

Изучение влияния фенозановой кислоты и ее комбинации с вальпроевой кислотой на развитие эпилептической системы в эксперименте

© А.А. ЯКОВЛЕВА, С.А. ЛИТВИНОВА, Н.А. ГЛАДЫШЕВА, В.В. РАДОНЦЕВА, Т.А. ВОРОНИНА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Изучить влияние фенозановой кислоты (ФК) и ее комбинации с вальпроевой кислотой (ВК) на развитие эпилептической системы (ЭС) в условиях модели хронической фокальной эпилепсии.

Материал и методы. Модель фокальной хронической эпилепсии у крыс создавали с помощью аппликации металлического кобальта на поверхность сенсомоторной области коры. Вживлялись долгосрочные электроды в сенсомоторную зону коры левого и правого полушарий, дорсальный отдел гиппокампа и латеральные ядра гипоталамуса. Влияние ФК (80 мг/кг) и ее комбинации с ВК (200 мг/кг) на разрядную активность проводили на 2-й день и на стадии генерализации ЭС — 6-й день. Стабильность ЭС оценивали на 10-й день при провокации эпилептического статуса (ЭПС) в ответ на введение гомоцистеина тиолактона (ГМЦ) в дозе 5,5 ммоль/кг.

Результаты. ВК в условиях хронической фокальной эпилепсии значительно подавляет пароксизмальную активность на 1-й и 2-й стадиях развития ЭС, но не влияет на формирование новых очагов эпилептиформной активности (ЭпА) в подкорковых структурах и контралатеральной коре. К 10-м суткам ЭС у крыс, получавших ВК, характеризовалась высокой разрядной активностью и лабильностью к провокации ЭПС: у 5 из 6 крыс развивался моторный и ЭЭГ ЭПС в ответ на введение ГМЦ. ФК не влияет на появившуюся ЭпА на начальной стадии развития ЭС в первичном очаге, коре на стороне аппликации кобальта и подкорковых структурах. ФК подавляет переход 1-й стадии ЭС во 2-ю стабильную стадию развития, что наблюдается по отсутствию отличий между фоновыми показателями крыс, получавших ФК, регистрируемыми на 2-е, 6-е и 10-е сут после аппликации кобальта. Комбинация препаратов более выражено, чем ФК, но менее, чем ВК, снижает количественные характеристики пароксизмальной активности в структурах мозга крыс через 48 ч после создания очага ЭпА, и в той же степени, что и ФК, замедляет развитие стабильной ЭС.

Заключение. ФК при монотерапии и в комбинации с ВК вызывает замедление генерализации очагов ЭпА и препятствует формированию стабильной ЭС в отличие от ВК, которая при данном режиме введения, обладая выраженным противосудорожным эффектом, не ослабляет развитие ЭС в использованной модели фокальной эпилепсии.

Ключевые слова: фенозановая кислота, Дибуфелон, судороги, вальпроевая кислота, эпилепсия, эпилептическая система.

Информация об авторах:

Яковлева А.А. — <https://orcid.org/0009-0006-9108-2516>

Радонцева В.В. — <https://orcid.org/0009-0008-9398-0824>

Литвинова С.А. — <https://orcid.org/0000-0001-9139-2334>

Воронина Т.А. — <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Гладышева Н.А. — <https://orcid.org/0009-0001-4585-7142>

Автор, ответственный за переписку: Яковлева А.А. — e-mail: alpeta11@yandex.ru

Как цитировать:

Яковлева А.А., Литвинова С.А., Гладышева Н.А., Радонцева В.В., Воронина Т.А. Изучение влияния фенозановой кислоты и ее комбинации с вальпроевой кислотой на развитие эпилептической системы в эксперименте. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2024;124(3):1–10. <https://doi.org/10.17116/jnevro20241240311>

Experimental study of the influence of phenosanic acid and its combination with valproic acid on the development of the epileptic system

© А.А. YAKOVLEVA, S.A. LITVINOVA, N.A. GLADYSHEVA, V.V. RADONTSEVA, T.A. VORONINA

Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

Abstract

Objective. To study the effect of phenosanic acid (PA) and its combination with valproic acid (VA) on the development of the Epi system.

Material and methods. A model of focal chronic epilepsy in rats was created by applying metallic cobalt to the surface of the sensorimotor area of the cortex. Long-term electrodes were implanted in the sensorimotor cortex of the left and right hemispheres, the hippocampus, and the hypothalamus. The effect of PA (80 mg/kg) and its combination with VA (200 mg/kg) on discharge activity was carried out on the 2nd day and at the stage of generalization of the Epi system — on the 6th day. The stability of the Epi sys-

tem on day 10 was assessed by provoking the development of epileptic status (Epi status) in response to the administration of thiolactone homocysteine (HMC) at a dose of 5.5 mmol/kg.

Results. In rats treated with PA, low discharge activity is observed, which is confirmed by the absence of EEG and motor manifestations of status epilepticus caused by HMC. PA does not suppress paroxysmal activity at the stages of development of the Epi system. VA significantly suppresses paroxysmal activity, but does not affect the formation of new foci of Epi activity in subcortical structures and the contralateral cortex. The epi system of rats treated with VA is characterized by high discharge activity by the 10th day of the experiment and lability to provocation of epi status. The combination of drugs is more pronounced than PA, but less than VA, reduces the numerical characteristics of paroxysmal activity in the brain structures of rats.

Conclusion. PA when administered alone, in combination with VA, causes a slowdown in the generalization of convulsive foci of Epi activity and prevents the formation of a stable Epi system. VA, having a pronounced anticonvulsant effect, does not weaken the development of the Epi system in the model of focal cobalt-induced epilepsy.

Keywords: phenosanic acid, Dibufelon, convulsions, valproic acid, epilepsy, epileptic system.

Information about the authors:

Yakovleva A.A. — <https://orcid.org/0009-0006-9108-2516>

Litvinova S.A. — <https://orcid.org/0000-0001-9139-2334>

Gladysheva N.A. — <https://orcid.org/0009-0001-4585-7142>

Corresponding author: Yakovleva A.A. — e-mail: alpetal1@yandex.ru

Radontseva V.V. — <https://orcid.org/0009-0008-9398-0824>

Voronina T.A. — <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

To cite this article:

Yakovleva AA, Litvinova SA, Gladysheva NA, Radontseva VV, Voronina TA. Experimental study of the influence of phenosanic acid and its combination with valproic acid on the development of the epileptic system. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry = Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2024;124(3):1–10. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/jnevro20241240311>

В настоящее время в лечении эпилепсии используется широкий спектр противоэпилептических препаратов (ПЭП), действие которых реализуется через различные механизмы. В большинстве случаев выбор ПЭП основывается на представлениях о форме эпилепсии, типе приступов и варьирует от монотерапии до одновременного назначения нескольких препаратов. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении эпилепсии, не менее чем у 30–40% пациентов приступы сохраняются [1, 2]. Клинические проявления приступов зависят от особенностей организации эпилептической системы (ЭС) [3], что обуславливает необходимость дальнейшего изучения этиопатогенеза, поиска новых ПЭП и их рациональных комбинаций, воздействующих на различные структурные и функциональные мишени на разных стадиях развития ЭС, способных привести к улучшению прогноза заболевания.

ЭС является динамической, постепенно усложняющейся патологической структурно-функциональной системой, состоящей из структур с детерминантными, вторичными и третичными очагами эпилептической активности (ЭПА), путей распространения эпилептических разрядов и структур, способствующих их генерализации [3]. Развитие ЭС сопровождается нарушением защитной противоэпилептической системы, представленной, прежде всего, структурами ствола головного мозга, главным образом каудального его отдела, а также гипоталамуса, хвостатого ядра, мозжечка, которые обладают ингибиторной функцией [4, 5].

Поиск оптимальных комбинаций ПЭП с препаратами, обладающими нейропротективными и антиоксидантными свойствами, обусловлен особенностями этиопатогенеза, включающими нарушение не только баланса тормозных и возбуждающих процессов, но и энергетического метаболизма в нейронах, усиление перекисного окисления липидов в нейрональной мембране и развитие оксидативного стресса. Фенозановая кислота (3-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)-пропионовая кислота, ФК), являясь пространственно-затрудненным фенолом, сочетает антиоксидантный, нейропротективный и противосудорожный эффекты, что про-

является в способности улучшения интеллектуально-мнестических функций пациентов с эпилепсией [6] и повышении эффективности противоэпилептической терапии. Механизм действия ФК обусловлен стабилизацией нейрональных мембран посредством торможения в них процессов перекисного окисления и изменения их состава, а также влиянием на активность аденилатциклазы и протеинкиназы С [7]. В клинической практике ФК используется в комбинациях с базисной ПЭП [6], в том числе с препаратами вальпроевой кислоты (ВК). Препараты ВК (Вальпроат натрия, Энкорат, Ацеди-прол, Конвулекс, Депакин, Депакин хроно) благодаря своим уникальным свойствам остаются препаратами первой линии в лечении идиопатических (генерализованных/фокальных), криптогенных/симптоматических форм эпилепсии, являются препаратами выбора во всех случаях недифференцированных приступов и труднокурабельных форм фокальной эпилепсии [8]. Механизм действия ВК мультитаргетный и включает блокаду Ca^{2+} - и Na^{+} -каналов, стабилизацию эндогенной ГАМК и повышение ее содержания в тканях мозга, активацию Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проводимости, уменьшение уровня возбуждающей кислоты аспартата и др. [9, 10]. Препараты, сочетающие противосудорожную, антиоксидантную и нейропротективную активность, а также их комбинации с известными ПЭП, могут быть более успешными в лечении эпилепсии, чем последние, и обладать, кроме противосудорожного (симптоматического) действия, антиэпилептогенным эффектом.

Цель исследования — изучение влияния ФК и ее комбинации с ВК на развитие ЭС в условиях модели хронической фокальной эпилепсии.

Материал и методы

В эксперименте были использованы белые беспородные крысы-самцы массой 240–260 г (2,5–3 мес), полученные из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животные содержались в соответствии с межгосударственными стандартами ГОСТ

33215-2014; Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными; Правилами оборудования помещений и организации процедур (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014; Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными; Правилами содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание). Организация и проведение работ осуществлены в соответствии с международными правилами (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.)) и одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

Используемые соединения. В эксперименте использованы ФК (активная фармацевтическая субстанция препарата Дибуфелон, ООО «ПИК-ФАРМА», Россия) и ВК (Sigma-Aldrich). Доза ФК (80 мг/кг массы тела животного) рассчитывалась на основании клинически эффективных доз с использованием межвидового коэффициента пересчета доз [11]. Рабочий раствор дозы готовили с предварительным растиранием в ступке с добавлением твин-80 и эквивалентных объемов физиологического раствора из расчета на каждые 100 г крысы по 0,1 мл готового раствора. ВК в дозе 200 мг/кг массы тела животного растворяли по аналогичной схеме. Готовые рабочие растворы вводили внутривенно через зонд.

Модель фокальной хронической кобальт-индуцированной эпилепсии. Методика кобальт-индуцированной эпилепсии широко используется в экспериментальных исследованиях для изучения механизмов действия ПЭП [12, 13] и рекомендована «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» ФБГУ НЦЭСМП Минздрава России [14]. Процесс эпилептизации мозга, запускаемый аппликацией кобальта на сенсомоторную кору мозга, создает хроническую модель эпилепсии как у грызунов, так и у приматов [15, 16]. В развитии ЭС, вызванной аппликацией кобальта, выделяют несколько стадий: основными из них являются стадия формирования первичного и вторичных эпилептогенных очагов через 24–48 ч после операции, стадия генерализованной ЭпА в различных структурах мозга со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов на 5–6-й день после аппликации кобальта и возможностью провокации генерализованных тонико-клонических судорог путем введения нейротоксина гомоцистеина тиолактона (ГМЦ) начиная с 7–8-х суток после аппликации кобальта [17]. С развитием ЭС появляются вторичные очаги, которые мигрируют в подкорковые структуры и на контралатеральную зону коры, создавая зеркальный очаг. Преимуществом метода является то, что данная модель адекватна для изучения зеркальных и вторичных кортикальных и подкорковых очагов у человека [18, 19].

Операции проводили под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг/массы тела животного внутривенно). Эпилептический очаг создавали аппликацией порошка металлического кобальта на поверхность двигательной области коры левого полушария мозга крыс по следующим координатам, представленным в атласе мозга крыс Буреша: 1 мм впереди от брегмы и 1 мм в сторону от сагиттального шва [20]. С этой целью в кости черепа просверливали трепанационное отверстие, в которое вводили стеклянную канюлю с порошком кобальта (диаметр канюли соответствовал диаметру от-

верстия и не превышал 1 мм). Канюлю опускали на поверхность коры (твердую мозговую оболочку предварительно вскрывали тонкой инъекционной иглой). Живление долгосрочных электродов в структуры мозга крыс осуществляли с помощью стереотаксического прибора («Stoelting Co.», США) по координатам: в сенсомоторную зону коры левого и правого полушарий (+1,5–2 мм от брегмы и 2 мм от сагиттального шва, глубина 1 мм), дорсальный отдел гиппокампа (–3 мм от брегмы, 3 мм влево от сагиттального шва, глубина 3,2–3,4 мм) и латеральные ядра гипоталамуса левого полушария (–1,7–2 мм от брегмы, 1,6–1,8 мм влево от сагиттального шва, глубина 8,2–8,4 мм) [20]. Индифферентный электрод, используемый при монополярной записи, помещали в носовую кость черепа. Электроды фиксировали на поверхности черепа стоматологическим висфат-цементом (Диоксифисфат), после застывания фиксирующего материала покрывали стоматологической самотвердеющей пластмассой Протакрил-М. Запись биоэлектрической активности (ЭЭГ) производилась в условиях свободного передвижения животного по экспериментальной камере. Осуществляли запись ЭЭГ в две основные стадии: на I стадии развития ЭС (стадия формирования первичного и вторичного эпилептогенных очагов через 48 ч после операции) и на II стадии развития ЭС (стадия генерализованной ЭпА на 5-й день после аппликации кобальта). Регистрация ЭЭГ осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса Нейросенсор-Нейро-КМ («СТАТОКИН», Россия) на базе IBM-PC Intel Core i5, с фильтрами на 32 Гц, с постоянной времени (0,03 с) и записью цифровой компьютерной ЭЭГ для последующей обработки данных.

Животные были разделены на 4 группы по 6 крыс в каждой: 1-я группа (контроль) получала физиологический раствор на 2-е и 5-е сутки после операции, 2-я — ФК, 3-я — ВК, 4-я — комбинацию ФК и ВК. Исследуемые препараты вводили дважды — через 48 ч и 5 дней после аппликации кобальта. Фоновую запись ЭЭГ (до введения препаратов) проводили в течение 20–30 мин. Далее изменения биоэлектрической активности мозга крыс регистрировали в течение 2 ч после введения препаратов. Вычисляли следующие показатели биоэлектрической активности: среднее количество разрядов за 1 мин, среднюю длительность разрядов за 1 мин с последующей обработкой по отдельным временным интервалам для каждой из структур. За эпилептический разряд принимали отклонение амплитуды ЭЭГ от среднего не более чем на 4 стандартных отклонения (*SD*). Отклонения далее были верифицированы визуально. Данные количественного анализа были получены из оцифрованных записей ЭЭГ общей продолжительностью не менее 300 с для каждой. Исходя из показателей биоэлектрической активности исследуемых структур головного мозга каждого животного, вычисляли средние показатели для группы и ошибку среднего ($M \pm SE$).

Модель эпилептического статуса (ЭПС), вызванного ГМЦ. Провокация ЭПС осуществлялась согласно описанной ранее методике [14, 21–23] на 10-й день после аппликации кобальта с помощью нейротоксина ГМЦ (DL-homocysteinethiolactone, «Sigma», США) 5,5 ммоль/кг, разведенного в 3,5 мл/кг физиологического раствора непосредственно перед использованием (внутрибрюшинно). Развитие ЭПС в исследуемых группах крыс оценивали по появлению высокоамплитудной ЭпА в электрограммах структур мозга (ипсиполушария и контралатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус) и появлению вторично-генерализованных тонико-клонических судорог (ВГТКС). К ВГТКС относили фокальные подерги-

вания, клонические комплексные судорожные движения (поза «кенгуру» или «барабанный бой»), клонико-тонические судороги, боковое положение и гибель животных. Запись ЭЭГ и регистрацию судорожных проявлений ЭПС осуществляли в течение 3 ч. Исследуемые препараты вводили на фоне появившихся ЭЭГ и клинических паттернов ЭПС.

Статистический анализ проводили с помощью программы BioStat. Вычисления количества и длительности разрядов проводили с помощью программы BRAINSYS. Соответствие массива данных нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка; полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных отклонений; данные обрабатывали с помощью параметрического критерия для связанных выборок парного критерия Стьюдента. Во всех случаях использовали двусторонний критерий при критическом уровне значимости $\alpha=0,05$.

Результаты

Влияние ФК, ВК и их комбинации на показатели судорожной активности на I стадии развития ЭС у крыс с кобальт-индуцированной эпилепсией. На I стадии развития ЭС в хронической модели кобальт-индуцированной эпилепсии, через 48 ч после аппликации кобальта, появляются первичные и вторичные эпилептические очаги. Увеличение количества разрядов и их продолжительности преобладает в ипсилатеральной коре (на стороне аппликации кобальта) и у части животных в гиппокампе (рис. 1, а—в). В контрольной группе после введения физиологического раствора ЭпА не отличалась от фоновых значений. Изучение влияния ВК в дозе 200 мг/кг на эпилептиформную активность мозга крыс на I стадии формирования ЭС показало, что препарат снижает количество разрядов ЭпА ($p<0,05$) в электрокортикограммах ипси- и контралатеральной коры и в гипоталамусе (см. рис. 1, а).

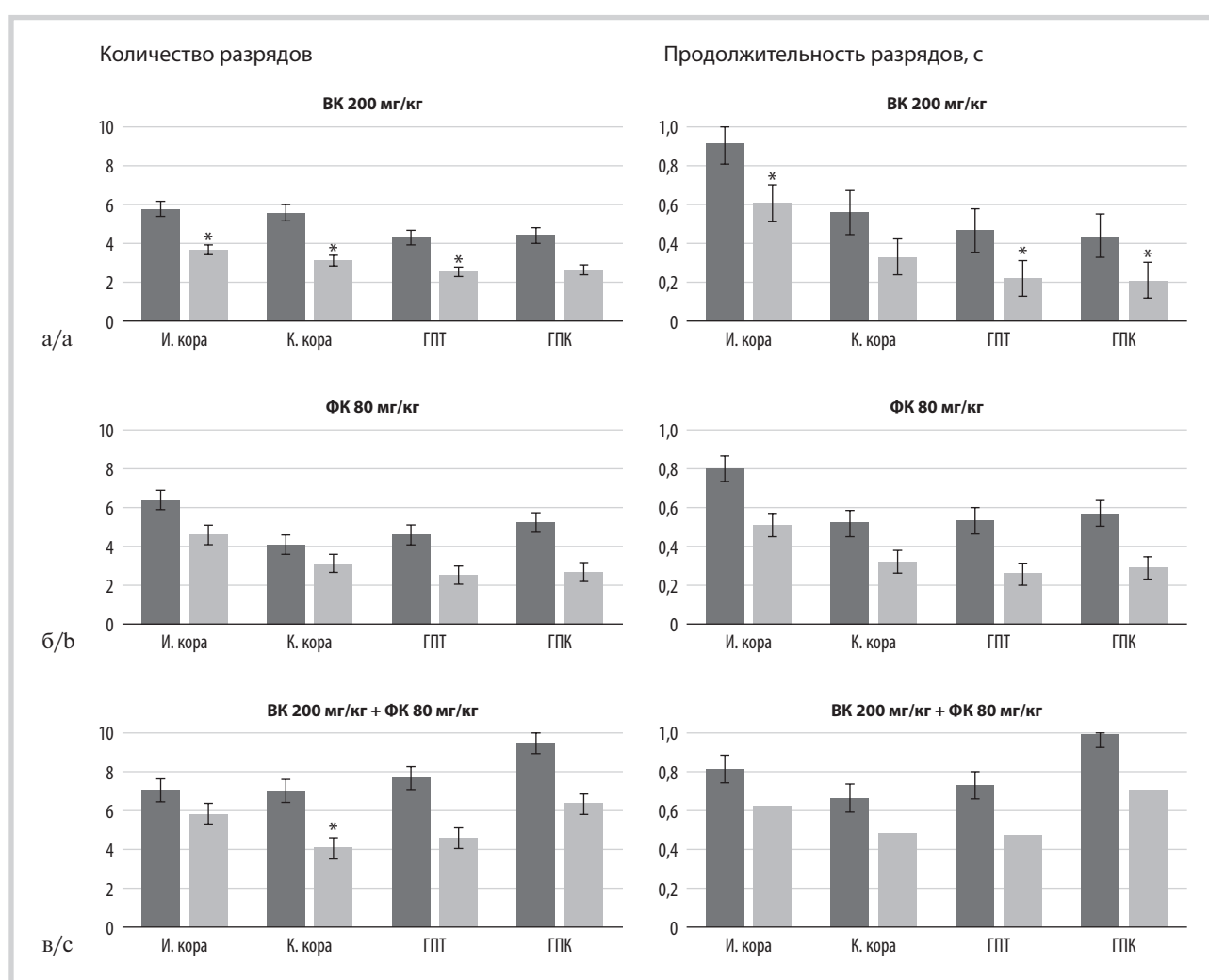


Рис. 1. Влияние ВК, ФК и их комбинации на количество и продолжительность разрядов на I стадии развития ЭС у крыс с кобальт-индуцированной эпилепсией.

Здесь и на рис. 2: серые столбцы — значения ЭпА после введения препаратов, черные — фоновые значения ЭпА; * — отличия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем ($p<0,05$ по сравнению с фоном, парный критерий Стьюдента). И. кора — ипсилатеральная кора, К. кора — контралатеральная кора, ГПТ — гипоталамус, ГПК — гиппокамп.

Fig. 1. Effect of valproic acid (VA), phenosan (PA) and their combination on the number and duration of discharges at the 1st stage of development of the Epi system in rats with cobalt-induced epilepsy

Here and in fig. 2: grey columns — EpA values after drug administration, black — background EpA values; * — significance at $p<0.05$ compared with background (paired Student's t test). I. cortex — ipsilateral cortex, C. cortex — contralateral cortex, HPT — hypothalamus, HPC — hippocampus.

ФК в дозе 80 мг/кг не оказывала статистически значимого влияния на разрядную активность, развившуюся через 48 ч (I стадия) после аппликации кобальта (см. рис. 1, б). При введении комбинации ВК 200 мг/кг и ФК 80 мг/кг на ЭПА мозга крыс на I стадии развития ЭС выявлялось статистически значимое (на 58%) снижение количества разрядов в контралатеральной коре (см. рис. 1, в).

Влияние ФК, ВК и их комбинации на показатели судорожной активности во II стадии развития ЭС у крыс с кобальт-индуцированной эпилепсией. На II стадии (5-й день) развития ЭС у крыс, ранее однократно получивших ВК, происходит генерализация ЭПА в различных структурах мозга со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов. Развитие ЭС в данной группе приводит к увеличению количества и продолжительности разрядов в гипоталамусе (на 71% — количество разрядов и на 78% — продолжительность) и в коре на стороне аппликации кобальта (на 104% — количество разрядов и на 80% — продолжительность) относительно I стадии. ВК (200 мг/кг) на II стадии развития ЭС значительно подавляла ($p < 0,05$) судорожную активность: наблюдалось уменьшение (в 4 раза) количества

разрядов и их длительности в ипсилатеральной коре и гипоталамусе, а также длительности разрядов в контралатеральной коре и гиппокампе (рис. 2, а).

Фоновая пароксизмальная активность крыс (количество разрядов и их длительность) на II стадии формирования ЭС у животных, ранее однократно получивших ФК, не отличалась от I стадии развития ЭС в ипси- и контралатеральной коре и гиппокампе, но была статистически значимо выше в гипоталамусе (на 103% — количество и продолжительность разряда). ФК (80 мг/кг) не оказывала статистически значимого влияния на имеющуюся фоновую пароксизмальную активность мозга крыс ни в одной из исследуемых структур мозга (рис. 2, б).

В группе крыс, получивших однократно комбинацию ВК (200 мг/кг) и ФК (80 мг/кг), фоновые значения ЭПА на II стадии развития ЭС были на уровне I стадии и статистически значимо не отличались. Комбинация препаратов не оказывала значимого влияния на ЭПА, регистрируемую на 5-й день после аппликации кобальта (рис. 2, в).

Влияние ФК, ВК и их комбинации на развитие ЭПС, спровоцированного ГМЦ, у крыс с кобальт-индуцированной эпилепсией.

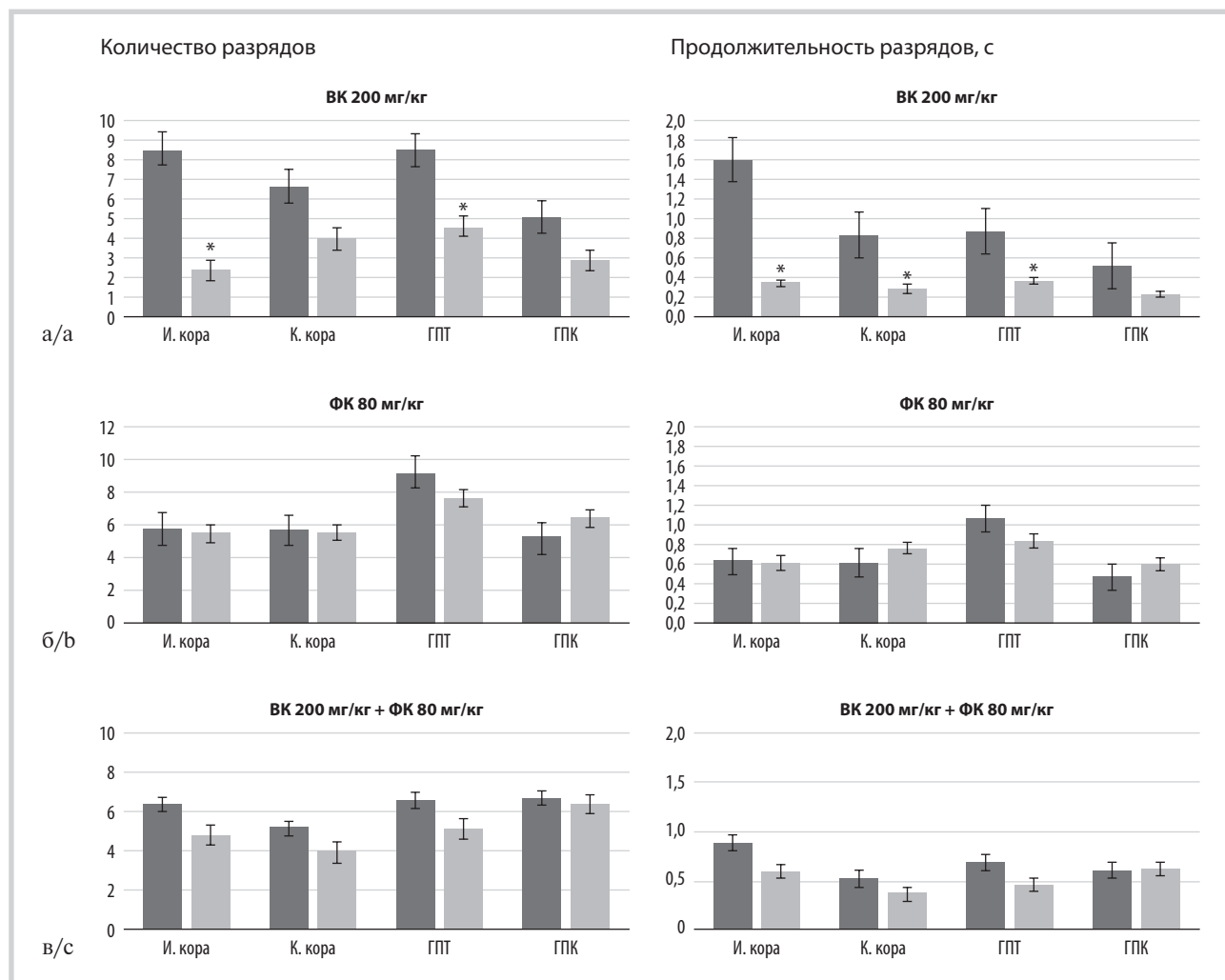


Рис. 2. Влияние ФК, ВК и их комбинации на количество и продолжительность разрядов на II стадии развития ЭС у крыс с кобальт-индуцированной эпилепсией.

Fig. 2. The effect of PA, VA and their combinations on the number and duration of discharges at the 2nd stage of ES development in rats with cobalt-induced epilepsy.

лепсий. Фоновая биоэлектрическая активность головного мозга крыс контрольной группы к 10-м суткам развития ЭС характеризовалась высокой разрядной активностью: количество разрядов в подкорковых структурах и контралатеральной коре превышало более чем в 2 раза ($p < 0,05$) значения фоновой пароксизмальной активности I стадии (рис. 3, а). Стабильность развития ЭС проверяли путем введения подпороговых доз ГМЦ, не вызывающих у интактных крыс развития ЭПС. Введение ГМЦ крысам контрольной группы приводило к развитию ЭПС в течение 20—40 мин: отмечалось выраженное увеличение (в 1,5—2 раза) пароксизмальной активности ($p < 0,05$) во всех исследуемых структурах мозга с преобладанием количества разрядов в подкорковых структурах, а их продолжительности — в ипсилатеральной коре относительно фоновых значений 10-х суток (см. рис. 3, а). ЭЭГ-картина отражала синхронизацию высокоамплитудной ЭпА в виде ЭЭГ-паттерна развернутого ЭПС (рис. 4, а), которая сопровождалась развитием ВГТКС у всех животных, а у 67% — заканчивающихся гибелью через 3 ч без лечения.

Фоновые показатели ЭЭГ у крыс, дважды получивших ВК (200 мг/кг) на 2-е и 5-е сутки, к 10-м суткам характеризовались высокой разрядной активностью ($p < 0,05$) относительно I стадии развития ЭС во всех исследуемых структурах мозга, с преобладанием более чем в 2 раза в контралатеральной коре и гиппокампе (рис. 3, б). После введения ГМЦ у крыс, ранее получивших ВК, наблюдалось усиление пароксизмальной активности во всех структурах мозга более чем в 2 раза, которая нарастала до появления высокоамплитудных продолжительных разрядов на ЭЭГ, сопровождаемых ВГТКС у 100% животных. По данным ЭЭГ регистрировался ЭПС (рис. 4, б). Через 3 ч после введения ВК (200 мг/кг внутрь) отмечалось устранение характерных паттернов ЭПС на ЭЭГ и моторных проявлений у 67% крыс, а также снижение гибели животных до 33% (в контроле — 67%).

На 10-е сутки после аппликации кобальта фоновые показатели ЭЭГ крыс, получавших на 2-е и 5-е сутки ФК, характеризовались низкой разрядной активностью в подкорковых структурах, сопоставимой с фоновыми значениями I стадии развития ЭС. В электрокортикограммах правого и левого полушарий наблюдалось увеличение (в 2 раза, $p < 0,05$) количества разрядов относительно I стадии развития ЭПС. ГМЦ в группе крыс, получавших ФК, не вызывал развития ЭПС (отсутствовали высокоамплитудная ЭпА и соответствующие поведенческие реакции) (рис. 3, в, 4, в).

У крыс, получавших комбинацию ВК с ФК, на 10-й день наблюдалась повышенная разрядная активность относительно I стадии развития ЭС только в контралатеральной коре. После введения ГМЦ в группе, получавшей комбинацию препаратов, развитие стабильного ЭПС (с ЭЭГ и поведенческими паттернами) наблюдалось у 1 животного (рис. 3, г, 4, г).

Обсуждение

Использование модели хронической очаговой эпилепсии, индуцированной нанесением кобальта на сенсорную зону коры, с развитием первично- и вторично-генерализованных судорог, позволило изучить влияние препаратов и их комбинации на ЭС животных в начальной (I) и стабильной (II) стадиях ее развития. Впервые кобальтовая модель эпилепсии была смодели-

рована на кошках и описана в 1952 г. М. Bonvallet [24]. В нашей стране аппликацию кобальта стали использовать для изучения электроактивности кобальт-индуцированного коркового и амигдаларного очага у кроликов [18, 19] и крыс [17]. В условиях модели стадийного развития ЭС сопровождается формированием вторичных, третичных и зеркальных очагов ЭпА, которые, синхронизируясь, образуют сложную патологическую структурно-функциональную систему. В I стадию развиваются первичный очаг ЭпА (на стороне аппликации кобальта) и вторичные очаги в подкорковых структурах ипсилатерального полушария. На II стадии доминирующие очаги ЭпА появляются в подкорковых структурах (третичные очаги) и контралатеральной коре (зеркальный очаг). Затухание первичного очага, согласно данным литературы, происходит после 14-х суток, но остаются вторичные и третичные очаги.

В исследовании установлено, что в условиях модели фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии на I и II стадиях формирования ЭС у крыс ВК (200 мг/кг внутримышечно) вызывает статистически значимое уменьшение количества и длительности разрядов. Наиболее выраженный эффект ВК наблюдается в электрограммах ипсилатеральной коры и гипоталамуса, что согласуется с ранее полученными результатами [15]. Вместе с тем у крыс, ранее дважды получавших ВК, наблюдается формирование стабильной ЭС к 10-м суткам после аппликации кобальта, что проявлялось появлением высокоразрядных вторичных и третичных очагов ЭпА в подкорковых структурах и контралатеральной коре (зеркальный очаг). ФК (80 мг/кг внутримышечно) оказывает слабое ингибирующее влияние на появившуюся пароксизмальную активность на I и II стадиях развития ЭС. Однако в данной группе крыс к 10-м суткам не наблюдалось высокоразрядных очагов ЭпА в подкорковых структурах, характерных для стабильной стадии развития ЭС. Комбинация ВК (200 мг/кг) с ФК (80 мг/кг) ослабляет выраженность пароксизмальной активности только в очаге ЭпА, сформированном в контралатеральной коре на I стадии развития ЭС. При этом, как и в группе крыс с ФК, у животных не наблюдается появления высокоразрядных очагов патологической активности в гипоталамусе и гиппокампе, а также не формируется зеркального очага ЭпА в контралатеральной коре через 10 дней после аппликации кобальта. Несмотря на то что противосудорожное (симптоматическое) действие комбинации ВК с ФК на ЭпА на I стадии развития ЭС снижается по сравнению с изолированным введением ВК, данные препараты не имеют доказанного взаимно ингибирующего эффекта, что подтверждается результатами, полученными в тесте электрошоковых судорог, показавшими их синергизм [23]. Результаты, полученные в опытах на животных и свидетельствующие о суммации эффектов ФК и ВК, подтверждены в клинических исследованиях при лечении пациентов с фокальными формами эпилепсии [6]. Снижение влияния на пароксизмальную активность в хронической фокальной кобальт-индуцированной модели эпилепсии при применении комбинации препаратов может быть обусловлено их действием на общие молекулярные или функциональные мишени. ВК имеет доказанный ингибирующий эффект на потенциалзависимые натриевые каналы, которым отводится основная роль в генерации и распространении ЭпА. Потенциалзависимые натриевые каналы экспрессируются повсеместно с повышенной плотностью в перекрестках Ранвье и начальных сегментах аксона [25]. Выделяют 9 подти-

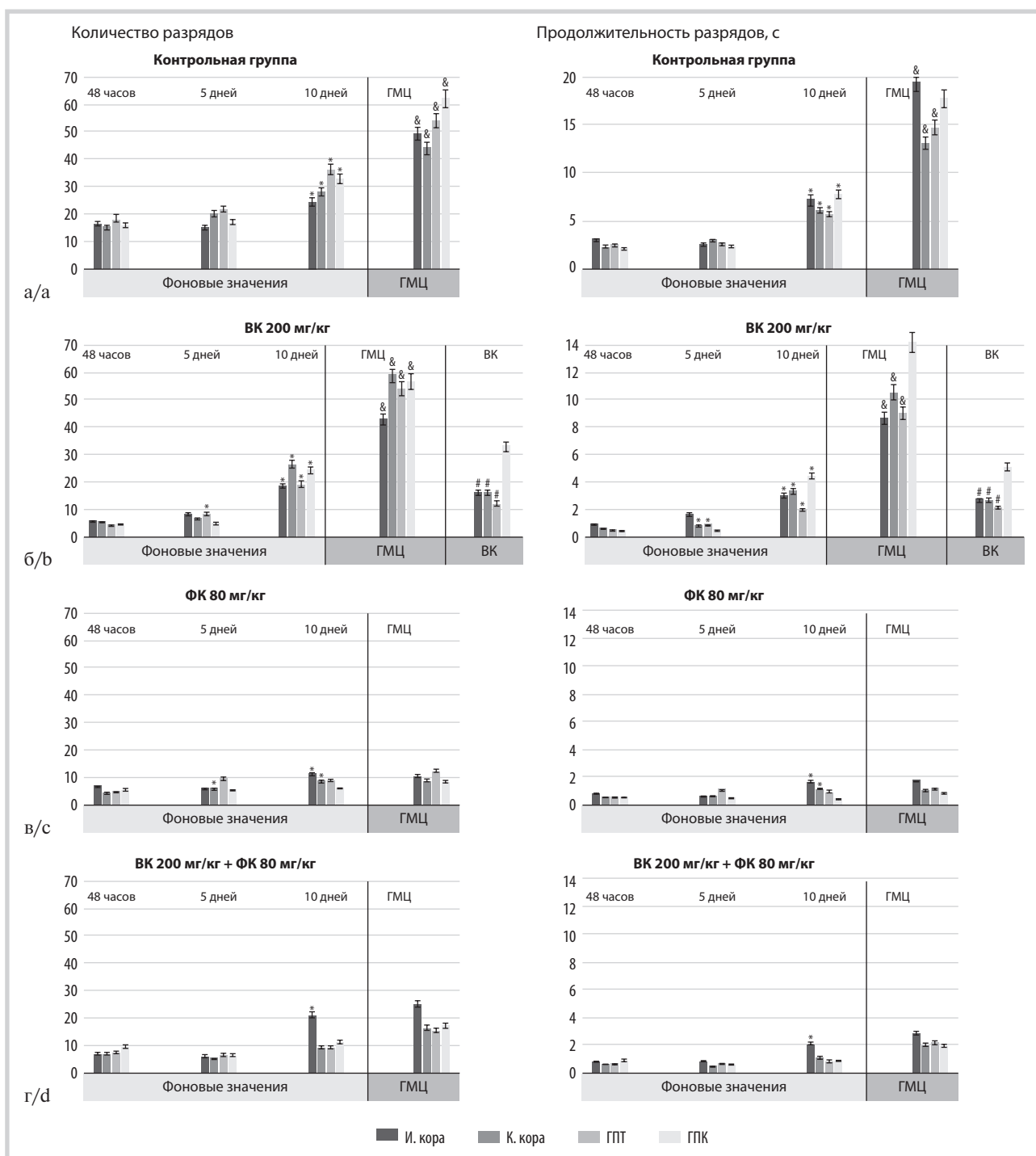


Рис. 3. ЭпА в структурах мозга крыс, получавших ФК, ВК и их комбинацию, в течение развития ЭС и после провокации ЭПС (на 10-й день), вызванного ГМЦ.

* — отличия статистически значимы при сравнении с I стадией развития ЭС; & — по сравнению с фоном, # — по сравнению с ГМЦ ($p < 0,05$, парный критерий Стьюдента).

Fig. 3. EpA in the brain structures of rats previously treated with PA, VA and their combination, during the development of the Epi system and after provocation of status epilepticus (on the 10th day) caused by homocysteine thiolactone (HMC)

* — significance of differences in EpA when compared with the 1st stage of development of the Epi system; & — significance compared to background, # — significance compared to GMC ($p < 0.05$ paired Student's t test).

пов данных каналов, среди которых 1.1, 1.2, 1.3, 1.6 подтипы располагаются в ЦНС и принимают непосредственное участие в распространении ЭпА [26]. Модуляция активности данных каналов участвует в реализации эффекта боль-

шого количества ПЭП (карбамазепин, фенитоин, ламотриджин, лакосамид, топирамат, ВК). ВК, подобно фенитоину, воздействует на каналы 1.1, 1.2, 1.6 в нейронах гиппокампа и коры, оказывает влияние на фазу быстрой инактивации

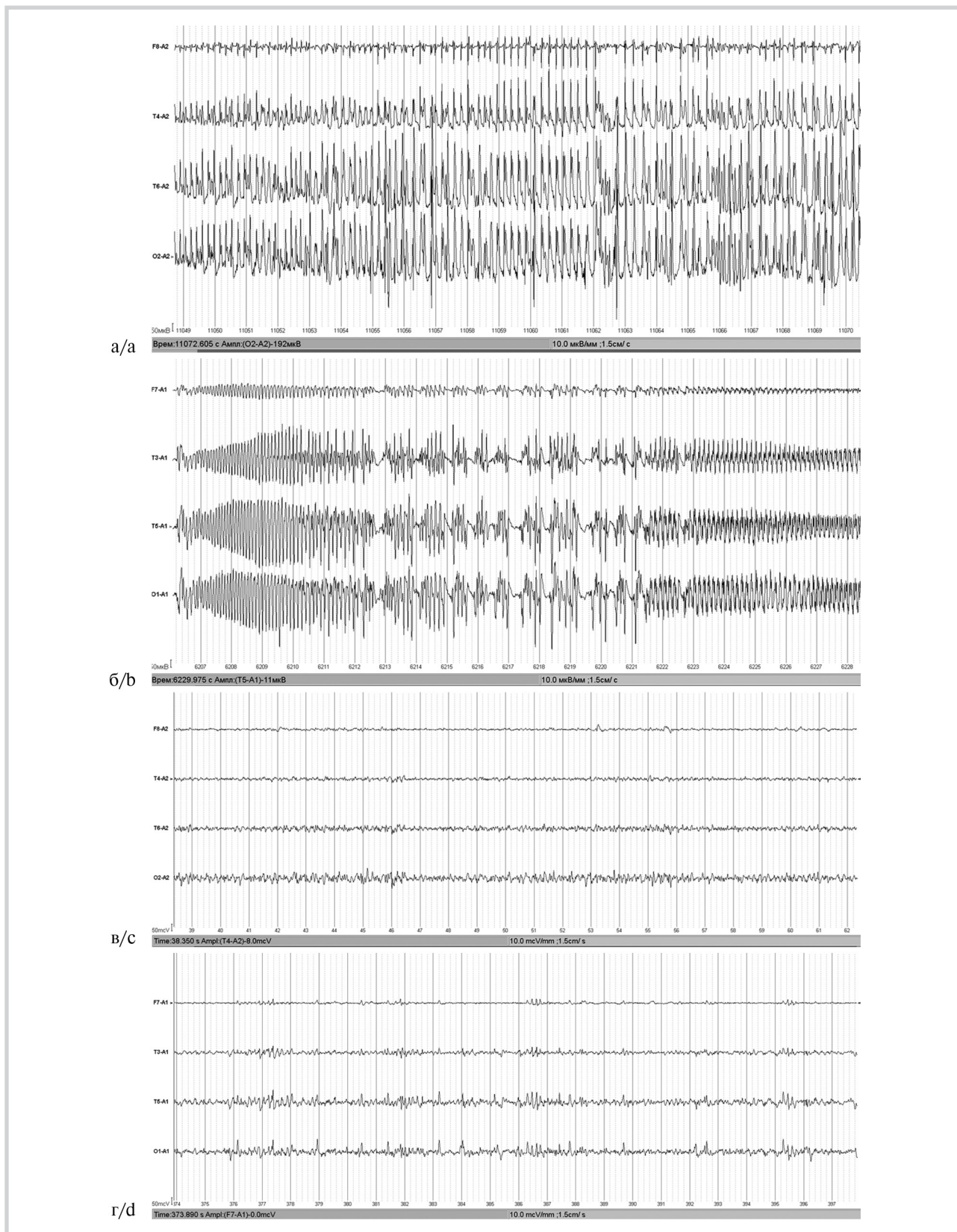


Рис. 4. ЭЭГ-проявления ЭПС, вызванного ГМЦ на 10-й день развития ЭС.

а — контрольная группа; б — ВК; в — ФК; г — комбинация ВК+ФК; F(7,8) — ипсилатеральная кора (слева); T(3,4) — контрлатеральная кора (справа); T(5,6) — гипоталамус; O(1,2) — гиппокамп.

Fig. 4. Electrographic manifestations of status epilepticus caused by HMC on the 10th day of development of the Epi system.

а — control group; б — VA; в — PA; г — комбинация VA + PA; F(7,8) — ipsilateral cortex (left); T(3,4) — contralateral cortex (right); T(5,6) — hypothalamus; O(1,2) — hippocampus.

ции, пролонгируя резистентное к возбуждению состояние канала до последующей деполяризации [26—28]. ФК воздействует на натриевые каналы опосредованно через активацию протеинкиназы С, являющейся эндогенным модулятором натриевого тока. Активаторы протеинкиназы С, фосфорилируя потенциалзависимые натриевые каналы, продлевают состояние инактивации канала и снижают пиковые токи натрия в нейронах ЦНС [29, 30]. При этом модуляция натриевых токов активаторами протеинкиназы С может снижать эффекты ПЭП, воздействующих на натриевые каналы, что было показано в экспериментальном исследовании на примере топирамата [31]. В нашем исследовании данный механизм может обуславливать снижение противосудорожного (симптоматического) действия ВК в комбинации с ФК, наблюдаемое в течение 2 ч регистрации после введения. Однако это снижение не влияет на способность комбинации препаратов препятствовать формированию высококорядных очагов ЭПА. Данный результат подтверждается тем, что крысы, получавшие ФК в качестве монотерапии и в комбинации с ВК, устойчивы к провокации ЭПС нейротоксином ГМЦ, что свидетельствует о слабости сформировавшейся ЭС у этих животных, в отличие от крыс, получавших физиологический раствор или ВК. ГМЦ — токсичный метаболит гомоцистеина, находящийся в цепи продуктов метаболизма метионина, его концентрация возрастает в мозге у пациентов с эпилепсией в силу различных причин, в числе которых нарушение метаболизма цистеина и окислительный стресс [32]. Гомоцистеин и его производные структурно похожи на глутамин и оказывают прямое возбуждающее действие на NMDA-рецепторы, могут регулировать активность различных метаболитных рецепторов глутамата и вызывают судороги у подопытных животных [33]. Развитие ГМЦ-индуцированного ЭПС у крыс с кобальтовым очагом ЭПА возможно только при генерализованной высококорядной активности в структурах мозга и сопровождается ВГТКС [34].

Таким образом, ФК в условиях модели хронической фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии при изолированном введении и в комбинации с ВК ослабляет развитие ЭС, что проявляется в сдерживании формирования высококорядных очагов ЭПА в подкорковых структурах и коре. ВК не препятствует развитию ЭС в целом и формированию высококорядных зеркальных корковых и подкорковых очагов ЭПА при данном режиме введения. При совместном введении ФК с ВК в течение 2 ч регистрации отмечается ослабление влияния на пароксизмальную активность по сравнению с ВК при изолированном введении, что возможно, обусловлено снижением функциональной активности натриевых каналов, вызванным ФК, ингибирование которых вносит вклад в противосудорожное действие ВК, и нуждается в дальнейшем изучении в клинической практике. Выявленный антиэпилептогенный эффект ФК может способствовать подавлению развития и стабилизации ЭС и, как следствие, улучшать прогноз течения заболевания, в том числе при комбинированной терапии с ПЭП.

Выводы

ФК, в отличие от ВК, оказывает слабое влияние на появившуюся пароксизмальную активность, регистрируемую на I и II стадиях развития ЭС. ФК, в отличие от ВК, препятствует развитию стабильной ЭС у крыс в модели кобальт-индуцированной хронической фокальной эпилепсии. Комбинация ФК с ВК предупреждает развитие высококорядных вторичных и третичных очагов ЭПА, участвующих в формировании ЭС в целом, но при этом наблюдается ослабление влияния ВК на пароксизмальную активность в течение 2 ч после введения.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Карлов В.А. *Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин: руководство для врачей*. М.: Медицина; 2019. Karlov VA. *Epilepsy in children and adult women and men: a guide for doctors*. М.: Medicine; 2019. (In Russ.).
2. Авакян Г.Н., Воронина Т.А., Хромых Е.А. *Эпилепсии. Патогенез. Патогенетическая терапия. Пособие для врачей*. М. 2007. Avakyan GN, Voronina TA, Khromykh EA. *Epilepsy. Pathogenesis. pathogenic therapy. A guide for doctors*. М. 2007. (In Russ.).
3. Авакян Г.Н., Авакян Г.Г. Трансформации эпилептической системы. Состояние вопроса и возможности решения проблемы. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2017;2:34-39. Avakyan GN, Avakyan GG. Transformations of the epileptic system. The state of the issue and the possibility of solving the problem. *Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2017;2:34-39. (In Russ.). <https://doi.org/10.17749/2077-8333.2017.9.2.006-019>
4. Крыжановский Г.Н. *Фундаментальные механизмы и общие закономерности дисрегуляторной патологии нервной системы*. М.: Медицина; 2009. Kryzhanovsky GN. *Fundamental mechanisms and general patterns of dysregulatory pathology of the nervous system*. М.: Medicine; 2009. (In Russ.).
5. Карлов В.А. *Эпилепсия*. М.: Медицина; 1990. Karlov VA. *Epilepsy*. М.: Medicine; 1990. (In Russ.).
6. Бурд С.Г., Лебедева А.В., Пантина Н.В. и др. Клинические результаты и перспективы применения фенозаноной кислоты у взрослых пациентов с фокальной эпилепсией. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(10):52-59.
7. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И. и др. Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеинкиназы С в процессах пероксидного окисления. *Росс. хим. журн.* 1999;43(5):55-62. Palmina NP, Maltseva EL, Pynzar EI, et al. Modification of protein kinase activity with ligands in ultra-low concentrations. The role of protein kinase C in peroxide oxidation processes. *Russ Chem Zhurn.* 1999;43(5):55-62. (In Russ.).
8. Карлов В.А. *Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин*. М.: МЕДпресс; 2010. Karlov VA. *Epilepsy in children and adult women and men*. М.: MEDpress. 2010. (In Russ.).
9. Rahman M, Awosika AO, Nguyen H. *Valproic Acid*. 2023 Aug 17. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
10. Owens MJ, Nemeroff CB. Pharmacology of valproate. *Psychopharmacol Bull.* 2003;37 Suppl 2:17-24.
11. Арзамасцев Б.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия лекарственных средств. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М. 2012;1(1):21-28.

- Arzamastsev BV, Berezovskaya IV, Verstakova OL, et al. Guidelines for studying the general toxic effects of drugs. *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs*. М. 2012;1(1):21-28. (In Russ.).
12. Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А. и др. Влияние карбамазепина на структурно-функциональные связи в развитии эпилептической системы. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;2:7-10.
Avakyan GN, Nerobkova LN, Voronina TA, et al. The influence of carbamazepine on structural and functional connections in the development of the epileptic system. *Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2002;2:7-10. (In Russ.).
 13. Bregman F, Le Saux S, Trottier P, et al. Chronic Cobalt-induced Epilepsy: Noradrenaline Ionophoresis and Adrenoceptor Binding Studies in the Rat Cerebral Cortex. *J. Neural Transmission*. 1985;63:109-118.
 14. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. 2012;1(14):235-250.
Voronina TA, Nerobkova LN. Guidelines for the Study of the anticonvulsant activity of pharmacological substances. *Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products*. 2012;1(14):235-250. (In Russ.).
 15. Dow RS, Fernández-Guardiola A, Manni E. The production of cobalt experimental epilepsy in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1962;14(3):399-407.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(62\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0013-4694(62)90116-5)
 16. Chusid JG, Kopeloff LM. Epileptogenic effects of pure metals implanted in motor cortex of monkeys. *J Appl Physiol*. 1962;17:697-700.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1962.17.4.697>
 17. Воронина Т.А., Стойко М.И., Неробкова Л.Н. и др. Анализ влияния фенитоина на распространение судорог и эпилептический статус, вызванный нейротоксином гомоцистеином тиолактоном у крыс с кобальтовой эпилепсией. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(1):15-18.
Voronina TA, Stoiko MI, Nerobkova LN, et al. Investigation of the effect of fenitoin on the development of homocysteine induced convulsions and epileptic status in rats with cobalt-induced epilepsy. *Eksp Klin Farmakol*. 2002;65:15-18. (In Russ.).
 18. Толмасская Э.С., Неробкова Т.Н., Шебланов В.Ю. О роли систем подкрепления гипоталамуса в проявлении судорожной активности. *Успехи физиологии наук*. 1980;11(4):99-114.
Tolmasskaya ES, Nerobkova TN, Shcheblanov VYu. On the role of hypothalamic reinforcement systems in the manifestation of convulsive activity. *Advances in Physiology Sciences*. 1980;11(4):99-114. (In Russ.).
 19. Чепурнов С.А., Чепурнова Н.Е. *Миндалевидный комплекс*. М.: Изд-во МГУ; 1981.
Chepurnov SA, Chepurnova NE. *Amygdala complex*. М.: Moscow State University Publishing House; 1981. (In Russ.).
 20. Buresh Dz, Petran' M, Zakhar D. *Electrophysiological Methods in Biology Research*. Prague. 1960.
 21. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике. *РМЖ*. 2016;7:434-438.
Voronina TA. Pioneer of antioxidant neuroprotection. 20 years in clinical practice. *RMZh*. 2016;7:434-438. (In Russ.).
 22. Литвинова С.А., Авакян Г.Г., Воронина Т.А. и др. Сравнение эффектов и электрофизиологических механизмов действия вальпроевой кислоты и леветирацетам на экспериментальной модели очаговой эпилепсии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2018;12(3):45-53.
Litvinova SA, Avakyan GG, Voronina TA, et al. Comparison of the effects and electrophysiological mechanisms of action of valproic acid and levetiracetam in an experimental model of focal epilepsy. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2018;12(3):45-53. (In Russ.).
<https://doi.org/10.25692/ACEN.2018.3.6>
 23. Яковлева А.А., Литвинова С.А., Воронина Т.А. и др. Изучение потенцирования эффектов вальпроевой кислоты и карбамазепина фенозойной кислотой с анализом нейрохимических показателей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85:31-37.
Yakovleva AA, LtvinoVA SA, Voronina TA, et al. Study of the potentiation of the effects of valproic acid and carbamazepine by fenoic acid with the analysis of neurochemical parameters. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85:31-37. (In Russ.).
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-12-31-37>
 24. Bonvallet M, Dell P, Hugelin AJ. Projections olfactives, gustatives, viscerales, vagales, visuelles et auditives au niveau des formations grises du cerveau anterieur du chat. *J Physiol*. 1952;44:222-224.
 25. Kaplan DI, Isom LL, Petrou S. Role of Sodium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6):a022814.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022814>
 26. Abdelsayed M, Sokolov S. Voltage-gated sodium channels: pharmaceutical targets via anticonvulsants to treat epileptic syndromes. *Channels (Austin)*. 2013;7(3):146-152.
<https://doi.org/10.4161/chan.24380>
 27. Brake N, Mancino AS, Yan Y, et al. Closed-state inactivation of cardiac, skeletal, and neuronal sodium channels is isoform specific. *J Gen Physiol*. 2022 Jul 4;154(7):e202112921. <https://doi.org/10.1085/jgp.202112921>
 28. Errington AC, Stöhr T, Heers C, Lees G. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol*. 2008;73(1):157-169.
<https://doi.org/10.1124/mol.107.039867>
 29. Franceschetti S, Taverna S, Sancini G, et al. Protein kinase C-dependent modulation of Na⁺ currents increases the excitability of rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol*. 2000;528(Pt 2):291-304.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00291.x>
 30. Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*. 2003;4(3):207-213.
<https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>
 31. Curia G, Aracri P, Colombo E, et al. Phosphorylation of sodium channels mediated by protein kinase-C modulates inhibition by topiramate of tetrodotoxin-sensitive transient sodium current. *Br J Pharmacol*. 2007;150(6):792-797.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707144>
 32. Дмитренко Д.В., Шнайдер Н.А. Тератогенез противоэпилептических препаратов: обзор литературы и собственные наблюдения. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2014;6(2):61-70.
Dmitrenko DV, Schneider NA. Teratogenesis of antiepileptic drugs: review of the literature and own observations. *Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2014;6(2):61-70. (In Russ.).
 33. Stanojlović O, Rašić-Marković A, Hrnčić D, et al. Two Types of Seizures in Homocysteine Thiolactone-Treated Adult Rats, Behavioral and Electroencephalographic Study. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;29(3):329-339.
<https://doi.org/10.1007/s10571-008-9324-8>
 34. Walton NY, Treiman DM. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by D, L-homocysteine thiolactone. *Epilepsy Res*. 1988;2(2):79-86.

Поступила 06.02.2024

Received 06.02.2024

Принята к печати 07.02.2024

Accepted 07.02.2024