

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616:[615.214.31+615.213]

Кузнецова Л.В.¹, Карпова М.Н.¹, Зиньковский К.А.², Клишина Н.В.¹

Противосудорожные эффекты цитиколина и диазепама при их сочетанном применении на модели острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом, у крыс линии Вистар

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г.Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ГБОУ ВПО «Тверской ГМУ» Минздрава России, 170100, г.Тверь, ул. Советская, д. 4

Цель исследования — изучение эффективности сочетанного применения цитиколина, обладающего ноотропным и противосудорожным действием, и антиэпилептического препарата диазепама на развитие острых генерализованных судорог (ОГС), вызванных конвульсантом пентилентетразолом (ПТЗ). **Методика.** Эксперименты выполнены на крысах самцах Вистар ($n = 68$) массой 160—190 г. Судороги вызывали внутривентральным введением ПТЗ в дозе 80 мг/кг (модель ОГС). Для изучения эффективности сочетанного применения препаратов определяли минимальное противосудорожное действие каждого препарата в отдельности. Цитиколин (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») вводили внутривентрально в дозах 500 и 300 мг/кг за 1 ч до ПТЗ, диазепам (Реланиум, Варшавский фармацевтический завод Польфа АО, Варшава, Польша) — в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг за 30 мин до введения ПТЗ. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор том же объеме и в аналогичных условиях опыта. **Результаты.** Показано, что сочетанное внутривентральное введение цитиколина и диазепама в минимально действующих дозах (300 и 0,25 мг/кг соответственно), усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов. **Заключение.** Сочетанное применение цитиколина с диазепамом в минимально действующих дозах усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов, снижая риск развития побочных эффектов. Исследование может служить экспериментальным обоснованием применения препаратов при судорогах с целью благоприятного влияния на когнитивные функции и замедления прогрессирования нейродегенеративных процессов.

Ключевые слова: эпилепсия; судороги; цитиколин; диазепам; ноотропные и антиэпилептические препараты.

Для цитирования: Кузнецова Л.В., Карпова М.Н., Зиньковский К.А., Клишина Н.В. Противосудорожные эффекты цитиколина и диазепама при их сочетанном применении на модели острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом у крыс Вистар. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 20—23.

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли, e-mail: karpovamn@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.09.2016

Kuznetsova L.V.¹, Karpova M.N.¹, Zinkovski K.A.², Klishina N.Yu.¹

Anticonvulsant effects of citicoline and diazepam at their combined application on model of the acute generalized convulsions induced by pentylenetetrazole in Wistar rats

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

² — GMU Russian Ministry of Health, 170100 Tver, Sovetskaya St., 4

The purpose. Studying of efficiency of the combined application of the citicoline possessing nootropic and anticonvulsive action and antiepileptic drug of diazepam on the acute generalized convulsions (AGC) caused by a convulsant pentylenetetrazole (PTZ). **Methods.** Experiments are executed on the male Wistar rats ($n = 68$) weighing 160—190 g on the AGC model caused by of PTZ in a dose of 80 mg/kg, intraperitoneally (i.p.). For studying of efficiency of the combined use of drugs determined the minimum anticonvulsive action of a citicoline (Tserakson, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») and diazepam (Relanium, Warsaw pharmaceutical plant of Polf AO, Warsaw, Poland). For this citicoline were administered i.p. in doses 500 and 300 mg/kg 1 hour before the PTZ and diazepam — in doses of 0,5 and 0,25 mg/kg 30 min before administration of PTZ. Control animals were injected with saline to the same extent and under the same experimental conditions. **Results.** It

is shown that the combined administration of a citicoline and diazepam in minimum active doses (300 and 0.25 mg/kg respectively), increases anticonvulsive properties of both drugs. **Conclusion.** The combined administration of citicoline with diazepam in minimally active doses enhances anticonvulsant properties of both drugs, thereby reducing the risk of development of side effects. In addition, the research may serve as experimental justification for the use of drugs in case of convulsions for the purpose beneficial effect on cognitive function and delays of progressing of neurodegenerative processes.

Keywords: epilepsy; seizures; citicoline; diazepam; nootropics and antiepileptic drugs.

For citation: Kuznetsova L.V., Karpova M.N., Zinkovski K.A., Klishina N.Yu. Anticonvulsant effects of citicoline and diazepam at their combined application on model acute generalized convulsions induced by pentylentetrazole in Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (4): 20–23. (in Russ).

For correspondence: Karpova M.N., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of fundamental and applied problems of pain, e-mail: karpovamn@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kuznetsova L.V., <http://orcid.org/0000-0002-0691-3690>

Karpova M.N., <http://orcid.org/0000-0002-4338-5567>

Zinkovski K.A., <http://orcid.org/0000-0002-6366-6622>

Klishina N.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-1348-1857>

Received 07.09.2016

Введение

Эпилепсия — сложное по этиологии и патогенезу хроническое заболевание головного мозга человека, характеризующееся повторными припадками, которые возникают в результате чрезмерных нейронных разрядов и сопровождаются разнообразными клиническими и параклиническими симптомами. Современные нейрорепатологические представления о патогенезе эпилепсии диктуют изменение подходов к ее лечению. Известно, что используемые для купирования повышенной судорожной активности мозга высокоэффективные классические и новые противоэпилептические лекарственные средства вызывают ряд побочных эффектов, к числу которых можно отнести нарушение основных когнитивных функций — внимания, памяти, восприятия и др. [1, 2]. Одним из основных направлений терапии указанных нарушений является применение ноотропов, оказывающих активизирующее влияние на интегративные механизмы мозга, которые имеют множественные точки приложения. При этом в патогенетические механизмы вовлекается большое количество анатомо-функциональных систем — нейротрансмиттерные, сосудистые, метаболизм клетки, реологические и т.д. Поэтому в последние годы нарастает исследовательская деятельность, связанная с поиском и изучением механизма действия новых и уже имеющихся ноотропных лекарственных средств, обладающих поликомпонентным спектром фармакологических эффектов и многофакторным механизмом действия [3–6]. Для лечения когнитивных расстройств сосудистого, травматического и интоксикационного генеза чаще всего применяют пирацетам. Однако его применение при эпилепсии ограничено

в связи с вызываемым им повышением судорожной активности мозга [7]. В настоящее время известна способность только двух ноотропов — мексидола и ноопепта — усиливать противосудорожное действие некоторых противоэпилептических препаратов [5, 8]. Ноотроп цитиколин (аналог эндогенного цитиколина) обладающий нейрорегенеративными и нейропротективными свойствами [9–13], широко применяется в лечении когнитивных, чувствительных, двигательных неврологических нарушений дегенеративной и сосудистой этиологии. Ранее нами было показано на модели острых генерализованных судорог (ОГС), что цитиколин оказывает противосудорожное действие и его сочетанное введение с вальпроатом в минимально действующих дозах усиливает противосудорожный эффект обоих препаратов [3, 4, 6].

Цель исследования — изучение сочетанного применения цитиколина, обладающего ноотропным и противосудорожным действием, и антиэпилептического препарата диазепама на ОГС, вызванные конвульсантом пентилентетразолом (ПТЭ).

Методика

Эксперименты выполнены на крысах самцах Вистар ($n = 68$) массой 160–190 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Эффективность сочетанного применения цитиколина и диазепама изучали на модели ОГС, вызванных внутрибрюшинным введением ПТЗ в дозе 80 мг/кг. Определяли латентные периоды первых судорожных проявлений, клонической и тонической фаз (падение животного на бок) генерализованной судорожной реакции, длительность этих фаз, тяжесть судорожной реакции, продолжительность жизни и летальность. Тяжесть судорожной реакции оценивали в баллах:

- 1 — миоклонические вздрагивания;
- 2 — клонические судороги передних конечностей (поза «кенгуру»);
- 3 — повторные клонические судороги;
- 4 — тонико-клонические судороги с падением животного на бок;
- 5 — повторные тонико-клонические судороги и/или гибель животного.

Для изучения эффективности сочетанного применения цитиколина и диазепама на ОГС у животных определяли минимальное противосудорожное действие каждого препарата. Цитиколин (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») вводили внутрибрюшинно в дозах 500 и 300 мг/кг за 1 ч до ПТЗ, а диазепам (Реланиум, Варшавский фармацевтический завод Польфа АО, Варшава, Польша) — в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг за 30 мин до введения ПТЗ. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор том же объеме и в аналогичных условиях опыта.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «IBM SPSS Statistic 20». Проводили предварительную проверку предположения о нормальном характере распределения эмпирических данных в каждой экспериментальной группе по тестам Колмогорова—Смирнова. Оценку значимости показателей и различий рассматриваемых выборок проводили по t-критерию Стьюдента. Частоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка среднеарифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего. Числовые данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У контрольных животных введение ПТЗ приводило к развитию генерализованной эпилептической активности: через 50—55 с появлялись первые судорожные проявления в виде вздрагивания головы или отдельных мышц туловища, которые переходили в клонические вздрагивания всего тела. Через 57—63 с следовали клонические судороги передних конечностей с подъемом животного на задние лапы (поза «кенгуру»). Завершались судороги тонико-клоническим припадком с падением животного на бок и фазой постприступной депрессии. Тяжесть судорог у животных в среднем составляла 4,43 балла, а летальность — 78,57% (таблица).

Таблица

Влияние сочетанного применения цитиколина и диазепама на острые генерализованные судороги (M ± m)

Группа и число (n) животных	ЛП первых судорожных проявлений, с	Клонические судороги		Тонические судороги		Тяжесть судорог, балл	Продолжительность жизни животных, с	Летальность, %
		ЛП, с	Длительность, с	ЛП, с	Длительность, с			
Контроль, n = 14	53,79 ± 2,21	60,79 ± 3,43	13,55 ± 1,28	86,78 ± 10,33	16,45 ± 0,99	4,43 ± 0,31	708,09 ± 120,80	78,57
Цитиколин, 500 мг/кг, n = 12	67,58 ± 3,61 ***XXOOO	85,00 ± 5,17 ****XXXOOOO	13,42 ± 1,26	438,00 ****X	17,00 O	2,42 ± 0,26 ****OOO	1212 XXXX	8,33 ****OOO
Цитиколин, 300 мг/кг, n = 10	51,90 ± 1,84	62,60 ± 2,13	14,50 ± 2,01	181,60 ± 44,37 *	14,80 ± 1,83	3,80 ± 0,42	587,20 ± 182,17	50,00
Диазепам, 0,50 мг/кг, n = 10	66,20 ± 1,93 ***XXOOOO	77,70 ± 2,45 ****XXXOOOO	11,10 ± 0,43	424,00 ****X	12,00	2,20 ± 0,20 ****	—	—
Диазепам, 0,25 мг/кг, n = 10	49,20 ± 4,18	55,00 ± 5,48	14,20 ± 2,02	96,33 ± 15,06	10,33 ± 0,33	2,9 ± 0,46 **oooo	255,67 ± 15,67	30,00 **
Диазепам, 0,25 мг/кг + цитиколин, 300 мг/кг, n = 12	67,33 ± 3,71 **XXOOOO	84,50 ± 6,07 **** XXXOOO	13,00 ± 0,99	380,00 ± 145,16 ***	14,00 ± 1,15	2,67 ± 0,36 ****O	450,00 ± 160,00	16,67 ****OO

Примечание: ЛП — латентный период; * — $p < 0,03$; ** — $p < 0,003$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$ — по сравнению с контролем; X — $p < 0,01$; XX — $p < 0,004$; XXX — $p < 0,002$; XXXX — $p < 0,001$ — по сравнению с диазепамом 0,25 мг/кг; O — $p < 0,05$; OO — $p < 0,04$; OOO — $p < 0,01$; OOOO — $p < 0,003$; OOOOO — $p < 0,001$ — по сравнению с цитиколином 300 мг/кг

1. Эффекты цитиколина

Введение цитиколина в дозе 500 мг/кг оказывало противосудорожное действие, которое выражалось в увеличении на 25,64% латентного периода первых судорожных проявлений и развития клонических судорог на 39,82% по сравнению с группой контрольных животных (таблица). Тонико-клонический припадок с падением животного на бок и фазой постприступной депрессии наблюдали только у одного животного, латентный период его наступления увеличился в 5 раз. Тяжесть судорог была ниже на 45,37%, чем в контрольной группе. Введение цитиколина в дозе 300 мг/кг вызывало у животных только удлинение латентного периода наступления тонических судорог по сравнению с группой контрольных животных.

2. Эффекты диазепама

Противосудорожное действие диазепама в дозе 0,5 мг/кг выражалось в увеличении латентных периодов первых судорожных проявлений и клонических судорог на 23,07% и 27,82% соответственно, снижении на 49,66% тяжести судорог и предотвращения гибели животных по сравнению с контрольными (таблица). Следует отметить, что тонические судороги наблюдали только у одного животного и латентный период их появления значительно возрастал по сравнению с контролем и был сопоставим с группой животных с введением цитиколина в дозе 500 мг/кг. Введение диазепама в дозе 0,25 мг/кг вызывало только снижение тяжести судорог и летальности и не влияло на другие показатели судорожной активности по сравнению с контролем.

Таким образом, цитиколин и диазепам в дозах 300 и 0,25 мг/кг оказывали наименее выраженное противосудорожное действие и были использованы для проведения дальнейшего исследования.

3. Эффекты сочетанного применения цитиколина и диазепама

Сочетанное применение цитиколина в дозе 300 мг/кг и диазепама в дозе 0,25 мг/кг привело к усилению противосудорожных свойств обоих препаратов (таблица). Так, латентные периоды появления первых судорожных проявлений и клонических судорог, а также тяжесть судорог и летальность были сравнимы с животными, получавшими эти препараты в больших дозах, 500 и 0,50 мг/кг соответственно.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что сочетанное применение цитиколина с диазепамом

в минимально действующих дозах усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов. Важно отметить, что применение препаратов в низких дозах снижает риск развития побочных эффектов. Исследование может служить экспериментальным обоснованием применения цитиколина с целью благоприятного влияния на когнитивные функции и замедления прогрессирования нейродегенеративных процессов.

References

1. Fritz N., Glogau S., Hoffmann J. et al. Efficacy and cognitive side effects of tiagabine and topiramate in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2005; 6 (3): 373-81.
2. Meador K.J., Loring D.W., Moore E.E. et al. Comparative cognitive effects of phenobarbital, phenytoin, and valproate in healthy adults. *Neurology.* 1995; 45(8): 1494-9.
3. Karpova M.N., Kuznecova L.V., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Increasing the threshold of convulsive reactions after administration of citicoline mice C57Bl/6. *Bul. eksper. biol. i med.* 2014; 158 (9): 296-8. (in Russian).
4. Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Kuznecova L.V., Klishina N.Ju. Anticonvulsant effects of citicoline and valproate during their combined application on the model of acute generalized seizures caused by pentylenetetrazole in Wistar rats. *Bul. eksper. biol. i med.* 2015; 160(10): 425-8. (in Russian).
5. Kravchenko E.V., Ponteleva I.V., Trofimov S.S. et al. The original nootropic and neuroprotective drug noopept potentiates the anticonvulsant activity of valproate in mice. *Eksp. i klin. farmakol.* 2009; 72(6): 15-7. (in Russian)
6. Kuznecova L.V., Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of brain (pentylenetetrazole kindling) and acute generalized seizures in mice C57Bl/6 subjected to kindling. *Patol. fiziol. i eksperim. terapiya.* 2014; 58(3): 4-8. (in Russian)
7. Lender P. Pharmacotherapy of epilepsy: safety problems. *Epilepsia. Modern Aspects of Treatment.* Chicago: Illinois Univ. Ed., 2010; P. 184-99.
8. Voronina T.A. Meksidol: spectrum of pharmacological effects. *Zh nevol. i psikh.im. S.S. Korsakova.* 2012; 112(12): 86-90. (in Russian)
9. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395-414.
10. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (2): 336-45.
11. Hurtado O., Lizasoain I., Moro M.A. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke.* 2011; 42(Suppl. 1): 33-5.
12. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5(4): 167-77.
13. Secades J.J. Probably role of citicoline in stroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54(3): 173-9.

Сведения об авторах:

Кузнецова Лада Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП

Зиньковский Константин Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. психиатрии, наркологии и медицинской психологии ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России

Клишина Наталья Юрьевна, науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП