

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## РЕЦЕПТОР-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА РУ-1205 В СРАВНЕНИИ С ДИАЗЕПАМОМ И U-50,488Н

А. А. Спасов<sup>1, 2</sup>, О. Ю. Гречко<sup>1</sup>, К. Ю. Калитин<sup>1</sup>, В. А. Анисимова<sup>3</sup>

Изучены механизмы противосудорожного действия нового производного бензимидазола соединения РУ-1205 (9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазол), диазепама и U-50,488Н на моделях судорог у мышей, вызванных коразолом (75 мг/кг подкожно) и биккукуллином (5,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно). Антагонист бензодиазепинового сайта ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов флумазенил (10 мг/кг внутривнутрибрюшинно) полностью блокировал противосудорожный эффект диазепама (1 мг/кг внутривнутрибрюшинно) на модели судорог, индуцированных коразолом, однако не оказывал существенного влияния на продолжительность латентного периода миоклонических и клонических судорог у животных, получавших соединение РУ-1205 (10 мг/кг внутривнутрибрюшинно). Соединение РУ-1205 (10 мг/кг внутривнутрибрюшинно) и селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов U-50,488Н (4,1 мг/кг внутривнутрибрюшинно) удлиняли латентный период судорог, вызванных биккукуллином. Противосудорожный эффект исследуемых веществ полностью блокировался при предварительном введении селективного антагониста каппа-опиоидных рецепторов норбиналторфимина (non-BNI) (5 мг/кг внутривнутрибрюшинно). Полученные результаты позволяют заключить, что в реализации противосудорожного действия соединения РУ-1205 и U-50,488Н существенную роль играет активация каппа-опиоидных рецепторов.

**Ключевые слова:** бензимидазолы; противосудорожные средства; судороги; коразол; биккукуллин; каппа-опиоидные рецепторы.

### ВВЕДЕНИЕ

Каппа-опиоидные агонисты в настоящее время рассматривают в качестве перспективных средств для коррекции судорожных состояний [9]. Показано, что недостаточная экспрессия гена эндогенного лиганда каппа-рецепторов — продинорфина — ассоциирована с повышением судорожного порога и склонности к развитию эпилепсии, как у животных, так и у человека [10]. Также установлено, что активация каппа-опиоидной системы мозга определяет противосудорожные и нейропротективные эффекты [7].

В результате предварительных исследований выявлено, что соединение РУ-1205 с экспериментально установленным каппа-рецепторным профилем фармакологической активности проявляет выраженные противосудорожные свойства на различных моделях эпилептогенеза, в том числе и при судорогах, вызванных

специфическими блокаторами ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [1, 3]. Данные факты послужили предпосылкой к оценке вклада бензодиазепинового сайта ГАМК-ионотропного комплекса и каппа-опиоидного рецептора в реализацию антиконвульсивного эффекта соединения РУ-1205.

Целью настоящей работы явилось изучение рецептор-зависимых механизмов противосудорожного действия нового производного имидазо[1,2-а]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205 в сравнении с агонистом бензодиазепиновых рецепторов диазепамом и каппа-агонистом U-50,488Н.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали противосудорожную активность нового производного бензимидазола — соединения под лабораторным шифром РУ-1205 (дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола), синтезированного в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. В экспериментах использовали коразол (“Sigma”, США), флумазенил (“Sigma”, США), биккукуллин (“Sigma”, США), антагонист каппа-рецепторов норбиналторфимин (non-BNI, “Sigma”, США). Препараты сравнения — диазепам («Реланиум», Польша), селективный каппа-агонист U-50,488Н (“Sigma”, США).

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ВолгГМУ, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; e-mail: olesiaigrechko@mail.ru

<sup>2</sup> Волгоградский медицинский научный центр, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

<sup>3</sup> НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Россия, 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2.

Таблица 1. Протокол введения изучаемых соединений в тесте судорог у мышей, вызванных коразолом

Группа (n = 10)	Время после введения		
	0 мин	через 5 мин	через 35 мин
Контроль	0,1 мл/кг дистиллированной воды	0,1 мл/кг дистиллированной воды	
Флумазенил	10 мг/кг флумазенил	0,1 мл/кг дистиллированной воды	
РУ-1205	0,1 мл/кг дистиллированной воды	10 мг/кг РУ-1205	Коразол
Флумазенил + РУ-1205	10 мг/кг флумазенил	10 мг/кг РУ-1205	75 мг/кг
Диазепам	0,1 мл/кг дистиллированной воды	1 мг/кг диазепам	
Флумазенил + диазепам	10 мг/кг флумазенил	1 мг/кг диазепам	

Эксперименты проводили на 120 половозрелых белых беспородных мышках-самцах массой 19–25 г (ФГУП ПЛЖ “Рапполово”). Животных содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (в соответствии с применимыми требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025 – 2009, ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 и “Правилами лабораторной практики”, утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, “ГОСТ 33044-2014. Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики” с соблюдением “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” [Directive 2010/63/EU]). Эксперименты выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [2], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств”. Все эксперименты одобрены Этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета (протокол № 149 – 2012 от 17 декабря 2011 г.).

Оценка роли бензодиазепинового сайта ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в реализации противосудорожного действия соединения РУ-1205 и препарата сравнения диазепама изучали на модели судорог, вызванных коразолом, на фоне введения антагониста бензодиазепинового рецептора флумазенила [5]. Было выделено 6 групп животных, протокол введения соединений представлен в табл. 1.

Изучаемые соединения, флумазенил и растворитель (дистиллированная вода) вводили внутривенно.

Коразол вводили подкожно, наблюдение осуществляли в течение 30 мин.

Вклад каппа-опиоидной рецепторной системы в противосудорожную активность соединения РУ-1205 и препарата сравнения U-50,488H изучали на модели судорог, вызванных биккуллином, на фоне антагониста каппа-опиоидных рецепторов nor-BNI [7]. Выделено 6 групп животных, протокол назначения веществ приведен в табл. 2.

Все изучаемые соединения и растворитель вводили внутривенно. Биккуллин растворяли в дистиллированной воде с добавлением 0,1 М HCl до pH 3,0. Период наблюдения составлял 30 мин.

Статистический анализ выполнен по методу ANOVA с постобработкой тестом Tukey или с помощью критерия Краскела-Уолиса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Коразол вызывал у 100 % контрольных животных судорожные припадки. Латентный период миоклонических и клонических судорог группы флумазенила был сопоставим с таковым у животных негативного контроля (табл. 3).

Соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг вызывало статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение латентного периода миоклонических и клонических судорог в 3 и 2,5 раза соответственно по сравнению с контрольными животными. При этом флумазенил за 5 мин до инъекции соединения РУ-1205 незначительно влиял на продолжительность латентного периода миоклонических и клонических судорог.

Диазепам в дозе 1 мг/кг также пролонгировал латентный период миоклонических судорог в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) и полностью предотвращал развитие клони-

Таблица 2. Протокол введения изучаемых соединений на модели судорог у мышей, вызванных биккуллином

Группа (n = 10)	Время после введения		
	0 мин	через 90 мин	через 120 мин
Контроль	0,1 мл/кг дистиллированной воды	0,1 мл/кг дистиллированной воды	
Nor-BNI	5 мг/кг Nor-BNI	0,1 мл/кг дистиллированной воды	
РУ-1205	0,1 мл/кг дистиллированной воды	10 мг/кг РУ-1205	Биккуллин
Nor-BNI + РУ-1205	5 мг/кг Nor-BNI	10 мг/кг РУ-1205	5,5 мг/кг
U-50,488H	0,1 мл/кг дистиллированной воды	4,1 мг/кг U-50,488H	
Nor-BNI + U-50,488H	10 мг/кг флумазенил	4,1 мг/кг U-50,488H	

ческих судорог. Данные эффекты диазепама были практически полностью устранены предварительным введением флумазенила до уровня, сопоставимого с группой контроля.

На модели судорог, вызванных бикикуллином, продолжительность латентного периода клонических и тонических судорог у контрольных животных составила 369 и 634 с соответственно. У мышей, которым вводили только *nor*-BNI, латентный период клонических и тонических судорог несколько сократился по сравнению с негативным контролем, однако статистический анализ не выявил значимых различий (табл. 4).

У животных, которым вводили соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг или U-50,488H в дозе 4,1 мг/кг латентный период клонических судорог увеличился в 1,4 и 1,3 раза соответственно, латентный период тонических судорог возрос в 1,6 и 1,4 раза соответственно по сравнению с группой, получавшей растворитель ( $p < 0,05$ ). Предварительное введение *nor*-BNI устранило описанные эффекты, при этом латентные периоды судорог статистически значимо не отличались от групп контроля.

Незначительное увеличение латентного периода судорог на фоне введения флумазенила может объясняться тем, что данный препарат проявляет частичный агонизм к бензодиазепиновому сайту ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов и в некоторых случаях может проявлять слабую противосудорожную активность [4]. В проведенном нами исследовании флумазенил не оказывал статистически значимого влияния на продолжительность латентного периода у контрольных животных и в группе, получавшей соединение РУ-1205, тем не менее практически полностью блокировал эффект диазепама. Полученные результаты позволяют заключить, что противосудорожная активность соединения РУ-1205 преимущественно не связана с активацией бензодиазепинового сайта.

Таблица 3. Влияние флумазенила (10 мг/кг внутривнутрино) на противосудорожную активность соединения РУ-1205 (10 мг/кг внутривнутрино) и диазепама (1 мг/кг внутривнутрино) на модели судорог, вызванных коразолом (75 мг/кг подкожно) (M ± SE)

Группа (n = 10)	Латентный период, с	
	миоклонических судорог	клонических судорог
Контроль	121,8 ± 12,8	478,6 ± 41,4
Флумазенил	126,3 ± 18,04	420,3 ± 50,7
РУ-1205	416,3 ± 43,4*	1280,0 ± 57,7*
Флумазенил + РУ-1205	398,6 ± 57,8*	1193,0 ± 68,0*
Диазепам	443,1 ± 61,9*	—
Флумазенил + диазепам	136,0 ± 23,2	515,3 ± 28,2

\* Статистически значимые различия с группой контроля и флумазенила ( $p < 0,05$ ).

В ранее проведенных исследованиях сообщается, что селективный агонист каппа-рецепторов U-50,488H проявляет противосудорожное действие на различных моделях судорог [6]. Также установлено [8], что U-50,488H при подкожном введении в диапазоне доз 0,6 – 80 мг/кг оказывает дозозависимое антиконвульсивное действие на модели судорог, вызванных бикикуллином. В дозе 4,1 мг/кг U-50,488H статистически значимо увеличивал порог судорожной активности почти в 2 раза.

В настоящей работе показано, что эффект U-50,488H являлся *nor*-BNI-обратимым (5 мг/кг внутривнутрино), что позволяет предположить преобладание каппа-рецепторного механизма в реализации антиконвульсивного действия. При этом *nor*-BNI не вызывал судорожных явлений у интактных животных.

В настоящее время представлены убедительные доказательства участия эндогенных каппа-опиоидов в регуляции возбуждающих процессов головного мозга, при этом их концентрация значительно возрастает во время судорожного приступа [6]. Также установлено, что агонисты каппа-опиоидных рецепторов модулируют ионные каналы, преимущественно подавляя кальциевые токи нейронов [8]. Предполагается, что постсинаптические каппа-рецепторы могут тормозить распространение патологического возбуждения, которое возникает в результате блока постсинаптических ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикикуллином, за счет угнетения кальциевого тока [8].

Таким образом, устранение влияния РУ-1205 на латентный период клонических и тонических судорог селективным каппа-антагонистом *nor*-BNI позволяет заключить, что в реализации антиконвульсивного действия изучаемого соединения доминирующую роль играет каппа-рецепторная система. Данный эффект носит обратимый характер и может блокироваться введением селективного антагониста.

Таблица 4. Влияние селективного антагониста каппа-опиоидных рецепторов *nor*-BNI (5 мг/кг внутривнутрино) на противосудорожную активность соединения РУ-1205 (10 мг/кг внутривнутрино) и U-50,488H (4,1 мг/кг внутривнутрино) на модели судорог, вызванных бикикуллином (5,5 мг/кг внутривнутрино) (M ± SE)

Группа (n = 10)	Латентный период, с	
	клонических судорог	тонических судорог
Контроль (растворит.)	376,2 ± 25,6	632,7 ± 65,8
<i>nor</i> -BNI	354,6 ± 30,9	612,8 ± 42,4
РУ-1205	529,8 ± 47,1*	976,6 ± 74,4*
<i>nor</i> -BNI + РУ-1205+	392,9 ± 24,6	682,2 ± 66,2
U-50,488H	486,9 ± 31,9*	913,8 ± 49,5*
<i>nor</i> -BNI + U-50,488H	372,2 ± 29,1	625,6 ± 55,0

\* Статистически значимые различия с группой контроля и *nor*-BNI ( $p < 0,05$ ).

## ВЫВОДЫ

1. Соединение РУ-1205 (10 мг/кг внутривенно) пролонгировало латентный период миоклонических и клонических судорог, индуцированных коразолом на 241,8 и 167,5 %, соответственно,  $p < 0,05$ . Диазепам (1 мг/кг внутривенно) статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивал латентный период миоклонических судорог на 263,8 % и полностью предотвращал развитие клонических судорог. Флумазенил (10 мг/кг внутривенно) устранял указанные эффекты диазепама и не влиял на продолжительность латентного периода у животных, получавших соединение РУ-1205.

2. Соединение РУ-1205 и U-50,488H статистически значимо увеличивали латентный период клонических и тонических судорог, вызванных биккуллином в среднем на 41 и 54 %; 30 и 44 %, соответственно,  $p < 0,05$ . Данные эффекты устранялись селективным антагонистом каппа-опиоидных рецепторов nor-BNI, что свидетельствует о ключевой роли каппа-опиоид-

ной рецепторной системы в реализации противосудорожного действия соединения РУ-1205.

## ЛИТЕРАТУРА

1. К. Ю. Калитин, О. Ю. Гречко, А. А. Спасов, В. А. Анисимова, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(4), 3 – 5 (2015).
2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Москва (2012).
3. А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, К. Ю. Калитин, *Вестн. Волг. ГМУ*, **50**(2), 120 – 122 (2014).
4. A. Albiero, *J. Epilepsy & Behav.*, **23**(2), 168 – 170 (2012).
5. H. Hosseinzadeh, S. Parvardeh, *J. Phytomed.*, **11**(1), 56 – 64 (2004).
6. C. M. McDermott, L. A. Schrader, *J. Physiol.*, **589**(14), 3517 – 3532 (2011).
7. E. Schunk, *J. Hippocampus.*, **21**(9), 1010 – 1020 (2011).
8. Y. Yajima, M. Narita, Y. Takahashi-Nakano, *J. Brain Res.*, **862**(1), 120 – 126 (2000).
9. L. Zangrandi, C. Schwarzer, *J. BMC Pharmacol.*, **11** (Suppl. 2), A10 (2011).
10. L. Zangrandi, C. Schwarzer, *J. BMC Pharmacol. Toxicol.*, **13**(Suppl. 1), A91 (2012).

Поступила 26.12.17

## RECEPTOR-DEPENDENT MECHANISMS OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE RU-1205 COMPARED TO DIAZEPAM AND U-50,488H

A. A. Spasov<sup>1,2</sup>, O. Yu. Grechko<sup>1\*</sup>, K. Yu. Kalitin<sup>1</sup>, and V. A. Anisimova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

<sup>2</sup> Volgograd Medical Science Center, Volgograd State Medical University, ul. Rokossovskogo 1g, Volgograd, 400081 Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, ul. Stachki 194/2, Rostov-on-Don, 344090 Russia

\* e-mail: olesiagrechko@mail.ru

The mechanisms of anticonvulsant action of benzimidazole derivative RU-1205 (9-(2-morpholinoethyl)-2-(4-fluorophenyl)imidazo(1,2- $\alpha$ )benzimidazole) in comparison to drug diazepam and selective  $\kappa$ -opioid receptor agonist U-50,488H were investigated using pentylenetetrazole-induced (75 mg/kg, s.c.) and bicuculline-induced (5.5 mg/kg, i.p.) seizure models. The antagonist of benzodiazepine site in the GABA<sub>A</sub>-BZD receptor complex, flumazenil (10 mg/kg, i.p.) completely blocked the anticonvulsant effect of diazepam (1 mg/kg, i.p.) on the pentylenetetrazole-induced seizure model in mice, but did not show any effect on the duration of latency to myoclonic and clonic seizures in RU-1205 (10 mg/kg, i.p.) treated mice. Both RU-1205 (10 mg/kg, i.p.) and U-50,488H (4.1 mg/kg, i.p.) significantly prolonged the latency time of bicuculline-induced convulsions in mice. The inhibitory effects of RU-1205 and U-50,488H were completely blocked by pretreatment with nor-binaltorphimine (5 mg/kg, i.p.), another selective  $\kappa$ -opioid receptor antagonist. These results emphasize the important role of  $\kappa$ -opioid receptors in the anticonvulsant action of RU-1205 and U-50,488H.

**Keywords:** benzimidazole derivatives; anticonvulsant; seizure; pentylenetetrazole; bicuculline;  $\kappa$ -opioid receptors.