

## АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ФЕНИТОИНА НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ СУДОРОГ И ЭПИЛЕПТИЧЕСКИЙ СТАТУС, ВЫЗВАННЫЙ НЕЙРОТОКСИНОМ ГОМОЦИСТЕИНОМ ТИОЛАКТОНОМ У КРЫС С КОБАЛЬТОВОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

Т. А. Воронина<sup>1</sup>, М. И. Стойко<sup>2</sup>, Л. Н. Неробкова<sup>1</sup>, Г. Н. Авакян<sup>2</sup>, В. А. Крайнева<sup>1</sup>

Показано, что применение нейротоксина гомоцистеина тиолактона у крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом в сенсомоторной области коры приводит к развитию вторично-генерализованных судорог и эпилептического статуса, картина которых имеет сходство с манифестацией судорог при эпистатусе у человека. Фенитоин (50 мг/кг) прерывает распространение судорог, купирует развитие эпилептического статуса, уменьшает количество и длительность вторичных генерализованных тонико-клонических приступов, уменьшает поведенческие проявления (фокальные подергивания, запрокидывания, “барабанный бой”, боковое положение), нормализует ЭЭГ и предотвращает летальный исход. Повышение дозы фенитоина до 100 мг/кг снижает противоэпилептическую активность препарата, усиливает побочные эффекты и увеличивает летальность животных.

**Ключевые слова:** эпилепсия, вторично-генерализованные тонико-клонические судороги, эпилептический статус, кобальт-индуцированная модель эпилепсии, фенитоин

### ВВЕДЕНИЕ

Фенитоин применяют для лечения генерализованных тонико-клонических приступов, атонических абсансов, атонических и тонических приступов, а так же при психомоторных формах эпилепсии и эпилептическом статусе [3 – 5, 7, 8].

Наибольшую активность в эксперименте фенитоин проявляет при генерализованных тонико-клонических судорогах, вызываемых транскорнеальной стимуляцией (максимальный электрошок) или некоторыми химическими веществами [10, 13, 16, 19]. Однако анализ результатов по этим моделям позволяет зарегистрировать предупреждающий эффект вещества, но не дает возможности оценить влияние фенитоина на распространение судорог, его способность прерывать судорожный приступ, поскольку единичный судорожный приступ развивается непосредственно после шока. Другим существенным недостатком классических моделей является невозможность оценить судорожную активность у отдельных животных одновременно в поведенческих и ЭЭГ показателях до и после введения вещества.

Целью настоящей работы явилось изучение механизма действия фенитоина на распространение вторично-генерализованного тонико-клонического приступа при использовании модифицированной модели кобальтовой эпилепсии у крыс с дополнительным введением нейротоксина гомоцистеина тиолактона, с оценкой моторных и ЭЭГ показателей судорожного

приступа индивидуально у каждого животного до и после введения препарата.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 220 – 280 г с хронически живлёнными электродами.

Эпилептогенный очаг создавали аппликацией порошка металлического кобальта на поверхность сенсомоторной коры левого полушария (координаты AP — 1,5 мм, L — 1,5 мм). Биоэлектрическую активность сенсомоторной области коры, дорзального гиппокампа и латерального гипоталамуса регистрировали ежедневно, начиная со второго дня после аппликации кобальта [1, 2, 6, 9]. Запись электрической активности проводили в условиях свободного передвижения животного по экспериментальной камере. На 6 – 8-й день после аппликации у животных с выраженными проявлениями кобальтовой эпилепсии провоцировали эпистатус введением нейротоксина гомоцистеина тиолактона (ГЦТ) в дозе 5,5 ммоль/кг (внутрибрюшинно) [23, 24].

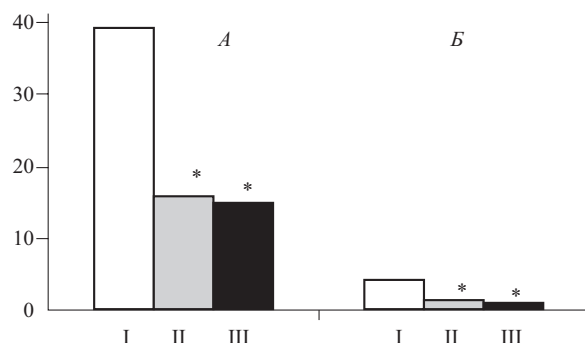
Для регистрации ЭЭГ использовали 17-канальный энцефалограф “Нейрограф-18” (фирма “О.Т.Е. Биомедика”, Италия) с полосой пропускания от 0,3 до 50 Гц. Обработка данных ЭЭГ и статистический анализ (стандартное параметрическое распределение) проводили на компьютере IBM PC-AT 486 DX2.

Фенитоин натрия (ампулы препарата zentropil фирмы “Nordmark”) в дозе 50 и 100 мг/кг и 0,5% раствор тилозы (контроль) вводили внутрибрюшинно. Каждую дозу исследовали на 10 животных.

Наблюдение за крысами проводили в течение 30 мин после введения веществ при постоянном мониторинге ЭЭГ. Регистрировали количество и дли-

<sup>1</sup> НИИ фармакологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

<sup>2</sup> Кафедра неврологии и нейрохирургии лечебного факультета (зав. — акад. РАМН Е. И. Гусев) Российского государственного медицинского университета, Москва, 117261, Ленинский проспект, 8, корп. 8



**Рис. 1.** Влияние фенитоина на количество генерализованных тонико-клонических приступов.

По оси ординат — количество генерализованных тонико-клонических приступов (ГТКП). *A* — общее число ГТКП в группе за 30 мин, *B* — среднее число ГТКП для крысы. Здесь и на рис. 2 и 3: I — контроль (тилоза), II — фенитоин 50 мг/кг, III — фенитоин 100 мг/кг. \* — достоверность различий с контролем при  $p \leq 0,05$ .

тельность генерализованных тонико-клонических приступов (ГТКП), интервалов между ними и число интериктальных пароксизмальных разрядов на ЭЭГ, а также наблюдали за поведением крыс в межприступном периоде.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аппликация кобальта на сенсомоторную область коры головного мозга крысы вызывает гиперактивность нейронов, локализованных в месте введения, что выражается в появлении эпилептиформных пароксизмальных разрядов на ЭЭГ. Ежедневный контроль ЭЭГ и поведения выявляет в развитии эпилептогенной системы 2 основные стадии: стадию формирования первичного и вторичного эпилептогенных очагов через 24 – 48 ч после операции и стадию генерализованной эпилептиформной активности в различных структурах мозга со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов на 6 – 8-й день после аппликации кобальта. Во второй стадии на ЭЭГ регистрировали эпилептиформную активность на стороне воздействия кобальта и полиспайковую активность, исходящую, из поврежденного кобальтом участка коры, а также комплексы “спайк-волна”, пачки синхронизированных острых волн. Изменения на ЭЭГ во второй стадии сопровождалась фокальными моторными приступами, типичными подергиваниями правой передней лапы или головы. Полученные характери-

стики кобальтовой эпилепсии у крыс полностью совпадали с результатами, полученными ранее [1, 2, 9, 23 – 25].

Введение животным с генерализованной эпилептиформной активностью ГЦТ приводило к развитию эпистатуса, основным проявлением которого явилось развитие ГТКП, картина которого имеет сходство с манифестацией судорог при эпистатусе у человека [23, 24]. Латентное время возникновения первого ГТКП после инъекции ГЦТ составило  $16,5 \pm 10,7$  мин; интервал между 1-м и 2-м генерализованными тонико-клоническими приступами —  $7,4 \pm 5,7$  мин.

На фоне развитого эпистатуса, сразу после второго ГТКП животным вводили исследуемые вещества: в опытной группе фенитоин, в контрольной группе — в том же объеме тилозу. После этого индивидуально у каждого животного оценивали количество ГТКП и поведение.

Фенитоин оказывал отчетливое влияние на ГТКП, достоверно уменьшая их число. Так, в дозе 50 мг/кг фенитоин снижал число ГТКП в 2,4 раза, в дозе 100 мг/кг — в 2,6 раза (рис. 1). При этом у 40% животных после введения фенитоина в дозе 50 мг/кг ГТКП полностью отсутствовали, однако на ЭЭГ отмечались разряды пароксизмальной активности длительностью более 2 с, разряды острых высокоамплитудных тета- и дельта-волн, генерализованные по всем исследуемым структурам.

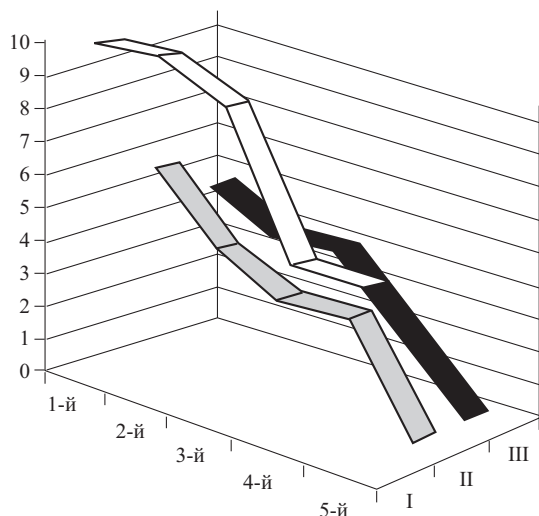
Анализ динамики изменения числа ГТКП показал, что у контрольных животных после введения тилозы первый и второй ГТКП наблюдались у всех особей, третий приступ — у 90% крыс, а 4 и 5-й ГТКП — у 50% животных. Под влиянием фенитоина в дозе 50 мг/кг первый и второй приступы отмечались у 60% крыс, третий ГТКП — у 40% животных, а пятый ГТКП отсутствовал (рис. 2).

Фенитоин в дозе 50 мг/кг оказывал выраженное влияние на латентность первого приступа и интервалы между приступами. В частности, интервал между первым и вторым ГТКП увеличивался более чем в 2 раза. При введении фенитоина в дозе 100 мг/кг этот показатель также имел тенденцию к увеличению (табл. 1). На ЭЭГ во всех исследуемых структурах в межприступный период отмечалось снижение амплитуды биоэлектрической активности, регистрировались пароксизмальные разряды отдельных острых высокоамплитудных тета-волн и пиков.

**Таблица 1.** Влияние фенитоина на длительность интервала между генерализованными тонико-клоническими приступами (ГТКП)

Вещество, доза	Латентность, с	Интервалы между ГТКП, с			
		1 – 2	2 – 3	3 – 4	4 – 5
Тилоза	$365,5 \pm 134,5$	$221,9 \pm 66,0$	$243,9 \pm 77,4$	$142,0 \pm 70,3$	$134,6 \pm 70,9$
Фенитоин, 50 мг/кг	$813,8 \pm 587,9$	$478,6 \pm 226,5^*$	$322,3 \pm 22,4^*$	$181,7 \pm 120,6$	
Фенитоин, 100 мг/кг	$541,7 \pm 278,0$	$584,3 \pm 489,8^*$	$291,8 \pm 124,9$	$192,5 \pm 14,7$	

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: \* — различия с контролем статистически значимы при  $p \leq 0,05$ .

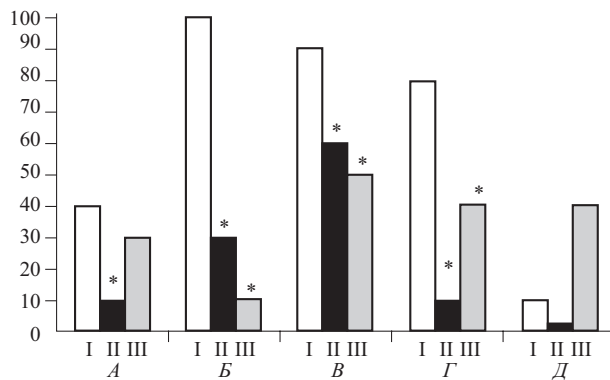


**Рис. 2.** Динамика изменения количества генерализованных тонико-клонических приступов после введения фенитоина.

По оси ординат — число животных, по оси абсцисс — порядковый номер приступа. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Наряду с уменьшением общего числа ГТКП под влиянием фенитоина наблюдалось снижение их длительности. Так, фенитоин в дозе 50 мг/кг сокращал длительность первых трех ГТКП примерно в 2 раза. Фенитоин в дозе 100 мг/кг не оказывал влияния на длительность первого ГТКП, но в два раза уменьшал длительность второго и третьего ГТКП (табл. 2).

Наблюдение за поведением животных показало, что в контрольной группе фокальные моторные приступы и сложные моторные приступы (комплексные подергивания), включающие подергивание передних лап, головы и всего тела с падением набок наблюдались у 100% животных, покачивание тела — у 40%, “барабанный бой” и боковое положение у 90 и 80% животных соответственно. 10% животных контрольной группы погибли в течение 30 мин наблюдения. Фенитоин в дозе 50 мг/кг уменьшал число крыс со сложными моторными приступами в 3,3 раза, с покачиванием тела — в 4 раза, с боковым положением — в 8 раз. Важно отметить, что при использовании указанной дозы не отмечалась гибель животных. Введение фенитоина в дозе 100 мг/кг снижало число животных со сложными моторными приступами до 10%, с боковым положением до 40% и с “барабанным боем” — до 50%; однако, была зарегистрирована гибель 40% животных (рис. 3).



**Рис. 3.** Влияние фенитоина на поведенческие реакции в межприступном периоде.

По оси ординат — количество реакций (в процентах), *A* — фокальные подергивания, *B* — комплексные подергивания, *B* — “барабанный бой”, *Г* — боковое положение, *Д* — гибель. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Таким образом, фенитоин оказывает выраженное влияние на распространение судорожной активности и прерывает развитие эписатуса. При этом противосудорожный эффект проявляется как по данным ЭЭГ, так и по моторным показателям. В дозе 50 мг/кг фенитоин уменьшает количество ГТКП и их продолжительность, увеличивает межприступные интервалы. Одновременно фенитоин в этой дозе снижает моторные проявления судорожного приступа и нарушения двигательного поведения в межприступные периоды и предотвращает летальные исходы. Фенитоин в дозе 100 мг/кг также обладает противосудорожной активностью, прерывая развитие ГТКП, но, в сравнении с действием фенитоина в меньшей дозе, способствует развитию бокового положения и увеличивает число животных с летальным исходом.

Согласно современным представлениям, механизм противосудорожного действия фенитоина определяется блокадой натриевых и кальциевых каналов [16, 17, 21, 22], увеличением в коре уровня ГАМК и снижением выброса глутамата [20]. С другой стороны, вовлечение ГАМК и глутаматергических систем в формирование эпилептической системы наблюдается при кобальтовой эпилепсии и эписатусе у крыс [12, 14, 18]. В связи с этим, можно предположить, что механизм прерывающего действия фенитоина на генерализованные тонико-клонические судороги определяется, прежде всего, вовлечением в этот патологический процесс ГАМК и глутаматергических систем.

**Таблица 2.** Влияние фенитоина на длительность (в с) генерализованных тонико-клонических судорог (ГТКС)

Вещество, доза	Порядковый номер ГТКС после введения вещества				
	1	2	3	4	5
Тилоза	59,8 ± 16,2	69,3 ± 24,8	111,2 ± 74,7	40,0 ± 7,6	440,0 ± 8,2
Фенитоин, 50 мк/кг	32,5 ± 4,2*	37,5 ± 4,9*	53,3 ± 22,9*	43,3 ± 14,2	
Фенитоин, 100 мк/кг	62,5 ± 37,9	38,6 ± 12,9*	46,3 ± 13,5*	75,0 ± 29,4	

Представляется важным, что результаты данной работы получены при сравнении судорожной активности до и после введения фенитоина у каждого животного индивидуально, что невозможно при использовании классических моделей с электрическим раздражением (электрошок) или при генерализованных судорогах, вызванных химическими веществами. Кроме того, поскольку действие фенитоина ориентировано, главным образом, на распространение судорог и прерывание судорожного приступа [5, 7, 8], результаты обычно проводимого анализа предупреждающего влияния фенитоина на ГТКП после максимального электрошока не дают представления о механизмах реализации противосудорожного эффекта этого препарата.

Сходный полученному в данной работе эффект и механизм действия фенитоина на распространение судорожной активности был показан в условиях новой модели постепенно увеличивающейся кортикальной стимуляции [13, 15], хотя недостатком этих исследований является анализ результатов с использованием только поведенческих показателей, а не ЭЭГ.

## ВЫВОДЫ

1. Применение нейротоксина гомоцистеина тиолактона у крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом в сенсомоторной области коры приводит к развитию вторично-генерализованных судорог и эпилептического статуса, картина которых имеет сходство с манифестацией судорог при эпистатусе у человека.

2. Фенитоин в дозе 50 мг/кг прерывает распространение судорожной активности, купирует развитие эпилептического статуса, уменьшает количество и длительность вторичных генерализованных приступов, уменьшает поведенческие проявления, нормализует ЭЭГ и предотвращает летальный исход.

3. Повышение дозы фенитоина до 100 мг/кг приводит к усилению побочных эффектов и увеличению летальности животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Алиев, Л. Н. Неробкова, Т. А. Воронина, Д. Л. Гусейнов, *Фармакол. и токсикол.*, **53**(1), 21 – 23 (1990).

2. О. Л. Бадалян, Л. Н. Неробкова, Т. А. Воронина и др., *Неврологический вестник*, № 1 – 2, 22 – 26 (1997).
3. Е. И. Гусев, Г. С. Бурд, *Эпилепсия*, Москва (1994).
4. Е. И. Гусев, Ю. Б. Белоусов, А. Б. Гехт и др., *Лечение эпилепсии: рациональное дозирование антиконвульсантов*, Речь, Санкт-Петербург (1999).
5. Т. А. Воронина, *Антиконвульсанты в психиатрической и неврологической практике*, Санкт-Петербург (1994), сс. 3 – 30.
6. Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Минздрав РФ, ИИА “Ремедиум”, Москва (2000), сс. 138 – 146.
7. В. А. Карлов, *Эпилепсия*, Медицина, Москва (1992).
8. В. А. Карлов, *Терапия нервных болезней*, Шаг, Москва (1996).
9. Л. Н. Неробкова, Т. А. Воронина, *Бюл. exper. биол.*, № 4, 397 – 400 (1988).
10. V. Andre, A. Ferrandon, C. Marescaux, and A. Nehlig, *J. Epilepsy Res.*, **42**, 7 – 22 (2000).
11. A. H. Burstein, D. S. Cox, B. Mistry, and N. D. Eddington, *J. Epilepsy Res.*, **34**, 129 – 133 (1999).
12. C. R. Craig and B. R. Colasanti, *Bioch. Behav.*, **41**(4), 813 – 816 (1992).
13. M. Danhof, O. E. Della Paschoa, J. W. Mandema, and R. A. Voskuyl, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**(2), 460 – 466 (1998).
14. S. Koganta, *Jap. J. Psych. Neurol.*, **46**(2), 351 – 362 (1992).
15. E. Krupp, and W. Lüscher, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**(3), 1137 – 1149 (1998).
16. T. Narahashi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 1 – 26 (1999).
17. M. Oka, Y. Itoh, and Y. Ukai, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 522 – 529 (2000).
18. S. M. Ross and C. R. Craig, *J. Neurosci.*, **1**(13), 88 – 96 (1981).
19. C. Rundfeldt and W. Lüscher, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**(1), 216 – 223 (1991).
20. P. Salvati, R. Maj, C. Caccia, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**(3), 1151 – 1159 (1999) глутамат.
21. S. M. Todorovic and C. J. Lingel, *J. Neurophysiol.*, **29**, 240 – 252 (1998).
22. S. M. Todorovic, E. Pepez-Reyes, and C. J. Lingel, *J. Pharmacol.*, **58**, 98 – 108 (2000).
23. N. Y. Walton and D. M. Treiman, *J. Neurology*, **40**, 990 – 994 (1990).
24. N. Y. Walton and D. M. Treiman, *J. Epilepsy Res.*, **24**, 19 – 28 (1996).
25. H. S. White, *J. Epilepsy*, **38**, 9 – 17 (1997).

Поступила 09.02.2001

## INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FENITOID ON THE DEVELOPMENT OF HOMOCYSTEINE INDUCED CONVULSIONS AND EPILEPTIC STATE IN RATS WITH COBALT-INDUCED EPILEPSY

T. A. Voronina<sup>1</sup>, M. I. Stoiko<sup>2</sup>, L. N. Nerobkova<sup>1</sup>, G. N. Avakyan<sup>2</sup>, and V. A. Kraineva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Psychopharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

<sup>2</sup> Neurology and Neurosurgery Department, Russian State Medical University, Leninskii Prospect 8/8, Moscow, Russia

The administration of neurotoxin thiolactone homocysteine in rats with cobalt-induced epileptogenic focus in the sensorimotor cortical region led to the development of secondary generalized convulsions and epileptic state. The pattern was analogous to the manifestation of convulsions in epileptic state in humans. Fenitoin (50 mg/kg) inhibited the development of convulsions, arrested the epileptic state, reduced the number and duration of the secondary generalized tonic – clonic attacks, decreased the behavioral manifestations (focal convulsions, lateral position etc.), normalized EEG, and prevented fatal outcome. An increase in the fenitoin dose to 100 mg/kg decreased the antiepileptic activity, enhanced side effects, and increased the lethality in test animals.