

УДК 615.015.23:57.017.4

DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i2.8638

М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, А. С. Редер, І. П. Валіводзь, Т. В. Михайлова  
 ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

## АНТАГОНІЗМ АЛОСТЕРИЧНИХ МОДУЛЯТОРІВ ГАМК<sub>A</sub>-РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСУ ПРОПОКСАЗЕПАМУ ТА БЕМЕГРИДУ, ЩО МАЮТЬ СПОРІДНЕНІСТЬ ДО РІЗНИХ СУБОДИНИЦЬ МАКРОМОЛЕКУЛИ

**Вступ.** Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК), її агоністи й антагоністи не конкурують з бенздіазепінами за місця зв'язування, і їх дія має місце тільки за присутності цієї кислоти. Той факт, що бенздіазепіни полегшують перебіг судом, викликаних антагоністами, свідчить не тільки про складність ГАМК-рецепторного комплексу, але й про тісний контакт його компонентів. Аналгетичний та протисудомний компоненти фармакологічної активності нового алкоксипохідного 1,4-бенздіазепіну (пропоксазепаму) припускають його взаємодію з ГАМК<sub>A</sub>-рецептором, відмінну від місць зв'язування інших бенздіазепінів.

**Мета дослідження** – провести фармакологічну оцінку протисудомної дії пропоксазепаму відносно судом, викликаних бемегридом, для визначення взаємодії місць зв'язування сполук на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторному комплексі.

**Методи дослідження.** На моделі судом, індукованих бемегридом (58 мг/кг, підшкірно, через 0,5 год після введення пропоксазепаму), визначали протисудомну дію пропоксазепаму (після його внутрішньоочеревинного введення), оцінювали час розвитку і кількість окремих типів судом (міоклонічні чи тонічні) та загальний час тривалості життя тварин.

**Результати й обговорення.** Введення пропоксазепаму збільшує час розвитку окремих типів судом у тварин. Навіть у низьких дозах, при яких не відзначають високої захисної дії (з 0,35 мг/кг), значно збільшується тривалість життя тварин порівняно з контрольною групою, але не спостерігають дозозалежного характеру між цими величинами. Антагонізм між пропоксазепамом та бемегридом за умов *in vivo* з високою ймовірністю відбувається через різні місця зв'язування, що проявляється відсутністю дозозалежності між часом тривалості життя та дозою пропоксазепаму. Не визначено значущої різниці між часом виникнення окремих компонентів судом (міоклонічні чи тонічні) та їх кількістю в бемегриду і пікротоксину та їх гальмування пропоксазепамом.

**Висновки.** Встановлено, що  $ED_{50}$  пропоксазепаму в даній моделі становить  $(0,96 \pm 0,12)$  мкмоль/кг. Із підвищенням його дози відмічають збільшення часу виникнення міоклонічних судом, що вказує на здатність сполуки підвищувати функціональну активність ГАМК-ергічної системи, заблокованої бемегридом. При введенні відносно високих доз пропоксазепаму ( $>1,5$  мг/кг) спостерігають ефективніше гальмування тонічних судом із майже повною репрезентацією судомного нападу у вигляді міоклонічного компонента. У дозі 4 мг/кг пропоксазепам повністю блокує розвиток цих судом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пропоксазепам; бемегрид; судомі; хемоконвульсанти.

ВСТУП. Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК), що є основним гальмівним медіатором у мозку, здійснює свої ефекти через іонотропні ГАМК<sub>A</sub>- і метаботропні ГАМК<sub>B</sub>-рецептори. ГАМК<sub>A</sub>-рецепторний комплекс (ГАМК<sub>A</sub>-РК) належить до суперсімейства G<sub>γ</sub>-петельних лігандокерованих іонних каналів, що формується п'ятьма субодинами, які мають гомологію вихідних амінокислотних послідовностей і структурну гомологію [1, 2]. Більшість представників цього комплексу, представлених у мозку, утворена двома α-, двома β- і однією γ-субодинами [3, 4]. Усі вони

© М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, А. С. Редер, І. П. Валіводзь, Т. В. Михайлова, 2018.

зв'язують ГАМК, але найвищу афінність має α-субодина.

Існує низка речовин, що зв'язуються з ділянками рецептора, відмінних від активного центру. Вони здатні модулювати функцію ГАМК<sub>A</sub>-РК через різні алостеричні сайти та можуть бути позитивними, тобто агоністами (етанол, барбітурати, бенздіазепіни, мусцимол, нейроактивні стероїди, Z-препарати, інгаляційні анестетики), або негативними, тобто антагоністами (бемегрид, коразол, бікукулін, флумазеніл, фурсосемід, пікротоксин, RO15-4513). Незважаючи на те, що агоністи є різними за структурою, на функціональному рівні їх активація призводить до збіль-

шення часу існування комплексу рецептор – ГАМК в активному стані та розвитку стійкої гіперполяризації клітин із подальшим гальмуванням сигналів збудження. Більшість із них широко застосовують у медицині як протисудомні, анксиолітичні, снодійні та знеболювальні агенти, а антагоністи, крім флумазенілу, використовують насамперед як засоби фармакологічного аналізу.

Відомо [4], що ГАМК, її агоністи й антагоністи не конкурують з бенздіазепінами за місця зв'язування, і їх дія має місце тільки за присутності цієї кислоти. Той факт, що бенздіазепіни полегшують перебіг судом, викликаних антагоністами, свідчить не тільки про складність зазначеного комплексу, але й про тісний контакт його компонентів. Тому метою цього дослідження було провести фармакологічну оцінку протисудомної дії пропоксазепаму відносно судом, викликаних бемеGRIDом, для визначення взаємодії місць зв'язування сполук на ГАМК<sub>A</sub>-РК. Таке вивчення викликає особливий інтерес, оскільки дозволяє розкривати механізми, що лежать в основі даної форми нейротоксичного процесу, та розробляти ефективні протисудомні препарати.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проводили на білих безпородних мишах обох статей (46 тварин), яких утримували відповідно до міжнародних та національних біоетичних рекомендацій (Директива Європейського Союзу 2010/10/63 EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети). Миші перебували на стандартній лабораторній дієті при природному світловому циклі з вільним доступом до води та їжі.

Пропоксазепам вводили експериментальним тваринам внутрішньоочеревинно, що запобігало впливу величини біодоступності, тривалості всмоктування, можливого ефекту первинного проходження через печінку та інших факторів на досягнення максимальної концентрації сполуки у внутрішньому середовищі організму. Тварини контрольної групи отримували аналогічний об'єм ізотонічного розчину натрію хлориду. БемеGRID (58 мг/кг) вводили підшкірно через 0,5 год після введення пропоксазепаму в різних дозах. Починаючи з моменту введення хемоконвульсанта, фіксували час початку та кількість судом різної тяжкості (міоклонічні й тонічні), а також загальний час тривалості життя тварин.

Кількісним критерієм захисної дії сполуки була величина ED<sub>50</sub> (мг/кг та ммоль/кг), при якій вірогідність прояву захисної дії в 50 % тварин є найбільшою. Захисний ефект сполуки оцінювали за первинними показниками мишей, які ви-

жили в кожній окремій групі. Розрахунок величини ED<sub>50</sub> здійснювали з використанням скорегованих показників вірогідності розвитку ефекту пробіт-методом [5, 6]. Розрахунок нахилу кривої “доза – ефект” проводили за формулою:

$$s = \left( \frac{ED_{82} + ED_{50}}{ED_{50} + ED_{18}} \right) \cdot 0,5,$$

де ED<sub>18</sub>, ED<sub>50</sub> та ED<sub>82</sub> – розраховані дози, що відповідають розвитку ефекту в 18, 50 і 82 % тварин (дози у межах  $\pm 1\sigma$ ).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Для визначення можливої взаємодії окремих компонентів ГАМК<sub>A</sub>-РК необхідним було уточнення спорідненості пропоксазепаму та бемеGRIDу до відповідних місць зв'язування макромолекули.

Пропоксазепам (7-бром-5(о-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-он) розроблено у Фізико-хімічному інституті імені О. В. Богатського НАН України. Під час доклінічних досліджень було виявлено низку його позитивних фармакологічних властивостей, зокрема анагетичну дію за умов поєданого (соматогенного та нейропатичного) болювого синдрому [7, 8]. Інноваційність сполуки захищена відповідним патентом України [9], триває широке доклінічне її вивчення. Пропоксазепам належить до похідних бенздіазепіну, тому з достовірністю можна припустити, що, як і всі представники цього класу сполук [10], він взаємодіє лише з рецепторами, в яких є  $\delta$ -субодинація, а точніше із сайтом в інтерфейсі між  $\alpha$ - і  $\gamma$ -субодинаціями. Тільки зв'язуючись зі своїм місцем спорідненості, бенздіазепіни викликають конформаційні зміни рецептора, які зумовлюють підвищення його афінності до ГАМК. Цей тип взаємодії – приклад алостеричної модуляції, коли максимальні струми, спричинені ГАМК, не змінюються, а концентраційна крива для ГАМК зсувається в зону більш низьких концентрацій.

З метою уточнення механізму рецепторно-лігандної взаємодії пропоксазепаму було оцінено відповідні експериментальні показники молекулярного докінгу низки похідних 1,4-бенздіазепіну різного фармакологічного спектра дії [11]. Серед 19 вивчених лігандів 14 представників мають спільне місце зв'язування на бенздіазепіновому сайті ГАМК<sub>A</sub>-РК. Аналіз розташування амінокислот на рецепторі показав, що вони формують два підцентри, віддалених один від одного на 20 Å. Аномально високі значення утворення зв'язку виявлено для амінокислот у другому підцентрі, три з яких (Asp-43 головного ланцюга та Gln-64 й Thr-176 бокового) беруть участь у взаємодії з пропоксазепамом. Отримані дані підтверджено [12] в дослідях *in vitro*, в яких визначено параметри зв'язування пропоксазепаму

із синапсоматомами мозку щурів ( $K_i$  гальмування специфічного зв'язування  $[^3\text{H}]$ флумазенілу становить  $(3,5 \pm 0,3)$  нМоль). За величиною ГАМК-зсуву сполуку віднесено до повних агоністів ГАМК-рецепторного комплексу.

Що стосується бемеґриду, то дані про його взаємодію з ГАМК<sub>A</sub>-РК суперечливі. Деякі автори [13] припускають, що бемеґрид є парціальним агоністом барбітурового алостеричного сайту макромолекули. В організмі він конкурує з барбітуратами за рецептор, конкретно за  $\alpha$ - та  $\beta$ -субодиниці, й витісняє їх з нього. Оскільки внутрішня активність бемеґриду незначна, то після зв'язування з рецептором він практично не стимулює його і підвищені під впливом барбітуратів хлорогальмівні струми знижуються, не перешкоджаючи розповсюдженню збудження у ЦНС. Найімовірніше, такий висновок було зроблено на підставі відомих даних про антидотні властивості бемеґриду відносно барбітуратів.

Більш реальною є концепція, в якій [14] бемеґрид, поряд із пікротоксином, коразолом, пеніциліном, відносять до так званих ГАМК-літиків, тобто антагоністів (блокаторів) хлоронних каналів ГАМК<sub>A</sub>-РК. Такі сполуки мають низку загальних властивостей. По-перше, всі вони є високотоксичними судомними агентами. По-друге, спостерігають їх антагонізм щодо електрофізіологічної дії ГАМК на біомембрани. По-третє, більшість з них гальмує зв'язування специфічних лігандів хлоронних каналів  $^3\text{H}$ -третбутилбіциклоортобензоату ( $^3\text{H}$ -ТОВО) і  $^{35}\text{S}$ -третбутилбіциклофосфортіонату ( $^{35}\text{S}$ -ТВПС). Останній є основною сполукою в радіолігандних дослідженнях ГАМК<sub>A</sub>-РК. Крім того, ці судомні агенти гальмують потік хлору в нейрональних мембранах, що свідчить про блокування іонофору. Зазначені результати базуються на радіолігандних, імуноцитохімічних та електрофізіологічних дослідженнях *in vitro*, дають інформацію тільки про спорід-

неність ліганду до рецептора і не враховують таких важливих складових організму, як бар'єрні механізми (клітинні, гістогематичні тощо), внутрішня активність сполуки та баланс взаємодії різних медіаторних систем у ЦНС, тому в нашій моделі аналізується інтегральна фізіологічна відповідь організму при взаємодії агоніста (пропоксазепам) і антагоніста (бемеґрид) з ГАМК<sub>A</sub>-РК в експериментах *in vivo*.

Беручи до уваги нейрофізіологічну спрямованість дії бемеґриду, для аналізу протисудомної активності пропоксазепаму ми використали такі показники: 1. Інтегральні (характеристики кривої "доза – ефект"). 2. Ті, що впливають на підвищення судомної готовності мозку (міоклонічний компонент судомного нападу) та формують стійкі осередки пароксизмальної активності (зовні діагностують за розвитком тонічних судом). Окрім того, проведено порівняння протисудомної дії пропоксазепаму на моделях судом, викликаних пікротоксином та коразолом, тобто з хемоконвульсантами, мішенями яких є різні ділянки ГАМК<sub>A</sub>-РК.

Введення мишам бемеґриду в дозі 56 мг/кг (що відповідає показнику  $\text{LD}_{95}$  нейротоксичності бемеґриду) показало, що з підвищенням дози пропоксазепаму зростає захисний ефект, який у дозі 0,8 мг/кг сягає 100 %, при цьому функція "доза – ефект" у використаному інтервалі доз наближена до лінійної (рис. 1, А). У більшості випадків таким функціям притаманна сигмоїдна форма, нахил якої характеризує афінність окремого ліганду до рецептора, як, наприклад, у разі пікротоксину (рис. 1, Б), тоді як лінійність зберігається на вузькій ділянці в точці перегину (близькій до  $\text{LD}_{50}$ ). Майже лінійний характер отриманої функції для бемеґриду в інтервалі доз, що забезпечують 0–100 % ефекту, в даному випадку зумовлений порівняно низьким афінітетом сполуки. Втім, на підставі отриманих даних

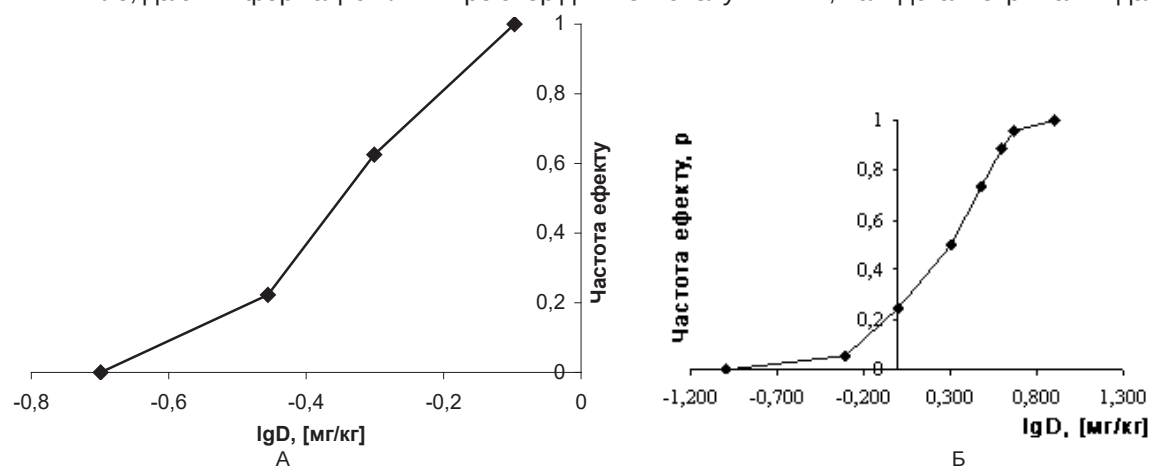


Рис. 1. Залежність величини захисної дії пропоксазепаму від дози (внутрішньоочеревинне введення) при введенні бемеґриду (56 мг/кг, підшкірно, через 0,5 год після введення пропоксазепаму – А) та пікротоксину (6,5 мг/кг, підшкірно – Б) [15].

пробіт-методом було розраховано середню ефективну захисну дозу пропоксазепаму, яка становила  $(0,39 \pm 0,05)$  мг/кг із кутом нахилу кривої  $s=1,19$ .

З метою ідентифікації місць зв'язування бемегриду з ГАМК<sub>A</sub>-РК для порівняння ми використали наші попередні дані [15], які стосуються взаємодії пікротоксину та коразолу з відповідними рецепторами. Пікротоксин, як було зазначено раніше [14], на відміну від бікукуліну, конкурентного антагоніста ГАМК, є неконкурентним антагоністом, оскільки діє всередині іонного каналу, а не на сайт зв'язування ГАМК. Коразол належить до ліганду ГАМК<sub>A</sub> - та гліцинергічної систем [16, 17], хоча його місця зв'язування ідентифіковано й у хлоріонофорному каналі ГАМК<sub>A</sub>-РК, внаслідок чого його ефект часто характеризують як "неконкурентний" відносно похідних 1,4-бенздіазепіну, які мають протисудомну дію [18, 19].

Так, для коразолу ми спостерігали найнижчу нейротоксичність ( $LD_{95}$  120 мг/кг, 0,87 ммоль/кг) в організмі мишей, що перевищувало аналогічні показники для бемегриду (58,0 мг/кг, 0,37 ммоль/кг) та пікротоксину (6,5 мг/кг, 0,022 ммоль/кг). Звідси необхідність різних доз пропоксазепаму для еквівалентного гальмування судом, викликаних цими хемоконвульсантами ( $ED_{50}$  0,4, 4,1 та 2,2 мг/кг відповідно для бемегриду, пікротоксину і коразолу). Показник нахилу кривої залежності "доза – ефект" становить таку закономірність: 1,19; 0,79; 0,82.

Отже, незважаючи на те, що бемеGRID, пікротоксин та коразол мають ідентичне місце зв'язування на ГАМК<sub>A</sub>-РК, показники, які характеризують нейротоксичність цих сполук та протисудомну активність пропоксазепаму, в зазначених моделях відрізняються. Щодо співвідношення показників  $ED_{95}/ED_{50}$ , то вони можуть свідчити про те, що бемеGRID (58,0/0,4) та коразол (120/2,2), на відміну від пікротоксину (6,5/4,1), зв'язуються з низькоафінним місцем хлоріонофору ГАМК<sub>A</sub>-РК. Це також підтверджується різними величинами кута нахилу кривої залежності "доза – ефект". Наявність різних за ступенем зв'язування агоністів та антагоністів на рецепторі доведена [20]. Водночас ми не виключаємо можливості зв'язування бемегриду з аналогічними амінокислотними залишками відповідного сайту ГАМК<sub>A</sub>-РК, з якими взаємодіють і пікротоксин, і коразол. Міцність такого зв'язування залежить від фізико-хімічних властивостей ліганду. В даному випадку наявність відповідних груп у структурі бемегриду, які можуть створювати водневі та гідروفобні зв'язки з рецептором, свідчить про незначну його афінність. Так, пікротин (активна речовина пікротоксину) має сім акцепторів водневого зв'язку та володіє значною

площею полярної поверхні ( $105,59 \text{ \AA}^2$ ) і низькою величиною ліпофільності ( $\log P=-0,99$ ), що призводить до більш міцної взаємодії з рецептором. Навпаки, бемеGRID має лише два атоми-акцептори, здатних утворювати водневий зв'язок, внаслідок чого його взаємодія з ГАМК<sub>A</sub>-рецептором є значно слабшою. З огляду на те, що величина топологічної площі полярної поверхні бемегриду та коразолу майже однакова, саме наявність акцепторів водневого зв'язку (три для коразолу і два для бемегриду) можна розглядати як провідний фактор низької афінності до ГАМК<sub>A</sub>-РК.

Отже, відсутність конкуренції між пропоксазепамом і бемеGRIDом за місця зв'язування на ГАМК<sub>A</sub>-РК є підставою вважати, що протисудомна активність бенздіазепіну може бути опосередкована алостеричним посиленням спорідненості ГАМК до рецепторів або, найімовірніше, кооперативним, спільно з ГАМК, впливом на іонофори, а саме на хлорний канал, місцем зв'язування бемегриду.

Розвиток збудження в ЦНС і подальше досягнення летальної дії є кінцевою стадією взаємодії ГАМК, пропоксазепаму та бемегриду. Цей період також охоплює окремі проміжні етапи, які відображаються на фізіологічному рівні у вигляді довільних скорочень скелетних м'язів. У подальшій роботі ми вивчили особливості зазначених процесів, що дало можливість уточнити деякі зі сторін антагоністичної взаємодії пропоксазепаму та бемегриду.

Протягом експерименту реєстрували поведінкові показники судомної активності, що представлені міоклонічними і тонічними судомами, виникнення яких пов'язане з формуванням осередків епілептоформної активності та генералізацією генерованого ними збудження відповідно. Перший показник відповідає утворенню спорадичних осередків епілептоформної активності, які в подальшому можуть перетворюватись у центри пароксизмальної активності, та характеризує власне епілептоформну готовність мозку. Також визначали час початку міоклонічних судом, зміна якого (за умов постійного та рівного надходження бемегриду з місця введення до ЦНС) непрямо характеризує здатність мозку до судомної активності.

У тварин контрольної групи (рис. 2, А) час розвитку міоклонічних судом після введення бемегриду становив близько 2 хв. Введення доз пропоксазепаму, що підвищуються, поступово збільшує цей час, хоча в інтервалі доз, при яких не спостерігають 100 % захисної дії, такі зміни не зазнають статистично вірогідної різниці. Проте з підвищенням дози пропоксазепаму відмічають і збільшення часу виникнення міоклонічних

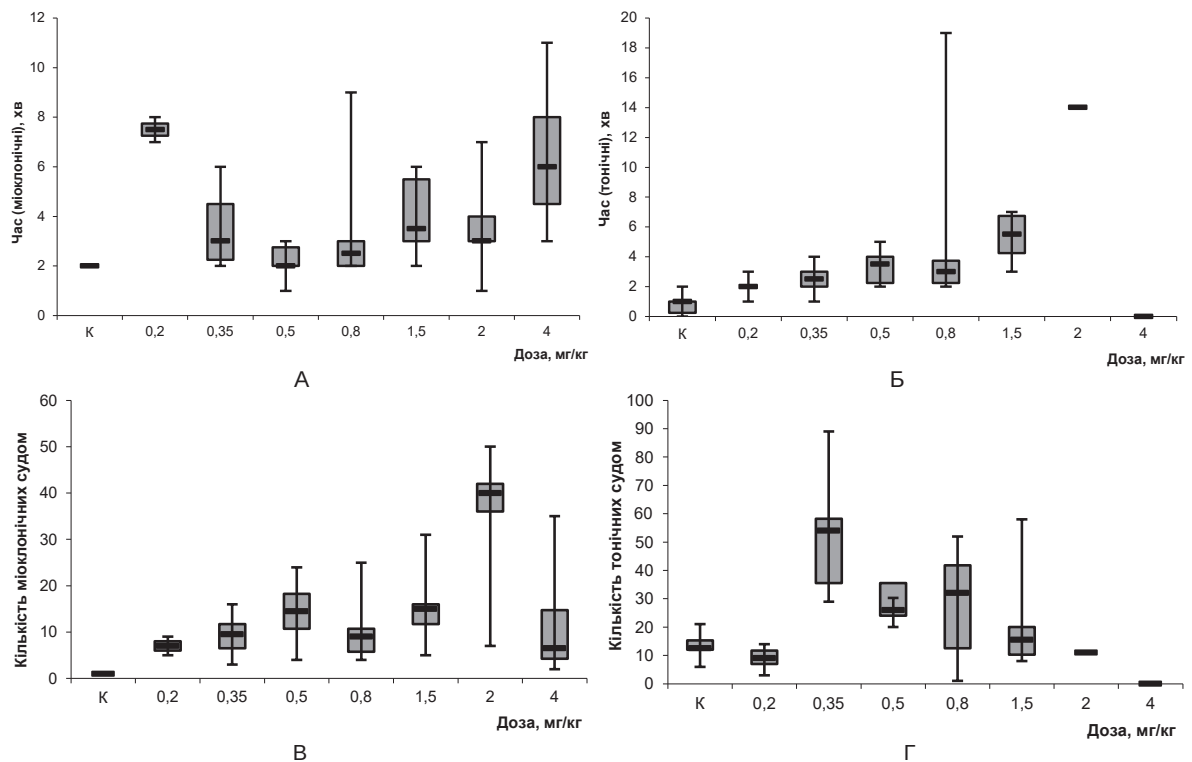


Рис. 2. Зміна латентного часу розвитку міоклонічних (А) і тонічних (Б) судом та їх кількості (В – міоклонічні, Г – тонічні) при введенні бемегриду (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення різних доз пропоксазепаму (0,5 год, внутрішньоочеревинно).

судом, що свідчить про здатність сполуки підвищувати функціональну активність ГАМК-ергічної системи, блокованої бемегридом. Слід зазначити, що не тільки кількість міоклонічних судом у контрольній групі, але й розкид цих значень (рис. 2, В) є значно меншими за відповідні показники в експериментальних групах, що пов'язано зі швидкістю розповсюдження та генералізацією збудження, внаслідок чого розвиваються не міоклонічні, а тонічні судоми. Навпаки, при підвищенні дози пропоксазепаму відмічають зростання кількості міоклонічних судом, що є менш обтяженими порівняно з тонічними, а при введенні пропоксазепаму у високий дозі (4 мг/кг) навіть спостерігають часткове (статистично невірне) зниження кількості міоклонічних судом.

Тонічні судоми відображають тяжкий стан збудження ЦНС, при якому дії гальмівних систем (переважно ГАМК-ергічної) недостатньо для блокування осередків пароксизмальної активності. З підвищенням дози пропоксазепаму збільшується здатність мозку до обмеження цих осередків, що проявляється зростанням латентного часу розвитку тонічних судом (рис. 2, Б) та поступовим зменшенням їх кількості (рис. 2, Г). Слід зазначити, що пропоксазепаму не властива значна гальмівна дія, оскільки навіть у дозах, при яких спостерігають 100 % захисну дію (вживання тварин), відмічають окремі епізоди тонічних судом.

У дозі 2 мг/кг, при якій захисна дія пропоксазепаму сягає 100 %, значно збільшується латентний час розвитку тонічних судом (до 13 хв) і зростає їх кількість, однак це можна пояснити тим, що активність епілептоформних осередків здатна ефективніше гальмуватись, завдяки чому підвищується питома частота даного виду судом. У дозі 4 мг/кг пропоксазепам повністю блокує розвиток судом цієї групи тяжкості (рис. 2, В, Г). Загалом навіть зростання захисної дії з підвищенням дози пропоксазепаму не викликає вірогідних змін у структурі судомного нападу (рис. 3), хоча і спостерігають поступове зменшення парціального внеску судом високої тяжкості (тонічні судоми). Та при введенні більших доз пропоксазепаму (>1,5 мг/кг) відзначають ефективніше

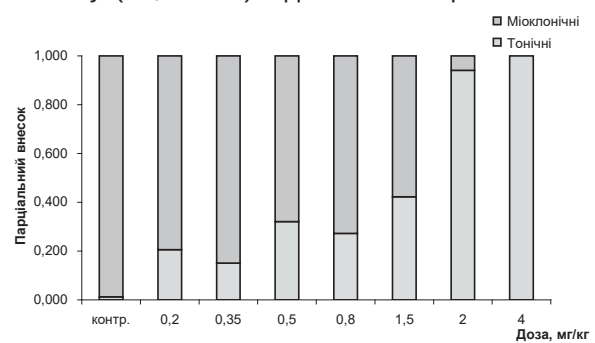


Рис. 3. Парціальний внесок у загальну структуру судомного нападу, викликаного бемегридом (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення пропоксазепаму в різних дозах (0,5 год, внутрішньоочеревинно).

гальмування тонічних судом із майже повною репрезентацією судомного нападу у вигляді міоклонічного компонента.

Разом із тим, навіть у низьких дозах, при яких не відзначають високої захисної дії (з 0,35 мг/кг), значно збільшується тривалість життя тварин (рис. 4) порівняно з контрольною групою, але не спостерігають дозозалежного характеру між цими величинами. Оскільки тривалість життя пов'язана з ефективністю генералізації збудження, що виникає в пароксизмальних осередках, ЦНС, можна зробити висновок, що лише високі дози пропоксазепаму здатні активувати ГАМК<sub>A</sub>-РК та викликати стійку гіперполяризацію клітин із розвитком гальмування.

Таким чином, на моделі бемеGRID-індукованих судом пропоксазепам продемонстрував високу активність за величиною захисної дії, збільшуючи час тривалості життя тварин та зменшуючи прояв тонічних судом. Антагонізм між пропоксазепамом та бемеGRIDом за умов

*in vivo* з високою ймовірністю відбувається через різні місця зв'язування, що проявляється відсутністю дозозалежності між часом тривалості життя тварин та введеною дозою пропоксазепаму.

Водночас ми не визначили значущої різниці між часом виникнення окремих компонентів судом (міоклонічні чи тонічні) та їх кількістю в бемеGRIDу і пікротоксину та їх гальмування пропоксазепамом. Така подібність зовнішнього прояву гальмування функціонування ГАМК-ергічної системи різними за активністю хемоконвульсантами свідчить про більш складний інтегральний характер судомних проявів, що виникають у ЦНС, оскільки нормальний функціональний стан ЦНС є наслідком балансу між процесами збудження і гальмування нейрональних систем. Судоми, що виникають при дії хемоконвульсантів, можуть бути опосередковані не тільки пригніченням процесів гальмування, але й гіперактивацією процесів збудження.

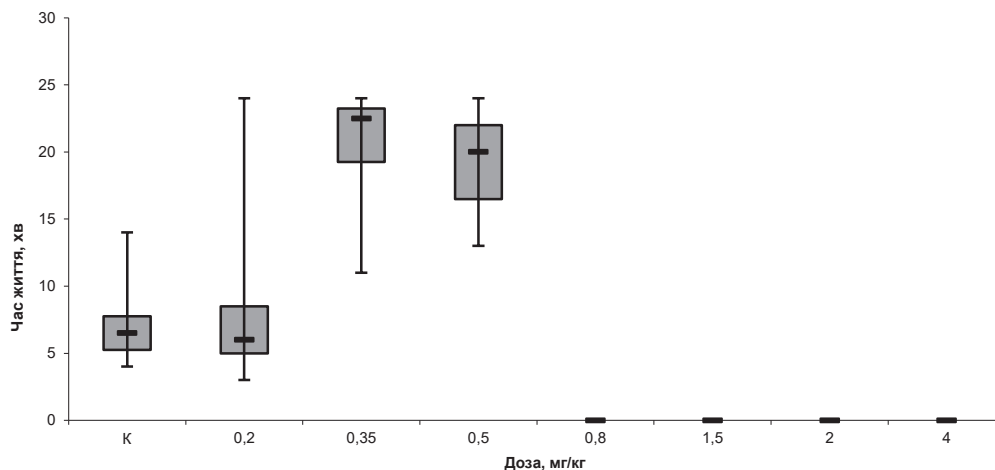


Рис. 4. Зміна загального часу тривалості життя тварин при введенні бемеGRIDу (58 мг/кг, підшкірно) на тлі попереднього введення різних доз пропоксазепаму (0,5 год, внутрішньоочеревинно).

**ВИСНОВКИ.** 1. Величина середньої ефективної дози пропоксазепаму на моделі бемеGRID-індукованих судом становить  $(0,39 \pm 0,05)$  мг/кг ( $(0,96 \pm 0,12)$  мкмоль/кг) із кутом нахилу кривої  $s=1,19$ .

2. Із підвищенням дози пропоксазепаму відмічають збільшення часу виникнення міоклонічних судом, що вказує на здатність сполуки підвищувати функціональну активність ГАМК-ергічної системи, заблокованої бемеGRIDом. У дозі 2 мг/кг, при якій захисна дія пропоксазепаму сягає 100 %, значно збільшується латентний час роз-

витку тонічних судом (до 13 хв) і зростає їх кількість, однак це можна пояснити тим, що активність епілептоформних осередків здатна ефективніше гальмуватись, завдяки чому підвищується питома частота даного виду судом. У дозі 4 мг/кг пропоксазепам повністю блокує розвиток судом цієї групи тяжкості.

3. При введенні більших доз пропоксазепаму (>1,5 мг/кг) спостерігають ефективніше гальмування тонічних судом із майже повною репрезентацією судомного нападу у вигляді міоклонічного компонента.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sige E. Structure, function, and modulation of GABA<sub>A</sub> Receptors / E. Sige, M. E. Steinmann // J. Biol. Chem. – 2012. – 23, 287 (48). – P. 40224–40231.

2. Семьянов А. В. ГАМК-ергическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия /



sis of neurochemical antinociceptive mechanisms of propoxazepam action]. *Farmakolohiia ta lik. Toksykologhiia – Pharmacology and Drug Toxicology*, 1 (52), 3-11 [in Ukrainian].

9. Reder, A.S., Andronati, S.A., Holovenko, M.Ya., Pavlovskiy, V.I., Kabanova, T.A., Khalimova O.I., Lari-  
nov, V.B. et al. (2017). Zastosuvannia 7-brom-5-(o-khlor-  
fenil)-3-propoksi-1,2-dihidro-3H-1,4-benzodiazepin-2-onu  
dlia halmuvannia neiropatichnoho boliu ta sudom riznoi  
etiologii [The use of 7-bromo-5 (o-chlorophenyl)-3-pro-  
poxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one for inhibi-  
tion of neuropathic pain and seizures of different etiology].  
*Patent Ukrainy – Ukrainian Patent No. 115205; 2017, Sept 25* [in Ukrainian].

10. Sigel, E., & Luscher, B.P. (2011). A closer look at  
the high affinity binding site for benzodiazepines on  
GABA<sub>A</sub> receptors. *Cur. Top Med. Chem.*, 11, 241-246.

11. Lari-  
nov, V.B., & Holovenko, M.Ya. (2017). Mole-  
kuliarni dokinh benzodiazepiniv – alosterychnykh modu-  
liatoriv GAMK-retseptory [Molecular docking of benzodi-  
azepines – GABA receptor allosteric modulators]. *Farmakolohiia ta lik. Toksykologhiia – Pharmacology and Drug Toxicology*, 4-5 (53), 38-49 [in Ukrainian].

12. Holovenko, M.Ya., Pavlovskiy, V.I., Lari-  
nov, V.B., & Valivodz', I.P. (2017). Napivempirichni analiz vzaie-  
modii alkoksipokhidnykh 1,4-benzodiazepiny z GAMK<sub>A</sub>-ret-  
septorom na pidstavi dannykh molekuliarnoho dokinyh  
ta farmakolohichnoho efekty [Semi-empirical analysis of  
1,4-benzodiazepine alcoxy derivatives interaction with  
GABA<sub>A</sub>-receptor on the base of molecular docking data

and pharmacological effect]. *Medychna ta klinichna khi-  
miia – Medical and Clinical Chemistry*, 19 (4), 23-30 [in  
Ukrainian].

13. Mistry, D.K., & Cottrell, G.A. (1990). Actions of  
steroids and bemegride on the GABA<sub>A</sub> receptor of mouse  
spinal neurones in culture. *Exp. Physiol.*, 75 (2), 199-209.

14. Olsen, R. (2006). Picrotoxin-like channel blockers  
of GABA<sub>A</sub> receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 18; 103  
(16), 6081-6082.

15. Golovenko, N.Ya., Lari-  
nov, V.B., Reder, A.S., &  
Valivodz', I.P. (2017). [An effector analysis of the interac-  
tion of propoxazepam with antagonists of GABA and  
glycine receptors]. *Neurochemical Journal*, 11 (4), 302-  
308.

16. Sigel, E., & Steinmann, M. (2012). Structure,  
function, and modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *The Jour-  
nal of Biological Chemistry*, 287 (48), 40224-40231.

17. Shaikh, M.F., Sancheti, J., & Sathaye, S. (2013).  
Effect of *Eclipta alba* on acute seizure models: a GABA<sub>A</sub>-  
mediated effect. *Indian J. Pharm. Sci.*, 75 (3), 380-384.

18. Glykys, J., & Mody, I. (2007). Activation of GABA<sub>A</sub>  
receptors: Views from outside the synaptic cleft. *Neuron*,  
56, 763-770.

19. Gatch, M.B. (2002). The discriminative stimulus  
effects of pentyletetrizol as a model of anxiety: recent  
developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26 (4), 429-439.

20. Chang, Y., & Weiss, D.S. (2002). Site specific  
fluorescence reveals distinct structural changes with  
GABA receptor activation and antagonism. *Nat. Neuro-  
sci.*, 5, 1163-1168.

Н. Я. Головенко, В. Б. Ларионов, А. С. Редер, И. П. Валиводзь, Т. В. Михайлова  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

## АНТАГОНИЗМ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ ГАМК<sub>A</sub>-РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСА ПРОПОКСАЗЕПАМА И БЕМЕГРИДА, ОБЛАДАЮЩИХ СРОДСТВОМ К РАЗНЫМ СУБЪЕДИНИЦАМ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

### Резюме

**Вступление.** Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), ее агонисты и антагонисты не конкурируют с бензодиазепинами за места связывания, и их действие имеет место только в присутствии этой кислоты. Тот факт, что бензодиазепины облегчают протекание судорог, вызванных антагонистами, свидетельствует не только о сложности ГАМК-рецепторного комплекса, но и о тесном контакте его компонентов. Анальгетический и противосудорожный компоненты фармакологической активности нового алкоксипроизводного 1,4-бензодиазепина (пропоксазепам) предполагают его взаимодействие с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором, которое отличается от мест связывания других бензодиазепинов.

**Цель исследования** – провести фармакологическую оценку противосудорожного действия пропоксазепам по отношению к судорогам, вызванным бемегридом, для определения взаимодействия мест связывания соединений на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторном комплексе.

**Методы исследования.** На модели судорог, индуцированных бемегридом (58 мг/кг, подкожно, через 0,5 ч после введения пропоксазепам), определяли противосудорожное действие пропоксазепам (после его внутрибрюшинного введения), оценивали время развития и количество отдельных типов судорог (миоклонические или тонические) и общее время длительности жизни животных.

**Результаты и обсуждение.** Введение пропоксазепам увеличивает время развития отдельных типов судорог у животных. Даже в низких дозах, при которых не отмечают высокого защитного действия (с 0,35 мг/кг), значительно увеличивается длительность жизни животных в сравнении с контрольной группой, но не наблюдают дозозависимого характера между этими величинами. Антагонизм между про-



проксазепамом и бемегридом в условиях *in vivo* с высокой вероятностью осуществляется через разные места связывания, что проявляется отсутствием дозозависимости между временем длительности жизни и дозой пропксазепама. Не определено значимой разницы между временем возникновения отдельных компонентов судорог (миоклонические или тонические) и их количеством у бемегрида и пикротоксина и их подавления пропксазепамом.

**Выводы.** Установлено, что  $ED_{50}$  пропксазепама в данной модели составляет  $(0,96 \pm 0,12)$  мкмоль/кг. С повышением его дозы отмечают увеличение времени возникновения миоклонических судорог, что указывает на способность соединения повышать функциональную активность ГАМК-эргической системы, блокированной бемегридом. При введении относительно высоких доз пропксазепама ( $>1,5$  мг/кг) наблюдают более эффективное торможение тонических судорог с почти полной репрезентацией судорожного приступа в виде миоклонического компонента. В дозе 4 мг/кг пропксазепам полностью блокирует развитие этих судорог.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пропксазепам; бемегрид; судороги; хемоконвульсанты.

M. Ya. Golovenko, V. B. Larionov, A. S. Reder, I. P. Valivodz, T. V. Mykhailova  
O. BOHATSKYI PHYSICAL-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKAINE, ODESA

## ANTAGONISM OF GABA<sub>A</sub>-RECEPTOR COMPLEX ALLOSTERIC MODULATORS – PROPOXAZEPAM AND BEMEGRIDE, POSSESSING AFFINITY TO DIFFERENT MACROMOLECULE SUBUNITS

### Summary

**Introduction.** Both GABA and its agonists/antagonists do not compete with benzodiazepines for binding sites and their action takes place only in the presence of GABA. The fact that benzodiazepines mitigate antagonists-induced seizures is the evidence of the GABA-receptor agglomerate complexity, as well as tight junction of its components. Analgesic and antoconvulsive components of propoxazepam (new 1.4-benzodiazepine alcoxy derivative) assume its interaction with GABA<sub>A</sub>-receptor which differs from binding sites for other benzodiazepines.

**The aim of the study** – propoxazepam anticonvulsive action pharmacological estimation on the bemegrinduced convulsions experimental model for determining its binding sites.

**Research Methods.** Anticonvulsive action of propoxazepam (intraperitoneally administered) was estimated after bemegrinduced seizures (58 mg/kg subcutaneously, 0.5 hours after propoxazepam administration) as their quantity and appearance time (for both myoclonic and tonic components) and total animals survival time.

**Results and Discussion.** Propoxazepam administration increases the time of different seizures development on experimental animals. Even in low doses which do not exhibit significant protective action (from 0.35 mg/kg) animals survival time increases substantially in compare to control group but not in a dose-dependent manner. Antagonism between propoxazepam and bemegrind *in vivo* seems to take place through different binding sites what determinates dose-dependence absence between survival time and propoxazepam dose. There is no significant difference between time of different seizures types (myoclonic or tonic) appearance and their quantity (bemegrind- or picrotoxine-inuced) after their suppression with propoxazepam.

**Conclusions.** It was found that propoxazepam  $ED_{50}$  on this model is  $0,96 \pm 0,12$   $\mu$ mol/kg. Propoxazepam dose increase lead to increasing of myoclonic seizures appearance time, which indicates GABA-ergic functionality increase, impaired by bemegrind. Relatively high propoxazepam doses ( $>1.5$  mg/kg) inhibited tonic seizures with mainly represented myoclonic component. At the dose of 4 mg/kg propoxazepam totally blocked these seizures appearance.

KEY WORDS: propoxazepam; bemegrind; seizures; chemoconvulsants.

Отримано 27.04.18

Адреса для листування: В. Б. Ларіонов, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Лютсдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: lvb\_78@ukr.net.