ± 9,5	0,7

Примітка: α - індекс взаємодії, який дорівнює співвідношенню ЕД₅₀ експериментальна / ЕД₅₀ теоретична

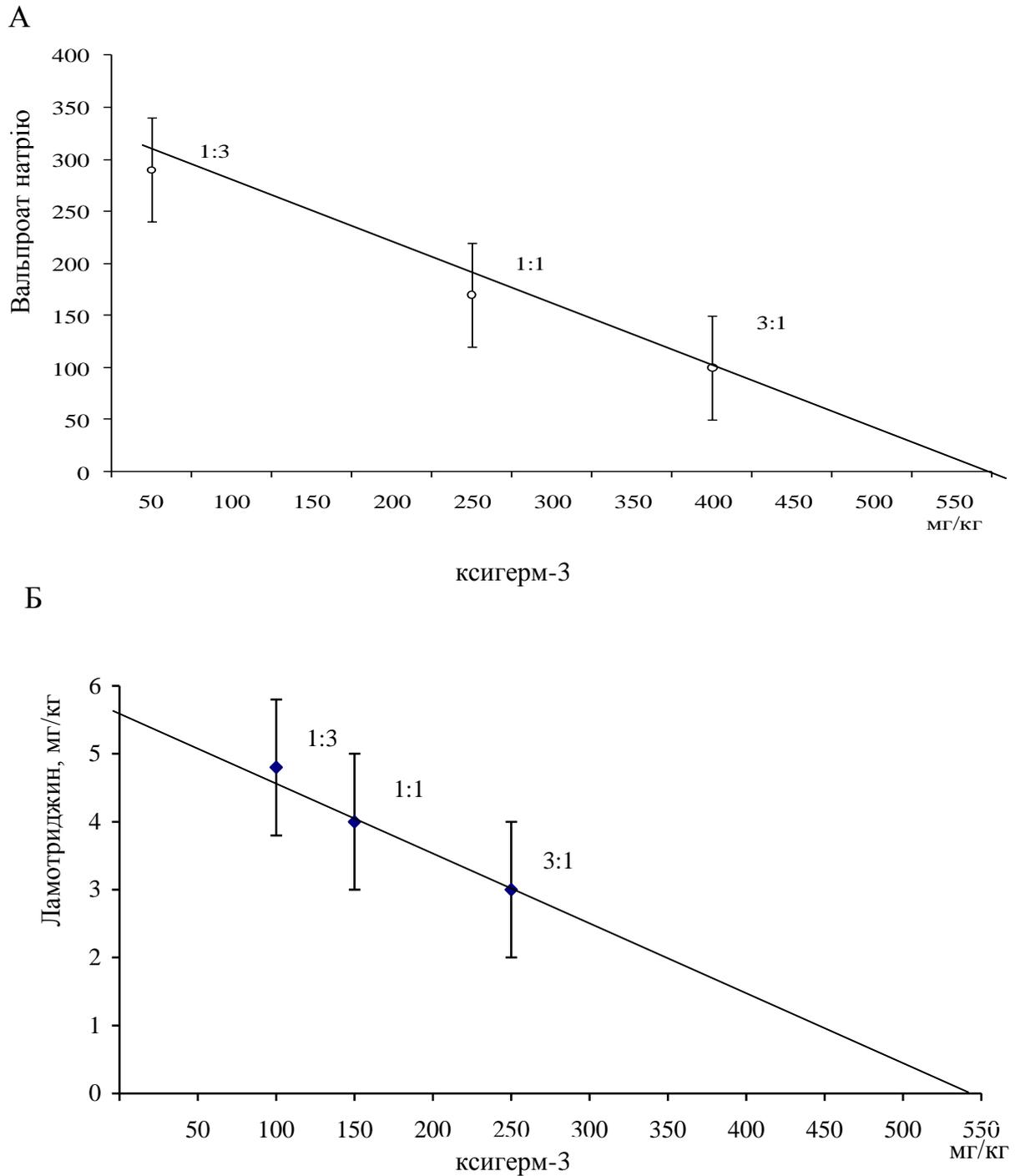


Рис. 4.21. Ізоболограма взаємодії ксигерму-3 і вальпроату натрію (А) та ламотриджину (Б) на моделі максимальних електрошокових судом у мишей за умов різних фіксованих комбінацій доз
За віссю абсцис - дози ксигерму-3, мг/кг; за віссю ординат - дози вальпроату натрію (А) та ламотриджину (Б), мг/кг

Таблиця 4.14

Вплив різних протиепілептичних препаратів та їх комбінацій с ксигермом-3 на м'язову координацію в тесті «обертового стрижня» у мишей

ЕД для МЕС	БАВ, препарати, в/очер	Дози, мг/кг	Кількість мишей с порушенням координації
ЕД ₂₅	Ксигерм-3	285,0	0
ЕД ₅₀	Ксигерм-3	570,0	10
ЕД ₂₅	Вальпроат натрію	147,0	20
ЕД ₅₀	Вальпроат натрію	294,0	40
ЕД ₅₀ теорет	Ксигерм-3 + вальпроат натрію	285,0+294,0	20
ЕД ₂₅	Карбамазепін	4,6	10
ЕД ₅₀	Карбамазепін	9,2	20
ЕД ₅₀ теорет	Ксигерм-3 + карбамазепін	285,0 + 4,6	10
ЕД ₂₅	Фенобарбитал	12,0	10
ЕД ₅₀	Фенобарбитал	24,0	30
ЕД ₅₀ теорет	Ксигерм-3 + фенобарбитал	285,0+12,0	10
ЕД ₂₅	Ламотриджин	4,0	0
ЕД ₅₀	Ламотриджин	8,0	20
ЕД ₅₀ теорет	Ксигерм-3 + ламотриджин	285,0+4,0	10

4.5.2. Взаємодія сполук за умов 6-Гц-викликаних судом

Враховуючи те, що нові протиепілептичні препарати застосовуються лише як додаткові препарати до протисудомної терапії, а також те, що у 30 % - 40 % пацієнтів з епілепсією у зв'язку з неефективністю і розвитком фармакорезистентності до монотерапії застосовується комбінована політерапія декількома препаратами, істотний інтерес представляло дослідження взаємодії ксигерму-3 з класичними протисудомними препаратами [246, 249]. Тому метою наших наступних досліджень була оцінка протисудомних ефектів ксигерму-3 і класичних протиепілептичних препаратів (карбамазепіну, вальпроату натрію і ламотриджину за умов їх окремого і комбінованого застосування на моделі 6-Гц-викликаних судом, як одній з найбільш адекватних моделей фармакорезистентних судом [116].

У відповідності до мети експериментальні дослідження були виконані у два етапи. По-перше, визначалась середньоефективна протисудомна доза (ED_{50}) ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів на моделі 6-Гц-викликаного судомної активності (по 10 тварин у кожній групі). Під час наступного етапу досліджувались протисудомні ефекти ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів за умов їх комбінованого застосування на моделі 6-Гц-викликаних судом. Для з'ясування типу взаємодії використовували 3 фіксованих співвідношення доз компонентів 1:3, 1:1 і 3:1:

1. Ксигерм-3 дозою, що є еквівалентною ED_{20-25} (400,0 мг/кг) і карбамазепін дозою, що є еквівалентною ED_{20-50} (20,0; 40,0; 60,0 мг/кг)
2. Карбамазепін дозою, що є еквівалентною ED_{20-25} (20,0 мг/кг) і ксигерм-3 дозою, що є еквівалентною ED_{20-50} (400,0; 600,0; 900,0 мг/кг)
3. Ксигерм-3 дозою, що є еквівалентною ED_{20-25} (400,0 мг/кг) і вальпроат натрію дозою, що є еквівалентною ED_{20-50} (50,0; 100,0; 120,0 мг/кг)

4. Вальпроат натрію дозою, що є еквівалентною ED_{20-25} (50,0 мг/кг) і ксигерм-3 дозою, що є еквівалентною ED_{20-50} (400,0; 600,0; 900,0 мг/кг)
5. Ксигерм-3 дозою, що є еквівалентною ED_{20-25} (400,0 мг/кг) і ламотриджин дозою, що є еквівалентною ED_{20-50} (30,0; 50,0; 80,0 мг/кг)
6. Ламотриджин дозою, що є еквівалентною ED_{20-25} (30,0 мг/кг) і ксигерм-3 дозою, що є еквівалентною ED_{20-50} (400,0; 600,0; 900,0 мг/кг).

У всіх мишей контрольної групи за умов введення фізіологічного розчину спостерігались судомні реакції під впливом електростимуляції струмом частотою 6-Гц і силою 32 мА, що відповідає раніше отриманим результатам [116].

Ксигерм-3 та протиепілептичні препарати демонстрували дозозалежні протисудомні ефекти (табл. 4.15). За умов цієї моделі ED_{50} ксигерму-3 склала $900,0 \pm 141,4$ мг/кг, карбамазепіну - $60,0 \pm 12,1$ мг/кг, вальпроату натрію $120,0 \pm 14,2$ мг/кг. У ламотриджину ED_{50} становила $80,0 \pm 12,6$ мг/кг.

У групі тварин, яким вводили ксигерм-3 (450,0 мг/кг, еквівалент ED_{25}) і карбамазепін (20,0; 40,0 50,0 мг/кг, еквівалент ED_{20-40}) судомні реакції були відсутніми в 2 з 10; 3 з 10 та в 4 з 10 тварин відповідно (табл. 4.16). Таким чином, реальна експериментальна ЕД у цьому співвідношенні двох препаратів була суттєво більшою, ніж та, що очікувалась теоретично. Подібні синергічні ефекти були виявлені також і в інших співвідношеннях доз карбамазепіну (30,0 мг/кг, еквівалент ED_{25}) і ксигерму-3 (400,0; 600,0; 800,0 мг/кг, еквівалент ED_{20-40}) (табл. 4.16).

У групі мишей, яким вводили ксигерм-3 (450,0 мг/кг, еквівалент ED_{25}) і вальпроат натрію (50,0; 100,0 120,0 мг/кг, еквівалент ED_{20-40}) судомні реакції були відсутніми в 4 з 10; 5 з 10 та в 6 з 10 тварин відповідно (див. табл. 4.16).

Ці дані свідчать про відповідність теоретично розрахованої ефективної дози до реальної експериментальної ЕД.

Визначення ED_{50} ксигерму-3, карбамазепіну, вальпроату натрію
і ламотриджину на моделі 6-Гц-викликаних судом, $n=10$

Препарат	Дози, мг/кг	Відношення числа мишей, захищених від судом до загального числа тварин
Контроль		0/10
Ксигерм-3	400,0	1/10
	600,0	3/10*
	900,0	5/10*
	1100,0	7/10*
	1300,0	7/10*
$ED_{50} (M \pm m)$		$900,0 \pm 141,4$
Карбамазепін	20,0	2/10*
	40,0	4/10*
	60,0	5/10*
	80,0	7/10*
	100,0	8/10*
$ED_{50} (M \pm m)$		$60,0 \pm 12,1$
Вальпроат натрію	50,0	2/10*
	100,0	3/10*
	120,0	5/10*
	140,0	6/10*
	160,0	8/10*
$ED_{50} (M \pm m)$		$120,8 \pm 14,2$
Ламотриджин	30,0	2/10*
	60,0	3/10*
	80,0	5/10*
	100,0	6/10*
	120,0	8/10*
$ED_{50} (M \pm m)$		$80,0 \pm 12,6$

Взаємодія ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів
в умовах моделі 6-Гц-викликаних судом

Дози, мг/кг	Відношення числа захищених від судом до загального числа мишей в групі	Індекс взаємодії (ЕД ₅₀ експ /ЕД ₅₀ теорет)
Контроль	0/10	-
Ксигерм-3 (450,0) + карбамазепін (20,0)	2/10*	0,42
Ксигерм-3 (450,0) + карбамазепін (40,0)	3/10*	0,56
Ксигерм-3 (450,0) + карбамазепін (50,0)	4/10*	0,62
Карбамазепін (30,0) + Ксигерм-3 (400,0)	2/10*	0,44
Карбамазепін (30,0) + Ксигерм-3 (600,0)	2/10*	0,36
Карбамазепін (30,0) + Ксигерм-3 (800,0)	3/10*	0,48
Ксигерм-3 (450,0) + вальпроат натрію (50,0)	4/10*	0,89
Ксигерм-3 (450,0) + вальпроат натрію (100,0)	5/10*	0,91
Ксигерм-3 (450,0) + вальпроат натрію (120,0)	6/10*	0,92
Вальпроат натрію (60,0) + Ксигерм-3 (400,0)	4/10*	0,90
Вальпроат натрію (60,0) + Ксигерм-3 (600,0)	6/10*	1,09
Вальпроат натрію (60,0) + Ксигерм-3 (800,0)	6/10*	0,92
Ксигерм-3 (450,0) + ламотриджин (30,0)	2/10*	0,44
Ксигерм-3 (450,0) + ламотриджин (50,0)	3/10*	0,54
Ксигерм-3 (450,0) + ламотриджин (70,0)	4/10*	0,62
Ламотриджин (40,0) + Ксигерм-3 (400,0)	2/10*	0,46
Ламотриджин (40,0) + Ксигерм-3 (600,0)	4/10*	0,72
Ламотриджин (40,0) + Ксигерм-3 (800,0)	4/10*	0,61

У групі тварин, яким вводили вальпроат натрію (60,0 мг/кг, еквівалент ЕД₂₅) сумісно з ксигермом-3 дозами 400,0; 600,0; 800,0 мг/кг (еквівалент ЕД₂₀₋₄₀) також не виявлено суттєвої різниці між теоретичним і експериментальним значенням ефективних доз, що свідчить про просту сумачію протисудомних ефектів ксигерму-3 і вальпроат натрію (табл. 4.16).

У групі мишей, яким вводили ксигерм-3 (450,0 мг/кг, еквівалент ЕД₂₅) і ламотриджин (30,0; 50,0 70,0 мг/кг, еквівалент ЕД₂₀₋₄₀) судомні реакції були відсутніми у 3 з 10, 3 з 10 та в 4 з 10 тварин відповідно (табл. 4.16). Таким чином, реальна експериментальна ЕД у цьому співвідношенні двох препаратів була суттєво більшою за ту, що очікувалась теоретично. Подібні синергічні ефекти були виявлені також і в інших співвідношеннях доз ламотриджину (40,0 мг/кг, еквівалент ЕД₂₅) і ксигерму-3 (400,0; 600,0; 800,0 мг/кг, еквівалент ЕД₂₀₋₄₀) (див. табл. 4.16).

Результати дослідження впливу ксигерму-3 на нейротоксичні ефекти протиепілептичних препаратів у тесті стрижня, що обертається, представлені в табл. 4.16. Вони свідчать про те, що в жодній з досліджуваних комбінацій препаратів, під впливом ксигерму-3, не спостерігалось погіршення м'язової координації (див. табл. 4.16).

Таким чином, проведені дослідження виявили, що ксигерм-3 в умовах моделі 6-Гц-викликаних судом виявляє протисудомну дію з ЕД₅₀ майже в 2 рази більшу ($900,0 \pm 141,4$ мг/кг), ніж на моделі МЕС. Ці дані узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які виявили, що за умов даної моделі фармакорезистентних судом більшість класичних протиепілептичних препаратів також потребують значного збільшення дози для досягнення протисудомного ефекту [164].

Результати досліджень даного розділу знайшли відображення:

1. Варбанець О. І. Дослідження взаємодії нового ксиларатного комплексу германію (IV) з іонами калію та протисудомних препаратів в умовах моделі 6-Гц-викликаних судом у мишей / О. І. Варбанець // Клінічна та експериментальна патологія. - 2012. - Т. XI, №3 (41). - С. 19-23.
2. Варбанець О. І. Протисудомна дія нового ксиларатного комплексу германію (IV) на моделях гострого судомного синдрому / О. І. Варбанець, В. В. Годован, О. А. Шандра, І. Й. Сейфулліна, О. А. Кащенко, О. Е. Марцинко // Інтегративна антропологія. - 2012. - №2 (20). - С. 33-36.
3. Варбанець О. І. Вплив нового ксиларатного комплексу германію (IV) з іонами калію на хронічну судомну активність за умов кіндлінгу у мишей / О. І. Варбанець // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2012. - Т. 12, №4 (40) - С. 108-113.
4. Пат. 103871 А Україна, МПК (2001) 6 А 61В 5/06, А 61В 17/24. Спосіб визначення терапевтичної толерантності нейромодулятора природного походження ксигерм-3 при корекції судомного синдрому в експерименті / О. І. Варбанець, В. В. Годован, О. А. Шандра, О. А. Кащенко ; заявник та патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № 11550 ; заявл. 08.10.2012 ; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22. - 2 с.
5. Варбанець О. І. Протисудомна дія нових ксиларатних комплексів германію з натрієм, калієм та літієм на моделі гострих пентиленететразолових судом / О. І. Варбанець // Філатовські читання : наук.-практ. конф. офтальмологів з міжнародною участю, 24-25 травня 2012 р. : матер. доп. - Одеса, 2012.- С.302.
6. Варбанець О. І. Вплив нових ксиларатних комплексів германію з літієм, калієм та натрієм на прояви максимального електрошокового синдрому у мишей / О. І. Варбанець, О. А. Кащенко, В. В. Годован, І. Й. Сейфулліна,

О. Е. Марцинко // XI читання ім. В. В. Підвисоцького, присвячені до 155-річчя з дня народження : наук.-практ. конф., 24-25 травня 2012 р. : бюлет. - Одеса, УкрНДІ медицини транспорту, 2012. - С.21-22.

7. Варбанець О. І. Протисудомна дія нових ксиларатних комплексів германію (IV) на різних моделях судомного синдрому у мишей / О. І. Варбанець // Адаптационные стратегии живых систем : междисциплинар. науч. конф., 11-16 июня 2012 г. : тезисы докл. - Новый Свет, 2012. - С. 206.
8. Varbanets O. I. Anticonvulsant effects of a new germanium (IV) xylarate complexe with potassium to acute seizure models in mice / O. I. Varbanets, V. V. Godovan, V. Y. Kresyun // 30th International Epilepsy Congress, 23-27 Jun. 2013 : final booklet - Montreal, 2013. - P.170.

РОЗДІЛ 5

ОЦІНКА АНТИПСИХОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КСИЛАРАТНИХ СПОЛУК ГЕРМАНІЮ У ТВАРИН

5.1. Ефекти нових БАР на прояви синдрому стереотипної поведінки у щурів

Метою наступної серії досліджень була оцінка антипсихотичної активності нових комплексів ксигерм-1, -2 і -3 на моделях стереотипної поведінки, сформованої в щурів. Синдром стереотипної поведінки у тварин розглядається як еквівалентний за рядом патогенетичних механізмів параноїчній формі шизофренії [251]. Така обставина дозволяє використовувати даний синдром як експериментальну модель для дослідження ефектів існуючих психофармакологічних препаратів, так і скринінгу нових сполук, які мають антипсихотичну активність [250].

Через 5-7 хв після введення амфетаміну сульфату (10,0 мг/кг, в/очер) у тварин спостерігались елементи підвищеної локомоторної активності, які протягом наступних 10-15 хв переходили у симптоми виразної амфетамінової стереотипії тривалістю 1,5-2 год. На фоні проявів стереотипії в більшості тварин відмічались інтенсивні судомні реакції (міоклонічні тремтіння м'язів морди, голови, джерки та ін.).

Літію хлорид, який вводили в/очер у вигляді 10 % розчину дозами від 100,0 до 500,0 мг/кг, виявивши виражену депримуєчу дію на амфетамінову стереотипну поведінку тварин, ступінь якого був дозозалежним (рис. 5.1). Так, під час введення дози 100,0 мг/кг спостерігалось часткове пригнічення стереотипної поведінки та зменшення його інтенсивності. Дозою 300,0 мг/кг літію хлорид повністю пригнічував стереотипні рухи голови (обнюхування, лизання, жувальні та пошукові рухи) і меншою мірою впливав на локомоторні вияви стереотипії (перебіжки, проходи, переступи передніми лапами). Такий ефект зберігався протягом 45-60 хв, а потім вияви амфетамінової стереотипії

відновлювались. Дозою 500,0 мг/кг літію хлорид викликав повне пригнічення стереотипної поведінки і локомоторної активності, причому цей ефект виникав вже через 2-5 хв після його введення. Відновлення проявів синдрому амфетамінової стереотипії за цих умов не спостерігалось.

В/очер введення галоперидолу дозами 0,2-0,8 мг/кг викликало зменшення частоти та інтенсивності проявів стереотипних комплексів, викликаних введенням амфетаміну сульфату (рис. 5.1). Дозою 1,0 мг/кг відмічалось повне пригнічення синдрому амфетамінової стереотипної поведінки.

Сполуки ксигерм-2, -3 дозами 1200,0-1600,0 і 1100,0-1500,0 мг/кг, відповідно, достовірно не впливали на виразність амфетамінової стереотипної поведінки у тварин, хоча зі збільшенням дози відмічалось її пригнічення (рис. 5.1). Сполука ксигерм-1 дозами 1000,0 - 1300,0 мг/кг викликала зменшення частоти виникнення та інтенсивності проявів стереотипних комплексів, а дозою 1400,0 мг/кг - повне гальмування синдрому амфетамінової стереотипної поведінки щурів. Причому, за виразністю ефекту ксигерм-1 не поступався референс-препаратам.

Білатеральне введення в ростральну частину хвостатих ядер конвульсанту викликало формування характерного синдрому стереотипії. Перші симптоми стереотипії проявлялися практично відразу ж після введення пікротоксину у хвостаті ядра. Вони спостерігались у вигляді повторних пароксизмів стереотипної поведінки, які включали регулярні перебіжки до сусідніх кутів камери з поверненням до вихідного місця, а також у посиленні пошукових рухів голови, обнюхуванні стінок камери, гризінні сітки або постійних жувальних рухах нижньої щелепи, лизанні, гризінні підлоги, стінки, переступанні передніми лапами. У деяких тварин спостерігався набір рухів, які регулярно повторюються за певним напрямком. В окремих тварин спостерігався гіперболізований грумінг морди і меншою мірою, тулуба. Довготривалість пароксизмів варіювала від 5-7 хв до 15-20 хв і залежала від дози конвульсантів.

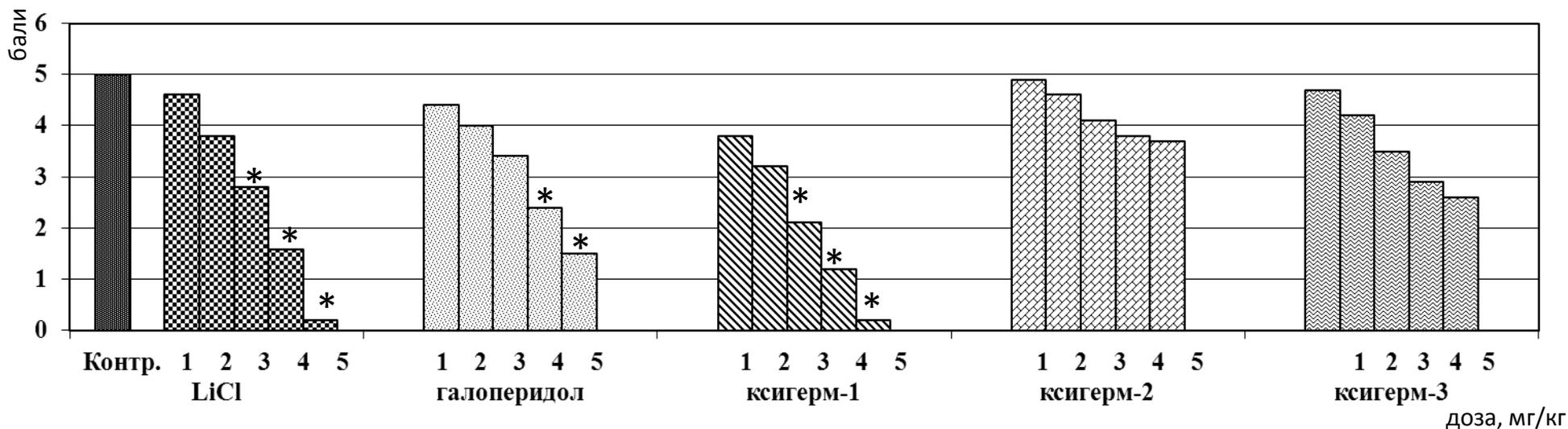


Рис. 5.1. Ефекти досліджуваних сполук на амфетаміновій моделі синдрому стереотипної поведінки в щурів.

За віссю абсцис - дози сполук, мг/кг; за віссю ординат - інтенсивність розвитку синдрому стереотипної поведінки, бали

У всіх далі рис. * - достовірність порівняно до контролю ($P \leq 0,05$).

- - контроль (амфетаміну сульфат – 10 мг/кг + 0,9 % NaCl)
- ▣ - амфетаміну сульфат + LiCl (1-100 мг/кг, 2 -200 мг/кг, 3 -300 мг/кг, 4 - 400 мг/кг, 5 - 500 мг/кг)
- ▤ - амфетаміну сульфат + галоперидол (1 - 0,2 мг/кг, 2 - 0,4 мг/кг, 3 - 0,6 мг/кг, 4 - 0,8 мг/кг, 5-1,0 мг/кг)
- ▥ - амфетаміну сульфат + ксигерм-1 (1-1000 мг/кг, 2-1100 мг/кг, 3-1200 мг/кг, 4-1300 мг/кг, 5-1400 мг/кг)
- ▦ - амфетаміну сульфат + ксигерм-2 (1-1200 мг/кг, 2-1300 мг/кг, 3-1400 мг/кг, 4-1500 мг/кг, 5 -1600 мг/кг)
- ▧ - амфетаміну сульфат + ксигерм-3 (1-1100 мг/кг, 2-1200 мг/кг, 3-1300 мг/кг, 4-1400 мг/кг, 5-1500 мг/кг)

Під час введення невеликих доз пікротоксину стереотипні комплекси у тварин спостерігались протягом 45-60 хв. Більші дози призводили до виникнення синдрому, що тривав протягом 1,5-2,5 год після введення. За цих умов стереотипні рухи проявлялись в різних комбінаціях (рис. 5.2)

В/очер введення літію хлориду дозою 100,0 мг/кг викликало незначне зниження інтенсивності проявів стереотипної поведінки дозами 200,0-300,0 мг/кг - пригнічення більш великою мірою стереотипних рухів голови і меншою - зниження локомоторних проявів, викликаних формуванням генератора патологічного збудження (ГПЗ). Дозою 400,0 мг/кг хлорид літію повністю пригнічував симптоми даної стереотипної поведінки і рухової активності щурів (рис. 5.2).

В/очер введення галоперидолу дозами 0,2-0,6 мг/кг викликало зменшення частоти й інтенсивності проявів стереотипних комплексів, викликаних формуванням ГПЗ. Дозою 0,8 мг/кг відмічалось повне пригнічення синдрому стереотипної поведінки, викликаного за допомогою пікротоксину (рис. 5.2).

Сполуки ксигерм -2, -3 не мали суттєвого впливу на прояви стереотипії, сформованої ГПЗ, у досліджуваних дозах. Сполука ксигерм-1 залежно від дози зменшувала або повністю пригнічувала описану вище стереотипну поведінку тварин (рис. 5.2). Так, дозами 900,0-1100,0 мг/кг вже за 5-10 хв відмічалось зниження частоти виникнення та інтенсивності проявів стереотипії, викликаної формуванням ГПЗ, а дозою 1200,0 мг/кг - зникнення ознак синдрому, який не відновлювався до кінця спостереження. Причому, за ефективністю дії новий комплекс ксигерм-1 перевершував референс-препарати.

Таким чином, проведені дослідження встановили виразну антипсихотичну дію нового *біс*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманату (IV) літію ксигерм-1, який зменшував інтенсивність проявів синдрому стереотипної поведінки тварин, маючи дозозалежний ефект. За умов амфетамінової моделі комплекс ксигерм-1 найбільш ефективно захищає від виникнення та розвитку синдрому стереотипної поведінки дозою 1400,0 мг/кг.

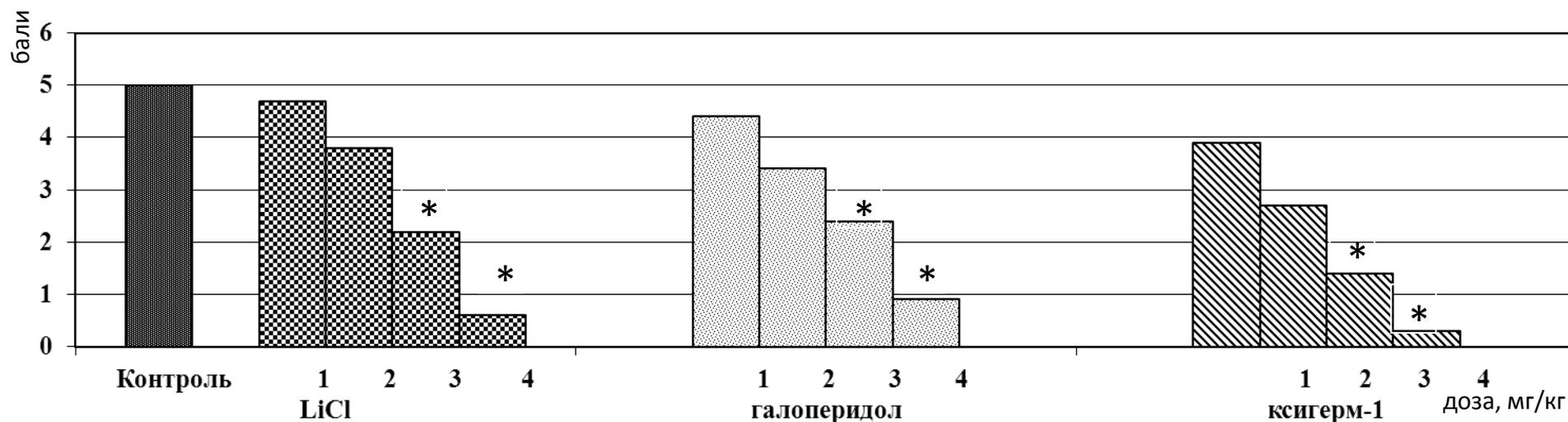


Рис. 5.2. Ефекти досліджуваних сполук на моделі синдрому стереотипної поведінки у щурів, відтвореної шляхом формування генератора патологічного збудження у ростральній частині голівки хвостатих ядер.

За віссю абсцис - дози сполук, мг/кг; за віссю ординат - інтенсивність розвитку синдрому стереотипної поведінки, бали;

- - Контроль (пікротоксин + 0,9 % NaCl)
- - пікротоксин + LiCl (1-100 мг/кг, 2 -200 мг/кг, 3 -300 мг/кг, 4 - 400 мг/кг)
- - пікротоксин + галоперидол (1 - 0,2 мг/кг, 2 - 0,4 мг/кг, 3 - 0,6 мг/кг, 4 - 0,8 мг/кг)
- - пікротоксин + ксигерм-1 (1 - 900 мг/кг, 2-1000 мг/кг, 3-1100 мг/кг, 4-1200 мг/кг)

За умов формування моделі ГПЗ ксигерм-1 достовірно зменшує частоту виникнення та інтенсивності проявів стереотипії. За цих умов, ксигерм-1 дозою 1200,0 мг/кг має найбільш виражену антипсихотичну дію за показниками інтенсивності та тривалості елементів стереотипної поведінки порівняно з референс-препаратами - хлоридом літію (400,0 мг/кг) і галоперидолом (0,8 мг/кг).

Комплекси ксигерм -2, -3 виявили слабку протективну дію за умов всіх досліджуваних моделей.

5.2. Вплив ксигерму-1 на амфетамін-посилені реакції самостимуляції у щурів

Раніше нами було показано, що новий ксиларатний комплекс германію (IV) з літієм - *біс*(μ -ксіларато)дигідроксодигерманат (IV) літію (ксигерм-1), впливає на порушену поведінку, проявляючи виражену антипсихотичну дію за умов моделі стереотипної поведінки, викликаній за допомогою амфетаміну [255]. Відомо, що такі протисудомні препарати, як карбамазепін, вальпроати та інші мають виражені ефекти за умов біполярних розладів (БР) [268, 269]. Ці препарати називають «протисудомними стабілізаторами настрою» [268].

У зв'язку з викладеним, було доцільним дослідити і порівняти ефекти ксигерму-1, літію хлориду, галоперидолу і вальпроату натрію на підкріплюючі властивості самостимуляції латерального гіпоталамуса у щурів. Окремим завданням дослідження було також з'ясувати ефекти зазначених сполук за умов амфетамін-індукованого посилення реакції самостимуляції у щурів.

5.2.1. Вплив ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на реакції самостимуляції у щурів

Завданням цієї серії експериментів стало дослідження дозозалежних ефектів ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на реакції СМ.

Підвищення порога СМ свідчить про пригнічення, а його зниження вказує на активацію в/мозк систем підкріплення [254]. Зміни порогу СМ і максимальної частоти натискань на педаль після одноразового введення препаратів представлені на рис. 5.3. Ксигерм-1 дозами 1200,0 і 1800,0 мг/кг (рис. 5.3, А), літію хлорид дозами 100,0 і 200,0 мг/кг (рис. 4.23, В), вальпроат натрію дозою 300,0 мг/кг (рис. 5.3, Д) істотно підвищували поріг СМ. Ксигерм-1 і літію хлорид найбільш високими дозами (1800,0 мг/кг і 200,0 мг/кг відповідно) викликали достовірне зниження частоти СМ (рис. 5.3, Б і Г). За умов введення вальпроату натрію відзначалася тенденція до зниження частоти натискань, яка, однак, не досягала статистичної значущості (рис. 5.3, Е). Дослідження впливу поєданого застосування ксигерму-1 дозою 600,0 мг/кг і вальпроату натрію дозами 30,0; 100,0 і 200,0 мг/кг виявили, що за цих умов відзначається значне зростання порогу СМ (рис. 5.3, Ж), а дозами ксигерму 1600,0 мг/кг і вальпроату натрію 200,0 мг/кг знижувалося число натискань на педаль (рис. 5.3, З).

5.2.2. Вплив ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на амфетамін-індуковане посилення реакції самостимуляції

У наступній серії експериментів, використовуючи ті ж групи тварин, досліджували ефекти ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на амфетамін-викликане посилення реакції СМ. У відповідності з даними [265] введення амфетаміну сульфату викликало дозозалежну активацію реакції СМ. Наші результати також виявили, що введення амфетаміну сульфату дозою 0,5 мг/кг викликало зниження порогу СМ і підвищення числа натискань на педаль (рис. 5.4 А, Б), що свідчить про активацію підкріплюючих систем. Введення ксигерму-1 і літію хлориду викликало дозозалежне підвищення порога СМ, зниженого за допомогою амфетаміну сульфату (рис. 4.24 А, В). Ксигерм-1 і літію хлорид у відносно великих дозах (800,0-1000,0 мг/кг і 50,0-100,0 мг/кг

відповідно) блокували також амфетамін-викликане підвищення частоти натискань на педаль (рис. 5.4 Б, Г).

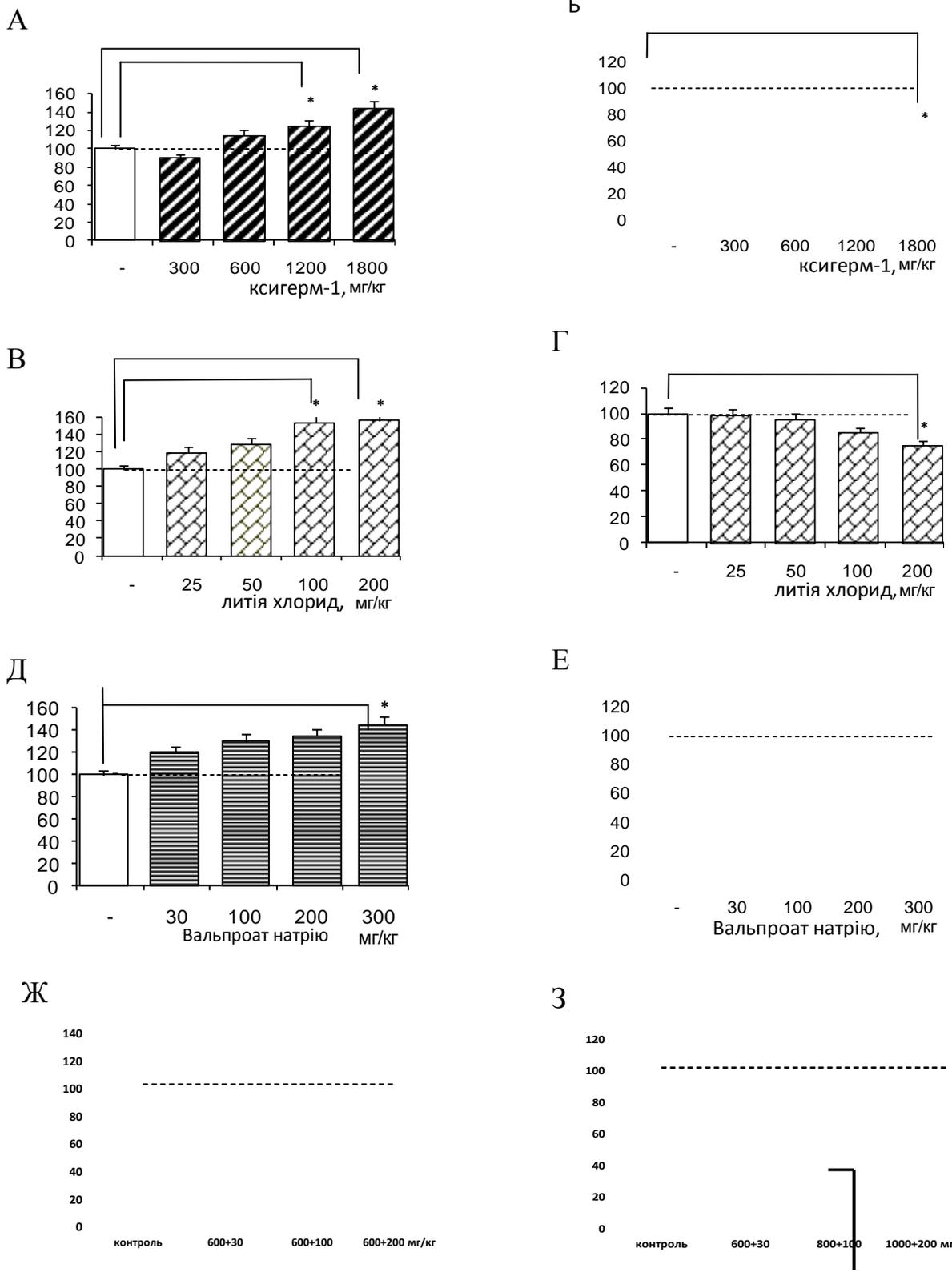


Рис. 5.3. Вплив одноразового введення ксигерму-1, літію хлориду й вальпроату натрію на реакції самостимуляції у щурів.

За віссю абсцис - дози препаратів (мг/кг): - ксигерм-1, - літію хлорид, - вальпроат натрію, - ксигерм-1 + вальпроат натрію. За віссю ординат - поріг самостимуляції (А, В, Д, Ж) і максимальна частота натискань на педаль (Б, Г, Е, З) (%).

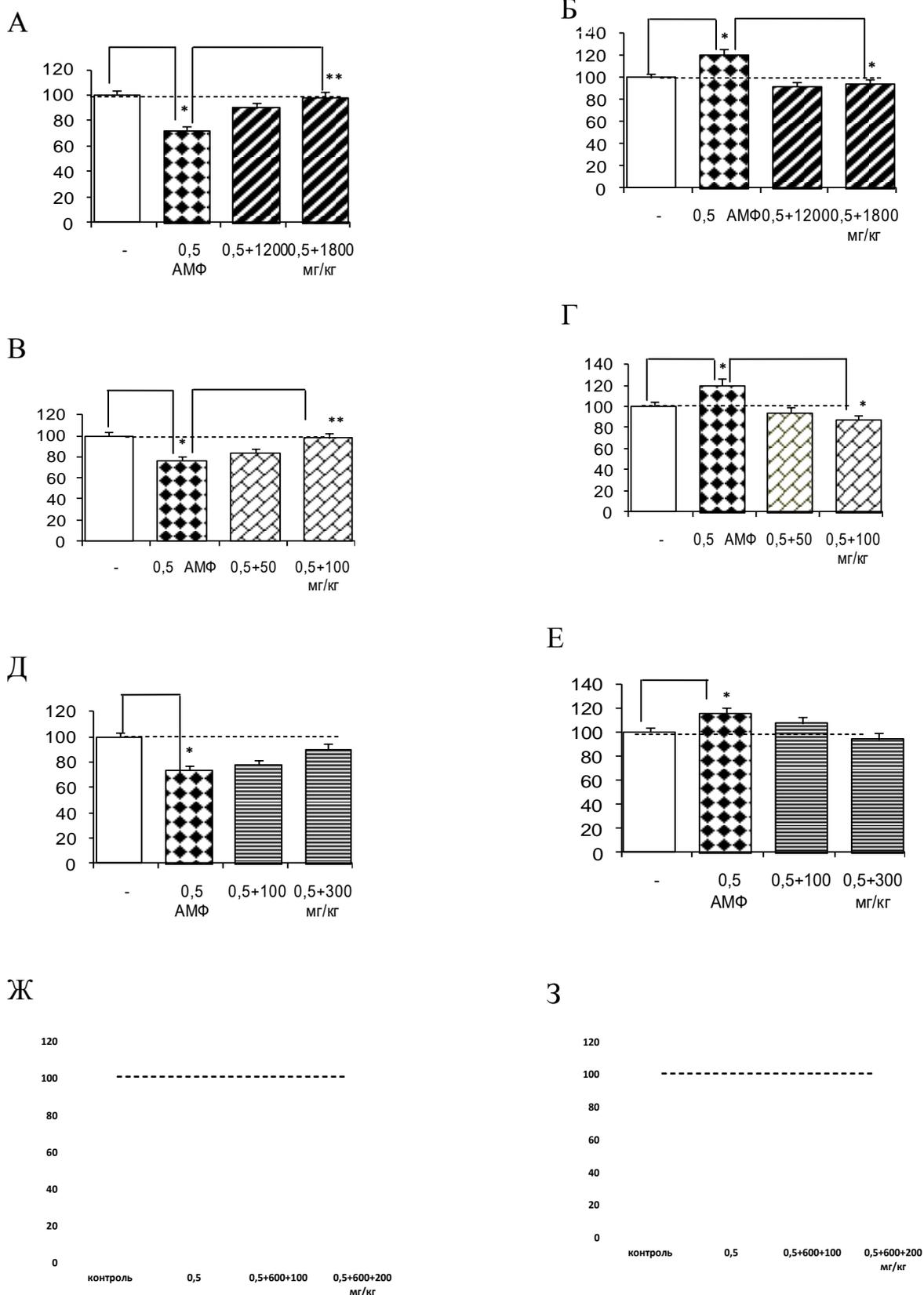


Рис.5.4. Вплив одноразового введення ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату натрію на амфетамін-індуковане посилення реакції самостимуляції у щурів. За віссю абсцис - дози препаратів (мг/кг): - ксигерм-1, - літію хлорид,

▣-вальпроат натрію, ▣▣-ксигерм-1 + вальпроат натрію. За віссю ординат - поріг самостимуляції (А, В, Д, Ж) і максимальна частота натискань на педаль (Б, Г, Е, З) (%).

Вальпроат натрію в досліджуваних дозах не мала суттєвого впливу на амфетамін-викликане посилення реакції СМ (рис. 5.4 Д, Е). Комбіноване застосування ксигерму-1 і вальпроату натрію дозами, що не мають ефектів за умов їх окремого застосування викликало значну пригнічувальну дію на амфетамін-викликане посилення реакції СМ (рис. 5.4 Ж, З).

Таким чином, проведені дослідження виявили, що ксигерм-1, літію хлорид, а також вальпроат натрію у відносно великих дозах значно підвищували пороги реакцій самоподразнення, що дозволяє припустити пригнічувальну дію досліджуваних сполук на систему винагороди.

Крім того, тільки ксигерм-1 і літію хлорид у найбільших дозах (1800,0 і 200,0 мг/кг відповідно) значно знижували максимальну частоту реакції СМ.

Під впливом вальпроату натрію у великих дозах також відзначалися подібні зміни частоти самоподразнення, однак, вони не досягали статистичної значущості.

Показано також, що застосування ксигерму-1 у поєднанні з вальпроатом натрію в підпорогових дозах, які були мало ефективними за умов їх роздільного застосування виявляє пригнічувальний ефект на реакцію самоподразнення, істотно підвищуючи поріг СМ.

У цілому, отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що нова сполука ксигерм-1 має виражений вплив на поведінку, зокрема на підкріплюючі системи мозку, який схожий до дії літію хлориду і відрізняється від дії вальпроату натрію.

Результати досліджень даного розділу знайшли відображення:

1. Варбанець О. І. Вплив нових ксиларатних комплексів германію (IV) на прояви синдрому стереотипної поведінки у щурів / О. І. Варбанець, В. В.

- Годован, О. А. Кащенко, І. Й. Сейфулліна, О. Е. Марцинко // Одеський медичний журнал. - 2012. - № 4 (132). - с. 15-18.
2. Варбанец Е. И. Влияние нового ксиларатного комплекса германия (IV) с литием на амфетамин-усиленные реакции самостимуляции у крыс / Е. И. Варбанец, В. В. Годован, А. А. Шандра, О.А. Кащенко // Казанский медицинский журнал. - 2013. - №3. - С.344-349.
3. Варбанець О. І. Вплив нового ксиларатного комплексу германію (IV) з літієм та його сумісного застосування з вальпроатом натрію євою кислотою та літієм хлоридом на реакції самостимуляції мозку / О. І. Варбанець, В. В. Годован, О. А. Шандра, О. А. Кащенко // Актуальные проблемы транспортной медицины. - 2013. - № (32-II). - С.126-128.
4. Пат. 115491 А Україна, МПК (2001) 6 А 61В 5/06, А 61В 17/24. Спосіб виявлення терапевтичної толерантності нейромодулятора природного походження ксигерм-1 при корекції експериментального синдрому стереотипної поведінки / О. І. Варбанець, В. В. Годован, О. А. Шандра, О. А. Кащенко ; заявник та патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № 11549 ; заявл. 08.10.2012 ; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22. - 2 с.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Підсумовуючи вплив нових досліджуваних сполук на поведінку інтактних тварин, можна виділити деякі закономірності їх дії. Дослідження у тестах прямої актометрії та «відкритого поля» виявило, що нові ксиларатні похідні германію по-різному впливали на рухову активність і поведінку тварин. Сполука з калієм (ксигерм-3) виявила значний дозозалежний пригнічувальний ефект, максимально виразний дозою 1120,0 мг/кг (1/10 ТД₅₀). Так, в умовах «відкритого поля» дана БАР достовірно зменшувала вертикальну (на 60,0 %) і горизонтальну (на 32,4 %) компоненти рухової активності. Вплив нових сполук на показники дослідницької активності, такі як число заглядань в "нори", елементи грумінгу, число болюсів, також виявило зв'язок з показниками горизонтальної і вертикальної рухової активності, найбільше знижуючись під впливом ксигерму-3. Навпаки, при застосуванні похідного германію з літієм (ксигерм-1) відмічався активуючий вплив на моторну активність і поведінкові реакції щурів, однак він був незначний і виявлявся при збільшенні дози (1/20 < 1/10 ТД₅₀). Сполука германію з натрієм (ксигерм-2) практично не впливала на до-сліджувані параметри в обох тестах.

В умовах підвищеної рухової активності щурів, викликаній амфетаміном, введення ксигерму-3 (1120,0 мг/кг) призводило до значного зниження показників вертикальної і горизонтальної рухової активності. Ксигерм-1, -2 максимально досліджуваними дозами достовірно не впливали на активуючу дію психостимулятора.

На моделі гексенал-викликаного сну нові БАР не виявили самостійної здатності викликати сон, однак продемонстрували здатність впливати на фармакологічний сон, збільшуючи відсоток тварин, які заснули за умов збільшення дози вказаних речовин. Найбільші відсотки тварин, що заснули, (66,7 і 83,3 %) спостерігалися при введенні ксигерму-3 дозами 560,0 і 1120,0 мг/кг відповідно. Під час оцінки здатності нових сполук пролонгувати

гексеналовий сон найбільш виразний снодійний ефект виявив ксигерм-3, який у всіх досліджуваних дозах (від 280,0 до 1120,0 мг/кг) зменшував латентний період засинання і збільшував тривалість сну. Таким чином, досліджувані ксилартні сполуки германію дозозалежно впливали на сон, викликаний гексеналом, який має властивості ГАМК-міметика, що дозволяє висловити припущення щодо нових механізмів дії ксиларатних похідних германію.

Різноспрямованість ефектів нових сполук за цих умов можливо пояснити різною хімічною структурою досліджуваних речовин, що зумовлює їх різні властивості [196].

У наступних експериментах досліджувався вплив нових германійорганічних сполук на м'язовий тонус у тесті «обертового стрижня», тому що наявність або відсутність міорелаксантаї дії в нейротропних препаратів є їх важливою характеристикою. Як відомо посилення ГАМК-ергічної передачі викликає зниження активності мотонейронів стовбура і спинного мозку та спричиняє міорелаксацію [270]. Отримані результати дослідження впливів ксигерму-1, -2, і -3 на м'язову координацію мишей у тесті "обертового стрижня" показали, що в жодній з досліджуваних доз нові сполуки не виявили нейротоксичної дії, а ксигерм-3 за силою міорелаксантаї дії перевершував інші досліджувані сполуки.

Під час дослідження ноотропної дії досліджуваних сполук за допомогою тесту водного лабіринту Мориса на 1-у добу після введення ксигерму-1, -2, -3 не було виявлено значного впливу на латентний період знаходження платформи тваринами. На 10-у добу тільки ксигерм-1 (2100,0 мг/кг) мав позитивний вплив на мнестичні функції тварин порівняно з контролем. Ксигерм-3 (1680,0 мг/кг) достовірно подовжив латентний період знаходження щурами платформи.

Особливості антидепресантаного ефекту сполук, а також здатності мозку тварин до переключення на активно-адаптивну плавальну поведінку досліджувалися в тесті Порсолта [222]. Було виявлено, що в умовах застосування ксигерму-1 максимально досліджуваною дозою 2100,0 мг/кг

достовірно зростала кількість пасивно-адаптивних рухових елементів плавання і гальмувалась здатність до переключення на поведінку активно-адаптивного характеру. У випадку введення ксигерму-2, -3 досліджуваними дозами щурам середнє число пасивно-адаптивних плавальних актів не розрізнялось з аналогічними контрольними показниками.

Таким чином, аналіз загального нейрофармакологічного профілю нових комплексних сполук в ряду *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманатів (IV) літію, натрію та калію у широкому діапазоні доз виявив різнопланову нейротропну активність двох речовин, спрямованість і виразність якої залежить від їх структури та дози. Ксигерм-3 (1680,0 мг/кг) має виразну депремууючу дію на центральну нервову систему. Ксигерм-1 (2100,0 мг/кг), поряд з незначним активуючим впливом на рухову активність тварин, виявляє седативний, ноотропний ефект, збільшує прояви пасивно-адаптивної поведінки.

Дослідження протисудомної дії нових сполук з використанням широкого спектру експериментальних моделей гострої та хронічної судомної активності виявило, що з трьох сполук тільки ксигерм-3 мав протисудомну дію. Так на моделі МЕС ксигерм-3 був ефективний у захисті від судом як мишей так і щурів і його ED_{50} була відповідно 570,0 і 396,0 мг/кг.

Починаючи з 1960 року, використання експериментальних моделей судомної активності для дослідження різниці у протисудомній активності нових сполук базувалось на їх здатності пригнічувати розповсюдження судомної активності або збільшувати судомний поріг [31, 117, 151, 155]. Для досягнення цієї мети використовують дві моделі: МЕС і пентилентетразоловий тест [157-161]. Виявлено, що протиепілептичні препарати, що блокують розвиток тонічної екстензії, яка викликана МЕС, ефективно стримували розповсюдження судомної активності, не маючи впливу на її розвиток, наприклад, фенітоїн або вальпроат натрію. Тому отримані дані дозволяють припустити потенціальну ефективність досліджуваної сполуки у запобіганні розповсюдження судомної активності у пацієнтів.

За цих умов TD_{50} ксигерму-3 у тесті оцінки порушення координації «обертвого стрижня» становила у мишей та щурів 1740,0 та більше 2000,0 мг/кг відповідно. Захисний індекс, який є найбільш точним показником співвідношення користі та ризику порівняно з терапевтичним індексом [31] для ксигерму-3 склав 3,1 у мишей і 5,1 у щурів. Для порівняння захисні індекси деяких стандартних протиепілептичних препаратів є такими: вальпроат -1,68, фенобарбітал -3,21, фенітоїн - 4,6, карбамазепін - 4,8 [272]. Виявлено також, що ксигерм-3 підвищував судомний поріг у мишей за умов введення уже у відносно низькій дозі (100,0 мг/кг). Цей результат не тільки підтверджує протисудомну дію ксигерму-3, але і вказує на те, що досліджувана сполука не знижує судомний поріг і не виявляє протисудомну дію навіть у високих дозах. У цьому тесті доза ксигерму-3, яка підвищує судомний поріг на 50 %, становила 174,0 мг/кг. Захисний індекс за цих умов для ксигерму-3 дорівнював 10,3, що суттєво більше чим для діазепіну (1,8), вальпроєвої кислоти (6,0), але менше, чим для карбамазепіну (20,0). Загалом, ці дані свідчать про виразне розмежування протисудомних і нейротоксичних ефектів ксигерму-3.

Виразність протисудомних ефектів БАР була різною і залежала від природи індукованої судомної активності. Ксигерм-3 мав високу дозозалежну протисудомну дію на моделях пентилентетразол-, пікротоксин-викликаних судом. ED_{50} ксигерму-3 за умов пентилентетразолових-викликаних і пікротоксинових судом у щурів відповідно становила 370,0 і 486,7 мг/кг. Крім того, ксигерм-3 був ефективним також по відношенню до судом, які викликані за допомогою холіноміетику пілокарпіну (ED_{50} 328,0 мг/кг) та агоніста збуджуючих амінокислот - каїнової кислоти (ED_{50} 554,0 мг/кг). Однак він не був ефективним за умов судом, що викликані за допомогою агоніста збуджуючих амінокислот NMDA. За допомогою поведінкових і електрофізіологічних досліджень було виявлено, що системне введення пілокарпіну і каїнової кислоти викликало у щурів формування судомної активності, яка мала фокальний початок у структурах лімбічної системи, ймовірніше, в структурах гіпокампу [236, 273-276]. Крім того, в подальшому

мала місце вторинна генералізація пілокарпін-викликаної судомної активності. Таким чином, вважають, що ця модель відтворює комплексні парціальні судоми з вторинною генералізацією у пацієнтів. Ефективність ксигерму-3 по відношенню до пілокарпін-викликаних судом у мишей корелює з даними про обмеження під його впливом деяких показників судомної активності за умов інших моделей генералізованих судом, які отримані під час дослідження.

Ксигерм-3 також не мав суттєвого впливу на судомну активність, викликану за допомогою інгібітора потенціал-залежних K^+ -каналів - 4-амінопіридину. Даний епілептоген відрізняється від більшості хемоконвульсантів тим, що збуджуючі і гальмівні синаптичні шляхи, включаючи ГАМК-ергічну систему за умов даної моделі не тільки лишаються інтактними, але їх активність навіть посилюється [244, 262, 277-279]. Клінічно ефективні протиепілептичні препарати, які захищають тварин за умов МЕС, зменшували також летальність тварин, викликану за допомогою 4-амінопіридину. Разом з тим, вплив на летальність, очевидно не може бути показником протисудомної активності. Отримані дані також виявили, що карбамазепін і вальпроат натрію мали протисудомний вплив на 4-амінопіридинові судоми. Водночас модулятор ГАМК-ергічної системи вігабатрин був неефективним за умов даної моделі судомної активності. Y. Fueta, M. Avoli [280] продемонстрували, що карбамазепін і вальпроат натрію були малоефективними по відношенню до 4-амінопіридинових судом за умов *in vitro* моделі. W. Yonekawa et al. [281] також виявили, що вальпроат був неефективним по відношенню до 4-амінопіридин-викликаної ЕпА, а карбамазепін і фенітоїн лише частково пригнічували ЕпА в умовах гіпокампальних зрізів.

Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить про те, що ксигерм-3 має виражений спектр протисудомної активності. Підтвердженням цього є також його протисудомні ефекти за умов моделі аудіогенних судом. Необхідно звернути увагу на те, що один з найбільш ефективних протиепілептичних препаратів, що застосовується на сьогоднішній день в

клініці - леветирацетам у процесі попередніх скринінгових досліджень був абсолютно неефективним за умов більшості традиційних тест-моделей у гризунів, що включали класичні моделі - МЕС, а також судоми, що викликані за допомогою системного або внутрішньомозкового введення хемоконвульсантів (пентилентетразолу, бікукліну, пікротоксину, NMDA, каїнової кислоти та ін.) [115]. Єдиною моделлю, яка виявила протисудомну ефективність леветирацетаму і що допомогло привернути увагу дослідників до нової сполуки, була модель аудіогенних судом. Висока вибіркова протисудомна активність леветирацетаму була у наступному підтверджена за умов кіндлінгової та інших моделей [113, 116].

Важливе значення мають дані про протисудомну ефективність ксигерму-3 по відношенню до судом у мишей, які викликані за допомогою низькочастотної 6-Гц-стимуляції. Ця психогенна модель є єдиною, яка дозволяє моделювати клінічно важливу фармакорезистентну форму епілепсії і є обов'язковою у пакеті скринінгових моделей, що включені до Програми досліджень нових протиепілептичних препаратів [63, 151]. Результати наших досліджень також виявили, що більшість, у тому числі нових протиепілептичних препаратів, малоефективні або неефективні за умов 6-Гц-викликаного судомної активності у мишей. ЕД₅₀ для ксигерму-3 за умов цієї моделі становила 900,0 мг/кг, що є більшим, ніж за умов МЕС.

Враховуючи той факт, що біля 30 % пацієнтів є фармакорезистентними [5, 38], ці дані вказують на великий потенціал для застосування ксигерму-3 у терапії фармакорезистентних судом.

Принципово важливе значення для нових препаратів, що застосовуються під час захворювань ЦНС, має відповідь на питання відносно його ефективності за умов довготривалого курсового введення і пов'язаний з цим розвиток залежності або толерантності. Останнє є єдиним з головних факторів, що суттєво обмежує терапевтичне застосування сучасних лігандів бензодіазепінових рецепторів [282, 283]. Виявлено, що за умов хронічного введення діазепаму розвивається толерантність, що супроводжується суттєвим

зниженням судомного порогу і гіперзбудливістю внаслідок їх відміни [284, 285].

У цьому зв'язку є важливим те, що протисудомні ефекти ксигерму-3 були еквіпотенціальними як під час однократного гострого введення, так і в умовах щоденного його застосування протягом 14 днів. Суттєво також те, що за умов 14-денного курсового введення ксигемру-3 не відмічалось змін судомного порогу МЕС, а також не формувалась гіперзбудливість за типом феномену віддачі, який зумовлений відміною протиепілептичних препаратів. Не дивлячись на необхідність подальших досліджень особливостей дії ксигерму-3 за умов курсового застосування, результати таких спостережень дозволяють припустити, що його застосування не викликало розвитку толерантності і залежності, подібних до таких, що мають місце за умов застосування бензодіазепінів. Як відомо, введення діазепаму протягом 3-7 днів зумовлювало розвиток толерантності [285]. З цими даними узгоджуються також результати наших досліджень впливу введення протягом 14 днів ксигерму-3 і дазепаму на протисудомні ефекти зворотнього агоністу бензодіазепінових рецепторів FG7142.

Ксигерм-3 продемонстрував високу ефективність на моделях хронічної ЕпА, які відтворюють одну з найбільш частих форм епілепсії у дорослих пацієнтів - скроневу епілепсію [155, 162, 286]. Так, ксигерм-3 демонстрував виразні протисудомні ефекти за умов моделей корнеального електростимуляційного та хімічного кіндлінгу у мишей, а також за умов амігдалярного кіндлінгу у щурів. Ксигерм-3 викликав дозозалежний вплив на різні параметри судомної активності за умов корнеального і амігдалярного кіндлінгу, що розвивається у мишей і щурів, суттєво зменшуючи тяжкість судом та тривалість судомного післярозряду.

Важливою особливістю протисудомних ефектів ксигерму-3 за умов кіндлінгової моделі є те, що дози ксигерму-3 за цих умов були більш, чим у 2 рази меншими по відношенню до доз за умов МЕС або пентиленететразол-викликаних судом. Цим ксигерм-3 суттєво відрізняється від інших

протиепілептичних препаратів, які демонструють подібні протисудомні ефекти як за умов МЕС або пентилентетразол-індукованих судом, так і на моделях електростимуляційного або пентилентетразол-викликаного кіндлінгу. Розрахунок індексу безпеки ксигерму-3 у порівнянні до вальпроату і леветирацетаму за умов моделі кореального кіндлінгу у мишей виявив наявність широкого спектру безпеки для ксигерму-3 - 116 і леветирацетаму - 198 у порівнянні з індексом, який дорівнює 2,0 для вальпроату.

Таким чином, ці дані свідчать про протисудомну ефективність ксигерму-3 у дозах, які практично не викликають небажаних ефектів. Стільки ж широким спектром безпеки відрізняється також леветирацетам. Більша ефективність ксигерму-3 за умов моделі кіндлінгу у порівнянні до МЕС можливо свідчить про вибірккову дію ксигерму-3 за умов патологічно посиленої нейротропної активності і попередження переходу від інтеріктальної до іктальної судомної активності. Можливо, ксигерм-3 має слабкий вплив або зовсім не впливає на іктальну нейротропну активність. З цим, можливо, пов'язано те, що ксигерм-3 демонстрував найбільш слабку протисудомну дію за умов гострих судом, зумовлених швидкою генералізацією іктальної активності, яка була індукована МЕС або максимальною дозою різних хемоконвульсантів.

Кіндлінг, який є моделлю епілептогенезу у тварин і властивість речовин гальмувати розвиток судом, використовують для виявлення препаратів з потенціально протиепілептогенною дією. Серед існуючих протиепілептичних препаратів, що використовують у фармакотерапії епілепсії, тільки фенобарбітал і вальпроат демонстрували протиепілептичну дію на моделі кіндлінгу, проте у дозах, що викликають небажані ефекти. З нових синтезованих протиепілептичних препаратів тільки леветирацетам демонстрував виражену протиепілептичну дію. Нами виявлено, що ксигерм-3, починаючи з дози 60,0 мг/кг, затримував розвиток кореального кіндлінгу у мишей, а дозою 200,0 мг/кг гальмував розвиток амігдалярного кіндлінгу у щурів. Дослідження особливостей судомних реакцій у кіндлінгових тварин

виявило, що у щурів, яким раніше вводили ксигерм-3, має місце тенденція до збереження протиепілептичних ефектів протягом 1 міс після припинення введення ксигерму-3. Таким чином, цей факт дозволяє припустити, що введення ксигерму-3 перед кожною кіндлінговою стимуляцією має блокуючий вплив на базові процеси епілептогенезу, а не є пригніченням судомних проявів кіндлінгу. Проте є необхідним проведення подальших досліджень для з'ясування нейрональних і молекулярних механізмів протиепілептогенної дії ксигерму-3.

Важливим етапом у дослідженні нових протиепілептичних препаратів є з'ясування взаємодії нової сполуки з протиепілептичними препаратами, що традиційно застосовуються в клініці. Це зумовлено тим, що нові препарати на початкових етапах клінічного застосування завжди використовуються лише в якості додаткового препарату (ad on) до протисудомної терапії. Крім того, у більш ніж 40 % пацієнтів застосовують комбіновану терапію двома, трьома та більше препаратами [229, 246, 287], що зумовлює необхідність дослідження особливостей взаємодії препаратів з метою вибору оптимальних схем [249].

Сьогодні використовують два основних підходи до дослідження взаємодії між протиепілептичними препаратами: підпороговий метод та ізоболографічний аналіз [64, 247-249]. Перший підхід базується на дослідженні впливу максимальної підпорогової дози одного препарату на середньоефективну дозу (ED_{50}) іншого препарату за умов їх спільного застосування. Якщо досліджуваний препарат суттєво зменшує ED_{50} іншого протиепілептичного препарату, то це служить підставою для висновку про позитивний вплив на його протисудомну активність. Разом з тим, у клінічній практиці терапії, наприклад, фармакорезистентних форм епілепсії всі препарати, які використовуються в клініці звичайно застосовують у їх ефективних дозах. Тому більш доцільно досліджувати взаємодію препаратів за допомогою ізоболографічного методу [229, 246, 247, 249]. Даний підхід дозволяє досліджувати обопільний вплив двох препаратів дозами, які досягають ефективних концентрацій, що дозволяє екстраполювати отримані

результати експериментальної терапії у клініку і вибрати максимально ефективні комбінації препаратів для клінічної практики [287, 288].

Нині існує кілька модифікацій методу ізоболографічного аналізу критеріїв, які відрізняються варіюванням, моделей або співвідношень доз досліджуваних препаратів [289]. Теоретичне і математичне обґрунтування методу найбільш повно описане в роботах [229, 246, 248, 249, 289]. Проведений нами ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 із карбамазепіну і ламотриджину виявив, що досліджувані комбінації проявляють синергізм у протисудомній дії у всіх досліджуваних співвідношеннях доз препаратів (1:3, 1:1, 3:1), оскільки експериментально отримані величини ED_{50} для відповідних комбінацій були статистично достовірно меншими, ніж величини ED_{50} , розраховані теоретично. У відповідності до значення отриманого індексу взаємодії сполук було виявлено, що в умовах комбінованого застосування ксигерму-3 і вальпроату натрію відбувалося просте підсумовування їх протисудомних ефектів у всіх досліджуваних співвідношеннях доз. Індекс взаємодії варіював від 0,89 до 1,09 у різних співвідношеннях доз двох препаратів. Тепер відомо, що механізм протисудомної дії карбамазепіну і ламотриджину пов'язаний, головним чином, з їх блокуючою дією на потенціал-індуковані Na^+ -канали нейронних мембран і реалізується шляхом зміни транспорту іонів крізь клітинну мембрану завдяки підвищенню активності Na^+ , K^+ -АТФази та гальмуванню цАМФ [46, 47, 290]. Представляє істотний інтерес той факт, що в жодній з комбінацій ксигерму-3 з протиепілептичними препаратами, не реєструвалося взаємодії за антагоністичним типом, а також посилення нейротоксичної дії протиепілептичних препаратів у тесті «обертового стрижня». Останнє має особливе значення для характеристики нової сполуки, оскільки демонструє, що за умов поєданого застосування ксигерму-3 і класичних протиепілептичних препаратів можна зменшити дозу протиепілептичних препаратів без істотного зниження вираженості їх протисудомних ефектів, що дозволило б значно зменшити побічну дію протиепілептичних препаратів.

Ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів, проведений за умов іншої моделі МЕС, виявив, що за цих умов виявляється тільки сумація протисудомних ефектів ксигерму-3, вальпроєвої кислоти, карбамазепіну і фенобарбіталу у всіх досліджуваних співвідношеннях доз препаратів (1:3, 1:1, 3:1). Підтвердженням такого типу взаємодії є не тільки результати побудови ізоболографічних кривих і розташування крапок на них, але і показники індексу взаємодії, які за цих умов були близькими до одиниці.

На відміну від цих даних за умов комбінованого застосування ксигерму-3 і ламотриджину виявлено 2 типи взаємодії залежно від співвідношення доз препаратів. Так, застосування ксигерму-3 у відносно низькій дозі в комбінації з високою дозою ламотриджину (співвідношення 1:3) супроводжувалося субаддитивним або антагоністичним типом взаємодії. Індекс взаємодії становив за цих умов більше одиниці (1,4). Разом з тим, збільшення дози ксигерму-3 та її комбінації з меншою дозою ламотриджину супроводжувалося трансформацією взаємодії з антагоністичного у супраадитивний або синергичний тип. У цьому випадку індекс взаємодії становив 0,6. Обидва протилежні типи взаємодії були статистично достовірними і є підтвердженням того, що співвідношення доз препаратів відіграє істотну роль у реалізації взаємодії препаратів. Крім того, отримані дані свідчать про те, що використання для ізоболографічного аналізу принаймні трьох фіксованих комбінацій є достатнім для визначення можливого типу взаємодії і дозволяє виявити істотні досить значимі для клініки зміни в характері доз досліджуваних препаратів. На відміну від цих даних, за умов комбінованого застосування ксигерму-3 і леветирацетаму у всіх співвідношеннях доз препаратів відзначається синергізм у взаємодії з варіюванням індексу взаємодії від 0,6 до 0,7.

Наші дані про взаємодію двох протиепілептичних препаратів за умов варіювання досліджуваних комбінацій доз препаратів узгоджуються з даними інших авторів [246]. Так, J. Luszcki, S. Czuczwar [246] за допомогою ізоболографічного аналізу виявили, що тип взаємодії між карбазепіном і

класичними протиепілептичними препаратами (фенітоїн та ін.) варіював від антагоністичного до синергізму залежно від досліджуваних пропорцій доз препаратів.

У відповідності з даними С. Deckers et al. [247] взаємодія за типом синергізму відзначається у випадку комбінованого застосування двох препаратів, які мають різні механізми дії, а підсумовування ефектів - під час застосування препаратів, які мають подібні механізми дії. Цей висновок отримав підтвердження за результатами нашого дослідження, яке виявило, що адитивний (підсумовуючий) ефект відзначався за умов комбінованого застосування ксигерму-3 і карбамазепіну, вальпроєвої кислоти і фенобарбіталу. Загальним у механізмі дії цих препаратів є блокада Na^+ -каналів. Виключенням є комбінація ксигерму-3 з іншим блокатором Na^+ -каналів - лаотриджином. Ці відмінності ефектів комбінованого застосування зазначених препаратів, можливо, зумовлені різною афінністю лаотриджину, карбамазепіну, вальпроєвої кислоти і фенобарбіталу з ділянками взаємодії в межах Na^+ -каналів або існуванням різних типів Na^+ -каналів з різною чутливістю до зазначених протиепілептичних препаратів. Хоча механізм протисудомної дії леветирацетаму залишається неясним, деякі його клітинні і молекулярні ефекти важливі для розуміння протисудомної дії леветирацетаму. Так, виявлено, що леветирацетам пригнічує активність потенціал-залежних K^+ -іонних струмів [40], гальмує N-тип і особливо P/Q- підтип потенціал-керованих Ca^{2+} -каналів [118, 119], а також пригнічує гальмівну дію цинку і β -карболіну на GAMK_A - і гліцинергічні іонні струми [291]. Дослідження молекулярних механізмів дії леветирацетаму на трансгенних мишах виявило, що препарат зв'язується із синаптичним везикулярним білком SV2A, який бере участь у везикулярному екзоцитозі [111, 114]. Хоча механізми протисудомної дії ксигерму-3 невідомі, можна припустити, що вони суттєво відрізняються від таких для леветирацетаму, що зумовлює синергізм дії двох препаратів у всіх досліджуваних комбінаціях доз препаратів.

Становить інтерес ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 і ламотриджину. Ізоболограма взаємодії демонструє швидкий перехід від синергізму до антагонізму в процесі зміни співвідношення доз досліджуваних комбінацій препаратів. Настільки різні ефекти в умовах комбінованого застосування препаратів, можливо, є підтвердженням припущення висловленого С. Deckers et al. [247] протиепілептичних препаратів про те, що під час комбінованого застосування двох протиепілептичних препаратів (обидва введені дозою, що виявляє протисудомний ефект) формується «нова якість ефективності взаємодії». Така нова ефективність не залежить від використання протиепілептичних препаратів, а зумовлена, можливо, фармакодинамічною взаємодією. Фармакологічний профіль комбінації, можливо, залежить від пропорції використовуваних протиепілептичних препаратів. Можна припустити більш складний механізм протиепілептичної дії із залученням різних медіаторних систем у реалізацію ефектів двох речовин, що входять у комбінацію протиепілептичних препаратів.

Необхідні подальші дослідження для характеристики механізмів, що забезпечують двохфазові взаємодії «ксигерм-3 + ламотриджин». Викликають інтерес отримані дані про те, що в жодній комбінації ксигерму-3 з протиепілептичними препаратами не відзначалося посилення нейротоксичної дії препаратів, яка визначалась за порушенням координації в тесті «обертового стрижня». Відсутність потенціювання небажаних ефектів має особливе значення для характеристики нової сполуки тому, що свідчить про те, що за умов комбінованого застосування ксигерму-3, загальноприйнятих і нових протиепілептичних препаратів, можна зменшити дозу кожного із препаратів, які включені до комплексу, без істотного зменшення виразності його протисудомних ефектів та одночасно дозволить зменшити побічну дію протиепілептичних препаратів. З погляду клініцистів, оптимальними є комбінації, які дозволяють використовувати низькі дози двох скомплексованих препаратів, які дають такий же терапевтичний ефект, як і препарат, що вводиться максимальною дозою, яка є суттєво меншою за токсичну [287, 288].

Наведений нами ізоболографічний аналіз взаємодії ксигерму-3 та інших протиепілептичних препаратів свідчить на користь таких зазначених даних клініцистів. Можна припустити, що різні механізми дії протиепілептичних препаратів і ксигерму-3 зумовлюють природу синергічного у випадку комбінації з леветирацетамом типів взаємодії таких компонентів препаратів.

Разом з тим, виражений антагонізм між ксигермом-3 і ламотриджином на моделі МЕС, а також підсумовування побічних ефектів цих препаратів за умов їх комбінованого застосування у деяких фіксованих дозах свідчить про те, що така їх комбінація не є оптимальною з погляду можливого клінічного застосування. Відомо, що протиепілептичні препарати у пацієнтів з епілепсією виявляють більш виражені різноманітні небажані ефекти, ніж за умов експериментів на гризунах. Проте передбачити профіль побічних ефектів у пацієнтів надзвичайно складно. Разом з тим, виявлена чітка кореляція між небажаними ефектами, які включають порушення функцій ЦНС у пацієнтів у досліджах на гризунах. Так, препарати, які демонструють побічні ефекти у досліджах на гризунах, з високим ступенем імовірності викликають порушення функцій ЦНС у пацієнтів. Тому дуже важливо на етапі проведення доклінічних досліджень виявити ефекти комбінацій протиепілептичних препаратів у плані індукції таких небажаних реакцій як страх, сонливість, порушення пам'яті, координації рухів і ін. Найчастіше із цією метою використовуються такі тести як «обертний стрижень», «димохідний тест», тест пасивного уникнення. Проте, у досліджах на тваринах досить важко досліджувати побічні ефекти, пов'язані із тривалим застосуванням протиепілептичних препаратів, наприклад, такі як гірсутизм, гіперплазія ясен (фенітоїн), гіпонатріємія (карбамазепін), гепатити і панкреатити (вальпроати), гематологічні небажані ефекти (фелбамат), системні реакції гіперчутливості (ламотриджин) [172, 292]. Проблема може з'явитися також, коли два препарати у складі комбінації протиепілептичних препаратів можуть викликати порушення когнітивних функцій, проте один з них викликає зниження, а інший збільшення маси тіла. Ці обмеження слід урахувати під час переносу результатів

експериментальних досліджень до умов клініки. Таким чином, підсумовуючи у цілому результати досліджень з комбінованого застосування ксигерму-3 і протиепілептичних препаратів за умов моделей МЕС і 6-Гц-викликаних судом, можна зробити висновок, що ефекти комбінованого застосування ксигерму-3 і більшості досліджуваних протиепілептичних препаратів у різних фіксованих комбінаціях доз є досить перспективними для подальших доклінічних і клінічних досліджень.

Проведені дослідження ефектів ксигерму-3 за умов експериментальних моделей *in vivo* виявили, що досліджувана сполука має досить широкий спектр протисудомної дії. Проте, можливості таких моделей у плані з'ясування механізмів протисудомної дії досить обмежені.

Протягом останніх десятиліть електрофізіологічні моделі *in vitro* такі як зрізи гіпокампу і кори мозку культури спинальних нейронів припускають використання для з'ясування механізмів дії протиепілептичних препаратів. Комбінація різних хемоконвульсантів, за умов моделей переживаючих зрізів мозку, дозволяє досліджувати початок генерації, поширення і гальмування судомної активності. Так, епілептиформна активність індукована *in vitro* за допомогою 4-амінопіридин дозволила диференціювати відмінність ефектів досліджуваних протиепілептичних препаратів і ксигерму-3. У нашому дослідженні виявлено, що вплив ксигерму-3 на спонтанну ЕпА, а також на амплітудно-частотні характеристики викликаних популяційних відповідей відрізнявся від ефектів інших протиепілептичних препаратів. Відомо, що 4-амінопіридин посилює збуджуючу і гальмівну синаптичну активність за умов *in vitro* та *in vivo* моделей [244, 262, 277-280]. Основний механізм дії 4-амінопіридину зумовлений його селективною блокадою ряду потенціал-залежних K^+ -каналів [244, 277, 281]. Також можлива участь постсинаптичного глутаматергічного компоненту [277]. 4-амінопіридин індукує різні типи спонтанної ЕпА залежно від дози, віку тварини і способів готування зрізів мозку [262, 278, 279], які характеризуються різною чутливістю до дії протиепілептичних препаратів. Механізм дії фенітоїну, карбамазепіну і,

можливо, вальпроєвої кислоти пов'язують із залученням Na^+ -каналів [49, 50, 58]. Один ефект відзначався під впливом ксигерму-3, який був подібний до впливу фенітоїну і карбамазепіну - скорочення тривалості ВППС, викликаних за допомогою 4-амінопіридину. Можливо, цей факт пов'язаний із властивістю ксигерму-3 гальмувати поширення судом, не впливаючи на їх генерацію. Ксигерм-3, як і вальпроат, ефективно пригнічував судомну активність, індуковану за допомогою пентилентетразолу і МЕС. Крім того, ксигерм-3 був ефективний по відношенню до аудіогенних та кіндлінгових судом. Проте результати наших досліджень свідчать про істотну відмінність у впливі вальпроату і ксигерму-3 на амінопіридин-викликану судомну активність *in vitro*. Тоді як вальпроат мало впливав на амінопіридин-індуковану судомну активність, ксигерм-3 був досить ефективний. За цих умов найбільшою мірою відзначалося пригнічення амплітуди ПС і тривалості популяційних післярозрядів.

Таким чином, порівняння ефектів ксигерму-3 і клінічно ефективних препаратів карбамазепіну, фенітоїну і вальпроєвої кислоти свідчить про істотну відмінність механізму протисудомної дії ксигерму-3 і референс-препаратів.

З метою подальшого вивчення механізмів протисудомної дії ксигерму-3 були проведені дослідження його ефектів за умов моделі судом, індукованих низькою концентрацією Ca^{2+} та Mg^{2+} . За умов видалення Ca^{2+} з перфузійного розчину відзначається повне блокування синаптичної передачі, і тільки препарати, ефекти яких зумовлені взаємодією із внесинаптичними ділянками є ефективними. Таким чином, дана модель судомної активності дозволяє розділити ГАМК-ергічні ефекти ксигерму-3 і вплив на Na^+ - або K^+ -канали. Модель із низьким вмістом Mg^{2+} була обрана для одержання даних, що підтверджують висновок про широкий спектр протисудомних ефектів ксигерму-3. Існує ряд передумов того, що K^+ -канали можуть бути загальною мішенню для нових протисудомних препаратів [52, 65, 107, 111, 293]. Відкриття K^+ -каналів призводить до гіперполяризації нейронів і зниженню

ефектів збудливих входів. На моделях ЕпА показано, що мутація K^+ -каналів є причиною формування ЕпА [294-296], а сполуки, що активують АТФ-чутливі K^+ -канали, виявляють протисудомну дію [110, 111]. Проте, донедавна застосування відомих активаторів K^+ -каналів обмежувалось їх вираженим впливом на артеріальний тиск та інші периферичні ефекти. Єдиний новий протиепілептичний препарат, механізм дії якого зумовлений активацією K^+ -каналів є ретигабін (Д-23121) [103]. Доклінічні і клінічні дослідження якого завершені і почате клінічне застосування. Дослідження ксигерму-3 на цій моделі виявили, що сполука виявляє дозозалежний інгібуючий ефект. Так, починаючи з концентрації 500 μ м ксигерм-3 блокував судомну активність протягом $24,0 \pm 2,8$ хв. За умов підведення в розчин більшої концентрації ксигерму-3 відзначалося посилення ефектів і час блокування скорочувався до 15-17 хв. Особливістю дії ксигерму-3 за цих умов було те, що ксигерм-3 гальмував частоту розрядів і викликав зниження їх амплітуди, тоді як препарати порівняння фенітоїн і карбамазепін спочатку викликали збільшення частоти розрядів з наступним зниженням. Навпаки, ксигерм-3 у відносно низьких концентраціях зменшував частоту розрядів і суттєво не впливав на їх амплітуду. Дія ксигерму-3 була подібна до впливу кромакаліну, який активує K^+ -канали, і відрізнялося від ефектів таких блокаторів Na^+ -каналів як фенітоїн і карбамазепін, які в граничних концентраціях індукували зростання частоти та зниження амплітуди розрядів і лише у високій концентрації протягом тривалого часу пригнічували ЕпА. Такого збільшення частоти розрядів не відбувалося під впливом активатора K^+ -каналів кромакаліну і ксигерму-3. У граничній концентрації ксигерм-3 викликав редукцію частоти розрядів, не впливаючи на їх амплітуду. В умовах застосування ксигерму-3, а також після відмиву зрізів відзначалося зменшення частоти розрядів, однак амплітуда змінювалася значно менше.

З метою подальшого дослідження механізмів протисудомної дії ксигерму-3 були проведені дослідження особливостей його ефектів на активність зрізів гіпокампу за умов низької концентрації Mg^{2+} . На даній моделі

видалення магнію редукує магній-зумовлене блокування NMDA-рецепторів глутаматергічної системи, що приводить до її активації та генерації спонтанної ЕпА [265, 267]. Під впливом глутамату, NMDA і AMPA, які були апліковані на нейрони поля СА3 гіпокампу відзначалося значне зростання ритму епілептиформних розрядів [88]. Антагоністи NMDA або AMPA рецепторів, а також блокатори Ca^{2+} каналів ефективно пригнічували ЕпА в низьких концентраціях [80, 82, 83]. Вальпроати, що виявляють комплексну дію на ГАМК-ергічну і Ca^{2+} -передачу, також блокували ЕпА, викликану видаленням Mg^{2+} із середовища [48, 50]. У наших дослідах вальпроат натрію також дозозалежно пригнічувала ЕпА за умов даної моделі. Ксигерм-3 також у відносно низькій концентрації (100 μM) викликав зниження частоти генерації ЕпА, а більшою дозою викликав пригнічення і амплітуди розрядів. Такі ефекти ксигерму-3 були подібні до дії активатора K^+ -каналів кромакаліну та були досить несподіваними, тому що ксигерм-3 впливав на NMDA-викликану судомну активність лише у відносно великій дозі. На підставі отриманих результатів можна припустити, що ксигерм-3 пригнічував епілептиформні розряди шляхом блокування AMPA й/або NMDA-опосередкованої глутаматергічної передачі або потенціювання активності ГАМК-ергічної гальмівної системи. Інший важливий механізм протисудомної дії ксигерму-3 пов'язаний з активацією K^+ -каналів тобто ефектом подібним до дії кромакаліну. Відкриття K^+ -каналів приводить до гіперполяризації мембрани нейронів і підвищує поріг генерації судомних післярозрядів.

Таким чином, можна підсумувати, що ксигерм-3 ефективно пригнічував ЕпА, викликану у гіпокампальних зрізах за допомогою незначних концентрацій Ca^{2+} і Mg^{2+} . Виражені ефекти за умов моделі низької концентрації Ca^{2+} можуть бути зумовлені активацією K^+ -каналів під впливом ксигерму-3. У свою чергу потенційна ефективність ксигерму-3 гальмувати ЕпА, яка викликана низькою концентрацією Mg^{2+} , можливо свідчить про здатність ксигерму-3 брати участь у підтримці балансу збудливих і гальмівних нейромедіаторних механізмів. У цілому, отримані дані свідчать про

доцільність подальшого з'ясування механізмів протисудомної дії ксигерму-3 з метою розробки препаратів для подальшого лікування різних форм епілепсії.

Завданням наступного розділу досліджень було з'ясування антипсихотичних властивостей нових комплексних сполук германію - ксигерму -1, -2 і -3. Першою передумовою для проведення досліджень є широке застосування солей літію, який входить до складу ксигерму-1, у лікуванні психічних порушень [269, 297-299]. Іншою підставою були дані про протисудомні властивості ксигерму-3. А оскільки деякі протиепілептичні препарати останніми роками застосовуються також для лікування різних психічних порушень, наприклад, біполярних розладів, такі препарати часто називають «протисудомними стабілізаторами настрою» [269, 299-301]. Так, вальпроати ефективні в лікуванні і запобіганні нових епізодів маніакальних порушень за умов біполярних розладів [8, 302]. Ламотриджин застосовують як антидепресант, а також у лікуванні біполярних розладів [303-305]. Залишається неясним механізм впливу цих і інших протиепілептичних препаратів у якості модуляторів або стабілізаторів настрою і психічних процесів. Можливо, їх клінічні ефекти за умов психічних розладів частково зумовлені їх блокувальним впливом на Na^+ -канали [306 -308]. З іншого боку, антипсихотичні ефекти протиепілептичних препаратів є аргументом на користь спільності патогенетичних механізмів епілепсії, психічних синдромів, невропатичного болю за умов яких також ефективні протиепілептичні препарати. Одним із загальних патогенетичних механізмів зазначених порушень є генераторна природа вищевказаних невропатологічних синдромів, які характеризуються гіперактивністю систем [309]. Із зазначеної теорії випливає також принцип комплексної патогенетичної терапії, уперше запропонований

Г.Н. Крижановським і М.Н. Алієвим [310] на моделі стереотипії, що є еквівалентною психічним порушенням. Викладене послужило підставою для проведення досліджень антипсихотичних ефектів нових сполук германію. Спочатку було проведено дослідження ефектів нових сполук за умов моделі

амфетамін-викликаних порушень поведінки у щурів. Дана модель широко застосовується в якості скринінгової моделі для дослідження ефектів нових сполук. Отримані результати виявили, що ксигерм-1, -2 і -3 дозозалежно пригнічували амфетамін-викликані стереотипні порушення у щурів. За цих умов найбільшою ефективністю характеризувалась сполука ксигерм-1, виразність ефектів яких відповідала впливу референс-препаратів - літію хлориду і галоперидолу. Подальше підтвердження антипсихотичних ефектів ксигерму-1 отримане в умовах моделі стереотипії, викликаній шляхом створення генераторів патологічно посиленого збудження за допомогою мікроін'єкцій пікротоксину до ростральної частини хвостатого ядра. На даній моделі ксигерм-1 дозою 1050,0 мг/кг виявляв ефекти, які порівняні з такими для літію хлориду дозою 400,0 мг/кг і галоперидолом - 0,8 мг/кг. За цих умов сполуки ксигерм-2 та -3 виявляли слабо виражений вплив. Одним з важливих патогенетичних механізмів амфетамін-викликаній стереотипії є активація дофамінергічної системи, яка зумовлена посиленням під впливом амфетаміну вивільненням дофаміну із пресинаптичних закінчень [254, 255]. Підтвердженням цього є ефекти галоперидолу, який блокує рецептори дофаміну і пригнічує прояви стереотипних порушень у тварин. Можливо, антипсихотичні ефекти літію хлориду за умов моделі амфетамін-індукованої стереотипії також частково зумовлені його здатністю знижувати активність дофамінергічної передачі. Так, виявлено, що під впливом літію хлориду відзначається зниження рівня дофаміну в *n. accumbens* гіпоталамуса [311]. Можливо, що ефекти ксигерму-1 за умов моделі амфетамін-викликаній стереотипії також пов'язані з його впливом на дофамінергічну систему.

В основі патогенезу синдрому стереотипної поведінки, викликаного шляхом створення генераторів патологічно посиленого збудження у хвостатому ядрі за допомогою введення в нього пікротоксину, також є дисбаланс нейрохімічних систем. Блокування під впливом пікротоксину ГАМК-ергічних механізмів гальмівного контролю приводить до розгальмовування і гіперактивації дофамінергічної системи - ключової ланки

патогенезу стереотипії. Результати експериментів виявили, що за умов даної моделі стереотипної поведінки ксигерм-1 також відзначався найбільшою ефективністю у порівнянні з іншими комплексами ксигермом-2, -3 і виявляв дозозалежні депримуєчі ефекти порівнянні із впливом хлориду літію і галоперидолом. Відомо, що дія літію зумовлена блокуванням гіперактивності катехоламінергічної системи шляхом активації моноамінооксидази, посиленням руйнування катехоламінів, посиленням зворотного захоплення медіаторів, пригніченням їх секреції та гальмуванням активності аденілатциклази нейронів мозку [297, 298, 307]. Можна припустити, що саме літієм, який входить до складу комплексної сполуки ксигерм-1, зумовлена його властивість нормалізувати поведінку тварин, порушену за умов двох моделей стереотипії. Ці дані відповідають результатам інших досліджень, які виявили здатність хлориду літію гальмувати інші амфетамін-викликані порушення поведінки у епілептиформних тварин [310, 311].

Біполярні розлади або маніакально-депресивні психози відносять до числа загальних тяжких хронічних психічних розладів, що характеризуються чергуванням манії і депресії [256]. Етіологія та основні патофізіологічні механізми розвитку біполярних розладів залишаються багато в чому не з'ясованими. Однією з причин недостатньої дослідженості патофізіології біполярних розладів є відсутність адекватних експериментальних моделей на тваринах. Важливим фактором, що лімітує моделювання у тварин біполярних розладів є їх циклічна природа, чергування манії і депресії. Проте більшість експериментальних моделей моделюють лише одне з істотних проявів захворювання у пацієнтів. Так, сьогодні розроблено кілька валідних моделей депресії [312, 313], однак адекватні моделі маніакального стану відтворити не вдалося. Тим не менш, різні фармакологічно- або фізіологічно-індуковані форми поведінки тварин, можливо представляють певні симптоми прояву захворювання [314, 315]. Оскільки однією з провідних ознак у діагностиці біполярних розладів є наявність симптомів маніакальних порушень, то адекватними є ті моделі на тваринах, які відтворюють деякі ознаки

маніакальних епізодів, таких як ейфорія, посилення мотивацій, гіперактивності, гіперсексуальності, інсонії та агресивності й інших. Однією з таких експериментальних моделей дослідження мотиваційних станів у тварин є модель самостимуляції мозку, яка полягає в тому, що тварини через імплантовані в мозок електроди прагнуть до підвищеного роздратування мозку [253, 255]. Дана поведінкова парадигма ґрунтується на відкритті, зробленому Дж. Олдсом і П. Мілером [252], які продемонстрували, що щури шляхом повторного натискання на педаль викликають електричну стимуляцію специфічних структур, компонентів мозкової системи винагороди, підкріплення. Результати численних досліджень підтвердили адекватність моделі самостимуляції мозку для дослідження ефектів препаратів як підсилюючих, так і гальмуючих підкріплювальний ефект та інші модуляції мотиваційного поведінки [255, 316-318]. Таким чином, самостимуляція поведінки, можливо, представляє корисний поведінковий інструмент мозкової системи винагороди, за допомогою якого можна досліджувати доклінічно вказані прояви маніакальних станів. Виявлено, що психостимулятори викликають полегшення поведінкових реакцій СМ у щурів [316, 319], яке вказує на гіперактивність мозкової системи винагороди. Вважають, що ці ефекти певною мірою відповідають симптомам підвищеного настрою і гедонічних мотивацій, які спостерігаються у пацієнтів з БР. З іншого боку, ефекти препаратів, що нормалізують настрій і психічні реакції, на реакції СМ поглиблено не досліджувалися. У невеликій кількості робіт продемонстровано, що літій підвищував поріг СМ, тоді як вальпроат натрію не впливала на цей показник [320, 321]. Викладене вище слугує передумовою для проведення дослідження ефектів ксигерму-1, літію, вальпроату натрію, а також їх комбінованого застосування на реакції СМ латерального гіпоталамусу у щурів. Крім того, оцінювалась ефективність зазначених сполук на амфетамін-індуковане посилення реакції СМ у щурів. Вважаємо, що використовуючи парадигму СМ, можливо виявити гедонічні прояви, викликані за допомогою амфетаміну у тварин. Таким чином, потенційно дана модель може бути

корисною для з'ясування терапевтичних ефектів стабілізаторів настрою, особливо для тестування нових сполук і порівняння їх ефектів з існуючими референс-препаратами. З цією метою для порівняння були обрані хлорид літію і вальпроат - два препарати, які найчастіше використовуються в клініці. Отримані нами результати виявили, що ксигерм-1, хлорид літію і вальпроат у відносно низьких дозах не чинили впливу на реакції СМ, тоді як великі дози підвищували пороги СМ, що дозволяє припустити інгібуючу дію досліджуваних сполук на систему винагороди. Крім того, тільки ксигерм-1 і літій високими дозами (2100,0 і 200,0 мг/кг відповідно) значно знижували максимальну частоту реакції СМ. Під впливом вальпроату у великій дозі відзначалась тенденція до зниження частоти СМ. Якою мірою отримані дані можуть бути перенесені на клінічні ситуації залишається нез'ясованим. Однак отримані дані вказують, що гостре введення ксигерму-1, літію хлориду і вальпроату редукують функціонування мозкової системи винагороди, викликаючи ангедонічні ефекти. Цей ефект є протилежним ейфорії, посиленню гедонічних прагнень, які спостерігаються у пацієнтів з БР.

Отримані нами дані про вплив літію на поріг СМ відповідають результатам інших авторів [298, 321]. Дані про інгібуючий вплив ксигерму-1 на систему винагороди є новими і дуже подібними на вплив літію хлориду. У клінічній практиці показано, що комбіноване застосування літію та вальпроатів надає більш виражені терапевтичні ефекти за умов біполярних розладів [320]. У цьому зв'язку, представляють інтерес отримані нами дані про те, що застосування ксигерму-1 у поєднанні з вальпроатом і літієм у підпорогових дозах, які були неефективними за умов їх роздільного застосування, має виражену гальмівну дію на реакції СМ, викликаючи підвищення їх порогу, і що особливо важливо, зменшення максимальної частоти СМ. Однак, залишається незрозумілим, яким чином поєднання ксигерму-1 з літієм і вальпроатом, препаратами з різними механізмами дії в підсумку призводить до потенціювання ефектів за умов зазначеної моделі. Разом з тим, однаковий інгібуючий ефект літію та вальпроату на мозкову систему винагороди,

можливо, пояснює також подібне застосування в клініці у пацієнтів з БР. У цьому плані, отримані дані про вплив ксигерму-1, хлориду літію та вальпроату натрію на поріг СМ були протилежними ефектам амфетаміну й інших психостимуляторів і можуть бути інтерпретовані як протиманічні.

Наступні експерименти на моделі амфетамін-індукованого посилення реакції СМ виявили, що амфетамін подібно до інших речовин, які збуджуюче впливають на ЦНС, значно знижував поріг СМ латерального гіпоталамуса і викликав одночасне зростання частоти СМ. Іншими словами, амфетамін зменшував число стимуляцій, необхідних для досягнення певного рівня відповідних реакцій, підвищуючи активність системи винагороду. Ці дані відповідають результатам про те, що амфетамін полегшував реакції СМ, викликані роздратуванням медіального пучка переднього мозку та інших ядер [255, 311, 321]. За цих умов виявлені деякі відмінності в дії досліджуваних сполук. Так, показано, що ксигерм-1 і літію хлорид дозозалежно блокували активуючі винагороду ефекти амфетаміну, тоді як вальпроат натрію не чинив суттєвого впливу на них. Однак за умов одночасного застосування ксигерму-1 і вальпроат натрію у відносно низьких дозах (600,0 і 200,0 мг/кг відповідно) також відзначалося значне гальмування підсилюючих ефектів амфетаміну. Таким чином, вальпроат натрію потенціював ефекти ксигерму-1. Можливо, що активуючі реакції СМ ефекту амфетаміну зумовлені його здатністю збільшувати вивільнення дофаміну в синапсах ЦНС [322]. У зв'язку з цим, можна припустити, що інгібуючі ефекти ксигерму-1 і літію хлориду на амфетамін-індуковане посилення реакції самостимуляції зумовлені їх впливом на дофамінергічну систему. Підтвердженням можуть бути дані про те, що під впливом літію хлориду відзначалося зниження рівня дофаміну в гіпоталамусі [322]. Наші дані узгоджуються з результатами [320], які виявили інгібуючі ефекти літію хлориду і його комбінацій з вальпроєвою кислотою на амфетамін-посилені реакції самостимуляції гіпоталамуса у щурів. Виявлена також здатність літію хлориду блокувати і інші поведінкові ефекти амфетаміну сульфату в експериментальних тварин [311]. Загалом, отримані результати

дозволяють зробити висновок про те, що нова сполука ксигерм-1 має виражений вплив на поведінку, зокрема на підкріплюючі системи мозку, яка подібна до дії літію хлориду і відрізняється від дії вальпроєвої кислоти.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено нове вирішення актуального завдання нейрофармакології, яке полягає у пошуку нових високоефективних та безпечних нейротропних лікарських засобів. У роботі експериментально обґрунтовано доцільність і перспективність застосування нових комплексних сполук в ряду *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманатів (IV) літію, натрію та калію як потенційних протисудомних і антипсихотичних лікарських препаратів.

1. Аналіз загального нейрофармакологічного профілю нових комплексних сполук в ряду *bis*(μ -ксиларато)дигідроксодигерманатів (IV) літію, натрію та калію (відповідно ксигерм-1, -2, -3) у широкому діапазоні доз виявив різнопланову нейротропну активність двох речовин, спрямованість і виразність якої залежить від їх структури та дози. Ксигерм-3 (1680,0 мг/кг) має виразну депремууючу дію на центральну нервову систему. Ксигерм-1 (2100,0 мг/кг), поряд з незначним активуючим впливом на рухову активність тварин, виявляє седативний, ноотропний ефект, збільшує прояви пасивно-адаптивної поведінки.

2. За виразністю і широтою спектру протисудомної дії сполука ксигерм-3 значно перевищує відповідні ефекти інших похідних. Виразність протисудомних ефектів БАР була різною і залежала від природи індукованої судомної активності. Ксигерм-3 мав високу дозозалежну протисудомну дію на моделях пентиленететразол-, пікротоксин-, пілокарпін-, каїнат-викликаних, а також аудіогенних і фармакорезистентних 6-Гц-викликаних судом (ED_{50} становила відповідно 370,0, 486,7, 242,0, 540,0, 178,0 і 900,0 мг/кг). Проте він практично не був ефективний проти судом, викликаних бікукуліном, стрихніном, 4-амінопірином, NMDA. Курсове введення ксигерму-3 протягом 14 днів не викликало розвитку нейротоксичних ефектів, толерантності, не змінювався судомний поріг, а припинення застосування не призводило до феномену віддачі.

3. Ксигерм-3 дозозалежно уповільнював розвиток хімічного та

електростимуляційного кіндлінгу: ED_{50} складала відповідно 640,0 і 250,0 мг/кг. В умовах сформованого кіндлінгу БАР мала більш значну протисудомну дію в менших дозах 570 та 150 мг/кг відповідно, ніж за умов гострих судом, викликаних за допомогою пентиленететразолу та максимального електрошоку.

4. Дослідження впливу ксигерму-3 на активність нейронів зрізів гіпокампу в умовах дії 4-амінопіридину та низького вмісту магнію та кальцію в омиваючому зрізи розчині виявило, що його протисудомна дія певною мірою зумовлена активацією K^+ -каналів.

5. Ізоболографічний аналіз в умовах моделі 6-Гц-викликаних судом виявив потенціюючий характер взаємодії ксигерму-3 з карбамазепіном, ламотриджином та адицію протисудомних ефектів з вальпроатом натрію. На моделі МЕС ізоболографічний аналіз отриманих даних виявив просту сумачію протисудомних ефектів між ксигермом-3, вальпроатом натрію і карбамазепіном, фенобарбіталом та потенціювання дії із леветирацетамом. Індекс взаємодії в зазначених комбінаціях сполук варіював від 0,6 до 1,2, що підтверджує їх синергічний характер взаємодії.

6. Сполука, яка містить літій (ксигерм-1), викликала антипсихотичну дію в умовах моделей стереотипної поведінки та самостимуляції мозку, маючи дозозалежний ефект. За показниками інтенсивності та тривалості елементів стереотипної поведінки ксигерм-1 дозою 1200,0 мг/кг мав більш виразну антипсихотичну дію порівняно з референс-препаратами - літію хлоридом (400,0 мг/кг) і галоперидолом (0,8 мг/кг).

7. Цілеспрямовано синтезовані германійорганічні сполуки ксигерм-1, -3 переконливо демонструють виразну дозозалежну нейротропну дію і перспективність подальшого дослідження для створення на їх основі нових протиепілептичних та антипсихотичних лікарських засобів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Виничук С. М. Новые возможности патогенетической коррекции ишемических повреждений ткани головного мозга: взгляд на проблему / С. М. Виничук // Український медичний часопис. – 2009. – № 2. – С. 5–9.
2. Мищенко Т. С. Современная диагностика и лечение неврологических заболеваний / Т. С. Мищенко. — Киев, 2010. — 470 с.
3. Schmidt D. New developments in antiepileptic drug resistance : an integrative view epilepsy / Dieter Schmidt, Wolfgang Löscher // Epilepsy Curr. – 2009. – № 9 (2). – P. 47–52.
4. Марцинковский И. А. Коморбидность и биполярность: биполярное расстройство через призму доказательной медицины / И. А. Марцинковский // НейроNews. — 2009 — № 6 (17). — С. 61—67.
5. Kwan P. Current concepts : Drug-resistant epilepsy / P Kwan, S. C Schachter, M. J. Brodie // N. Engl. J. Med. – 2011. – № 365. – P. 919–926.
6. Воронкова К. В. Современные принципы терапии эпилепсии / К. В. Воронкова, О. А. Пылаева, Е. С. Косякова // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С.Корсакова. – 2010. – Т. 110, № 6. – С. 24–36
7. Perucca P. Adverse effects of antiepileptic drugs / P. Perucca, F. G. Gilliam // Lancet Neurol. – 2012. – № 11 (9). – P. 792–802.
8. Valproate for the treatment of acute bipolar depression: systematic review and meta-analysis / C. L. Bowden, L. A. Smith, G. J. Perugi [et al.] // Affect Disord. – 2010. – № 122 (1–2). – P.1–9.
9. Tiagabine for acute affective episodes in bipolar disorder / K. Macritchie, J. Geddes, A.H. Young [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. – 2012. – № 12.– P. 46–94.
10. Cataldi M. The Changing Landscape of Voltage-Gated Calcium Channels in Neurovascular Disorders and in Neurodegenerative Diseases / M. Cataldi // Curr. Neuropharmacol. – 2013. –№11(3). – P.276–297.

11. Epilepsy therapy development: technical and methodologic issues in studies with animal models / A. S. Galanopoulou, M. Kokaia, J.A. Loeb [et al.] // *Epilepsia*. – 2013. – № 54., Suppl 4. – P. 13–23.
12. Goodman S. Germanium – the health and life enhancer: editorial issue / S. Goodman // *Positive health*. – 2003. – № 91. – P. 1–2
13. Влияние координационного соединения германия с никотинамидом на энергетический гомеостаз при экспериментальном медикаментозном гепатите / И. И. Сейфуллина, В. Д. Лукьянчук, М. А. Внукова [и др.] // *Укр. журн. експерим. медицини*. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 79–84.
14. Годован В. В. Патогенетичні механізми гепатозахисної дії нових похідних нікотинової кислоти та нікотинаміду / В. В. Годован, В. Й. Кресюн // *Інтегративна антропологія*. – 2007. – № 1. – С. 61–68.
15. Кресюн В. Й. Перспективи створення нових лікарських препаратів на основі комплексних сполук германію / В. Й. Кресюн, І. Й. Сейфулліна, В. В. Годован // *Одеський медичний журнал*. – 2011. – № 1 (123). – С. 31–35.
16. Лукьянчук В. Д. Витагерм–2 при закрытой черепно–мозговой травме с использованием многофакторного регрессионного анализа / В. Д. Лукьянчук // *Журнал Національної Академії Медичних Наук України*. – 2013. – Т. 19, N 1. – С. 104–108.
17. Jung B. G. Antiviral effect of dietary germanium biotite supplementation in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus / B. G. Jung, J. A. Lee, B. J. Lee // *J. Vet. Sci.* – 2013. – № 14 (2). – P. 135–141.
18. Yoshinari O. Hepatoprotective effect of germanium–containing Spirulina in rats with d–galactosamine– and lipopolysaccharide–induced hepatitis / O. Yoshinari, Y. Shiojima, K. Igarashi // *Br. J. Nutr.* – 2013. – № 17. – P. 1–6.
19. Волощенко Д. Б. Изоболографический анализ взаимодействия МИГУ–5 с общепринятыми и новыми противозепилептическими препаратами в условиях модели 6–Гц–вызванных судорог у мышей / Д. Б. Волощенко,

- П. А. Шандра, О. А. Кащенко // Одеський медичний журнал. – 2007. – № 1 (99) – С. 30–35.
20. Доклінічні токсикометричні дослідження нового засобу детоксикації МІГУ–5 за умов ендogenous отруєння / В. Д. Лук'янчук, Т. Р. Лучишин, Д. С. Кравець [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології – 2011. – № 3 – С. 40 – 44.
21. Мегдятов Р.С. Глицин в лечении невралгии тройничного нерва / Р.С. Мегдятов, Ю.Н. Савченко, А.П. Хохлов // Журнал невропатологии и психиатрии им. Корсакова Р.С. – 1991. – №4 – С. 105–106.
22. Lin C.H. The clonic phase of seizures in patients treated with electroconvulsive therapy is related to age and stimulus intensity / Lin C.H., Wang C.C., Chiu Y.C. // *Front. Psychiatry*. – 2013. – №4. – P.156 –166.
23. Ionic nature of Ge(II)-centered dications: a germanium K-edge X-ray absorption near edge structures study / M. W. Murphy, M. J. Ward, P. A. Rupar [et al.] // *Chem. Commun. (Camb)*. – 2010. – № 46 (37). – P. 7016–7018.
24. Thiele D. J. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals / Thiele D. J., Ishida S., Lee J., // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002 – № 14. – P. 298–302.
25. Головенко Н. Я. Физико-химическая фармакология / Головенко Н. Я. – Одесса: АстроПринт, 2004. – 718 с.
26. Головенко Н. Я. Биохимическая фармакология пролекарств / Н. Я. Головенко, И. А. Кравченко – Одесса : Екологія, 2007. – 360 с.
27. Кукес В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты / Кукес В. Г. – М. : Реафарм, 2004. – 144 с.
28. Guyton J. R. Safety considerations with niacin therapy / J. R. Guyton, H. E. Bays // *Am. J. Cardiol.* – 2007. – № 99. – С. 22–31.
29. Nagalski A. Niacin in therapy / A. Nagalski, J. Bryła // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2007. – № 61. – P. 288–302.

30. Browne T. R. Handbook of epilepsy / T. R. Browne, G. L. Holmes. – [4th ed]. – Lippincott Williams and Wilkins, 2008. – P. 279.
31. Исследования противосудорожных агентов: достижения и перспективы / Ш. Пандей, Ш. Шукла, Д. Пандей, [и др.] // Усп. хим. – 2011. – № 80 (2). – С. 199–208.
32. Structural Plasticity of Dentate Granule Cell Mossy Fibers During the Development of Limbic Epilepsy / J. O. McNamara, S. C. Danzer, X. He [et al.] // Hippocampus. – 2010. – № 20(1). – P.113–124.
33. Scharfman H. E. The Neurobiology of Epilepsy / H. E. Scharfman // Curr. Neurol. Neurosc. Rep. – 2007. – № 7 (4). – P. 348–354.
34. Löscher W. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research / Wolfgang Löscher, Claudia Brandt // Pharmacol/ Rev. – 2010. – № 62(4). – P.668–700.
35. Functional analysis of conserved sequences within a temporally restricted neural precursor cell enhancer / T. Brody, A. Kuzin, M. Kundu [et al.] // Mech. Dev. – 2011. – № 128 (3–4). – P.165–177.
36. Perucca E. The pharmacological treatment of epilepsy in adults / E. Perucca, T. Tomson // Lancet. Neurol. – 2011. – № 10. –P. 446–56.
37. Bialer M. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs / M. Bialer, H.S. White // Nat. Rev. Drug Discov. – 2010. – № 9 (1). – P. 68–82.
38. Predictive factors for early identification of pharmaco-resistant epilepsy / I. Marković, D. Sporis, S. Basić [et al.] // Acta Clin Croat. – 2013. – № 52 (1). – P.11–15.
39. Perucca E. Development of new antiepileptic drugs: Challenges, incentives, and recent advances / E. Perucca, J. French, M. Bialer // Lancet Neurol. – 2007. – № 6. –P. 793–804.

40. Shorvon S. The Pharmacokinetics and clinical therapeutics of the antiepileptic drugs : Oxford textbook of epilepsy and epileptic seizures / S. Shorvon, M. Cook. – Oxford university press., 2013. – 400 p.
41. Schmidt D. Antiepileptic drugs: advantages and disadvantages / D. Schmidt, B. Abou-Khalil // *Handb. Clin. Neurol.* – 2012. – № 108. – P. 723–39.
42. Schmidt D. Efficacy of New Antiepileptic Drugs / D. Schmidt // *Epilepsy Curr.* – 2011. – № 11 (1). – P. 9–11.
43. Issues related to development of antiepileptogenic therapies / W. Löscher, D. Schmidt, I. Mody [et al.] // *Epilepsia.* – 2013. – № 54, Suppl 4. – P. 35 –43.
44. Development of new treatment approaches for epilepsy: Unmet needs and opportunities / D. Schmidt, R. J. Porter, H. S. White // *Epilepsia.* – 2013. – № 54, Suppl 4. – P.3–12.
45. Engelborghs S. Pathophysiology of epilepsy / S. Engelborghs, R. D’Hooge, P. P. De Deyn // *Acta Neurol. Belg.* – 2000. – № 100. – P. 201–13.
46. Macdonald R. L. Antiepileptic drug mechanisms of action / R. L. Macdonald, K. M. Kelly // *Epilepsia.* – 1995. – № 36, Suppl 2. – P.2–12.
47. Czapiński P. Mechanisms of action of antiepileptic drugs // P. Czapiński, B. Blaszczyk, S.J. Czuczwar // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2005. – № 5(1). – P. 3–14.
48. Czuczwar S. J. The new generation of GABA enhancers: potential in the treatment of epilepsy / S. J. Czuczwar, P. N. Patsalos // *CNS Drugs.* –2001. – № 15. – P. 339–350.
49. Interaction between Ca^{2+} , K^{+} , carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode / M. Okada, Y. Kawata, K. Mizuno [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. – № 124. – P. 1277–1285.
50. Stefani A. Voltage-activated calcium channels: targets of antiepileptic drug therapy / A. Stefani, F. Spadoni, G. Bernardi // *Epilepsia.* – 1997. – № 38. – P. 959–65.

51. Rogawski M. A. The neurobiology of antiepileptic drugs / M. A. Rogawski, W. Löscher // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2004. – № 5. – P. 553–564.
52. Brodie M. J. Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents / M. J. Brodie, L. J. Stephen // *CNS Drugs.* – 2011. – № 25. – P. 89–107.
53. The State of Antiepileptic Drug Development / M. D. Porter, N. Andrew, M. D. Wilner [et al.] // *Medscape Neurology* – 2012. – №7(25). – P.1–2.
54. Preclinical profiling and safety studies of ABT-769: a compound with potential for broad-spectrum antiepileptic activity / M. W. Decker, W. J. Giardina, M. J. Dart [et al.] // *Epilepsia.* – 2005. – № 46(9). – P. 1349–1361.
55. Mechanisms of action of antiseizure drugs / M. A. Rogawski, R. J. Porter, A. Dhir [et al.] // *Handb. Clin. Neurol.* – 2012. – № 108. – P. 663–681.
56. Efficacy and tolerability of lamotrigine in Juvenile Myoclonic Epilepsy in adults: a prospective, unblinded randomized controlled trial / R. A. Machado, V. F. García, A. G. Astencio [et al.] // *Seizure.* – 2013. – № 7 (31). – P.199–204.
57. A comparison of extracellular excitatory amino acids release inhibition of acute lamotrigine and topiramate treatment in the hippocampus of PTZ-kindled epileptic rats / Y. Deng, M. Wang, L. Jiang [et al.] // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2013. – №9 (6). – P. 1123–1128.
58. White H.S. Carbamazepine, but not valproate, displays pharmacoresistance in lamotrigine-resistant amygdala kindled rats / H. S. White, A. K. Srivastava // *Epilepsy Res.* – 2013. – № 104 (1–2). – P. 26–34.
59. Lamotrigine ameliorates seizures and psychiatric comorbidity in a rat model of spontaneous absence epilepsy / H. Y. Huang, H. W. Lee, S. D. Chen [et al.] // *Epilepsia.* – 2012. – № 53 (11). – P. 2005–2014.
60. Thomas P. Absence and myoclonic status epilepticus precipitated by antiepileptic drugs in idiopathic generalized epilepsy / P. Thomas, L. Valton, P. Genton // *Brain.* – 2006. – № 129 (Pt 5). – P. 1281–1292.

61. Guglani V. Eyelid myoclonia with absence seizure precipitated by carbamazepine therapy // V. Guglani, C. Azad // *Indian Pediatr.* – 2012. – № 49 (10). – P.840–841.
62. Bialer M. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs) / M. Bialer // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – № 64 (10). – P. 887–895.
63. White H. S. Review: Discovery of antiepileptic drugs / H. S. White, M. Smith, K. S. Wilcox // *Neurotherapeutics.* – 2007. – № 4 (1). – P. 12–17.
64. Patsalos P. N. Drug Interactions with the Newer Antiepileptic Drugs (AEDs)– Part 1: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions Between AEDs. / P. N. Patsalos // *Clin. Pharmacokinet.* – 2013. – № 20. – P. 1–12.
65. Landmark C. J. Targets for antiepileptic drugs in the synapse / Landmark C.J. // *Med. Sci. Monit.* // 2007. – № 13(1). – P. 1–7.
66. Goodnick P. J. Review: Anticonvulsants in the treatment of bipolar mania / P. J. Goodnick // *Expert. Opin. Pharmacother.* – 2006. – № 7 (4). – P. 401–10.
67. Davydov O.S. Review: Antiepileptic drugs: over than epilepsy (anticonvulsants drugs use in different pain syndromes) / O. S. Davydov // *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im S S Korsakova.* – 2013. – №113(4). – P. 58–65.
68. Oxcarbazepine for neuropathic pain / M. Zhou, N. Chen, M. Yang [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2013. – № 28 (3). – P. 1–12.
69. Rathore C. Prophylactic antiepileptic drugs in brain tumors : what evidence is enough evidence? / C. Rathore, K. Radhakrishnan // *Neurol. India.* – 2013. – № 61 (2). – P.105–106.
70. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs / S. J. Czuczwar, M. K. Trojnar, R. Małek [et al.] // *Pol. J. Pharmacol.* –2002. – № 54 (6) – P. 557–66.
71. Neuroprotective, Neuroplastic, and Neurobehavioral Effects of Daily Treatment With Levetiracetam in Experimental Traumatic Brain Injury / H. Zou, S.W. Brayer, M. Hurwitz [et al.] // *Neurorehabil. Neural. Repair.* – 2013 – № 6 (27). – P. 1–15.

72. Levetiracetam protects hippocampal neurons in culture against hypoxia-induced injury / K. Sendrowski, L. Boćkowski, W. Sobaniec [et al.] // *J. Folia Histochem. Cytobiol.* – 2011 – № 49 (1). – P. 148–152.
73. Löscher W. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver : ways out of the current dilemma / Wolfgang Löscher, Dieter Schmidt // *Epilepsia.* – 2011. – № 52 (4). – P. 657–678.
74. Meldrum B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain : review of physiology and pathology / B. S. Meldrum // *J. Nutr.* – 2000 – № 130. – P. 1007–1015.
75. Meldrum B. S. Excitatory amino acid receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia / B. S. Meldrum // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1995. – № 757. – P. 492–505.
76. Meldrum B. S. Epileptic seizures : Basic Neurochemistry / B. S. Meldrum, A. G. Chapman ; ed. [Siegel A. G., Agranoff G., Albers B. et al.] – [6th ed.]. – Lippincott Raven Publishers, 1999. – 1183 p.
77. Meldrum B. S. Glutamate and glutamate receptors in status epilepticus : Status Epilepticus: Mechanisms and Management / B. S. Meldrum, A. G. Chapman ; ed. C. G. Wasterlain, D. M. Treiman – MIT Press, 2006 – 648 p.
78. Excitatory Amino Acids in Epilepsy / S. J. Czuczwar, W. A. Turski, E. M. Urbanska [et al.] // *Restorative Neurology and Neuroscience.* – 1998. – № 13 (1–2). – P. 25–39.
79. Kleinrok Z. Glutamate receptor antagonists differentially affect the protective activity of conventional antiepileptics against amygdala-kindled seizures in rats / Z. Kleinrok, S. J. Czuczwar, K. K. Borowicz // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2001. – № 11 (1). – P. 61–68.
80. Czuczwar S. J. Glutamate receptor antagonists as potential antiepileptic drugs / S. J. Czuczwar // *Neurol. Neurochir. Pol.* – 2000. – № 34 (8). – P. 41–46.

81. Brain extracellular branched-chain amino acids in medically refractory localization-related epilepsy / C. Ong, E. Damisah, C. Haldeman [et al.] // *Neurosurgery*. – 2013. – № 60 (1). – P. 166–167.
82. Muir K. W. Excitatory amino acid antagonists for acute stroke / K. W. Muir, K. R. Lees // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2003. – № 3. – P. 12–44.
83. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy / B. S. Meldrum, R. X. Moldrich, A. G. Chapman [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – № 476Ю – P.1–16.
84. Herrling P. Excitatory amino acids / P. Herrling. – Academic press, 1997. – 157 p.
85. Turski L. Excitatory amino acids: ten years later / L. Turski., E. Cavalheiro. – Amsterdam: IOS Press, 2001. – P.347
86. Mareš P. Excitatory Aminoacids and Epileptic Seizures in Immature Brain / P. Mareš, J. Folbergrova, H. Kubova // *Physiol Res*. – 2004. – № 53 (1). – P. 115–124.
87. AMPA and NMDA receptors adopt different subunit arrangements / J. M. Edwardson, A. P. Stewart, Y. Suzuki [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – № 6 (11). – P. 1–17
88. Rao V.R. NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks / V. R. Rao, S. Finkbeiner // *Trends Neurosci*. – 2007. – № 30 (6) – P. 284–291.
89. Chung C. H. Minireview:NMDA receptor as a Newly identified member of the metabotropic glutamate family: clinical implications for neurodegenerative diseases / ChiHye Chung // *Molecules and cells*. – 2013. – P.1–6
90. Dalby N. O. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach / N. O. Dalby, I. Mody // *Curr. Opin. Neurol*. – 2001. – № 14(2). – P. 187 – 192.
91. Dalby N. O. GABA-level increasing and anticonvulsant effects of three different GABA uptake inhibitors / N. O. Dalby // *Neuropharmacology*. – 2000. –№ 39 (12). – P. 2399–2407.

92. Sills G. J. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin / G. J. Sills // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2006. – №6(1). – P. 108–113.
93. Marais E. Review: Calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits: differential expression, function, and drug binding / E. Marais, N. Klugbauer, F. Hofmann // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2003. – № 35(6). – 639–47.
94. Pregabalin is a potent and selective ligand for $\alpha_2\delta-1$ and $\alpha_2\delta-2$ calcium channel subunits / F. Bian, D. Hoffman, S. Donevan [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – № 667(1–3). – P. 80–90.
95. Landy S. H. Review: Migraine treatment throughout the lifecycle / S. H. Landy, B. L. Lobo // *Expert. Rev. Neurother.* – 2005. – № 5 (3). – P. 343–353.
96. Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acid: a receptor α_1 subunit knockout mice / J. E. Kralic, H. E. Criswell, J. L. Osterman [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – № 115 (3). P. 774–779.
97. Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy: Review / J. Noebels, D. Johnston, A. J Vincent [et al.] // *Physiol.* – 2013. – № 591 (4). – P. 753–764.
98. Gabapentin can improve postural stability and quality of life in primary orthostatic tremor / J. P. Rodrigues, D. J. Edwards, S. E. Walters [et al.] // *Mov. Disord.* – 2005. – № 20 (7). – P. 865–70.
99. Brain gamma-aminobutyric acid (GABA) abnormalities in bipolar disorder / R. O. Brady, J. M. McCarthy, A. P. Prescott [et al.] // *Bipolar Disord.* – 2013. – № 2. – P. 20–24.
100. Discovery of N-(2,6-dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: hybrid pharmacophore-based design / J. J. Stables, P. Yogeewari, D. Sriram [et al.] // *Med. Chem.* – 2005 – № 48 (20). – P. 6202–6211.
101. Triggle D. J. L-type calcium channels/ D. J. Triggle // *Curr. Pharm. Des.* – 2006. – № 12 (4). – P. 443–57.

102. Calcium modulation in epilepsy / S. J. Czuczwar, W. Kułak, W. Sobaniec [et al.] // *Pol. J. Pharmacol.* – 2004. – № 56 (1). – P. 29–41.
103. Discovery of a retigabine derivative that inhibits KCNQ2 potassium channels / H. N. Hu, P. Z. Zhou, F. Chen [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2013. – № 8 – P. 38–43.
104. Neuronal potassium channel openers in the management of epilepsy: role and potential of retigabine / V. Barrese, F. Miceli, M. Virginia [et al.] // *Clin. Pharmacol.* – 2010. – № 2. – P. 225–236.
105. The delta sleep-inducing peptide, its analogs and the serotonergic system in the development of anticonvulsant action / B. Nickel, A. A. Shandra, L. S. Godlevski [et al.] // *Russ. Fiziol. Zh. im I. M. Sechenova.* – 1997. – № 83(8). – P. 39–45.
106. Ion Channels as Drug Targets in Central Nervous System Disorders / A. M. Waszkielewicz, A. Gunia, N. Szkaradek [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – № 20 (10). – P. 1241–1285.
107. Asconapé J. J. Epilepsy: new drug targets and neurostimulation / J. J. Asconapé // *Neurol. Clin.* – 2013. – P. 31 (3). – P. 785–98.
108. Ciliberto M. A. Clinical utility, safety, and tolerability of ezogabine (retigabine) in the treatment of epilepsy // M. A. Ciliberto, J. L. Weisenberg, M. Wong // *Drug Healthc. Patient Saf.* – 2012. – P. 4. – P. 81–86.
109. Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets / W. Löscher, I. Mody, H. Potschka [et al.] // *Epilepsia.* – 2012. – № 53 (11). – P. 1868–1876.
110. Meldrum B. S. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development // B. S. Meldrum, M. A. Rogawski // *Neurotherapeutics.* – 2007. – № 4 (1). – P. 18–61.
111. Targeting SV2A for Discovery of Antiepileptic Drugs : Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies: / [Klitgaard H., Kaminski R. M., Gillard M. et al.] ; ed. [Noebels J. L., Avoli M., Rogawski M. A. et al.] – [4th ed.]. – Nat. Center for Biotech. Inf.: Oxford University Press, 2012. – 1199 p.

112. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents / H. Klitgaard, A. Matagne, J. M. Rigo [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – № 136 – (5). – P. 659–672.
113. Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model / S. Ishihara, Y. Ohno, R. Terada [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2010. – № 89 (2–3). – P. 360–364.
114. Anti-convulsive and anti-epileptic properties of ucb 34714, a high-affinity ligand for the synaptic vesicle protein, SV2A / H. Klitgaard, A. Matagne, D. Margineanu [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – № 154 (8). – P. 1662–1671.
115. Shorvon S. A new antiepileptic drug – levetiracetam / S Shorvon, K. Rijckevorsel // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2002. – № 72 (4). – P. 426–429.
116. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy / M. E. Barton, B. D. Klein, H. H. Wolf [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2001. – № 47 (3). – P. 217–27.
117. Martín E. D. Animal Models for the Development of New Neuropharmacological Therapeutic / E. D. Martín, M. A. Pozo // *Curr. Neuropharmacol.* – 2006. – № 4 (1). – P. 33–40.
118. Shin H. W. Review of Levetiracetam as a First Line Treatment in Status Epilepticus in the Adult Patients. What Do We Know so Far? // H. W. Shin, R. Davis // *Front. Neurol.* – 2013. – № 4. – P. 111–119.
119. Beaulieu M. J. Levetiracetam / M. J. Beaulieu // *Neonatal. Netw.* – 2013. – № 32 (4). – P. 285–288.
120. Effects of Levetiracetam Monotherapy on the Cognitive Function of Epilepsy Patients / D. L. Koo, K. J. Hwang, D. Kim [et al.] // *Eur. Neurol.* – 2013. – № 70 (1–2) – P. 88–94.
121. The effectiveness of levetiracetam in the treatment of neuropathic pain / E. D. Pozo, E. Pereira-Pérez // *Rev. Neurol.* – 2011. – № 53 (2). – P. 65–72.

122. Update on treatment of essential tremor / T. A. Zesiewicz, J. D. Shaw, K. G. Allison // *Curr. Treat. Options Neurol.* – 2013. – № 4. – P. 410 – 423.
123. Zelano J. Levetiracetam as alternative stage two antiepileptic drug in status epilepticus: a systematic review / J. Zelano, E. Kumlien // *Seizure.* – 2012. – № 21 (4). – P. 233–236.
124. Pharmacodynamic potentiation of antiepileptic drugs' effects by some HMG–CoA reductase inhibitors against audiogenic seizures in DBA/2 mice / E. Russo, E. D. Paola, P. Gareri [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2013. – № 70 (1). – P. 1–12.
125. Rogawski M. A. New molecular targets for antiepileptic drugs: alpha(2)delta, SV2A, and K(v)7/KCNQ/M potassium channels / M. A. Rogawski, C. W. Bazil // *Curr. Neurol. Neuros. Rep.* – 2008. – № 8 (4). – P. 345–352.
126. Levetiracetam inhibits Na⁺–dependent Cl[–]/HCO₃[–] exchange of adult hippocampal CA3 neurons / D. Bingmann, M. Wiemann, T. Leniger [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – № 142 (7). – P. 1073–1080.
127. Rogawski M. A. Brivaracetam: a rational drug discovery success story // M. A. Rogawski // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – № 154 (8). – P. 1555–1557.
128. Antiepileptic Drugs 2012: Recent Advances and Trends / J. I. Sirven, K. Noe, M. Hoerth [et al.] // *Mayo Clin. Proc.* – 2012. – № 87 (9). – P. 879–889.
129. Synergism of established antiepileptic drugs in the 6 Hz seizure model in mice / A. Shandra, P. Shandra, O. Kaschenko [et al.] // *Epilepsia* – 2009. – № 50, Suppl. 4. – P. 105
130. Effects of the Novel Antiepileptic Drug Lacosamide on the Development of Amygdala Kindling / H. Potschka, T. Stöhr, W. Loscher [et al.] // *Epilepsia* – 2006 – № 47 (11). – P. 1803–1809.
131. Stöhr T. The Acute and Chronic Effects of the Novel Anticonvulsant Lacosamide in an Experimental Model of Status Epilepticus / T. Stöhr, A. Matagne, C. G. Wasterlain // *Epilepsy Res.* – 2011. – № 94 (1–2). – P. 10–17.

132. Seeking a mechanism of action for the novel anticonvulsant lacosamide / A. C. Errington, L. Coyne, T. Stöhr [et al.] / *Neuropharmacology*. – 2006 – № 50 (8). – P. 1016–1029.
133. Effects of the novel antiepileptic drug lacosamide on the development of amygdala kindling in rats / C. Brandt, A. Heile, H. Potschka [et al.] // *Epilepsia*. – 2006 – № 47 (11). – P. 1803–1809.
134. Synergism of lacosamide with established antiepileptic drugs in the 6-Hz seizure model in mice / A. Shandra, P. Shandra, O. Kaschenko [et al.] // *Epilepsia*. – 2013. – № 54(7). – P. 1167–1175.
135. Synthesis and anticonvulsant activities of (R)-N-(4'-substituted)benzyl 2-acetamido-3-methoxypropionamides / C. Salomé, E. S. Grosjean, K. D. Park [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2010 – № 53 (3). – P. 1288–1305.
136. Discovery of lacosamide affinity bait agents that exhibit potent voltage-gated sodium channel blocking properties / K. D. Park, X. F. Yang, H. Lee [et al.] // *ACS Chem. Neurosc.* – 2013. – № 4 (3). – P. 463–474.
137. Sokolov S. Voltage-gated sodium channels: pharmaceutical targets via anticonvulsants to treat epileptic syndromes / S. Sokolov, M. Abdelsayed // *Channels (Austin)*. – 2013. – № 7 (3). – P. 146–152.
138. In silico docking and electrophysiological characterization of lacosamide binding sites on collapsin response mediator protein-2 identifies a pocket important in modulating sodium channel slow inactivation / Y. Wang, J. M. Brittain, B. W. Jarecki [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – № 285 (33). – P. 296–307.
139. Patyar S. Lacosamide, a newer antiepileptic / S. Patyar, B. Medhi // *Neurosciences (Riyadh)*. – 2010. – № 15 (1). – P. 3–6.
140. Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca²⁺ channel complex / S. M. Wilson, F. A. White, J. M. Brittain [et al.] // *Nat. Med.* – 2011. – № 17 (7). – P. 822–829.

141. Pezet S. Review: Neurotrophins: mediators and modulators of pain / S. Pezet, S. B. McMahon // *Annu Rev. Neurosci.* – 2006. – № 29. – P. 507–38.
142. McCleane G. Lacosamide for pain / G. McCleane // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2010. – № 19 (9). – P. 1129–1134.
143. Dickenson A.H. Effects of lacosamide, a novel sodium channel modulator, on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy / Dickenson A. H., Bee L.A. // *Neuropharmacology.* – 2009. – № 57 (4). – P. 472–479.
144. Posttraumatic epilepsy and neurorehabilitation / T. D. Hernández, P. M. Levisohn, K. Buytaert–Hoefen [et al.] // *Traumatic Brain Injury.* – 2010. – № 3. – P. 29–61.
145. Temkin N. R. Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs : meta-analysis of controlled trials / N. R. Temkin // *Epilepsia.* – 2001. – № 42 (4). – P. 515–524.
146. Lowenstein D. H. Review : Practice parameter: antiepileptic drug prophylaxis in severe traumatic brain injury: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology / D. H. Lowenstein B. S. Chang // *Neurology.* – 2003. – № 60 (1). – P. 10–16.
147. Changing trends in the use of seizure prophylaxis after traumatic brain injury: A shift from phenytoin to levetiracetam / R. M. Kruer, L. H. Harris, H. Goodwin [et al.] // *J. Crit. Care.* – 2013 – № 4. – P. 489–493.
148. Post R. M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena / R. M. Post // *Neurosc. Biobehav. Rev.* – 2007. – № 31(6). – P. 858–873.
149. Magnin M. Pathophysiology of neuropathic pain: review of experimental models and proposed mechanisms / M. Magnin, L. Garcia–Larrea // *Presse Med.* – 2008. – № 37 (2). – P. 315–340.
150. Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. / H. S. White, S. L. Moshé, W. Löscher [et al.] // *Epilepsia* – 2012. – № 53 (3). – P. 571–582.

151. White H. S. Animal Models for Evaluating Antiepileptogenesis : Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies: / H. S. White ; ed. [Noebels J. L., Avoli M., Rogawski M. A. et al.] – [4th ed.]. – Nat. Center for Biotech. Inf.: Oxford University Press, 2012. – 1199 p.
152. Baraban S. C. Animal Models of Epilepsy : Methods and Innovations San Francisco / Baraban S. C. – Humana Press Inc., 2009. – 272 p.
153. Akdogan I. Experimental Epilepsy Models and Morphologic Alterations of Experimental Epilepsy Models in Brain and Hippocampus : Underlying Mechanisms of Epilepsy / I. Akdogan, N. Goksin ; ed. F. S. Kaneez. – In Tech. Pub, 2011. – 368 p.
154. Pitkänen A. Models of Seizures and Epilepsy / Pitkänen A., Schwartzkroin P. A., Moshé S. L. – Academic Press Pub., 2006. – 712 p.
155. Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy / W. Löscher // Epilepsy Res. – 2002. – № 50 (1–2). – P. 105–123.
156. Animal models of epilepsy : Methods and Techniques in Animal Research Experimental Neurology: handbook / [Arida R. M., Silva A. V., Priel M. R., Cavalheiro E. A.] ; ed. T. Tatlisumak, M. Fisher. – Cambridge Univ. Press, 2006. – 594 p.
157. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs / M. M. Castel-Branco, G. L. Alves, I. V. Figueiredo [et al.] // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. – 2009. – № 31 (2). –P. 101–106.
158. McArthur R. A. The PTZ seizure model: random screening of new chemical entities: Animal and translational models for CNS drug discovery: Neurological disorders / R. A. McArthur, F. Borsini. – Elsevier academic press, 2008. – 416 p.

159. Giardina W. J. Acute Seizure Tests in Epilepsy Research: Electroshock- and Chemical-Induced Convulsions in the Mouse / W. J. Giardina, M. Gasior // *Current Protocols in Pharmacology*. – 2009. – № 5. – P. 5–22.
160. Mandhane S. N. Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice / S. N. Mandhane, K. Aavula, T. Rajamannar // *Seizure*. – 2007. – № 16 (7). – P. 636–644.
161. Akula K. K. Effect of various antiepileptic drugs in a pentylenetetrazol-induced seizure model in mice / K. K. Akula, A. Dhir, S. K. Kulkarni // *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* – 2009. – № 31 (7). – P. 423–432.
162. Sato M. Reports on studies on temporal lobe epilepsy by employing kindling / M. Sato // *Seishin Shinkeigaku Zasshi*. – 2006. – № 108 (2). – P. 111–116.
163. Löscher W. Functional, metabolic, and synaptic changes after seizures as potential targets for antiepileptic therapy / W. Löscher, R. Köhling // *Epilepsy Behav.* – 2010. – № 19 (2). – P. 105–113.
164. Potschka H. Animal models of drug-resistant epilepsy / H. Potschka // *Epileptic Disorders*. – 2012. – № 14 (3). – P. 226–234.
165. Lamotrigine treatment during amygdala-kindled seizure development fails to inhibit seizures and diminishes subsequent anticonvulsant efficacy / R. M. Post, S. R. Weiss, T. Postma [et al.] // *Epilepsia*. – 2000. – № 41 (12). – P. 1514–1421.
166. Chemical kindling: implications for antiepileptic drugs – sensitive and resistant epilepsy models / A. A. Shandra, L. S. Godlevsky, R. S. Vastyanov [et al.] // *Epilepsia*. – 1996. – № 37 (3). – P. 269–274.
167. Faulkner M. A. Safety profile of two novel antiepileptic agents approved for the treatment of refractory partial seizures: ezogabine (retigabine) and perampanel / M. A. Faulkner, R. A. Burke // *Expert. Opin. Drug Saf.* – 2013. – № 7. – P. 83–95.

168. Löscher W. Kindling as a model of drug-resistant partial epilepsy: selection of phenytoin-resistant and nonresistant rats / W. Löscher, C. Rundfeldt // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1991. – № 258 (2). – P. 483–489.
169. Impact of seizure activity on free extracellular phenytoin concentrations in amygdala-kindled rats / W. Löscher, H. Potschka, S. Baltes // *Neuropharmacology.* – 2011. – № 61(5–6). – P. 909–917.
170. Brandt C. Striking differences in individual anticonvulsant response to phenobarbital in rats with spontaneous seizures after status epilepticus / C. Brandt, H.A.Volk, W.Löscher // *Epilepsia.* – 2004. – Vol. 45, № 12. – P.1488–97.
171. Löscher W. Review: Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters / W. Löscher, H. Potschka // *Nat. Rev. Neurosc.* – 2005. – № 6 (8). – P. 591–602.
172. Löscher W. The pharmacokinetics of antiepileptic drugs in rats: consequences for maintaining effective drug levels during prolonged drug administration in rat models of epilepsy / W. Löscher // *Epilepsia.* – 2007. – № 48 (7). – P. 1245–1258.
173. Малинин Д. И. Побочное действие психотропных средств / Малинин Д. И. – М. : Вузовская книга, 2000. – 207с.
174. Петрухин А. С. Побочные эффекты и осложнения антиэпилептической терапии / А. С. Петрухин, О. А. Пылаева, К. В. Воронкова. // *Фарматека.* – 2004. – № 9 (10). – С. 6–7.
175. Болдырева С. Р. Побочные действия антиэпилептических препаратов / С. Р. Болдырева, А. Ю. Ермаков // *Клиническая эпилептология.* – 2009. – № 1. – С. 23–25.
176. Власов П. Н. Побочные эффекты вальпроатов / П. Н. Власов, Н. В. Орехова, М. В. Антонюк [и др.] // *Клиническая эпилептология.* – 2009. – № 1. – С. 2–6.

177. Зенков Л. Р. Осложнения противозепилептической фармакотерапии / Л. Р. Зенков // Российский медицинский журнал. – 2005. – №5. – С. 41–46.
178. Adverse antiepileptic drug effects in new-onset seizures: a case-control study / P. Perucca, A. Jacoby, A. G. Marson [et al.] // *Neurology*. – 2011. – № 76 (3). – P. 273–279.
179. Edwards I. R. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management / I. R. Edwards, J. K. Aronson // *Lancet*. – 2000. – № 356 (9237). – P. 1255–1259.
180. Perucca E. Adverse effects of antiepileptic drugs / E. Perucca, K. J. Meador // *Acta Neurol. Scand Suppl.* – 2005. – № 181. – P. 30–35.
181. Wyllie E Routine laboratory monitoring for serious adverse effects of antiepileptic medications: the controversy / E. Wyllie, R. Wyllie // *Epilepsia*. – 1991. – № 32 (5). – P. 74–79.
182. Glauser T. A. Review: Idiosyncratic reactions: new methods of identifying high-risk patients / T. A. Glauser // *Epilepsia*. – 2000. – № 41 (8). – P. 16–29.
183. Stephen L. J. Pharmacotherapy of epilepsy: newly approved and developmental agents / Stephen L. J., Brodie M. J. // *CNS Drugs*. – 2011. – № 25 (2). – P. 89–107.
184. Kennedy G. M. CNS adverse events associated with antiepileptic drugs / G. M. Kennedy; S. D. Lhatoo // *CNS Drugs*. – 2008. – № 22 (9). – P. 739–760.
185. Мухин К. Ю. Побочные эффекты антиконвульсантов при лечении идиопатической генерализованной эпилепсии / К. Ю. Мухин, А. С. Петрухин, Е. А. Рыкова // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 1997. – № 7. – С. 25–31.
186. Perucca E. Genetic basis for idiosyncratic reactions to antiepileptic drugs / E. Perucca, D. Franciotta, P. Kwan // *Curr. Opin. Neurol.* – 2009. – № 22 (2). – P. 144–149.
187. Zaccara G. Idiosyncratic adverse reactions to antiepileptic drugs / G. Zaccara, D. Franciotta, E. Perucca // *Epilepsia*. – 2007. – № 48 (7). – P. 1223–1244.

188. Löscher W. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations / W. Löscher, D. Schmidt // *Epilepsy Res.* – 1988. – № 2 (3). – P. 145–181.
189. Klitgaard H. Use of epileptic animals for adverse effect testing / H. Klitgaard, A. Matagne, Y. Lamberty // *Epilepsy Res.* – 2002. – № 50 (1–2). – P. 55–65.
190. Eddy C. M. Behavioral adverse effects of antiepileptic drugs in epilepsy / C. M. Eddy, H. E. Rickards, A. E. Cavanna // *J. Clin. Psychopharmacol.* – 2012. – № 32 (3). – P. 362–75.
191. D'Ambrosio R. What is an epileptic seizure? Unifying definitions in clinical practice and animal research to develop novel treatments / R. D'Ambrosio, J. W. Miller // *Epilepsy Curr.* – 2010. – № 10 (3). – P. 61–66.
192. Чекман И. С. Очерки фармакологии метаболитных средств / Чекман И. С., Горчакова Н. А., Галенко–Ярошевский П. А. – М. : Медицина, 2002. – 280 с.
193. Кебец Н. М. Смешаннолигандные комплексы биометаллов с витаминами и аминокислотами и их биологические свойства: монография / Кебец Н. М. – Кострома, 2005. – 234 с.
194. Goodman S Therapeutic effects of organic germanium / S Goodman // *Med. Hypotheses.* – 1988. – № 26 (3). – P. 207–215.
195. Germanium: Handbook on the toxicology of metals / [Faroon O. M., Keith L. S., Hansen H., Fowler B. A.] ; ed. Nordberg G. F., Fowler B. A., Nordberg M., Friberg L. – [3d ed.]. – Elsevier academic press, 2007. – 1024 p.
196. Фармакологічні ефекти германійорганічних сполук / І. Й. Сейфулліна, О. Д. Немятих, В. Д. Лук'янчук, Є. В. Ткаченко // *Одеський медичний журнал.* – 2002. – № 6. – С. 110–114.
197. Protective effects of gallium, germanium, and strontium against ovariectomized osteoporosis in rats / D. W. Qin, Z. Gu, L. Dai [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2013. – P. 153 (1–3). – P. 350–354.

198. Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxicity assays / C. Han; G. Wu; Y. Yin [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 1992. – № 30(6). – P. 521–524.
199. Влияние координационных соединений германия на синтез и активность ферментов / И. И. Сейфуллина, О. Е. Марцинко, О. А. Батракова, Л. Д. [и др.] // *Мікробіол. журн.* – 2002. – Т. 64, № 4. – С. 3–11.
200. Розробка режиму дозування координаційної сполуки германію з нікотиною кислотою в умовах гіпоксії замкнутого простору / І. Й. Сейфулліна, О. Д. Нем'ятих, О. П. Гудзенко [и др.] // *Фармацевт. журн.* – 2002. – № 4. – С. 86–90.
201. Сейфулліна І. Й. Скринінг і порівняльна оцінка ефективності протиішемічних засобів серед координаційних сполук германію з біолігандами при гострій цереброваскулярній недостатності / І. Й. Сейфулліна, Л. В. Чадова, В. М. Ткаченко // *Одес. мед. журн.* – 2005. – № 6 (92). – С. 19–22.
202. Скринінг і порівняльна оцінка церебропротекторної активності координаційних сполук германію на моделі закритої черепно–мозкової травми / І. Й. Сейфулліна, В. Д. Лук'янчук, А. А. Висоцький [та ін.] // *Ліки.* – 2006. – № 5–6. – С. 38–41.
203. Шевченко І. М. Корекція імунного статусу при токсичному гепатиті експериментальним гепатопротектором МІГУ–1 / І. М. Шевченко, В. В. Годован // *Буковинський медичний вісник.* – 2005. – Т. 9, № 1 – С. 100–102.
204. Протизапальна активність комплексів германію з саліцилальгідрозонами нітробензойної кислоти / І. І. Сейфулліна, О. В. Нікітін, Б. М. Галкін [та ін.] // *Одес. мед. журн.* – 2003. – № 3 (77). – С. 21–23.
205. Сейфулліна І. Й. Вивчення можливих шляхів детоксикації при гострому отруєнні динітроорртокрезолом і застосуванні координаційної сполуки

- германію з нікотинамідом / І. Й. Сейфулліна, М. М. Бабенко, В. М. Ткаченко // Одес. мед. журн. – 2005. – № 4 (90). – С. 18–20.
206. Годован В. В. Корекція перекисного окиснення ліпідів при токсичному гепатиті новими комплексними сполуками германію з біолігандами / В. В. Годован, В. Й. Кресюн // Досягнення біології та медицини. – 2007. – № 2. – С. 13–16.
207. Годован В. В. Порівняльна фармакологічна активність нових БАР – похідних дифосфонових кислот / В. В. Годован, В. Й. Кресюн, І. Й. Сейфуліна // Інтегративна антропологія. – 2007. – № 2. – С. 13–17.
208. Волошенков Д. Б. Вплив нової сполуки германію з нікотинамідом на різні форми судомного синдрому / Д. Б. Волошенков, О. А. Шандра, В. В. Годован // Одеський медичний журнал. – 2005. – № 2 (88). – С. 22–25.
209. Волошенков Д. Б. Эффекты производных дифосфоната германия с никотиновой кислотой, никотинамидом и магнием на активное избегание у крыс / Д. Б. Волошенков, О. А. Кащенко // Інтегративна антропологія. – 2005. – № 1–2 (5–6) – С. 51–54.
210. Волошенков Д. Б. Вплив сполуки діфосфонату германію з нікотинамідом на електричну активність пірамідних нейронів гіпокампу *in vitro* / Д. Б. Волошенков // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі та патології : III Всеукраїнська наукова конференція, присвячена 70-річчю з дня народження Г.М. Чайченка, 4–6 жов. 2006 р. : тези доп.– К : Знання України, 2006. – С. 20–21.
211. Волошенков Д. Б. Влияние производных дифосфоната германия с никотинамидом и никотиновой кислотой на оксотреморин–вызванную саливацию и тремор у мышей / Д. Б. Волошенков, В. В. Годован, О. А. Кащенко [и др.] // Гомеостаз: физиология, патология, фармакология и клиника : II міжнародна наукова конференція, 28–29 верес. 2005 р. : тези доп. – Одеса, 2005. – С.112–114.

212. Відавська А. Г. Фармакокінетика нової біологічно активної речовини– оксіетилідендифосфонату германію з нікотиною кислотою / А. Г. Відавська // Одеський медичний журнал. – 2001. – № 3. – С. 30–33.
213. Фармакокінетичний профіль МІГУ–5 у нормі та на моделі ендотоксемії / В. Д. Лук'янчук, В. Й. Кресюн, Т. Р. Лучишин [та ін.] // Журнал НАМН України. – 2012. – Т. 18, № 3. — С. 529–535.
214. Лук'янчук В. Д. Токсикометрические исследования потенциального церебропротектора ОК–3 / В. Д. Лук'янчук, А. А. Высоцкий, Д. С. Кравец // Совр. пробл. токсикологии. – 2007. – № 2. – С. 52–54.
215. Доклінічні токсикометричні дослідження нового засобу детоксикації МІГУ–5 за умов ендогенного отруєння / В. Д. Лук'янчук, Т. Р. Лучишин, Д. С. Кравець [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології – 2011. – № 3 – С. 40 – 44.
216. Синтез, структура и перспективы применения новых координационных соединений германия (IV) с гидроксикарбоновыми кислотами / И. И. Сейфуллина, Е. Э. Марцинко, Л. Х. Миначева [и др.] // Укр. хім. журн. – 2009. – Т. 75, № 1. – С. 3–8.
217. Крыжановский Г. Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы / Г. Н. Крыжановский. – М. : Медицина, 1980. -360 с.
218. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. –М. : Высшая школа, 1991. – 400 с.
219. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury / R. J. Hamm, B. R. Pike, D. M. O'Dell [et al.] // J. Neurotrauma. –1994. – № 11 (2). – P. 187–196.
220. D'Hooge R. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory / R. D'Hooge, P. P De Deyn // Brain Res. Rev. – 2001. – № 36 (1). – P. 60–90.

221. Vorhees C. V. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory / C. V. Vorhees, M. T. Williams // *Nature Protocols* – 2006. – № 1. – P. 848–858
222. Porsolt R. D. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants / R. D. Porsolt, A. Berlin, M. Jalfre // *Arch. Intern. Pharmacodyn.* – 1977. – № 229. – P. 327–336.
223. Factors influencing behavior in the Porsolt forced swim test / O.V. Bogdanova, S. Kanekar, K. E. D'Anci [et al.] // *Physiol. Behav.* – 2013. – № 118. – P. 227–39.
224. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy / M. E. Barton, B. D. Klein, H. H. Wolf [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2001. – № 47 (3). – P. 217–27.
225. Martín E. D. Animal Models for the Development of New Neuropharmacological Therapeutic / E. D. Martín, M. A. Pozo // *Curr. Neuropharmacol.* – 2006. – № 4 (1). – P. 33–40.
226. Technical and methodologic issues in studies with animal models: epilepsy therapy development / A. Pitkänen, M. A. Rogawski, K. J. Staley [et al.]. – *Epilepsia.* – 2013. – № 54 (4). – P. 13–23.
227. Coppola A. Animal models / A. Coppola, S. L. Moshé // *Handb. Clin. Neurol.* – 2012. – №107. – P.63–98.
228. Löscher W. New horizons in the development of antiepileptic drugs / W. Löscher, D. Schmidt // *Epilepsy Res.* – 2002. – № 50 (1-2). – P. 3–16.
229. Combination therapy of piperine and phenytoin in maximal electroshock induced seizures in mice: isobolographic and biochemical analysis / P. Saraogi, D.Vohora, R. Khanam [et al.] // *Drug Res (Stuttg).* – 2013. – № 63 (6). – P. 311–318.
230. Ghosh M. N. Fundamentals of experimental pharmacology / M. N. Ghosh. – [5th ed.]. – Hilton and Company , 2011. – 538 p.

231. Logan M. Biostatistical Design and Analysis Using R: A Practical Guide / M. Logan. –Wiley-Blackwell, 2010. – 576 p.
232. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Хабриев Р. У. – [2-е изд.]. –М : Медицина, 2005. – 832 с.
233. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function / S. F. Traynelis, L. P. Wollmuth, C. J. McBain [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2010. – № 62. – P. 405–496.
234. Rice A. C. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy / A. C. Rice, R. J. DeLorenzo // *Brain Res.* – 1998. – № 26;782(1-2). – P. 240–247.
235. VanDongen A. M. J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor: Biology of the NMDA Receptor / VanDongen A. M. J. – CRC Press, 2009. – 350 p.
236. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study / W. A. Turski, E. A. Cavalheiro, M.Schwarz [et al.] // *Behav. Brain Res.* – 1983. – № 9 (3). – P.315–335.
237. Racine R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation II. Motor seizure / R. J. Racine // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* – 1972. –№ 32 (3). – P. 281–94.
238. Improved technique for induction and monitoring of audiogenic seizure in deer mice / M. Veres, S. Payne, P. Fernandes // *Lab. Anim. (NY)*. – 2013. – № 42 (5). – P.166–169.
239. McIntyre D. C. Kindling: some old and some new // D. C. McIntyre, M. O. Poulter, K. Gilby // *Epilepsy Res.* – 2002. – № 50 (1-2). – P. 79–92.
240. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos C. Watson. – [6th ed.]. – Elsevier academic press, 2007. – 456 p.

241. Matagne A. Validation of corneally kindled mice: a sensitive screening model for partial epilepsy in man / A. Matagne, H. Klitgaard // *Epilepsy Res.* –1998. – № 31 (1). – P. 59–71.
242. Potschka H. Corneal kindling in mice: behavioral and pharmacological differences to conventional kindling / H. Potschka, W. Löscher // *Epilepsy Res.* – 1999. – № 37 (2). – P.109–20.
243. Yamamoto Y. Solution to the Inverse Regulator Problem for Discrete-time Systems // Y. Yamamoto, K. Sugimoto // *J. Contr.* –1988. – № 48. – P. 1285–1300.
244. Avoli M. J. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices / M. Avoli, P. Perreault // *Neurophysiol.* – 1991 – № 65 (4). – P. 771–85.
245. Graphical programming for measurement and automation – LabVIEW 7.1. – National instruments: USA, 2004.
246. Characterization of the anticonvulsant, behavioral and pharmacokinetic interaction profiles of stiripentol in combination with clonazepam, ethosuximide, phenobarbital, and valproate using isobolographic analysis / J. J. Luszczki, S. J. Czuczwar, P. N. Patsalos [et al.] // *Epilepsia.* – 2006. – № 47. – P. 1841–1854.
247. Review: Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed / C. L. Deckers, S. J. Czuczwar, P. N. Patsalos [et al.] // *Epilepsia.* – 2000. – № 41(11). – P. 1364–1374.
248. Tallarida R. J. Statistical analysis of drug combinations for synergism / R. J. Tallarida // *Pain.* – 1992. – № 49. – P. 93–97.
249. Tallarida R. J. Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: replacing the isobologram / R. J. Tallarida, R. B. Raffa // *Life sciences.* – 1996. – № 58(2). – P. 23–28.
250. Jones C. A. Animal models of schizophrenia: reviews / C. A. Jones, D. J. Watson, K. C. Fone // *Br. J. Pharmacology.* – 2011. – № 164. – P. 1162–1194.

251. Крыжановский Г. Н. Дизрегуляторная патология / Г. Н. Крыжановский. - М. : Медицина, 2002. – 96 с.
252. Olds J. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain./ J. Olds, P. Milner // J. Comp. Physio. Psychol. – 1954. – № 47. – P. 419–427.
253. Carlezon Jr. W. A. Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation./ Jr. W. A. Carlezon, E. H. Chartof // Nat. Protoc. – 2007. – № 2. – P. 2987–2995.
254. Шабанов П. Д. Дофамин и подкрепляющие системы мозга / Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Мещеров Ш. К. / СПб : Лань, 2002. -208 с.
255. Динамика реакции самостимуляции мозга у крыс после форсированного введения психоактивных веществ / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, А. В. Любимов [та ін.] / Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 9, вып.1–2. – С. 2524–2529.
256. Belmaker R. H. Bipolar disorder / R. H. Belmaker // N. Engl. J. Med. – 2006. – № 351. – P. 476–486.
257. Baldessarini R.J. Treatment research in bipolar disorder: issues and recommendations / R. J. Baldessarini // CNS drugs. – 2002. – № 16. – P. 721–729.
258. Zar J. H. Biostatistical analysis / J. H. Zar . – Prentice-Hall:Pearson, 2010 – 944 p.
259. Norman G. R. Biostatistics : The Bare Essentials / G. R. Norman, D. L. Streiner. – PMPH, 2007. – 393 p. Rosner B. A. Fundamentals of Biostatistics / B. A. Rosner. – Cengage Learning, 2006. – 868 p.
260. Whitlock M. The analysis of biological data / M. Whitlock, D. Schluter. – Roberts and Co. Pub., 2009. – 700 p.
261. Draper N. R. Applied Regression Analysis / N. R. Draper, H. Smith. – [3rd ed.]. – Wiley-Interscience, 1998. –736 p.

262. Voskuyl R. Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine / R. A. Voskuyl, H. A. Albus // *Brain Res.* –1985. –№ 342 (1). – P. 54–66.
263. Zito K. NMDA Receptor Function and Physiological Modulation / K. Zito, V. Scheuss // *Neurobiology*, 2009. – P. 1157–1164.
264. Fox J. E. Tissue Resistance Changes and the Profile of Synchronized Neuronal Activity During Ictal Events in the Low-Calcium Model of Epilepsy / J. E. Fox, M. Bikson, J. G. R. Jefferys // *J. Neurophysiol.* –2004. – № 92. – P. 181–188.
265. Smith D. A. Effect of changing extracellular levels of magnesium on spontaneous activity and glutamate release in the mouse neocortical slice / D. A. Smith, J. H. Connick, T. W. Stone // *Br. J. Pharmacol.* – 1989. – № 97 (2). – P. 475–82.
266. Dreier J. P. Regional and time dependent variations of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices / J. P. Dreier, U. Heinemann // *Exp. Brain Res.* – 1991. – № 87 (3). – P. 581–596.
267. Igelström K. M. Low-magnesium medium induces epileptiform activity in mouse olfactory bulb slices / K. M. Igelström, C. H. Shirley, P. M. Heyward // *J. Neurophysiol.* – 2011. – № 106 (5). – P. 2593–2605.
268. Effects of the anticonvulsant lacosamide compared to valproate and lamotrigine on cocaine-enhanced reward in rats / C. Beguin, D. N. Potter, W. A. Carlezon [et al.] // *Brain Res.* – 2012. – № 1479. – P. 44–51.
269. Ichikawa J. Lithium differs from anticonvulsant mood stabilizers in prefrontal cortical and accumbal dopamine release: role of 5-HT (1A) receptor agonism / J. Ichikawa, J. Dai, H. Y. Meltzer // *Brain Res.* – 2005. – № 1049. – P. 182–190.
270. Turski L. Muscle relaxant action of excitatory amino acid antagonists / L. Turski, M. Schwarz, W. A. Turski // *Neurosc. Lett.* – 1995. – № 53. – P. 321–326.

271. Савоненко А. В. Зависимость обучения реакции активного избегания от преодоления проблемной ситуации в челночной камере / А. В. Савоненко, С. А. Зелинский // Журнал высшей нервной деятельности. – 1998. – Т. 48, № 2. – С. 229–239.
272. D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures / A. Rostock, W. C. Löscher, H. S. White [et al.] // *Epilepsy Res.* – 1996. – № 23 (3) – P. 211–223.
273. Nadler J.V. Minireview: kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy / J. V. Nadler // *Life Sci.* –1981. – № 29 (20). – P. 2031–2042.
274. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy / Y. Ben-Ari // *Neurosci.* – 1985. – № 14. – P. 375–403.
275. Fritschy J. M. A New Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy / J. M. Fritschy // *Epileptologie.* –2004. – P. 21–28 p.
276. Shandra O. A. Effect of limbic structure and striatum damage caused by kainicacid on seizure reactions in animals after intracranial injury / O. A. Shandra, G. O. Volokhova, L. S. Godlevskyĭ // *Fiziol. Zh.* –1993. – № 39 (2–3). – P. 7–12.
277. Repeated 4-aminopyridine induced seizures diminish the efficacy of glutamatergic transmission in the neocortex / I. Világi, E. Dobó, S. Borbély [et al.] // *Exp Neurol.* – 2009. – № 219 (1). – P. 136–145.
278. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array / M. Avoli , J. Wang, G. K. Motamedi [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2011. – № 60 (7–8). – P. 1142–1153.
279. Salah A. Persistent ictal-like activity in rat entorhinal/perirhinal cortex following washout of 4-aminopyridine / A. Salah, K. L. Perkins // *Epilepsy Res.* – 2011. – № 2 (23). – P. 13–30.

280. Fueta Y. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus / Y. Fueta, M. Avoli // *Epilepsy Res.* – 1992. – № 12 (3). – P. 207–215.
281. Yonekawa W. D. The effects of anticonvulsant compounds on 4-aminopyridine-induced de novo synthesis of neurotransmitter amino acids in rat hippocampus in vitro // W.D. Yonekawa, I. M. Kapetanovic, H. J. Kupferberg // *Epilepsy Res.* – 1995. – № 20 (2). – P. 113–120.
282. Tolerance to benzodiazepines among long-term users in primary care / I. A. Willems, W. J. Gorgels, V. R. C. Oude [et al.] // *Fam. Pract.* – 2013. – № 30 (4). – P. 404–410.
283. Lugoboni F. Exploring the dark side of the moon: the treatment of benzodiazepine tolerance / F. Lugoboni, G. Quaglio // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2013. – № 4 (25) – P. 21–48.
284. Vinkers C. H. Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? / C. H. Vinkers, B. Olivier // *Adv. Pharmacol. Sci.* – 2012. – № 12. – P. 68–64.
285. Tolerance liability of diazepam is dependent on the dose used for protracted treatment / J. Divljaković, M. Milić, T. Timić [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2012. – № 64 (5). – P. 1116–1125.
286. Fritschy J. M. A New Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy / J. M. Fritschy // *Epileptologie.* – 2004. – P. 21–28 p.
287. Kwan P. Combination therapy in epilepsy: when and what to use / P. Kwan, M. J. Brodie // *Drugs.* – 2006. – № 66 (14). – P. 1817–1829.
288. Comparative efficacy of combination drug therapy in refractory epilepsy / N. P. Poolos, L. N. Warner, S. Williams [et al.] // *Neurology.* – 2012. – № 78 (1). – P. 62–68.

289. Interaction index and different methods for determining drug interaction in combination therapy / J. J. Lee, M. Kong, G. D. Ayers [et al.] // *J. Biopharm Stat.* – 2007. – № 17. – P. 461–480.
290. Brodie M. J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs / P. Kwan, G. J. Sills, M. J. Brodie // *Pharmacol. Ther.* – 2001. – № 90 (1). – P. 21–34.
291. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents / H. Klitgaard, A. Matagne, J. M. Rigo [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – № 136 – (5). – P. 659–672.
292. Eddy C. M. Behavioral adverse effects of antiepileptic drugs in epilepsy / C. M. Eddy, H. E. Rickards, A. E. Cavanna // *J. Clin. Psychopharmacol.* – 2012. – № 32 (3). – P. 362–75.
293. Ion Channels as Drug Targets in Central Nervous System Disorders / A. M. Waszkielewicz, A. Gunia, N. Szkaradek [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – № 20 (10). – P. 1241–1285.
294. Mutation of a potassium channel-related gene in progressive myoclonic epilepsy / P. V. Bogaert, R. Azizieh, J. Désir [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2007. – P. 61 (6). – P. 579–586.
295. Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy/ O. K. Steinlein, B. A. Neubauer, T. Sander [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2001. – №44 (2–3). – P. 191–195.
296. Deletion of the Kv1.1 potassium channel causes epilepsy in mice / S. L. Smart, V. Lopanstev, C. L. Zhang [et al.] // *Neuron.* – 1998. – № 20. – P. 809–819.
297. Neuroprotective action of lithium in disorders of the central nervous system / C. T. Chiu, D. M. Chuang, N. D. Xue [et al.] // 2011. – № 36. – P. 461–476.
298. Chiu C. T. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders / C.T. Chiu, D. M. Chuang // *Pharmacol. Ther.* – 2010. – № 128. –P. 281–304.

299. Bowden C. L. Atypical antipsychotic augmentation of mood stabilizer therapy in bipolar disorder / C. L. Bowden // *J. Clin. Psychiatry*. – 2005. – № 66 (3). – № 12–19.
300. Young L. T. What exactly is a mood stabilizer? / L. T. Young // *J. Psychiatry Neurosci*. – 2004. – № 29 (2). – P. 87–88.
301. Малярів С. А. Стабілізатори настроєння — основа терапії біполярного розладу / С. А. Малярів // *Здоров'я України*. – 2003. – № 67. – С. 17–22.
302. Lennkh C. Current aspects of valproate in bipolar disorder / C. Lennkh, C. Simhandl // *Int. Clin. Psychopharmacol*. – 2000. – № 15(1). – P. 1–11.
303. Spotlight on lamotrigine in bipolar disorder / D. R. Goldsmith, A. J. Wagstaff, T. Ibbotson [et al.] // *CNS Drugs*. – 2004. – № 18 (1). – P. 63–67.
304. Lamotrigine for treatment of bipolar depression: independent meta-analysis and meta-regression of individual patient data from five randomised trials / J. R. Calabrese, G. M. Goodwin, J. R. Geddes [et al.] // *The Br. J. Psych*. – 2009. – № 194. – P. 4–9.
305. Discovery and development of lamotrigine for bipolar disorder: A story of serendipity, clinical observations, risk taking, and persistence / R. H. Weisler, J. R. Calabrese, C. L. Bowden [et al.] // *J. Affect. Disord*. – 2008. – № 108(1–2). – P. 1–9.
306. Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers / S. I. Rapoport, M. Basselin, H. W. Kim [et al.] // *Brain Res. Rev*. – 2009. – № 61 (2). – P. 185–209.
307. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs / R. S. Williams, L. Cheng, A. W. Mudge [et al.] // *Nature*. – 2002. – № 417. – P. 292–295.
308. Schloesser R. J. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action / R. J. Schloesser, K. Martinowich, H. K. Manji // *Trends in neurosciences*. – 2012. – № 35(1) – P. 36–46.

309. Крыжановский Г. Н. Дизрегуляторная патология / Г. Н. Крыжановский. - М. : Медицина, 2002. – 96 с.
310. Kryzhanovsky G. N. The stereotyped behavior syndrom: a new model and proposed therapy / G. N. Kryzhanovsky, M. N. Aliev // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1991. – № 14 (3). – P. 273–281.
311. Effects of acute and chronic lithium treatment on amphetamine-induced dopamine increase in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in rats as studied by microdialysis / T. Baptista, L. Teneú, Q. Contreras [et al.] // *J. Neural Transmis.* – 1993. – №94 (2). – P. 75–89.
312. Overstreet D. H. Modeling depression in animal models // D. H. Overstreet // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – № 829. – P.125–144.
313. Krishnan V. Animal models of depression: molecular perspectives / V. Krishnan, E. J. Nestler // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* – 2011. – № 7. – P. 121–47.
314. Young J. W. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions / J. W. Young, B. L. Henry, M. A. Geyer // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – № 164 (4). – P. 1263–1284.
315. Lyon M. Animal Models for the Symptoms of Mania: Animal Models In Psychiatry: Neuromethods / M. Lyon; ed. [Boulton A., Baker G, Iverson M. M.]. – Humana Press Inc., 1991. – 430 p.
316. Differential Modulation of Thresholds for Intracranial Self-Stimulation by mGlu5 Positive and Negative Allosteric Modulators: Implications for Effectson Drug Self-Administration / R. M. Cleva, L. R. Watterson, M. A. Johnson [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2012. – № 2 (93) – P. 89-93.
317. Hayes R. J. The basolateral complex of the amygdala mediates the modulation of intracranial self-stimulation threshold by drug-associated cues / R. J. Hayes, E. L. Gardner // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – № 20 (1). – P. 273–280.
318. Hayes, R. J. Modulation of intracrainial self-stimulation threshold by drug-associated contextual cues and the role of context in an ICSS, cocaine-

- sensitization study / R. J. Hayes, E. L Gardner // Soc. for Neurosc. – 2001. – № 27 (1). – P. 588.
319. Singh J. Cholinergic and GABAergic modulation of self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral tegmentum: effects of carbachol, atropine, bicuculline, and picrotoxin / J. Singh, T. Desiraju, T. R. Raju // *Physiol. Behav.* – 1997. – № 61(3). – P. 411–418.
320. Behavioral effects of short-term administration of lithium and valproic acid in rats / H. C. Tomasiewicz, S. D. Mague, B. M. Cohen [et al.] // *Brain Res.* – 2006. – № 1093 (1). – P. 83–94.
321. Mavrikaki M. Effects of mood stabilizers on brain reward processes in rats: studies using the intracranial self-stimulation paradigm / M. Mavrikaki, G. G. Nomikos, G. Panagis // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2009. – № 19 (3). – P. 205–214.
322. Grace A. A. Evaluation of animal models of obsessive-compulsive disorder: correlation with phasic dopamine neuron activity / A. A. Grace, T. Sesiaa, B. Bizupa // *The International Journal of Neuropsychopharmacology.* – 2013. – №16 (6). – P. 1295–1307.