

## ВПЛИВ ПОЄДНАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДІАЗЕПАМУ ТА КЕТОГЕННОЇ ДІЄТИ НА ПРОЯВИ ФАРМАКОЛОГІЧНО РЕЗИСТЕНТНОГО СУДОМНОГО СИНДРОМУ

©В. О. Полясний

Одеський національний медичний університет

**РЕЗЮМЕ.** Показано, що судоми відтворені через три тижні з моменту відтворення генералізованого кіндлінгового синдрому шляхом внутрішньоочеревинного введення коразолу (30,0 мг/кг) на протязі трьох тижнів є стійкими до дії діазепаму (0,5 мг/кг, в/очер). В той же час неефективна доза діазепаму (0,1 мг/кг, в/очер) на тлі двотижневого застосування кетогенної дієти (80 % ліпідів, 3,3 % вуглеводів і 16,7 % білків) попереджала виникнення генералізованих клоніко-тонічних проявів у 53,3 % експериментальних тварин. Комбіноване застосування діазепаму та кетогенної дієти знижувало виразність післянападової рухової депресії тварин у тесті відкритого поля.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** судоми, кіндлінг, коразол, діазепам, кетогенна дієта, прозапальні цитокіни.

**Вступ.** Встановлено, що при формуванні епілептичного синдрому важливим механізмом є посилення активності ендогенної системи прозапальних цитокінів [1, 2]. Так, рівень фактора некрозу пухлин-альфа (ФНП-альфа) та інтерлейкіну-1-бета (ІЛ-1-бета) підвищується в тканині мозку щурів при моделюванні кіндлінгового епілептичного синдрому [4]. Вказують на патогенетичне значення цієї системи за умов формування хронічної епілептизації мозку, її значення в механізмах порушень ГАМК-ергічного гальмівного контролю нейрональних структур та виникнення патологічно посиленого їх збудження [5].

Встановлено, що в основі протиепілептичної дії кетогенної дієти (КД) лежить комплексний вплив, який включає антиоксидантну дію, корекцію нейро-медіаторних механізмів контролю збудливості нейрональних утворень мозку, в тому числі за рахунок зниження вивільнення прозапальних цитокінів [3, 6]. Однак, залишаються нез'ясованими питання ефективності контролю резистентної до лікування кіндлінгової судомної активності за умов поєднання КД з активацією бензодіазепінових механізмів мозку.

**Метою нашого** дослідження було вивчення особливостей судом та поведінки щурів в тесті відкритого поля у віддаленому періоді коразолового кіндлінгу за умов застосування КД, а також діазепаму.

**Матеріал та методи дослідження.** Спостереження виконано за умов гострого експерименту на щурах-самцях лінії Вістар масою 180–250 г за стандартних умов утримання віварію ОНМедУ. Досліди проводили згідно з вимогами GLP та комісії біоетики ОНМедУ (протокол № 84 від 10 жовтня 2008 р.).

До складу кетогенної дієти входило 80 % ліпідів, а також 3,3 % вуглеводів та 16,7 % білків [9]. На вказаній дієті щурів утримували протягом 2 та 4 тижнів, починаючи з моменту відтворення моделі кіндлінгових судом і наприкінці кожного тижня застосовували тестувальну дозу коразолу.

Кіндлінг відтворювали шляхом однократних щодобових введень субконвульсивної дози кора-

золу (30,0 мг/кг внутрішньоочеревинно) протягом трьох тижнів [4]. В подальших спостереженнях використовували щурів, у яких останні три ін'єкції викликали генералізовані клоніко-тонічні судомні напади. Цим тваринам (50 щурів) через три тижні з моменту відтворення кіндлінгу внутрішньоочеревинно застосовували тестувальну дозу коразолу (30,0 мг/кг). Тяжкість судом оцінювали за п'ятибальною шкалою [4].

Діазепам («Гедеон Ріхтер», Угорщина) вводили внутрішньоочеревинно виходячи із розрахунку 0,1 та 0,5 мг/кг. Коразол (30,0 мг/кг, в/очер) вводили через півгодини після застосування препарату.

Визначали число тварин з генералізованими судомними реакціями. Тваринам контрольної групи замість препаратів застосовували аналогічний об'єм 0,9 % розчину NaCl.

Дослідження поведінки щурів в тесті «відкритого поля» проводили через 24 год з моменту тестувального введення коразолу.

Оцінку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих в медико-біологічних дослідженнях статистичних критеріїв – ANOVA+ Newmann-Keuls, а також точного критерію Фішера для чотирипольної таблиці.

**Результати досліджень й обговорення.** У віддаленому періоді коразолового кіндлінгу тестуюче введення коразолу (30,0 мг/кг, в/очер) супроводжувалось виникненням клоніко-тонічних судом у всіх експериментальних тварин, які мали повторний характер і виникали в окремих тварин послідовно від 2 до 5 разів протягом півгодини спостереження.

Застосування діазепаму у щурів у віддаленому періоді кіндлінгу у відносно високій дозі (0,5 мг/кг) попереджало генералізовані клоніко-тонічні напади у 21,5 % тварин ( $P > 0,025$ ), в той час як за умов раннього періоду кіндлінгу (24 г) з моменту останнього кіндлінгового подразнення, яке викликало генералізовані судоми, аналогічна доза препарату попереджало генералізовані судоми у 8 з 11 (72,7 %) тварин ( $P < 0,025$ ).

Під впливом КД тривалістю 2 тижні у 35,7% тварин кіндлінгове введення коразолу не викликало розвитку генералізованих судом ( $P > 0,025$ ), тоді

як застосування КД протягом чотирьох тижнів су-проводжувалось превентивним ефектом у 20,0 % ( $P > 0,025$ ) (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив роздільного та поєданого використання діазепаму та кетогенної дієти у віддаленому періоді коразолового кіндлінгу у щурів

	Співвідношення числа щурів з судомами виразністю 4–5 балів до загального числа тварин в групі	P у порівнянні до контролю (критерій Фішера)
Контроль	15/15	-
Діазепам (0,1 мг/кг)	13/14	0,025
Діазепам (0,5 мг/кг)	11/14	$>0,025$
КД (2 тижні)	9/14	$>0,025$
КД (4 тижні)	12/15	$>0,025$
КД (два тижні) + діазепам (0,1 мг/кг)	7/15	$<0,025$
КД (чотири тижні) + діазепам (0,5 мг/кг)	4/15	$<0,025$

За умов комбінованого застосування діазепаму (0,1 мг/кг) на тлі двотижневого утримання щурів на КД клоніко-тонічні судоми були відсутні у 53,3 % експериментальних тварин ( $P < 0,025$ ), а при застосуванні діазепаму в дозі 0,5 мг/кг – у 60,0 % ( $P < 0,025$ ), що також було достовірно вище, ніж в групах, в яких застосовували діазепам та КД самотійно ( $P < 0,025$ ).

При дослідженні щурів у відкритому полі не було зареєстровано відмінностей між кіндлінговими тваринами та інтактними щурами ( $P > 0,05$ ). Однак, після тестуючого введення коразолу (30,0 мг/кг внутрішньоочеревинно) у кіндлінгових щурів спостерігалось різке пригнічення рухової активності – число перетнутих квадратів знижувалось в 3,17 раза у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).

Під впливом застосування одного діазепаму (0,5 мг/кг) загальне число пересічених квадратів зменшувалось на 55,5 % порівняно з вихідними показниками у кіндлінгових щурів, в тому числі зовнішніх квадратів зменшувалось на 57,6 % ( $P < 0,05$ ). За умов застосування одного тільки КД (два тижні) через 24 г з моменту застосування коразолу у кіндлінгових щурів спостерігалось зниження рухової активності, що проявлялось в зменшенні числа пересічених квадратів – на 40,0 % порівняно з вихідними даними у кіндлінгових тварин ( $P < 0,05$ ). При цьому йшлося про зменшення числа пересічених зовнішніх квадратів – на 46,9 % ( $P < 0,05$ ).

Загальне число стійок при застосуванні діазепаму зменшувалось в 4,7 раза, а при застосуванні КД – в 3,4 раза, в той час як при комбінованому застосуванні КД та діазепаму цей показник, порівняно з аналогічним у вихідному фоні, зменшувався на 41,8 % ( $P < 0,05$ ). Причому, він був достовірно більшим, порівняно з показниками в групі кіндлінгових тварин, яким не використовували препарати (в 4,3 раза), а також в групі кіндлінгових щурів з введенням одного діазепаму (в 2,7 раза) ( $P < 0,05$ ). Число стійок з опорою за умов одночас-

ного використання КД та діазепаму не відрізнялось від такого у вихідному фоні, і перевищувало показник у кіндлінгових щурів через 24 г з моменту введення тестуючої дози коразолу в 3,6 раза ( $P < 0,05$ ). Водночас число стійок без опори залишалось меншим, порівняно з таким у вихідному фоні (в 3,7 раза) ( $P < 0,05$ ).

Отримані результати свідчать, що у віддаленому періоді коразолового кіндлінгу, що є моделлю резистивної форми епілепсії [1, 4, 10] у щурів спостерігається певне зниження протиепілептичної ефективності діазепаму, який навіть при його застосуванні в дозі 0,5 мг/кг внутрішньоочеревинно не викликав протективного ефекту у відношенні до генералізованих клоніко-тонічних судомних нападів, в той час коли при гострих формах судом подібна доза препарату є ефективною [4, 7]. Слід зазначити, що зниження ефективності діазепаму у віддаленому періоді кіндлінгу може в певній мірі відображати відомі ефекти толерантності до дії цього препарату [8] і слугувати в якості експериментальної моделі толерантності до впливу бензодіазепінів.

Разом з цим, застосування діазепаму в самотійно неефективних дозах одночасно з КД, яка має здатність знижувати активність ендогенної системи прозапальних цитокінів [9], супроводжується виникненням протективного антисудомного ефекту. Цей факт може вказувати на значення прозапальних цитокінів – фактора некрозу пухлин-альфа (ФНП-альфа) та інтерлейкіну-1-бета (ІЛ-1-бета) в механізмах розвитку фармакологічної резистентності кіндлінгової епілептичної активності, а також на можливий функціональний зв'язок системи з ГАМК-ергічними механізмами регуляції нейрональної збудливості [5, 10].

Можна вважати, що дія КД на функціональний стан нейронів є комплексною та здійснюється як завдяки збільшенню тонуусу ГАМКергічної гальмівної системи, антиоксидантного потенціалу, в тому числі за рахунок продукції оксиду азоту, так і

шляхом пригнічення впливу збуджуючих амінокислот [6, 9]. Як відомо, посилення ГАМКергічної медіації забезпечує підвищення нейротропних ефектів діазепаму та феназепаму, в тому числі протисудомної дії препаратів [1, 4].

Отримані результати свідчать про те, що тривале пригнічення дослідницької рухової активності кіндлінгових щурів, провоковане застосуванням тестуючої дози коразолу, у віддаленому періоді кіндлінгу зменшується за своєю виразністю за умов одночасного застосування діазепаму та КД. Цей ефект є більш виразним у відношенні до показника числа вертикальних стійок тварин, зокрема, таких, які здійснюються з опорою на стінки відкритого поля. Важливим результатом є те, що застосування діазепаму було менш ефективним у відношенні до досліджуваних у відкритому полі показників рухової активності тварин, в той час як за умов одного застосування КД вони мали позитивну тенденцію до відновлення. Можна вважати, що рухові порушення провоковані у щурів з коразоловим кіндлінгом у віддаленому періоді його розвитку є більш залежними від стану збудження ендogenous системи прозапальних цитокінів, ніж від стану ГАМК-ергічного гальмування.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Годлевський Л.С. Нейроімунологічні механізми контролю збудливості головного мозку / Л. С. Годлевський, О. М. Нєнова // *Досягнення біології та медицини*. – 2006. – № 1. – С. 75–92.
2. Евсєєв В. А. Нейроіммунопатологические аспекты эпилепсии / В. А. Евсєєв, Л. А. Ветриле, М. Н. Карпова // *Вестник РАМН*. – 2004. – Т. 8. – С. 43–46.
3. Кетогенная диета в лечении фармакорезистентных эпилепсий / Е. Л. Усачева, С. О. Айвазян, Т. Н. Сорвачева и соавт. // *Лечащий врач*. – 2004. – № 5. – С. 46–50.
4. Шандра А. А. Кіндлінг как модель эпилептической активности / А. А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов. – Одесса: Астропринт, 1999. – 276 с.
5. Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in wistar albino Glaxo/Rijswijk rats / Z. Kovacs, K. A. Kekesi, N. Szilagyi [et al.] // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 140, № 2. – P. 731–742.

Таким чином, отримані результати свідчать про можливість підвищення ефективності дії антиепілептичних препаратів (бензодіазепінів) за умов їх застосування з препаратами, дія яких полягає в зниженні функціональної активності системи прозапальних цитокінів у відношенні до фармакологічно резистентних судомних проявів.

#### Висновки:

1. Застосування діазепаму на тлі утримання щурів на кетогенній дієті на моделі резистивних до дії антиепілептичних препаратів моделі коразол-індукованої кіндлінгової епілептичної активності супроводжується виникненням протективного ефекту у відношенні до генералізованих клоніко-тонічних судомних нападів.

2. Постсудомна рухова депресія, яка викликається у віддаленому періоді кіндлінгу тестуючим застосуванням коразолу, усувається комбінованим застосуванням діазепаму та КД.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у клінічній апробації комплексу утримання пацієнтів на кетогенній дієті та застосування бензодіазепінових препаратів.

6. Increased nitric oxide caused by the ketogenic diet reduces the onset time of kainic acid-induced seizures in ICR mice / H. S. Noh, D. W. Kim, G. J. Cho [et al.] // *Brain Res*. – 2006. – Vol. 1075. – P. 193–200.

7. Loscher W. Animal models of drug resistant epilepsy / W. Loscher // In: Ling V, ed. *Mechanisms of drug resistance in epilepsy: lessons from oncology*. Chichester: Wiley, 2002. – P. 149–158.

8. Pratt J. A. Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression / J. A. Pratt, R. R. Brett. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1998. – V. 59, № 4. – P. 925–934.

9. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects / J. Freeman, P. Veggiotti, G. Lanzi [et al.] // *Epilepsy Res*. – 2006. – Vol. 68. – P. 145–180.

10. Vezzani A. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence / A. Vezzani, T. Granata // *Epilepsia*. – 2005. – Vol. 46. – P. 1–20.

## THE INFLUENCE OF COMBINED USAGE OF DIAZEPAM AND KETOGENIC DIET UPON PHARMACOLOGICALLY RESISTANT SEIZURE SYNDROME MANIFESTATIONS

©V. O. Polyasnyi

*Odessa National Medical University*

**SUMMARY.** It was shown that seizures induced in three weeks from the moment of precipitation of generalized seizures via kindled corazol administration (30,0 mg/kg. i.p., during three weeks) were resistant to diazepam action which in a dosage of 0,5 mg/kg (i.p.) did not protect from seizures induction in response to testing epileptogen administration. At the same time, diazepam dosage, which did not cause antiseizure action (0,1 mg/kg, i.p.) being administered during two week maintenance of rats on ketogenic diet (80 % of lipids, 3,3 % of carbohydrates and 16,7 % of proteins) prevented the incidence of generalized clonic-tonic manifestations in 53,3 % of experimental animals. Combined administration of diazepam and ketogenic diet diminished the postseizure locomotor depression determined in "open field" test.

**KEY WORDS:** seizures, kindling, corazol, diazepam, ketogenic diet, inflammatory cytokines.