

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Зыбина Анна Михайловна

ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КАРБАМАЗЕПИНА,
ВКЛЮЧЕННОГО В ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Специальность 03.03.01 - физиология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

научный руководитель
кандидат биологических наук, доцент
Аббасова Кенуль Расимовна

Москва-2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список использованных сокращений.....	4
Введение.....	5
Обзор литературы.....	9
Эпилепсия. Типы заболевания. Эпилепсия височной доли.....	9
Модели эпилепсии. Проницаемость ГЭБ в различных моделях.....	12
Структура и проницаемость ГЭБ.....	16
Р-гликопротеин.....	21
Фармакорезистентная эпилепсия и ее взаимосвязь с Р-gp.....	23
Карбамазепин.....	24
Влияние КБЗ на поведение.....	26
Парентеральные формы КБЗ.....	29
Является ли карбамазепин субстратом для Р-гликопротеина.....	30
Наночастицы.....	32
Материалы и методы.....	36
Результаты.....	52
Глава 1.....	52
Исследование эффективности карбамазепина на ПТЗ-модели.....	52
Гистологические исследования проницаемости ГЭБ.....	53
Фотометрическая оценка проницаемости ГЭБ.....	55
Глава 2.....	58
Антиэпилептическая эффективность нанокапсулированной формы карбамазепина.....	58
Сравнение эффективности парентеральных форм КБЗ с «Финлепсином».....	62
АнализЭКоГ животных.....	63
Влияние хронического введения ЭКоГ на поведение.....	67
Глава 3.....	87
Влияние антагониста Р-gp верапамила на проницаемость ГЭБ для карбамазепина <i>in vivo</i>	87

Влияние блокады Р-гликопротеина на эффективность КБЗ-НЧ.....	90
Обсуждения.....	92
Глава 1.....	92
Глава 2.....	95
Глава 3.....	105
Заключение.....	110
Выводы.....	112
Список литературы.....	113

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЭП – антиэпилептический препарат

ВЕР – верапамил

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер

ИЗН – изониазид

КБЗ - карбамазепин

КБЗ-НЧ - карбамазепин, включенный в наночастицы

ЛБ – тест «Лабиринт Барнса»

ЛП – латентный период

НЧ – наночастицы

ОП – тест «Открытое поле»

ПКЛ – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПТЗ – пентилентетразол

ЭКоГ – электрокортикограмма

FDA – Food and Drug Administration

P-gp – P-гликопротеин

MDR – multidrug resistance proteins

Mdr1 – ген MRP

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Эпилепсия – это неврологическое заболевание, которому подвержены люди любых возрастов из всех стран мира. Эпилептические приступы приводят к возникновению у пациентов нейробиологических, психических, психологических нарушений, а также социальных проблем (Чепурнов и др. 2012). Это заболевание имеет множество различных проявлений, самым опасным из которых является возникновение судорог. Для предотвращения приступов пациенты вынуждены хронически принимать антиэпилептические препараты (АЭП). При постоянном приеме АЭП, как и к любым лекарствам, возникает привыкание, вследствие чего возникает необходимость в постоянном повышении дозировки. Со временем, это может привести к возникновению состояния, которое называют фармакорезистентностью, или устойчивостью к фармакологическим препаратам. В настоящее время количество таких пациентов составляет около 30% (Kwan et al., 2000; Chang et al., 2003). Поскольку при проявлении резистентности хотя бы к одному из АЭП, вероятность подобрать другой эффективный препарат низка, считается, что в ее возникновении задействован неселективный механизм (Loshner et al., 2005 (a,b); Kwan et al., 2005).

На роль неселективного механизма, который может приводить к возникновению множественной резистентности подходит семейство ABC (ATP binding cassette)-транспортеров, наиболее изученным из которых является Р-гликопротеин (Р-gp). Эти транспортеры являются полипотентными, то есть они способны переносить множество разнообразных субстратов из клетки в кровоток. Они могут располагаться как на эндотелии ГЭБ, так и на астроцитах. Более того, достоверно установлено, что экспрессия Р-gp значительно повышается в эпилептогенных тканях, что в свою очередь, приводит к снижению концентрации АЭП в этой области (Dombrowski et al., 2001; Sisodiya et al., 2002). Взаимодействие некоторых противосудорожных лекарств с такими

транспортерами уже доказано, однако, их взаимодействие с карбамазепином (КБЗ) до сих пор остаются спорным.

Карбамазепин является одним из препаратов первого выбора. Это один из самых эффективных и безопасных АЭП. Его взаимодействие с P-гр остается не до конца понятным. Есть множество работ, которые подтверждают или опровергают транспорт КБЗ (Baltes et al., 2007 a, b; Owen et al., 2001; Potschka et al., 2001; Weiss et al., 2003). Решение этого вопроса является важным шагом в исследовании механизмов эпилептогенеза и возникновения резистентности.

Поскольку P-гр является одним из главных факторов в возникновении резистентности, следует искать способы доставки препаратов, минуя P-гр. В настоящее время ведется множество исследований, предлагающих заключить КБЗ в носители различной природы (Brewster et al., 1991; Madhusudhan et al., 2007; Akkar, Müller, 2003). Это связано с тем, что КБЗ имеет очень низкую растворимость в воде и в клинической практике до сих пор не существует парентеральной формы этого препарата. Жидкая форма препарата необходима в некоторых экстренных случаях, например, при травмах, проблемах с ЖКТ, а также в случаях, когда необходимо резко увеличить количество препарата в организме, например, при угрозе возникновения судорог. Многие носители помогают перевести КБЗ в растворимую фракцию. Наночастицы, покрытые сурфактантом, способны проникать в головной мозг, минуя P-гр. Это было показано на противоопухолевых и обезболивающих препаратах (Olivier, 2005). Именно поэтому исследование КБЗ, включенного в PLGA-НЧ, имеет важное значение. Такая форма КБЗ не только может позволить перевести препарат в растворимую форму, но и осуществлять адресную доставку препарата в головной мозг.

Исследование эффективности новых форм КБЗ. Несмотря на обилие различных моделей эпилепсии, до сих пор самым простым методом определения эффективности препарата является применение хемоконвульсантов. Однако, часто используемый хемоконвульсант пентилентетразол (ПТЗ) дает неверное

прогнозирование относительно эффективности КБЗ. Именно поэтому необходимо исследовать новые, альтернативные модели эпилепсии для расширения выявления эффективности и снижения вероятности ошибки при тестировании новых АЭП.

Помимо тестирования самих антиэпилептических свойств препарата немаловажным аспектом является его влияние на поведение, так как пациенты вынуждены принимать препарат хронически. Существует большое количество экспериментальных и клинических данных о влиянии КБЗ на поведение. При этом, большинство влияний были положительными. В частности, КБЗ снимал тревожность и улучшал некоторые виды памяти (Rezvanfard et al., 2009; Zangrossi, Leite, 1992). Исследования влияния КБЗ-НЧ на поведение ранее не проводили.

Цели работы.

Исследовать противоэпилептические эффекты карбамазепина, включенного в полимерные наночастицы, и влияние этой формы карбамазепина на поведение животных

Для этого были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать противосудорожную эффективность КБЗ на пентилентетразоловой и изониазидовой моделях эпилепсии. Сравнить противосудорожную эффективность КБЗ и КБЗ-НЧ с препаратом «Финлепсин» на изониазидовой модели и определить минимальные эффективные дозы исследуемых препаратов.

2. Сравнить ЭКоГ крыс до и после введения изониазида (ИЗН) на фоне и без КБЗ или КБЗ-НЧ.

3. Исследовать изменение проницаемости ГЭБ во время судорог, вызванных изониазидом, фотометрическим методом и с помощью введения красителя Evans Blue.

4. Исследовать изменение тревожности и обучаемости животных при хроническом приеме КБЗ и КБЗ-НЧ в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Лабиринт Барнса».

5. Исследовать противозепилептические эффекты подпороговых доз КБЗ и КБЗ-НЧ на фоне блокады P-гp верапамилом на изониазидовой модели эпилепсии.

Научная новизна работы. При исследовании изониазидовой модели эпилепсии было выявлено отсутствие нарушений ГЭБ во время судорог. Следовательно, используемая в исследовании модель не искажает результаты эксперимента и не отражает ложное повышение эффективности. Эта модель ранее применялась при тестировании различных антиэпилептических препаратов, однако, подробное изучение состояния ГЭБ на изониазидовой модели было проведено впервые.

При сравнении препаратов КБЗ и КБЗ-НЧ, последний показал повышенную противосудорожную эффективность. Антиэпилептические свойства этого препарата исследовали впервые, и было выявлено снижение минимальной противозепилептической эффективной дозы в 30 раз. Также было проведено исследование о взаимодействии исследуемых препаратов с P-гp. Мы подтвердили частичное взаимодействие КБЗ с транспортером и впервые выявили его отсутствие с КБЗ-НЧ. Такой результат позволяет предположить возможность применения КБЗ-НЧ при фармакорезистентной форме эпилепсии.

В данном исследовании впервые было показано влияние хронического приема КБЗ-НЧ на поведение. Мы показали, что исследуемая форма улучшает память и снижает тревожность у животных. При этом подобные изменения поведения при применении КБЗ отсутствовали или были гораздо менее выраженными. В клинической практике КБЗ применяется не только как АЭП. Он обладает нормотимическими свойствами. Полученные эффекты при применении формы КБЗ-НЧ могут позволить расширить область применения этого препарата в клинической практике.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Эпилепсия. Типы заболевания. Эпилепсия височной доли.

Эпилепсия является заболеванием головного мозга, характеризующимся устойчивой предрасположенностью к генерации эпилептических приступов, сопровождающимся нейробиологическими, когнитивными, психологическими и социальными последствиями. Этому заболеванию подвержены люди всех возрастов во всех странах мира. По данным ВОЗ в настоящее время от эпилепсии страдает около 50 млн человек, что составляет около 1% населения планеты. Однако, не во всех странах медицина находится на достаточно высоком уровне и позволяет выявить всех больных. В развитых странах число людей, страдающих эпилепсией, составляет 1-2%, причем среди детей до 15 лет эта цифра по разным данным достигает 4% или 6% (Panayiotopoulos, 2009).

Для эпилепсии характерно появление повторяющихся припадков, которые сопровождаются кратковременными непроизвольными судорогами частей тела (парциальные приступы) или всего тела (генерализованные приступы). По тяжести припадков различают судорожную (*grand mal*) и бессудорожную (*petit mal*), или абсансную эпилепсию. Приступы могут сопровождаться потерей сознания, а также утратой контроля над функциями кишечника и мочевого пузыря.

Эпилепсия возникает при нарушении баланса между возбуждающей и тормозной медиаторными системами и является неоднородным заболеванием, при котором возбуждение превалирует над торможением. Именно поэтому многие АЭП являются модуляторами ГАМК-эргической системы (Fukata, Fukata, 2017). Эпилептические приступы возникают в очаге – группе нейронов, генерирующих синхронные разряды, откуда распространяются далее по синапсам (Khazipov et al., 2015). Однако, в генерации и распространении приступов важную роль играют не только нервные клетки, но и нейроглия. В норме, астроциты поддерживают нормальное метаболическое функционирование нейронов, функционирование ГЭБ, а также, могут модулировать нейрональную

пластичность, двусторонне общаясь с нейронами через метаботропные рецепторы к глутамату. Таким образом, астроциты могут быть участниками повышения активности нейронов в очаге эпилепсии (Khaspekov, Frumkina, 2017). Микроглия также активно вовлечена в нейрогенез и регулирует процессы, связанные с миелинизацией нервных волокон олигодендроцитами (Shigemoto-Mogami et al., 2014). Во взрослом головном мозге эти клетки вовлечены в процессы памяти, обучения, когнитивных функций и синаптической пластичности (Sipe et al., 2016). Микроглия принимает участие во многих патогенных процессах головного мозга, в том числе, ее активация была показана и при эпилепсии. При этом, она может оказывать как нейропротекторные, так и нейротоксичные эффекты (Boer et al., 2006; Eyo et al., 2017). Таким образом, в очаге эпилепсии возникают не только нейрональные, но и глиальные нарушения.

Приступы могут иметь различные проявления и причины возникновения. Определение конкретного типа и причин заболевания необходимо для эффективной терапии (Panayiotopoulos, 2009). Причины возникновения эпилептических приступов могут быть различны. Международная Антиэпилептическая Лига (International League Against Epilepsy, ILAE) выделяет несколько типов припадков по происхождению (Shorvon, 2011).

1. *Идиопатическая эпилепсия* имеет преимущественно генетическое происхождение, не имеет серьезных нейрофизиологических или нейроанатомических нарушений. Предположительно возникает при наследовании определенного сочетания генов, которое пока не выявлено. Тем не менее, известно множество отдельных генов, связанных с синаптической передачей, мутации в которых могут привести к возникновению эпилепсии (Fukata, Fukata, 2017).

2. *Симптоматическая эпилепсия* может иметь также генетическое происхождение, однако, она связана с грубыми анатомическими и патологическими нарушениями и/или может быть клиническим признаком другого заболевания.

3. *Вызванная (спровоцированная) эпилепсия* – это эпилепсия, в которой существует специфический фактор окружающей среды, который вызывает приступ, при этом у пациента не наблюдается грубых нейроанатомических и нейрофизиологических нарушений. Данный тип заболевания может иметь как генетическое, так и приобретенное происхождение.

4. *Криптогенной эпилепсией* принято называть симптоматическую эпилепсию, природу которой не удалось определить. Число случаев с криптогенной эпилепсией постепенно снижается. Тем не менее, около 40% случаев эпилепсии, которая началась во взрослом возрасте, относится к этой группе.

Классификация эпилепсии сложна, тем не менее, до сих пор возникают споры об отношении некоторых синдромов к той или иной категории. Каждый случай у каждого пациента может иметь и генетические, и приобретенные причины. Внешние проявления эпилептических приступов также могут отличаться. Именно поэтому в настоящее время остается большое количество случаев неклассифицированных форм заболеваний эпилепсии (рис. 1).

Несмотря на огромное количество различных типов эпилепсии, правильное распознавание типа заболевания является очень важным, так как лекарства, которые помогают при одном типе заболевания, способны усугубить его при другом. Например, такие лекарства как триметадион и этосуксимид являются эффективными против абсансной эпилепсии, в то время как фенитоин и карбамазепин эффективны только против судорожных припадков, и, в случае абсансов, способны вызвать отягощение протекания заболевания (Smith et al., 2007).

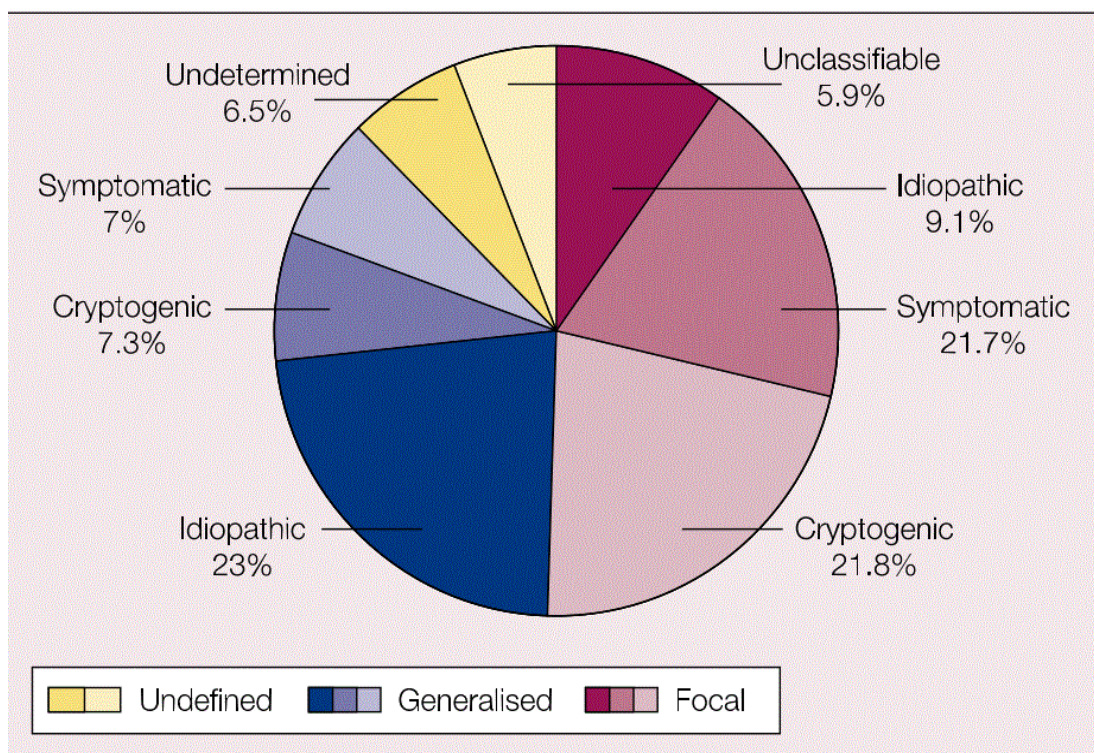


Рис. 1. Распространенность различных типов эпилепсии у детей (Panayiotopoulos, 2009).

Модели эпилепсии. Проницаемость ГЭБ в различных моделях. Необходимость исследования изониазидовой модели.

Эпилепсия височной доли является одним из самых распространенных видов эпилепсии у людей. Она характеризуется распространением патогенной активности на соседние области коры и гиппокамп, что в конечном итоге приводит к гибели нейронов (Bertram, 2009; Kandratavicius et al., 2014). Данных, которые можно получить при исследовании эпилептических приступов человека, недостаточно для полного понимания механизмов эпилепсии. Более того, в связи с активным развитием фармацевтики, в настоящее время появляется все больше потенциальных АЭП. Для их создания используется три основных направления: создание новых препаратов, варьирование химической формулы уже известных АЭП и создание лекарств, нацеленных на устранение причины возникновения эпилептического приступа (Bialer, White, 2010). Развитие различных моделей эпилепсии необходимо как для скрининга препаратов, так и для изучения механизмов эпилепсии.

В настоящее время существует множество таких моделей. Они отличаются по многим параметрам, в том числе и по сложности. Одной из первых классических моделей эпилепсии является модель максимального электрошока (МЭШ) (Castel-Branco et al., 2009; Putnam, Merrit, 1937; Rowley, White, 2010). На примере этой модели Путнам и Меррит впервые показали возможность использования модели на животных для оценки эффективности АЭП. В этом случае проводят транскраниальную стимуляцию поверхности головного мозга высокоамплитудным стимулом, который прикладывают к поверхности кожи головы животного. Данная модель, как и многие другие, несовершенна, и ее прогнозы не всегда справедливы. В частности, на этой модели не было выявлено эффективности таких АЭП как левитирацетам, тиагабин и вигабатрин (Rowley, White, 2010; Smith et al., 2007; Löscher et al., 1998). Кроме того, некоторые препараты, например, антагонисты NMDA-рецепторов, которые позволяют купировать судороги на этой модели, оказались не эффективны против настоящего заболевания (Rowley, White, 2010).

Несовершенства МЭШ привели к поиску новых моделей эпилепсии. В настоящее время существует множество способов индуцировать судороги как электрическим, так и химическим путем.

Примером другой модели, связанной с электрической стимуляцией, является киндлинг. Это одна из наиболее сложных для экспериментатора моделей. Животные подвергаются регулярной подпороговой электрической стимуляции структур с низким судорожным порогом, таких как, гиппокамп или миндалина. В процессе киндлинга благодаря пластичности синапсов, электрическая сеть головного мозга постепенно перестраивается так, что в конечном итоге это приводит к развитию судорог при стимуляции все тем же подпороговым стимулом (Kandratavicius et al., 2014). Эта модель имеет ряд преимуществ и в настоящее время активно исследуется. Именно эта модель позволяет наиболее точно предсказать антиэпилептическую активность препаратов (Kandratavicius et al., 2014). В частности, на данной модели была

показана эффективность одного из важнейших АЭП – левитирацетама, эффективность которого не была выявлена в ходе тестирования на ПТЗ-модели и модели максимального электрошока (Löscher et al., 1998). Существенным недостатком этой модели, наряду с необходимостью иметь сложное оборудование, является то, что она требует больших затрат времени экспериментатора. Киндлинг одного животного может занимать до 1-го месяца, при этом стимуляцию необходимо проводить с определенным интервалом в одно и то же время. Кроме того, в процессе киндлинга животное может повредить имплантированные электроды до завершения эксперимента (Kandratavicius et al., 2014).

Помимо электрических моделей, существуют также линии животных, генетически предрасположенных к судорожным состояниям. Первой такой моделью является линия крыс Крушинского–Молодкиной (Полетаева и др., 2017). Животных вывели в результате инбредного скрещивания и отбора крыс линии Wistar. У этих животных судороги возникают в ответ на громкие звуки. Позже были выведены и другие генетические модели эпилепсии, в частности линия GEPR (Genetic Epilepsy Prone Rats), выведенные в США из линии Sprague-Dowley (Consroe et al., 1979), а также линия WAR, селектированная в Бразилии (Garcia-Cairasco, 2002). У генетически предрасположенных животных судороги в ответ на громкий звук возникают в результате возбуждения стволовых структур. Генетические модели удобны и широко используются исследователями, однако, сложность заключается в поддержании и селекции популяции крыс.

Несмотря на все преимущества электрических методов индукции судорожной активности, для любого из них необходимо специфическое оборудование. Для использования генетических моделей необходимо постоянно поддерживать популяцию животных в лаборатории. Именно поэтому для быстрого скрининга препаратов часто используют хемоконвульсанты. Это препараты, введение которых индуцируют судороги. В настоящее время

разработано и исследовано множество моделей, основанных на действиях хемоконвульсантов.

Примером может служить пилокарпин - агонист мускариновых холинорецепторов. Он позволяет моделировать эпилептический статус - тяжелые судороги, при которых каждый последующий приступ возникает раньше, чем больной выходит из предыдущего, такие судороги длятся от 30 минут и приводят к необратимым изменениям в головном мозге, в особенности в гиппокампе и височной коре, а также вызывают массовую гибель нейронов. Эти повреждения соответствуют картине, которую наблюдают у людей с эпилепсией височной доли (Mathern et al., 2002). У животных эти повреждения приводят к возникновению спонтанных судорог. Существенным недостатком данной модели является очень высокий процент смертности животных (Kandratavicius et al., 2014; Lothman, Bertram, 1993).

Пентилентетразол является антагонистом ГАМК_A рецепторов. ПТЗ-модель воспроизводит симптоматику тонико-клонических припадков, однако, приступы длятся до нескольких минут и последствия не столь тяжелы, по сравнению с пилокарпином, т.е. на модели эпилептического статуса. После действия ПТЗ не возникает спонтанных эпилептических приступов. Эта модель не требует много времени и сложной аппаратуры, поэтому является наиболее подходящей для быстрого скрининга новых АЭП (Kandratavicius et al., 2014). Однако, такая модель тоже имеет свои недостатки. В частности, на этой модели неэффективна группа АЭП, механизм действия которых связан с блокадой быстрых натриевых каналов. К таким препаратам относят широко известные и применяемые в клинической практике фенитоин и карбамазепин (КБЗ) (Smith et al., 2007). Кроме того, эта модель используется для выявления противосудорожной эффективности некоторых препаратов при абсансной (бессудорожной) форме эпилепсии (Golyala, Kwan, 2017). На этой модели оказался эффективен триметадиион и этосуксимид, которые являются антиабсансными препаратами, а ламотриджин не проявил никакой антиэпилептической активности, хотя этот препарат в настоящее время

применяют как против судорожных припадков, так и против абсансов (Smith et al., 2007).

Таким образом, каждая модель имеет свои преимущества и недостатки. Самыми «быстрыми» из всех вышеперечисленных являются МЭШ и ПТЗ-модели. Именно они, по-отдельности или в паре, чаще всего используются для тестирования новых потенциальных АЭП. Однако, даже в таком случае исследователи не застрахованы от получения ошибочной негативной оценки эффективности АЭП (Golyala, Kwan, 2017).

Использование хемоконвульсантов, несомненно, является более быстрым и дешевым способом выявления антиэпилептических препаратов. Поэтому в настоящее время поиск веществ, используемых в качестве хемоконвульсантов, альтернативных ПТЗ, является одной из актуальных проблем.

Модель эпилепсии, в которой хемоконвульсантом служит изониазид (ИЗН), не распространена широко, по сравнению с ПТЗ моделью, и менее изучена. ИЗН тормозит работу ГАМК-аминотрансферазы, которая является ключевым ферментом в ГАМК-шунте при образовании тормозного нейромедиатора в нейронах и глиальных клетках. Использование этой модели в основном связано с быстрым скринингом АЭП, механизм которого связан с блокадой быстрых натриевых каналов (Nair et al., 2012). Кроме того, в некоторых исследованиях, эта модель является дополнением к ПТЗ- модели и модели МЭШ (Chindo et al., 2014; Mahendran et al., 2014). Однако, несмотря на то, что эта модель находит все большее применение в доклинических исследованиях, она остается слабоизученной.

Структура и проницаемость ГЭБ

Головной мозг является одним из сложнейших органов для лечения, так как он ограничен от кровотока гемато-энцефалическим барьером (ГЭБ).

Анатомически ГЭБ состоит из эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, базальной мембраны, отростков астроцитов и перицитов (рис. 3). Эндотелиальные клетки ГЭБ связаны друг с другом плотными контактами и не имеют фенестров. Такое строение является отличительной чертой сосудов головного мозга, так как системные сосуды имеют окна и пропускают гораздо больший спектр веществ (Georgieva et al., 2014). Кроме того, плотные контакты, взаимодействуя с экспонированными снаружи и изнутри специфическими белками и актиновым цитоскелетом, способны предотвратить парацеллюлярный транспорт, свойственный большинству капилляров (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006).

Мембрана клеток эндотелия ГЭБ значительно отличается в зависимости от ее расположения. Различают апикальную мембрану, обращенную к кровотоку; и базолатеральную мембрану, обращенную к тканям мозга (Georgieva et al., 2014). Множество белков базолатеральной мембраны, такие как матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы, вовлечены в регуляцию физиологической целостности ГЭБ, а также воспалительных процессов (Yong, 2005). Помимо эндотелия, в целостность ГЭБ свой вклад вносят различные молекулярные факторы, которые продуцируют глиальные клетки, например, ангиопоэтин-1, который является нейротрофным фактором (Hori et al., 2004) и ангиотензин II (Wosik et al., 2007).

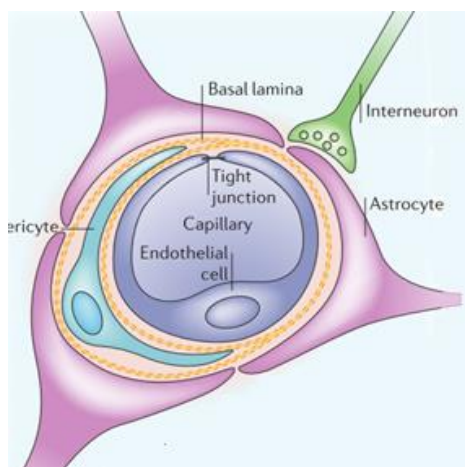


Рис. 3. Клеточное строение ГЭБ (Abbott et al., 2006).

Перициты также являются важной частью ГЭБ. Они контролируют его развитие и проницаемость (Daneman et al., 2010). Стабильность ГЭБ обеспечивается взаимодействием астроцитов с более, чем 99% поверхности эндотелия.

Заболевания, связанные с расстройствами головного мозга, всегда сложно лечить, так как вводимым препаратам необходимо преодолеть гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Из-за ГЭБ многие препараты хуже проникают в ЦНС, а некоторые – совсем проникнуть не могут. Поэтому важным критерием модели эпилепсии служит проницаемость ГЭБ.

Известно, что судорожная активность может увеличивать проницаемость ГЭБ. При этом, нарушение барьера способно усиливать судороги. Таким образом, возникает петля патологической обратной связи между судорогами и степенью проницаемости ГЭБ (Friedman, 2011). Нарушение целостности ГЭБ неоднократно было показано при эпилептическом статусе (Gorter et al., 2015; Van Vliet et al., 2007). Вопрос о изменениях проницаемости ГЭБ при однократных судорогах остается открытым. Вероятно, они зависят от продолжительности и выраженности судорожной активности на моделях электрически-вызванных судорог, а также, в случае использования хемоконвульсантов, от механизма действия самого препарата. Тем не менее, если бы проницаемость барьера просто увеличивалась при эпилепсии, то этот факт только облегчал бы лечение. Однако, известно, что несмотря на общее повышение проницаемости ГЭБ, в эпилептогенных тканях возможно формирование очага со сниженной проницаемостью барьера, в особенности для медикаментозных препаратов (Kwan, Brodie, 2005; Loscher, Potschka, 2005a; Schmidt, Loscher, 2005; Zhang et al., 2012).

Изменения функционального состояния барьера между мозговой тканью и кровотоком на различных моделях эпилепсии в настоящее время активно исследуют. Увеличение проницаемости ГЭБ было показано на пилокарпиновой модели эпилептического статуса (Nicola, 2007; Van Vliet et al., 2007). При использовании этой модели животные переносят тяжелые приступы, именно

поэтому изменение состояния ГЭБ в данном случае неизбежно. Исследования ПТЗ-модели показали, что данная модель повышает проницаемость ГЭБ за счет индукции NO-синтазы и повышения количества оксида азота в сосудах головного мозга (Danjo et al., 2013). Подобных исследований на ИЗН-модели не проводили.

Состояние ГЭБ является очень важным параметром модели эпилепсии. Если проницаемость барьера будет увеличиваться, то препараты, в норме не проходящие или слабо проходящие через ГЭБ, могут показать эффективность. Однако, как упоминалось выше, ГЭБ претерпевает сложные изменения в эпилептогенных очагах, вследствие чего его проницаемость заметно снижается (Kwan, Brodie, 2005; Zhang et al., 2012). Стоит отметить, что большинство препаратов применяют хронически, в бессудорожный период, когда общее состояние ГЭБ близко к норме. Именно поэтому так важно выделить препараты, не способные преодолеть барьер, а «идеальная модель» должна минимально изменять или вовсе не влиять на проницаемость ГЭБ.

Особые свойства ГЭБ отчасти проявляются за счет специфических свойств плотных контактов между клетками эндотелия. Эти контакты в эндотелии ГЭБ устроены гораздо сложнее и защищают головной мозг эффективнее по сравнению с другими тканями (Kniesel, Wolburg, 2000). Они сопротивляются прохождению заряженных молекул, в том числе и маленьких ионов (Butt et al., 1990). Таким образом, парацеллюлярный транспорт через плотные контакты ГЭБ (рис. 4а) оказывается весьма ограничен.

Несмотря на ограничения эндотелия ГЭБ, питательные вещества должны попадать в головной мозг. На мембране клетки располагается множество транспортеров, в том числе для глюкозы, азотистых оснований, некоторых аминокислот и многих других веществ, необходимых для работы головного мозга (рис. 4с) (Begley, Brightman, 2003). Специальные транспортеры могут располагаться не только на люминальной мембране, но и на базальной, обеспечивая транспорт веществ из ткани головного мозга в кровоток. В частности, таким путем выходит глутамат при значительном повышении

концентрации в головном мозге (Hawkins et al., 2002). Причем перенос таких веществ может осуществляться против градиента их концентрации. Проникновение более крупных белков возможно благодаря рецептор-опосредованному трансцитозу (рис. 4d). Таким образом в головной мозг проникают, например, инсулин и трансферрин (Abbott et al., 2006).

Незаряженные липофильные молекулы размером до 500 Да способны проходить через мембрану клеток, тем самым они способны беспрепятственно проникать через эндотелий ГЭБ (рис. 4b). Чтобы защитить головной мозг от нежелательных молекул на люминальной мембране есть специальный транспортер – Р-гликопротеин (P-gp). Эта молекула откачивает из клетки нежелательные молекулы и отправляет их обратно в кровоток (Abbott et al., 2006; Gelperina, 2006).

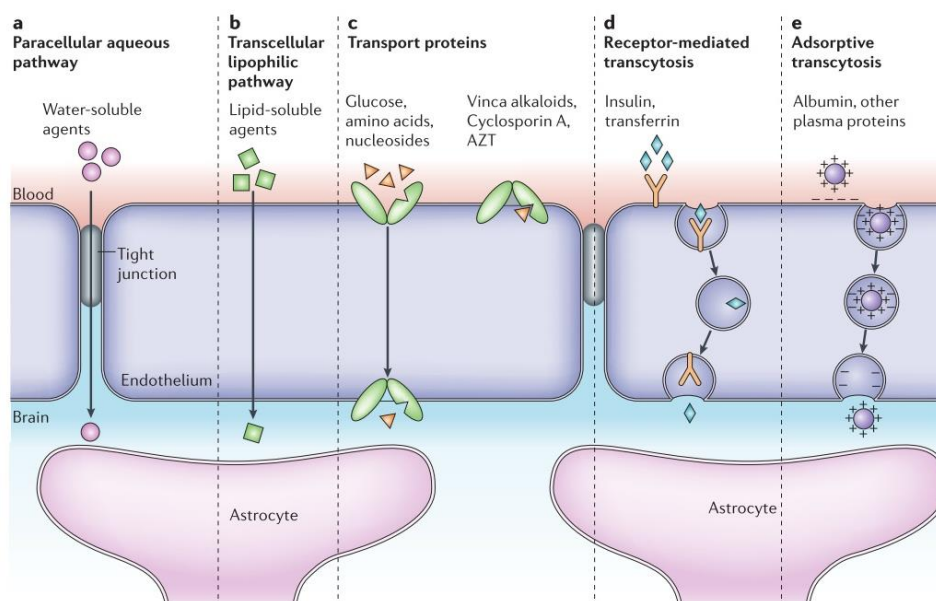


Рис. 4. Пути проникновения веществ через ГЭБ. а) парацеллюлярный транспорт для воды и полярных веществ, б) жирорастворимые молекулы могут проходить через клеточную мембрану, в) перенос веществ с помощью специальных транспортеров (для глюкозы, аминокислот, пуриновых оснований, нуклеозидов, холина и др.), д) некоторые белки, в частности инсулин и

трансферрин, захватываются специальными рецепторами и переносятся путем трансцитоза, е) белки плазмы крови, например альбумин, в норме не проходят через ГЭБ, однако их проникновение увеличивается при их катионизации (Abbott et al., 2006).

Р-гликопротеин

Р-гликопротеин является трансмембранным белком, гликозилированным на N-конце. Его масса составляет 170 кДа, он имеет 2 участка, каждый из которых состоит из 6 трансмембранных доменов и одного нуклеотид-связывающего домена (рис. 5) (Kwan, Brodie, 2005). Р-гликопротеин является продуктом гена *MDR1*, который располагается в 7-й хромосоме. Этот белок располагается на секреторной поверхности гепатоцитов, клетках поджелудочной железы, почек, кишечника и плаценты (Cordon-Cardo et al., 1990). На клетках, образующих ГЭБ, Р-гликопротеин был обнаружен в 1989 году (Cordon-Cardo et al., 1989). Он является АТФ-зависимым транспортером, расположенным на люминальной стороне мембраны, не имеет избирательности и преимущественно связывает вещества липофильной природы. (Gottesman, Pastan, 1993; Lam, Koren, 2014; Lazarowski et al., 2007).

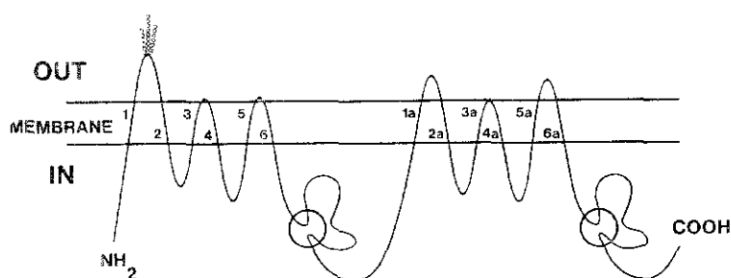


Рис. 5. Модель трансмембранной ориентации Р-гликопротеина (Chen et al., 1986).

Механизм устойчивости к препаратам химиотерапии был впервые описан на раковых клетках и объяснен через взаимодействие этих препаратов с транспортером Р-гликопротеином (Gottesman et al., 2001; Gottesman, Pastan, 1993). Позже выяснилось, что Р-gp способен связывать не только цитостатические

агенты, но и множество других лекарств. После этих открытий началась эра исследования транспортера. Позже было открыто целое суперсемейство подобных молекул – ABC-транспортеров (ATP-binding cassette protein), которые также носят название MDR (multidrug resistance proteins) и в настоящее время насчитывают более 100 белков (Gottesman, Pastan, 1993; Kwan, Brodie, 2005; van Veen, Konings, 1997).

После открытия P-gp, проводилось множество исследований, в которых пытались выяснить субстратную специфичность этой молекулы. Оказалось, что он способен откачивать из клетки против градиента их концентрации множество лекарственных препаратов, аминокислоты, сахара, пептиды, ферменты и даже металлы. Использование ингибиторов *in vitro* и *in vivo* позволило определить огромное количество веществ, которые являются субстратом P-гликопротеина (табл. 1) (Kwan, Brodie, 2005). Тем не менее, взаимодействие некоторых препаратов с P-gp, в частности КБЗ до сих пор вызывает споры.

Табл.1. Субстраты и ингибиторы P-гликопротеина (Kwan, Brodie, 2005).

P-gp substrates			
Anticancer drugs	Other cytotoxic agents	Steroids	
Doxorubicin	Colchicine	Aldosterone	
Daunorubicin	Emetine	Dexamethasone	
Vinblastine	Puromycin		
Vincristine		Miscellaneous	
Etoposide	Peptides	Digoxin	
Teniposide	Leupeptin	Protease inhibitors	
Paclitaxel	Pepstatin A	Loperamide	
Docetaxel	Gramicidin D	Rhodamine 123	
Actinomycin D	Nonactin	^{99m} Tc-SESTAMIBI	
Mitoxantrone		Triton X-100	
P-gp inhibitors			
Calcium channel blockers	Cyclic peptides	Steroids	Miscellaneous
Verapamil	Cyclosporin A	Progesterone	Dipyridamole
Nifedipine	Valinomycin	Tamoxifen	Amiodarone
Diltiazem	Tacrolimus	Cortisol	Quinidine
Nicardipine			Propranolol
	Phenothiazines	Antibiotics	Chloroquine
	Trifluoperazine	Erythromycin	Terfenadine
	Chlorpromazine	Ceftriaxone	Reserpine

Фармакорезистентная эпилепсия и ее взаимосвязь с Р-гликопротеином

Фармакорезистентная эпилепсия остается одной из важнейших проблем, с которой нередко сталкиваются пациенты и врачи. При этом от 30 до 40% пациентов не могут получить должного лечения, так как оказываются устойчивыми, или резистентными, ко многим антиэпилептическим препаратам (АЭП) (Chang, Lowenstein, 2003). Последствия резистентной эпилепсии могут быть очень тяжелыми. Смертность от приступов среди таких пациентов от 4 до 7 раз выше, по сравнению с другими видами эпилепсии (Sperling, 2004). Такие пациенты получают максимальные дозы АЭП как в виде монотерапии, так и в виде комбинированной терапии. Кроме того, в борьбе с приступами у таких пациентов оказываются неэффективны новые АЭП, даже если они имеют другой механизм действия. При возникновении устойчивости хотя бы к одному препарату, вероятность того, что другой АЭП окажется эффективен составляет около 20% (Kwan, Brodie, 2000). Это позволило предположить, что в основе резистентности лежат неселективные механизмы.

Участие Р-гликопротеина транспортера в возникновении фармакорезистентной эпилепсии впервые предположил в 1995 году Тишлер и сотрудники (Tishler et al., 1995). В настоящее время эта гипотеза находит все больше подтверждений.

Одним из главных доказательств участия Р-гр в возникновении резистентности к препаратам является повышение экспрессии этого гликопротеина и родственных ему транспортеров MDR в головном мозге людей, страдающих эпилепсией. Количество такого транспортера на поверхности клеток ГЭБ может возрастать до 1000 раз при возникновении резистентности, при этом увеличение плотности транспортера максимальна в очаге эпилепсии (Gottesman, Pastan, 1993; Ling, 1989). При этом, экспрессия повышается не только на мембране клеток эндотелия капилляров головного мозга, но и на астроцитах. Поскольку Р-гр и транспортеры семейства MDR взаимодействуют с широким спектром различных веществ, их повышенная экспрессия является логичным и

адекватным объяснением возникновения устойчивости ко многим АЭП (Kwan, Brodie, 2005; Loscher, Potschka, 2005a,b; Schmidt, Loscher, 2005).

Как упоминалось выше, Р-гликопротеин способен выводить противоопухолевые и многие другие группы препаратов из клетки даже против градиента их концентрации. В исследованиях головного мозга пациентов с устойчивой эпилепсией было показано не только повышение экспрессии ABC-транспортеров, но и пониженная концентрация различных АЭП в головном мозге (Loscher, Potschka, 2005a,b). В частности, было показано, что отношение концентрации фенитоина в головном мозге к плазме крови у мышей в ответ на судороги, индуцированные каином, значительно снижается при увеличении экспрессии Р-gp (Rizzi et al., 2002). Кроме того, концентрация АЭП в головном мозге может иметь и региональные отличия. В частности, концентрация лекарств в очаге эпилепсии может быть существенно ниже по сравнению с цереброспинальной жидкостью. Такой эффект был показан для ламотриджина, левитирацетама, карбамазепина и его активного метаболита 10-гидроксикарбазепина (Rambeck et al., 2006).

Карбамазепин.

Карбамазепин (КБЗ) является производным иминобензила, сходным по структуре с трициклическими антидепрессантами (рис. 2). Он был открыт в 1962 году и изначально его применяли как препарат при тригеминальной невралгии. Его антиэпилептические свойства были выявлены позже. Тем не менее, КБЗ является одним из препаратов первого выбора для лечения эпилепсии (Panayiotopoulos, 2009).

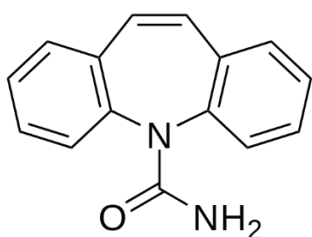


Рис. 2. Структура карбамазепина

Карбамазепин эффективен против парциальных и генерализованных тонико-клонических судорог (Grand mal), в том числе, при эпилепсии височной доли. Эффективен при лечении как идиопатической, так и симптоматической фокальной эпилепсии с и без вторичной генерализации. Против некоторых типов эпилепсии, в частности, против ювенильной миоклонической, абсансной эпилепсии и синдрома Леннокса-Гасто, препарат не только неэффективен, но и способен усугубить состояние пациента (Panayiotopoulos, 2009).

Антиэпилептический эффект карбамазепина в основном осуществляется через его взаимодействие с быстрыми натриевыми каналами. Он продлевает время их нахождения в инактивированном состоянии, тем самым препятствуя прохождению быстро повторяющихся разрядов, и таким образом, предотвращает патологическую деполяризацию нейронов (Ambrósio et al., 2002; Panayiotopoulos, 2009; Tulloch et al., 2012). Было показано, что КБЗ может действовать на канал как с внутренней, так и с внешней стороны. Хотя, такой результат может быть связан с липофильной природой препарата и тем, что он достаточно легко проникает через клеточную мембрану (Jo, Vean, 2014). Также КБЗ снижает выброс глутамата и стабилизирует клеточные мембраны, что также может вносить вклад в антиэпилептические свойства препарата (Panayiotopoulos, 2009).

КБЗ метаболизируется в печени под действием фермента цитохром P450 с образованием его активного метаболита эпоксида карбамазепина (КБЗ-Э, карбамазепин-10,11-эпоксид). КБЗ-Э также обладает противоэпилептическими свойствами. (Battino et al., 1995; Panayiotopoulos, 2009; Tulloch et al., 2012). КБЗ-Э гидролизуется до неактивного диола карбамазепина (транс-10,11-дигидрокси-10,11-дигидрокарбамазепин), который элиминируется в печени (Tulloch et al., 2012). КБЗ усиливает активность цитохрома P450 в 2-3 раза, таким образом усиливая свой метаболизм (аутоиндукция) (Marino et al., 2012). Этот механизм запускается через 24 часа после первого приема препарата и уровень аутоиндукции стабилизируется от 1 до 5 недель. Поэтому, для поддержания стабильной концентрации препарата в крови требуется подбор дозы в течении

первых 3 месяцев (Reith et al., 2001; Tulloch et al., 2012). Экскрецию метаболитов карбамазепина на 2-36% могут осуществлять почки (Battino et al., 1995).

Карбамазепин имеет низкую растворимость в воде (18 мкг/мл), именно поэтому он существует только в форме таблеток. В настоящее время активно ведутся поиски парентеральной формы КБЗ (Tulloch et al., 2012). При попадании в организм пероральным путем абсорбция препарата происходит медленно, а биодоступность обычно составляет 75-85%, однако, в отдельных случаях она может снижаться до 50% (Panayiotopoulos, 2009). Поскольку КБЗ нерастворим в воде, большая его фракция, а именно 68-83%, а также 58-68% КБЗ-Э находится в связанной с белками форме, причем большую часть этих белков составляют альбумин и α -1-кислый гликопротеин (Battino et al., 1995; Marino et al., 2012).

Риск тератогенных эффектов при приеме КБЗ во время беременности относительно низкий и в среднем составляет 2,2% (по разным данным от 1,4 до 3,4%). Эта цифра существенно ниже, чем количество мальформаций в случае, если беременная женщина не применяет никаких препаратов (в среднем 3,5%, по разным данным от 1,8 до 6,8%) (Panayiotopoulos, 2009). Практически полное отсутствие влияния карбамазепина на плод является очень важным преимуществом этого препарата по сравнению со многими другими, например, с вальпроатом натрия.

Суммируя все вышесказанное, карбамазепин считается одним из лучших АЭП, пригодных для лечения фокальных и вторично генерализованных приступов (Panayiotopoulos, 2009). Однако, он до сих пор существует только в форме таблеток. Именно поэтому одним из современных приоритетных направлений является поиск парентеральной формы карбамазепина.

Влияние КБЗ на поведение.

Структура карбамазепина схожа со структурой трициклических антидепрессантов (Panayiotopoulos, 2009). Было показано, что пациенты, которых лечат этим препаратом, реже страдают от депрессии по сравнению с другими

больными (Barbieri et al., 2015). КБЗ способен изменять проводимость нейронов ЦНС, что не может не влиять на поведение и когнитивные функции. Этот препарат относят к группе нормотимиков – препаратов, нормализующих и стабилизирующих настроение. Именно поэтому КБЗ применяют в психиатрии для лечения биполярных расстройств и шизофрении (Samara et al., 2016; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2017). Была показана взаимосвязь между болезнью Альцгеймера и эпилепсией. Оказалось, что у пациентов, страдающих этим нейродегенеративным заболеванием, может быть повышена возбудимость головного мозга. У людей, страдающих от болезни Альцгеймера, терапия с помощью АЭП, в том числе и КБЗ, улучшала их состояние (Vossel et al., 2017).

Влияние КБЗ на поведение и когнитивные функции многократно подтверждалось в исследованиях на животных. При этом, более выраженные изменения были показаны при хроническом введении препарата. Одним из наиболее выраженных эффектов КБЗ является снижение тревожности. Анксиолитические свойства препарата были показаны в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (Rezvanfard et al., 2009; Zangrossi, Leite, 1992). Также в тесте ПКЛ исследовали память животных. В одном из исследований крыс помещали на край открытого рукава ПКЛ и измеряли время достижения животным темного отсека, при этом эксперимент повторяли каждые 6 дней. Животные, которым вводили КБЗ быстрее обучались и перемещались в темный отсек. Более того, совместное введение КБЗ с ПТЗ приводило к частичной нормализации времени достижения темного отсека по сравнению с группой, животным которой вводили только хемоконвульсант, даже несмотря на то, что КБЗ неэффективен на данной модели эпилепсии (Aroga et al., 2010). Аналогичный тест проводили дважды на фоне судорог, индуцированных МЭШ. При этом, у животных также была выявлена нормализация поведения при лечении судорог с помощью КБЗ (Reeta et al., 2011).

Исследование поведения животных в других тестах и моделях подтверждает позитивное влияние КБЗ на память. Введение КБЗ мышам с

моделированной болезнью Альцгеймера также приводило к улучшению пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Zhang et al., 2017). Кроме того, было показано влияние КБЗ на способность животных различать знакомые и незнакомые объекты. Отличие было показано на животных со спонтанными судорогами на модели эписатуса, вызванным введением пилокарпина. Регулярное введение КБЗ здоровым животным не оказало никаких побочных эффектов (Bernardi, Barros, 2004).

Хроническое введение КБЗ влияет не только на тревожность и память, но и на многие другие аспекты поведения. Применение этого препарата уже через неделю снижало локомоторную активность животных в клетке с фотоэлементами, при этом в других тестах изменений в координации движений выявлено не было. (Nowakowska et al., 2011). Антидепрессантные свойства КБЗ также были показаны в «двухкамерном исследовательском тесте» по Кроули (Nowakowska et al., 2007).

Тесты на пассивное избегание также выявили изменения в поведении животных на фоне хронических инъекций КБЗ. Сами судороги в различных тестах приводили как к повышению (Arora et al., 2010), так и к понижению (Reeta et al., 2011) уровня пассивного избегания. Отличие эффекта в разных работах может быть связано с использованием исследователями разных моделей, что и могло привести к разным нарушениям в головном мозге. Однако, введение КБЗ в обоих случаях приводило к нормализации уровня пассивного избегания. Хронический прием КБЗ без инициирования судорог снижал этот параметр (Arora et al., 2010). В другом исследовании было показано отсутствие влияния КБЗ на пассивное избегание и память в тесте Т-образный лабиринт (Sudha et al., 1995).

Поскольку карбамазепин является блокатором натриевых каналов, он влияет на восприятие боли. Мыши, которым вводили высокие дозы карбамазепина, показывали сниженный порог болевой чувствительности в тестах «горячая пластина» и «сдавливание хвоста» (Sakaue et al., 2004).

Парентеральные формы карбамазепина

В настоящее время многие, но далеко не все АЭП существуют и в пероральной, и парентеральной форме. Растворимая форма препарата необходима для применения в тех случаях, когда пероральный прием препарата невозможен, например, во время операций, при наличии определенных желудочно-кишечных заболеваний, изменении психического статуса или при необходимости быстро восстановить уровень препарата в плазме крови (Franco et al., 2014). Парентеральные формы для многих АЭП появлялись гораздо позже пероральных. Например, для фенитоина такая форма появилась в 1956 году, через 15 лет после начала применения таблеток, в то время, когда препарат уже широко использовали для лечения эпилепсии. Растворимые формы вальпроевой кислоты и левитирацетама также были разработаны спустя многие годы после начала их применения в форме таблеток, даже несмотря на то, что эти препараты хорошо растворяются в воде (Patel et al., 2015).

КБЗ не имеет парентеральной формы в клинике до сегодняшнего дня. Однако, многие лаборатории мира ведут разработки подобных форм.

Одной из наиболее перспективных форм карбамазепина, которая в настоящее время ожидает одобрения от Управления по санитарному надзору за качеством продуктов и медикаментов (FDA, Food and Drug Administration), является КБЗ, солюбилизированный с 2-гидроксипролил- β -циклодекстрином (Brewster et al., 1991; Conway et al., 2009; Franco et al., 2014; Patel et al., 2015). Эта форма находится на этапе доклинических исследований и выглядит многообещающей.

Для растворения гидрофобных препаратов, уже на протяжении многих лет используют масляные эмульсии на основе триглицеридов с большой и средней длиной цепи. Эти эмульсии позволяют перевести нерастворимый в воде препарат в жидкую форму. Несмотря на это, долго не удавалось достигнуть большой концентрации препарата в одобренных для таких эмульсий маслах.

Растворимость карбамазепина в эмульсии удалось повысить при помощи технологии SolEmuls, при помощи которой препарат смешивают и гомогенизируют в липофундине под высоким давлением (1500 бар) (Akkar, Müller, 2003; Müller et al., 2004). Таким образом, удалось получить эмульсию с высокой концентрацией карбамазепина, однако сведений о ее антиэпилептической активности пока не получено.

Эмульсии карбамазепина и его комплекс с 2-гидроксипролил- β -циклодекстрином позволяет перевести нерастворимый препарат в растворимую форму, и никак не влияет на его биодоступность. Разработки на основе липосом и наноносителей предположительно должны не только перевести карбамазепин в растворимую форму, но и осуществлять адресную доставку в головной мозг. Это должно позволить снизить дозу препарата и свести к минимуму его побочные эффекты (Akkar, Müller, 2003).

Наноэмульсии на основе 1-О-алкилглицерола повышают проницаемость препаратов через ГЭБ. Они повышали эффективность цитостатиков и антибиотиков в головном мозге (Erdlenbruch et al., 2000). На основе 1-О-алкилглицерола было создано несколько эмульсий с карбамазепином. Для некоторых таких форм было показано увеличение накопления препарата в головном мозге мышей (Madhusudhan et al., 2007).

В настоящее время разработка наноносителей для транспортировки препаратов в головной мозг является одним из приоритетных направлений науки. Их использование позволяет не только переводить нерастворимые или слабо растворимые в воде препараты, но и осуществлять их адресную доставку.

Является ли карбамазепин субстратом для Р-гликопротеина

Как уже было сказано выше, Р-гликопротеин активно связывает преимущественно липофильные соединения. Многие АЭП, и в частности карбамазепин, имеют именно такую природу. Для многих противосудорожных лекарств связывание уже было показано, в частности для фенитоина (Alvariza et

al., 2013; Luna-Tortós et al., 2008) фенобарбитала, левитирацетама и ламотриджина (Luna-Tortós et al., 2008). Однако, взаимодействие КБЗ с Р-gp до сих пор вызывает споры.

В настоящее время вопрос о том, является ли карбамазепин субстратом этого транспортера остается открытым. Результаты некоторых исследований показывают, что транспортер не связывает карбамазепин. Это было показано на мышах с нокаутом гена *mdr1a/1b(-/-)*, а также на клеточных линиях с трансфекцией человеческого гена *Mdr1*, продуктом которого является Р-gp (Baltes et al., 2007; Baltes et al., 2007; Owen et al., 2001). Отсутствие направленного транспорта КБЗ также было показано на различных культурах клеток трансфицированных геном *Mdr1* (Luna-Tortós et al., 2008).

Однако, существует масса исследований, которые подтверждают взаимодействие КБЗ и Р-gp. Такой эффект был показан на клеточных культурах с трансфекцией человеческого гена этого транспортера и в экспериментах *in vivo* при ингибировании этого транспортера путем микродиализа (Potschka et al., 2001; Weiss et al., 2003). На культуре эндотелия сосудов головного мозга крысы (rBMES) было показано, что ингибиторы этого транспортера, а именно циклоспорин А, верапамил и многие другие, приводят к значительному увеличению поглощения КБЗ (Sun et al., 2006). На модели электрического киндлинга миндалины было показано, что экспрессия Р-гликопротеина возрастает во время развития эпилепсии (Ma et al., 2013). Вследствие чего снижается проницаемость ГЭБ для фенитоина и карбамазепина. Такое снижение на пике концентрации составляет примерно 30%. При связывании Р-gp с широко известным блокатором верапамилем, такое падение концентрации АЭП нивелируется. Кроме того, было показано увеличение концентрации КБЗ в диализате головного мозга крыс при введении блокаторов Р-gp верапамила или пробенецида (Potschka et al., 2001). Также существуют данные о влиянии КБЗ на Р-gp, а именно, на культуре rBMES было показано, что применение КБЗ в течение 60 дней приводит к увеличению уровня транспортера (Yang et al., 2008).

Таким образом, единого мнения о взаимодействии КБЗ и Р-гр не существует. Вероятно, взаимодействие между транспортером и препаратом есть, но в норме оно невелико. Однако, при эпилепсии повышается экспрессия Р-гр и это взаимодействие может выйти на первый план и сыграть драматическую роль в возникновении фармакорезистентности.

Наночастицы

Головной мозг является одним из самых сложных органов-мишеней для фармакотерапии. Проникновение многих препаратов, в том числе противораковых или антиэпилептических, может быть затруднено из-за особого устройства ГЭБ и наличия там АВС-транспортеров и, в частности, Р-гр. Увеличения проницаемости ГЭБ можно достигнуть различными способами, в частности, с помощью введения вазоактивных веществ, например, брадикинина, или гиперосмотических растворов. В этих случаях проницаемость изменяется временно и избирательно (Gelperina, 2006). Поэтому, в настоящее время ведутся активные разработки способов адресной доставки препаратов в головной мозг. Одной из перспективных разработок являются полимерные наночастицы (НЧ) (Балабаньян, Гельперина, 2012; Gelperina, 2006).

Для производства наночастиц часто в качестве полимера используют полибутилцианоакрилат (ПБЦА-НЧ) или сополимер молочной и гликоевой кислот (ПЛГА-НЧ) (Балабаньян, Гельперина, 2012; Gelperina et al., 2010). Эти полимеры метаболизируются в печени. Ни сами эти полимеры, ни их метаболиты не являются токсичными для организма.

Для возрастания времени циркуляции наночастиц, и, как следствие, увеличения биодоступности препарата, их поверхность необходимо стерически модифицировать неионными поверхностно-активными веществами (ПАВ), или сурфактантами. Для этой цели используют полисорбат-80 (ПС-80), полиэпиленгликоли (ПЭГ), полуксамины или полуксамеры (Балабаньян,

Гельперина, 2012; Gelperina, 2006). Без такой модификации препарат быстрее метаболизируется в печени и значительно хуже проникает в головной мозг.

С помощью таких частиц в головной мозг удалось доставить множество веществ – субстратов Р-гр, в частности даларгин, лоперамид и доксорубицин (Alyautdin et al., 1995, 1997; Gulyaev, 1995). Кроме того, в головной мозг с помощью таких частиц были доставлены и более крупные молекулы пептидной природы (Kurakhmaeva et al., 2009). Таким образом, наночастицы уже доказали свою способность доставлять вещества в головной мозг, которые в свободном виде не способны преодолеть гемато-энцефалический барьер.

Согласно последним исследованиям существует 4 предположительных способа доставки препарата при помощи наночастиц (Балабаньян, Гельперина, 2012; Gelperina, 2006).

1. Неселективное повышение проницаемости ГЭБ в результате воздействия НЧ или ПАВ (токсический эффект). Однако, он оказался практически сразу опровергнут в связи с тем, что, во-первых, в экспериментах *in vitro* нейротоксичности выявлено не было. Во-вторых, в этом случае препарат должен иметь эффективность не только в инкапсулированном виде, но и при совместном введении с НЧ (Ramge et al., 2003).

2. Поступление вещества в результате повышения градиента кровь-мозг, который может возрасти при увеличении концентрации препарата в крови, либо времени его циркуляции. В настоящее время ведется активная разработка «стелс» наночастиц, которые будут невидимыми для макрофагов, за счет чего увеличится время их циркуляции. С помощью «стелс» наночастиц удалось увеличить концентрацию доксорубицина в 9 раз по сравнению с обычными НЧ (Zara et al., 2002).

3. Взаимодействие НЧ с мембраной (неселективное или рецептор-опосредованное), как следствие – экзоцитоз или увеличение

времени удержания частиц у клеток эндотелия и, как следствие, увеличение времени для диффузии. Kreuter et. Al (2002) показали, что полисорбат-80 способствует абсорбции на поверхности НЧ апополипротеинов В и Е. Эти белки способны взаимодействовать рецепторами-мусорщиками SR-B1, которые в норме взаимодействуют с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) на мембране клеток эндотелия головного мозга и запускают процесс рецептор-опосредованного эндоцитоза. Благодаря этому процессу наночастицы с препаратом могут диффундировать в мозговую ткань (Georgieva et al., 2014; Petri et al., 2007).

4. Ингибирование АТФ-зависимых трансмембранных белков, таких как Р-гр, или снятие их ингибирующего влияния на проникновение препаратов. Этот механизм был предположен в связи с тем, что многие препараты, которые являются субстратами для Р-гр беспрепятственно проникали через ГЭБ. Предполагается, что наночастицы могут задерживаться в русле головного мозга и разрушаться там, образуя ионную пару с доставляемым препаратом, которая не взаимодействует с Р-гр (Балабаньян, Гельперина, 2012).

В действительности, *in vivo* могут работать сразу несколько из вышеперечисленных механизмов, поскольку работа одного из них не запрещает работу другого.

Несмотря на то, что механизм доставки препаратов в головной мозг до конца не выяснен, эффективность применения наночастиц как носителей для проникновения через ГЭБ была показана для многих препаратов. Введение такой формы доксорубина приводило к достоверному увеличению продолжительности жизни крыс с глиобластомой головного мозга. Также был показан анальгетический эффект на мышцах при применении лоперамида в НЧ, который в норме не проникает через ГЭБ (Gelperina, 2006; Gelperina et al., 2010; Gulyaev, 1995). Также, с помощью НЧ, в головной мозг был доставлен фактор

роста нервов. Концентрация этого препарата в головном мозге была достоверно выше в группе, животным которой вводили НЧ, модифицированные ПАВ. Кроме того, у животных при этом нормализовалось поведение после введения МФТП (модель Паркинсонизма) в различных тестах (Kurakhmaeva et al., 2009).

Поиск растворимых форм антиэпилептических препаратов, а также преодоление резистентности ко многим АЭП являются важными проблемами современной науки и медицины. Наночастицы являются перспективной разработкой, которая позволит не только перевести вещество в растворимую форму, но и увеличить его прохождение через ГЭБ, тем самым повысив эффективность препарата и снизив его дозу, что в конечном итоге приведет к облегчению лечения многих заболеваний головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Глава 1. Необходимость использования ИЗН модели и ее исследование

1. Исследование эффективности карбамазепина на ПТЗ-модели.

Эксперимент проводили на самцах крыс линии Wistar (n=17) массой 250-300 грамм. Судороги индуцировали путем внутрибрюшинного введения ПТЗ (рис. 6). Тяжесть судорог оценивали по пятибалльной шкале Racine (табл. 2). Для снижения смертности животных было применено дробное введение препарата. ПТЗ вводили три раза внутрибрюшинно по 25 мг/кг с интервалом в 15 минут. Максимальная суммарная доза препарата составляла 75 мг/кг. Если после второго введения тяжесть судорог составляла 3 балла или более, то третью дозу не вводили, так как это с высокой вероятностью привело бы к гибели животного. Животных, которые перенесли только 2 инъекции ПТЗ, относили к неустойчивым, а перенесшим 3 инъекции – к устойчивым (рис.7.).

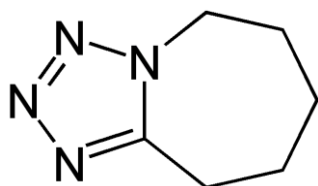


Рис.6. Структура пентилентетразола

Кроме ПТЗ животным за 45 минут до первой инъекции вводили физиологический раствор (контрольная группа, ПТЗ, n=8) или карбамазепин (опытная группа, КБЗ+ПТЗ, n=9).

В работе оценивали тяжесть судорог по пятибалльной шкале (табл. 2), латентный период наступления 3-балльных и 4-5 балльных судорог, а также процент устойчивых и неустойчивых к судорогам животных.

Таблица 2. Тяжесть судорог по шкале Racine (Racine et al., 1972; Racine, 1975).

Балл	Поведенческие проявления судорог
0	Нормальное поведение животного
1	Абнормальное поведение животного (замирание, затаивание), жевание, отдельные вздрагивания головы
2	Атипичные миоклонические судороги головы
3	Клонические судороги конечностей и тела
4	Поза «кенгуру»: клонические судороги конечностей, тонические судороги тела
5	Тяжелые тонико-клонические судороги с потерей позы

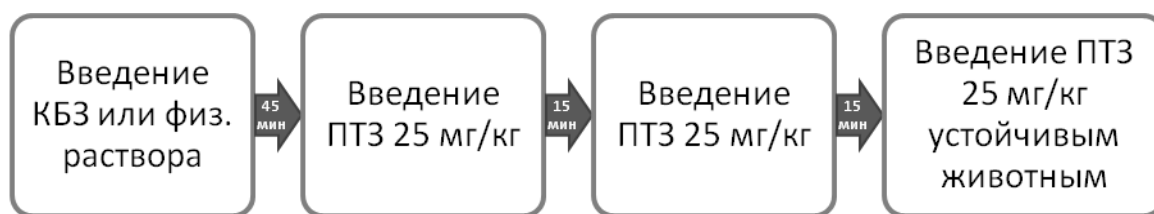


Рис.7. Схематичный протокол эксперимента по определению эффективности КБЗ на ПТЗ-модели.

2. Гистологические исследования проницаемости ГЭБ.

Для качественной оценки проницаемости ГЭБ после судорог, вызванных изониазидом, животным вводили внутривенно краситель Эванс Блю. При введении в кровь этот краситель образует комплекс с сывороточным альбумином (молекулярный вес комплекса 64 кДа), который в норме не проникает через неповрежденный ГЭБ. Проникновение Эванс Блю в головной мозг приводит к его яркому окрашиванию в синий цвет. Кроме того, этот краситель обладает флуоресцентными свойствами ($\lambda_{\text{возб}}=525$ нм, $\lambda_{\text{исп}}=620$ нм). Поэтому Эванс Блю служит маркером структурно-функциональной целостности ГЭБ.

Для качественной оценки проницаемости ГЭБ на фоне действия изониазидом животным вводили внутривенно краситель Эванс Блю в дозе 40 мг/кг. Через 2 ч

всем животным вводили внутривенно хлоралгидрат (ХГ, 400 мг/кг) и проводили перфузию. Судороги инициировали внутривенной инъекцией изониазида. ИЗН в дозе 300 мг/кг (в/б) вводили через 45 минут после Эванс Блю. В качестве положительного контроля проводили введение 2% раствора Эванс Блю в правый желудочек головного мозга в объеме 10 мкл (табл.3). Для этого животное наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг в/б), после чего помещали в стереотаксический аппарат, в котором и проводили инъекцию красителя в правый желудочек. Эванс Блю вводили с помощью помпы (540310 TSE systems, Germany) в течении 2 минут.

После эксперимента была проведена перфузия. Для этого животным под наркозом (хлоралгидрат в дозе 450 мг/кг) вскрывали брюшную полость, отодвигали печень от диафрагмы и аккуратно по краю вырезали диафрагму, и таким образом получали доступ к грудной полости. Затем аккуратно, чтобы не задеть сердце и крупные сосуды, делали надрезы поперек ребер параллельно грудине. Грудину с остатками ребер отгибали с помощью зажима, таким образом получая доступ к сердцу. В левый желудочек сердца вводили иглу, через которую в системный кровоток поступал физиологический раствор. После промывки сосудов 40-60 мл физиологического раствора, его заменяли на 4% формалин, который поступал в кровоток в объеме 40-60 мл до окоченения нижней челюсти животного. После этого извлекали головной мозг и выдерживали в формалине 3 дня. Затем его помещали на 3-4 дня в раствор 30% сахарозы для криопротекции.

Таблица 3. Дизайн эксперимента по исследованию проницаемости ГЭБ

Группы	Количество животных	Препарат	
		Evans Blue (ЕВ), 40 мг/кг, в/в	Изониазид (ИЗН), через 45 мин после ЕВ 300 мг/кг
1 (отрицательный контроль)	2	-	-
2	2	+	-
3	2	+	+
4 (положительный контроль)	2	icv 10 мкл	-

Проникновение красителя в мозг крыс оценивали визуально (при проникновении Эванс Блю, ткань головного мозга должна иметь синюю окраску) и методом флуоресцентной микроскопии *post mortem* на криосрезах толщиной 20 мкм. Работа была проведена на конфокальном микроскопе Zeiss Axio Imager 2 (Германия). Дизайн эксперимента представлен в Табл. 3.

3. Фотометрическая оценка проницаемости ГЭБ

Эксперимент проводили на самцах крыс линии Wistar (n=24) массой 250-300 г. Для количественной оценки проницаемости ГЭБ на фоне действия изониазида животным вводили внутривенно краситель Эванс Блю в дозе 40 мг/кг. Затем у части животных индуцировали судороги введением изониазида. ИЗН вводили через 45 минут после Эванс Блю в дозе 300 мг/кг внутривенно (Табл.4). В качестве отрицательного контроля использовали чистых животных, которым вместо красителя внутривенно вводили физиологический раствор.

Таблица 4. Дизайн эксперимента по количественному исследованию проницаемости ГЭБ

Группы	Количество животных	Препараты	
		Эванс Блю	Изониазид (ИЗН), 300 мг/кг
Отрицательный контроль (Физ. р-р)	6	-	-
Эванс Блю iv	6	40 мг/кг, внутривенно	-
Эванс Блю icv	6	10 мкл, в правый желудочек	-
Эванс Блю iv + судороги	6	40 мг/кг, внутривенно	+

В качестве положительного контроля использовали животных, которым вводили 2% раствор Эванс Блю в правый желудочек головного мозга в объеме 10 мкл (табл.4). Для этого животное наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг в/б), после чего помещали в стереотаксический аппарат, в котором и проводили

инъекцию красителя в правый желудочек. Эванс Блю вводили с помощью помпы в течении 2 минут.

Через 2 ч после введения красителя всем животным вводили внутривенно хлоралгидрат (ХГ, 450 мг/кг) и проводили перфузию (методика представлена в главе 1 пункт 2). Животным в левый желудочек сердца вводили иглу, через которую в системный кровоток инъецировали физиологический раствор в объеме 60-80 мл.

Из извлеченного головного мозга после перфузии под бинокуляром отделяли области коры, гиппокампа, таламуса с базальными ганглиями (далее для краткости названо таламус) и остаток, большую часть которого составляли мозжечок и ствол головного мозга. После отделения каждую из этих частей отдельно гомогенизировали и взвешивали. К гомогенату добавляли формамид из расчета 1 мкл на 1 мг ткани. Ткани в формамиде инкубировали двое суток в термостате при температуре 37°C. После инкубации пробы центрифугировали (300 об, 20 минут). Оптическую плотность супернатанта определяли при помощи анализатора Пикон Униплан при длине волны 620 нм.

Для построения калибровочной кривой использовали различные концентрации Эванс Блю в формамиде. Концентрацию красителя в супернатанте определяли по калибровочной кривой.

Глава 2. Исследование эффективности препарата КБЗ-НЧ

1. Антиэпилептическая эффективность нанокапсулированной формы карбамазепина.

Эксперимент проводили на крысах линии Wistar (n=155). В эксперименте использовали 14 групп животных, в каждой из которых было от 8 до 16 крыс. Всем животным вводили антиэпилептические препараты внутривенно в различных дозах за 45 минут до введения хемоконвульсанта изониазида (в/б 300 мг/кг). После инъекции хемоконвульсанта за животным наблюдали в течение 120 минут. Количество животных в каждой группе, препараты и их дозы представлены в таблице 5.

Таблица 5. Количество животных в каждой группе и вещества, вводимые им.

Группы	Кол-во животных	Препарат	
		АЭП	Изониазид 300 мг/кг
1. Контроль	16	- (физ. р-р)	+
2. Растворитель	12	- (10% Pluronic F-68)	+
3. КБЗ 3 мг/кг	8	КБЗ 3 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
4. КБЗ 15 мг/кг	8	КБЗ 15 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
5. КБЗ 20 мг/кг	12	КБЗ 20 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
6. КБЗ 25 мг/кг	8	КБЗ 25 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
7. КБЗ 30 мг/кг	13	КБЗ 30 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
8. НЧ плацебо	8	PLGA-наночастицы 10 мг/кг в 1% Pluronic F-68	+
9. КБЗ-НЧ 0,7 мг/кг	12	КБЗ-НЧ 0,7 мг/кг в 1% Pluronic F-68	+
10. КБЗ-НЧ 1 мг/кг	10	КБЗ-НЧ 1 мг/кг в 1% Pluronic F-68	+
11. КБЗ-НЧ 3 мг/кг	15	КБЗ-НЧ 3 мг/кг в 1% Pluronic F-68	+
12. КБЗ-НЧ 5 мг/кг	13	КБЗ-НЧ 5 мг/кг в 1% Pluronic F-68	+
13. КБЗ-НЧ 8 мг/кг	12	КБЗ-НЧ 8 мг/кг в 1% Pluronic F-68	+
14. КБЗ+НЧ	8	КБЗ 3 мг/кг + НЧ плацебо 10 мг/кг	+

В эксперименте использовали наночастицы, приготовленные из сополимера молочной и гликоевой кислот (ПЛГА-НЧ) диаметром 120-160 нм. Перед введением ПЛГА-НЧ как с КБЗ, так и плацебо в течении 30 минут инкубировали в 1% растворе Pluronic F-68. Это необходимо для модификации поверхности наночастиц для облегчения транспорта через ГЭБ.

В ходе эксперимента оценивали следующие параметры:

- тяжесть судорог по пятибалльной шкале Racine, где 0 – отсутствие поведенческих аномалий, а 5 – сильные тонико-клонические судороги (Racine et al., 1972; Racine, 1975) (табл. 2);
- латентный период наступления 4-5 балльных судорог, если в группе возникали судороги лишь у отдельных крыс, то их ЛП отображали на графике;
- продолжительность судорог, если судороги в течение эксперимента возникали несколько раз, то длительность всех приступов суммировалась. Если продолжительность судорог превышала 10 минут, то ее принимали равной 10 минутам.

2. Сравнение эффективности парентеральных форм КБЗ с «Финлепсином».

Поскольку карбамазепин в настоящее время существует только в форме таблеток, мы сравнивали выявленные эффективные дозы исследуемых препаратов с «Финлепсином», который является таблетированной формой КБЗ. «Финлепсин» вводили крысам линии Wistar (n=14) при помощи зонда в желудок за 2,5 часа до введения изониазида (в/б 300 мг/кг). Группу «Финлепсин» сравнивали по следующим параметрам: тяжесть, латентный период наступления и продолжительность судорог с группами контроль (физиологический раствор вместо АЭП), КБЗ 30 мг/кг (в/в) и КБЗ-НЧ 1 мг/кг (в/в) из предыдущего эксперимента.

3. Анализ ЭКоГ животных.

Эксперимент проводили на самцах крыс линии Wistar (n=40).

Животным вживляли регистрирующие электроды во фронтальную кору больших полушарий. Для этого животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг), после чего помещали в стереотаксический аппарат. Поле операции

дополнительно было обезболено новокаином. Регистрирующие электроды вживляли во фронтальную кору (AP=+2; L=2; H=2,5) (Paxinos and Watson, 1998). Индифферентный электрод вживляли в затылочную кость над мозжечком. Электроды фиксировали на голове с помощью самозатвердевающего зубного цемента «Протакрил». Для усиления фиксации цемента перед заливкой в череп вкручивали два винта. После операции животное проходило реабилитацию в течение 7-10 суток.

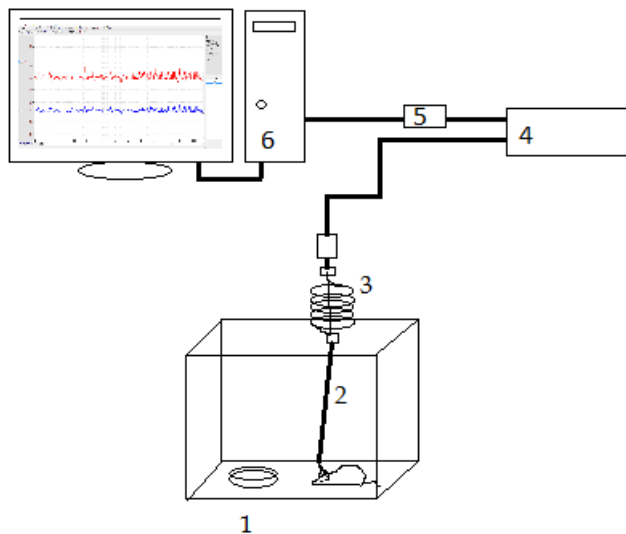


Рис. 8. Схема установки для записи ЭКоГ. 1) бокс с животным, 2) гибкий провод, подключаемый к животному, 3) пружина для компенсации движений животного, 4) усилитель, 5) аналогово-цифровой преобразователь, 6) компьютер с монитором и установленной на нем программой PowerGraph.

После реабилитации животное помещали в специальную камеру для регистрации ЭКоГ (рис. 8). Запись проводили с помощью программы PowerGraph. После 15-30 минут адаптации животного в камере проводили фоновую запись ЭКоГ чтобы убедиться в том, что в норме у животного нет пароксизмальной электрической активности головного мозга. Затем животному вводили АЭП внутривенно и проводили запись в течение 45 минут, чтобы убедиться в том, что исследуемые препараты не вызывают изменений нормальной ЭКоГ. После этого крысам вводили внутривенно ИЗН (300 мг/кг) и проводили двухчасовую запись ЭКоГ с параллельной регистрацией тяжести судорог в баллах по шкале Racine. Группы животных и вводимые им АЭП представлены в табл. 6.

На следующий, третий и седьмой дни после введения препаратов проводили регистрацию ЭКоГ для выявления отставленных эффектов препаратов.

После эксперимента были обработаны записи, и проведен анализ количества, продолжительности и латентного периода наступления пароксизмальной активности на ЭКоГ, а также их сравнение с тяжестью судорог. За пароксизмальную активность принимали повторяющиеся пики или аномалии на ЭКоГ, превышающие амплитуду нормальной записи как минимум в 2 раза.

Таблица 6. Группы животных и вводимы им препараты

Группы	Количество животных	Препарат	
		АЭП	Изониазид, 300 мг/кг
1. Контроль	9	- (физ. р-р)	+
2. КБЗ 30 мг/кг	7	КБЗ 30 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
3. КБЗ-НЧ 1 мг/кг	6	КБЗ-НЧ 1 мг/кг в 1% PluronicF-68	+
4. КБЗ-НЧ 3 мг/кг	6	КБЗ-НЧ 3 мг/кг в 1% PluronicF-68	+
5. КБЗ-НЧ 5 мг/кг	6	КБЗ-НЧ 5 мг/кг в 1% PluronicF-68	+
6. КБЗ-НЧ 8 мг/кг	6	КБЗ-НЧ 8 мг/кг в 1% PluronicF-68	+

4. Влияние хронического введения КБЗ на поведение

Эксперимент проводили на крысах линии Wistar (n=59). Животным разных групп ежедневно в хвостовую вену вводили физиологический раствор, растворитель или препараты карбамазепина в течение 28 дней. Группы животных и дозировка препаратов представлены в табл. 7.

На 21-й день введения проводили тест «Открытое поле» (ОП). На 22 день – «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). С 23 по 28 дни проводили тест «Лабиринт Барнса».

Таблица 7. Группы животных, участвовавших в хроническом эксперименте

Группы	Кол-во животных	АЭП
1. Контроль	12	- (физ. р-р)
2. Растворитель	11	- (5% Pluronic F-68)
3. КБЗ 30 мг/кг	12	КБЗ 30 мг/кг в 5% Pluronic F-68
4. НЧ-плацебо 10 мг/кг	12	НЧ плацебо 10 мг/кг в 1% Pluronic F-68
5. КБЗ-НЧ 1 мг/кг	12	КБЗ-НЧ 1 мг/кг в 1% Pluronic F-68

Тест «Открытое поле»

Тест «Открытое поле» (ОП) является стандартным тестом для оценки тревожности животного.

Крысу помещали в ОП диаметром 130 см и расчерченными на полу секторами на 5 минут (рис. 8). Животное в начале теста помещали в центр поля. Регистрировал следующие параметры:

- Латентный период выхода животного из центра поля (время перемещения животного из середины к краю арены)
- Вертикальную активность (стойки на задних лапах) поминутно. Чем выше этот параметр, тем менее тревожно животное и тем выше его ориентировочно-исследовательская активность.
- Горизонтальную активность животного (количество секторов, пройденных животным) поминутно.
- Выходы в центр 1 и 2 (пересечение первой или второй окружности в поле относительно стенки) поминутно. Чем выше этот параметр, тем менее тревожно животное.
- Количество актов груминга поминутно. Чем ниже этот параметр, тем менее тревожно животное.
- Суммарная продолжительность груминга за 5 минут. Чем ниже этот параметр, тем менее тревожно животное.

- Количество дефекаций за 5 минут. Чем ниже этот параметр, тем менее тревожно животное.

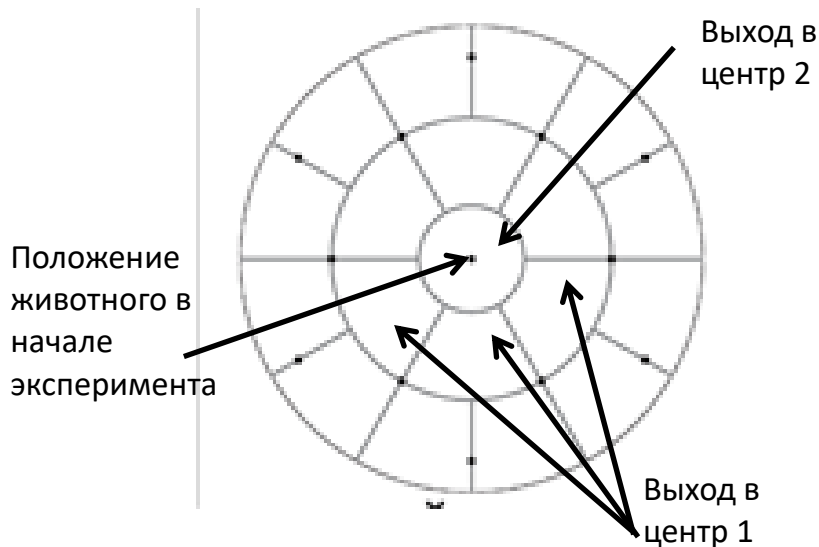


Рис. 8. Схема расположения секторов в тесте «Открытое поле».

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

ПКЛ является стандартным тестом для оценки стресса и тревожного поведения животных. Он состоит из двух открытых и двух закрытых рукавов, приподнятых над полом на 50 см (рис. 9). Открытые рукава подсвечиваются ярким светом, закрытые рукава сделаны из непрозрачного пластика и накрыты сверху крышкой, при этом края этих рукавов открыты.

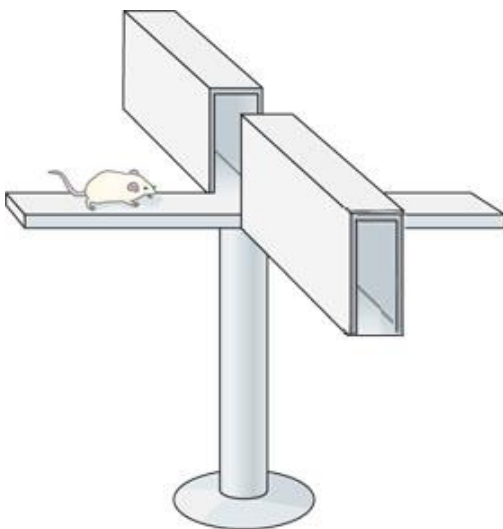


Рис. 9. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Животное помещали в центр (на пересечении рукавов). Затем в течение 5 минут регистрировали следующие параметры:

- время входа в темный рукав из центра;
- время нахождения на свету каждую минуту;
- вертикальная активность (количество стоек);
- выглядывания из темного отсека;
- свешивания с края платформы;
- выходы на центральный сектор;
- выходы в свет 1 (на ближайшую к центру $\frac{1}{2}$ открытого рукава);
- выходы в свет 2 (на дальнюю от центра $\frac{1}{2}$ открытого рукава)
- количество актов груминга;
- продолжительность груминга;
- количество актов дефекации.

Тест «Лабиринт Барнса»

«Лабиринт Барнса» является сухопутным аналогом «водного лабиринта Морриса» и предназначен для оценки пространственной памяти животных.



Рис. 10. «Лабиринт Барнса» с расчерченными секторами для обсчета положения животного.

Тест «Лабиринт Барнса» состоит из приподнятой платформы, в которой расположены 18 отверстий (рис. 10). Одно из отверстий является убежищем, остальные 17 - ложными норками. Убежище всегда находится в одном и том же месте для одной и той же крысы, при этом для разных животных убежище всегда располагалось в разных местах. Задача крысы состоит в том, чтобы как можно быстрее отыскать свое убежище. В качестве стрессирующего фактора для животного выступает яркий свет (2000 Лм), который горит над столом. На стенах вокруг теста «Лабиринт Барнса» на одном и том же месте висят предметы, которые способствуют ориентации животного в пространстве.

Обучение животного проходило в течении 5-ти дней, после чего, на 6-ой день проводили финальное тестирование. Во время обучения животное помещали в центр платформы под колпаком. Затем колпак снимали, и крыса начинала поиски убежища. За время тестирования оценивали:

- латентный период подхода к первой норке;
- латентный период входа в убежище;
- количество ошибок (обследованных «ложных норок»).

Если время поиска убежища составило более 300 секунд, то крысу аккуратно помещали в убежище и давали время посидеть в нем и сориентироваться. Каждый день каждая крыса имела по 4 попытки найти убежище.

На шестой, финальный день эксперимента проводили все те же манипуляции, однако, в качестве дополнительного стрессирующего фактора предъявляли громкий звонок.

Эксперимент записывали на видео и обрабатывали в программе RealTimer. Подсчитывали время нахождения животных в секторе убежища, в нейтральных секторах (справа и слева от убежища), а также в противоположном секторе.

Глава 3

Влияние антагониста P-гp верапамила на проницаемость ГЭБ для карбамазепина *in vivo*.

Эксперимент проводили на крысах линии Wistar (n=91).

Таблица 8. Группы животных и вводимые им препараты.

Группы	Количество животных	Препарат		
		Верапамил (ВЕР) 40 мг/кг	АЭП	Изониазид, 300 мг/кг
1. Контроль	16	-	- (физ. р-р)	+
2. ВЕР+ИЗН	8	+	10% Pluronic F-68	+
3. КБЗ 15 мг/кг	8	-	КБЗ 15 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
4. КБЗ 20 мг/кг	12	-	КБЗ 20 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
5. КБЗ 25 мг/кг	7	-	КБЗ 25 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
6. КБЗ 30 мг/кг	12	-	КБЗ 30 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
7. ВЕР+КБЗ 15 мг/кг	8	+	КБЗ 15 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
8. ВЕР+КБЗ 20 мг/кг	12	+	КБЗ 20 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
9. ВЕР+КБЗ 25 мг/кг	8	+	КБЗ 25 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+

Животным вводили верапамил внутривенно в дозе 40 мг/кг за 1 час до введения АЭП (табл. 8). Крысам контрольных групп вместо верапамила вводили физиологический раствор. На фоне верапамила проводили инъекцию различных доз КБЗ, а через 45 минут после него ИЗН (300 мг/кг, в/б). После введения последнего за животным наблюдали 120 минут и оценивали следующие параметры:

- тяжесть судорог по пятибалльной шкале Racine, где 0 – отсутствие поведенческих аномалий, а 5 – сильные тонико-клонические судороги;

- латентный период наступления 4-5 балльных судорог, если в группе возникали судороги лишь у отдельных крыс, то их ЛП отображали на графике;
- продолжительность судорог, если судороги в течение эксперимента возникали несколько раз, то длительность всех приступов суммировалась. Если продолжительность судорог превышала 10 минут, то ее принимали равной 10 минутам.

В качестве контроля на отсутствие антиэпилептической эффективности верапамила, провели его совместное введение с ИЗН с разницей в 1 час 45 минут.

2. Влияние блокады Р-гликопротеина на КБЗ-НЧ

Таблица 9. Группы животных и препараты, которые им вводили

Группы	Кол-во животных	Препарат		
		Верапамил (ВЕР) 40 мг/кг	АЭП	Изониазид, 300 мг/кг
1. Контроль	16	-	- (физ. р-р)	+
2. КБЗ 20 мг/кг	12	-	КБЗ 20 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
3. КБЗ 30 мг/кг	12	-	КБЗ 30 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
4. ВЕР+КБЗ 20 мг/кг	12	+	КБЗ 20 мг/кг в 10% Pluronic F-68	+
5. КБЗ-НЧ 0,7 мг/кг	12	-	КБЗ-НЧ 0,7 мг/кг в 1% PluronicF-68	+
6. КБЗ-НЧ 1 мг/кг	10	-	КБЗ-НЧ 1 мг/кг в 1% PluronicF-68	+
7. ВЕР+КБЗ-НЧ	10	+	КБЗ-НЧ 0,7 мг/кг в 1% PluronicF-68	+

Инъекцию исследуемых веществ проводили по схеме предыдущего эксперимента: верапамил (в/б 40 мг/кг), через час КБЗ или КБЗ-НЧ (в/в), через 45

минут ИЗН (300 мг/кг, в/б), после – наблюдение за животным и оценка его состояния в течение 120 минут. Дозы вводимых препаратов и группы представлены в таблице 9. Оцениваемые параметры те же, что и в предыдущем эксперименте.

Поскольку эффективность действия карбамазепина в предыдущем эксперименте на фоне верапамила повысилась на 30%, минимальную эффективную дозу КБЗ-НЧ мы также снизили на 30%.

Статистика

Статистическую обработку данных проводили в программах Statistica 8.0 и GraphPad Prism 7.0. В эксперименте с ПТЗ группы сравнивали по критерию Манна-Уитни. Сравнение количества устойчивых и неустойчивых животных проводили по четырехпольному критерию Фишера. Множественное сравнение групп проводили с контролем и друг с другом с помощью непараметрических аналогов one-way ANOVA (тесты Даннета и Тьюки). Сравнение пароксизмов на ЭКГ с моторными судорогами у одних и тех же животных проводили по критерию Вилкоксона для связанных выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Глава 1

1. Исследование эффективности карбамазепина на ПТЗ-модели

Исследование противосудорожной эффективности КБЗ на ПТЗ-модели показало, что тяжесть судорог в контрольной и опытной группах не отличались ($p=0.44$) (рис. 11а). В контрольной группе животных она в среднем составляла 4,5 балла, в опытной – 4,9 балла.

Латентный период наступления трехбалльных (рис. 11б) и тяжелых (4 и более баллов) (рис. 11в) моторных судорог в среднем были равны и составляли 28 и 25 минут в контрольной и опытной группах соответственно. Таким образом, по этому параметру также не было выявлено достоверных отличий ($p=0.28$ и $p=0.09$).

В контрольной группе количество устойчивых и неустойчивых животных оказалось равным (по 50%) (рис. 11г). При введении карбамазепина количество неустойчивых животных возрастает до 67%, а устойчивых – снижается до 33% (рис. 11д).

Таким образом, данные нашего эксперимента показали, что карбамазепин не эффективен на ПТЗ-модели. По тяжести судорог и латентному периоду их наступления группы также не отличаются друг от друга. Более того, при введении исследуемого препарата увеличивается процент неустойчивых к ПТЗ животных.

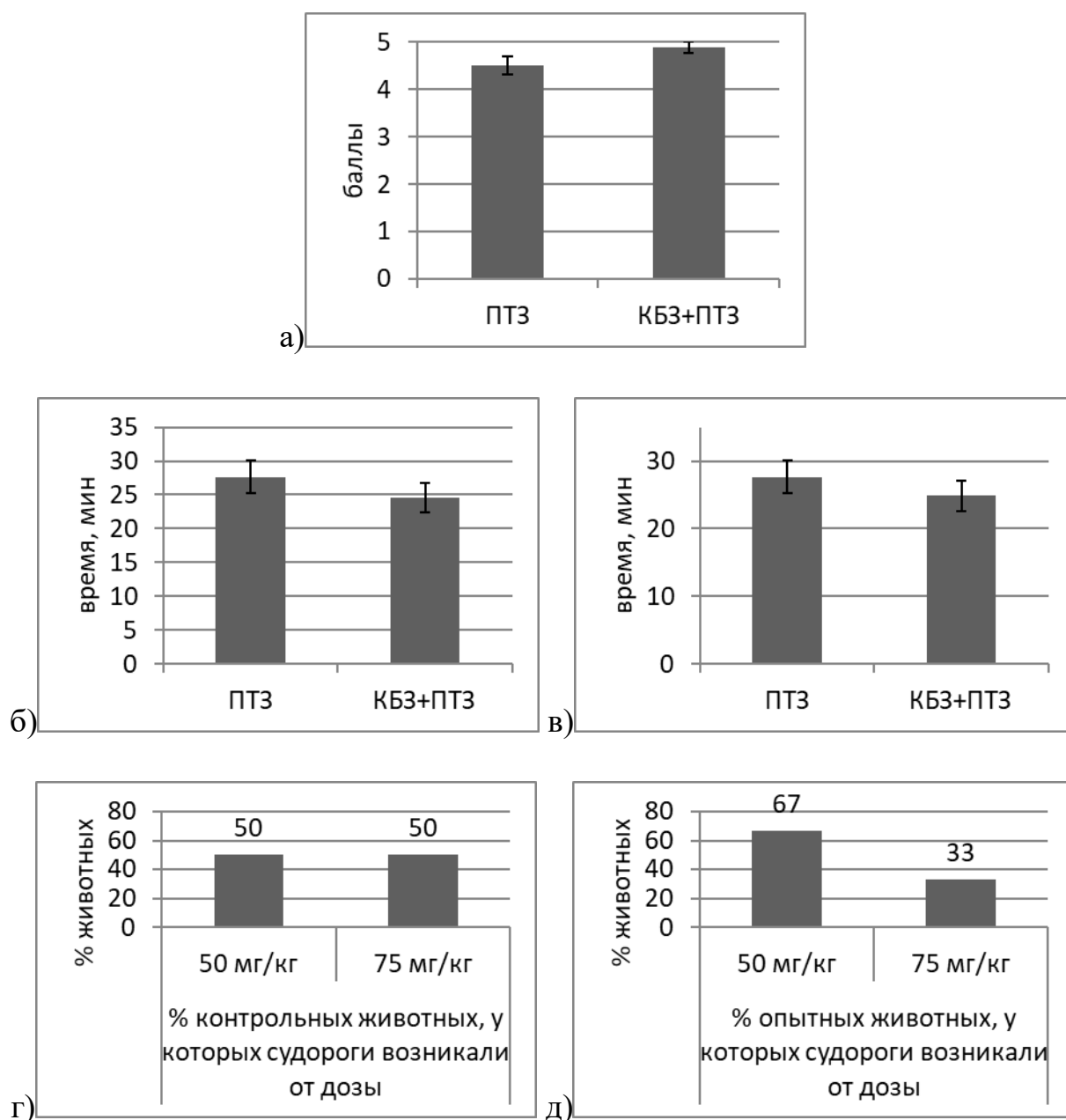


Рис. 11. Тяжесть (а), латентный период наступления 3-балльных (б) и 4-5 балльных (в) судорог (отличия отсутствуют по критерию Манна-Уитни), а также разделение животных на устойчивых и неустойчивых в контрольной (г) и опытной (д) группах (отличия отсутствуют по четырехпольному критерию Фишера).

2. Гистологические исследования проницаемости ГЭБ.

Визуальная оценка срезов головного мозга показала отсутствие проникновения красителя Эванс Блю в головной мозг во всех группах крыс, которым вводили Эванс блю внутривенно, а также в отрицательном контроле

(Рис. 12б-г). Окраска была выявлена только в группе животных, которые получали 2% раствор Эванс Блю в желудочек головного мозга в объеме 10 мкл (положительный контроль) (рис.12а).

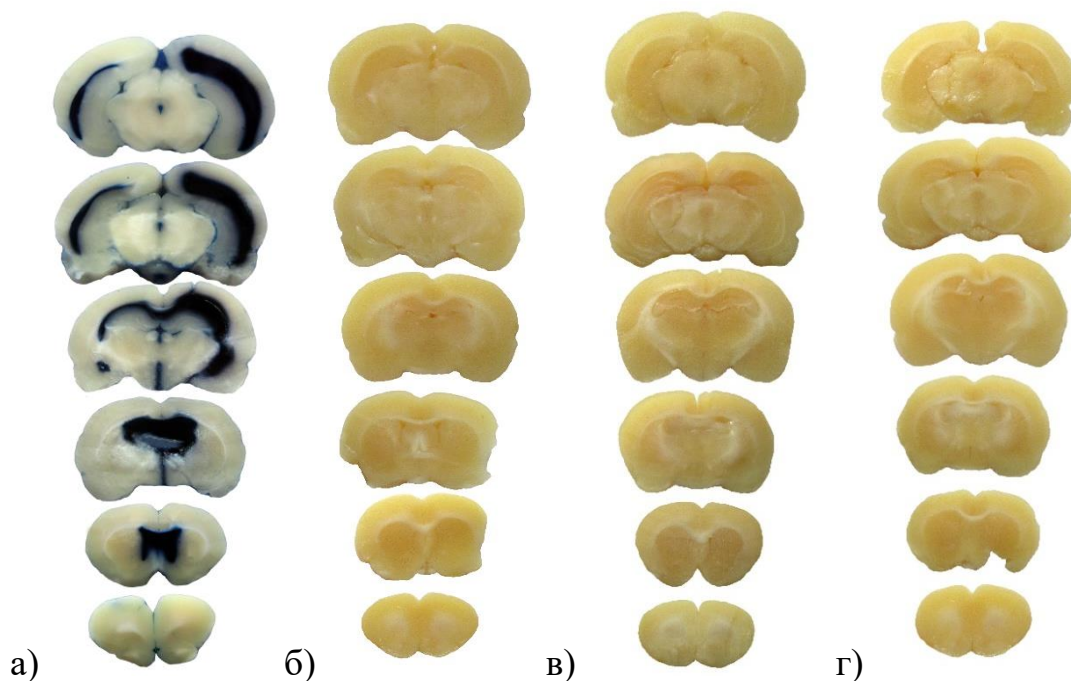


Рис. 12. Окрашивание головного мозга крысы при введении Эванс Блю. а) положительный контроль (внутрижелудочковое введение), б) отрицательный контроль, в) Эванс Блю внутривенно г) Эванс Блю внутривенно с последующими судорогами.

Флуоресцентная микроскопия срезов коры головного мозга показала наличие окрашивания в группе положительный контроль (рис. 13а). В остальных группах краситель в головной мозг не проник, и срезы не были окрашены (рис. 13б-г). Таким образом, было показано, что Эванс Блю обнаруживался только в головном мозге тех крыс, которым вводили краситель напрямую в желудочки (положительный контроль). При внутривенном введении красителя, флуоресцентного свечения в головном мозге не было обнаружено. Это свидетельствует о том, что в норме краситель не проходит через ГЭБ. После введения хемоконвульсанта на фоне Эванс Блю красителя в головном мозге нет. Таким образом, визуальный анализ, а также микроскопические исследования

позволяют сделать вывод, что, судороги, спровоцированные ИЗН, не изменяют проницаемость ГЭБ.

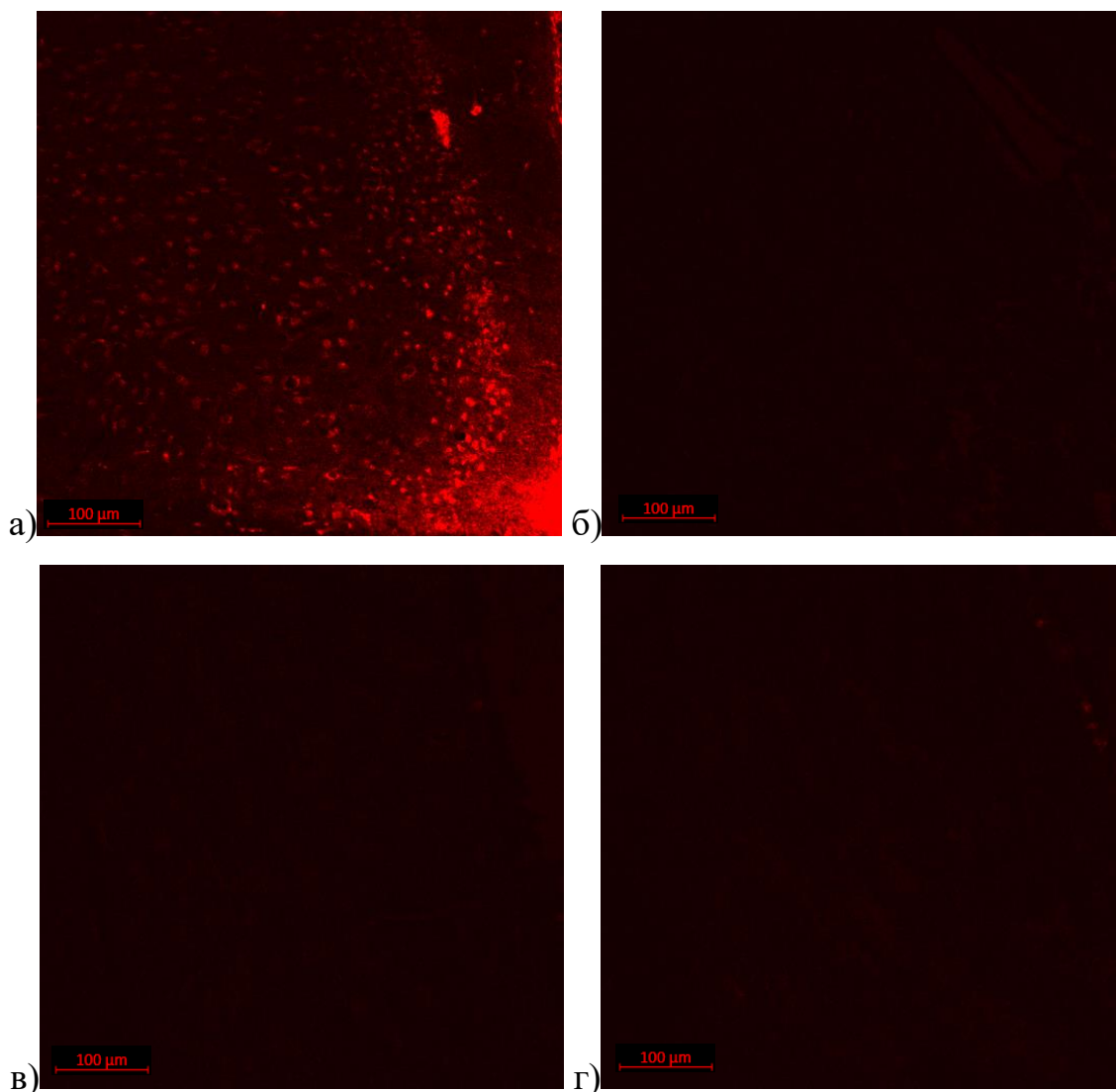


Рис. 13. Репрезентативные гистологические срезы коры головного мозга крыс через 2 ч после введения Эванс Блю. а) положительный контроль (исв введение красителя); б) отрицательный контроль (без красителя); в) Внутривенное введение Эванс Блю; г) внутривенное введение Эванс Блю с последующим введением хемоконвульсанта изониазида.

3. Фотометрическая оценка проницаемости ГЭБ

Концентрация красителя, вычисленная по оптической плотности, в образцах различных областей головного мозга крыс из группы отрицательный контроль, составила менее 0,005 мг/мл. Погрешность в фотометрическое исследование

могут вносить экстрагированные из тканей растворенные белки. Значения концентрации красителя для каждой области головного мозга в этой группе мы считали фоновыми и вычитали его из других групп (рис. 14).

Концентрация красителя в пробах животных, которым вводили Эванс Блю внутривенно с судорогами и без находилась в пределах фоновых значений.

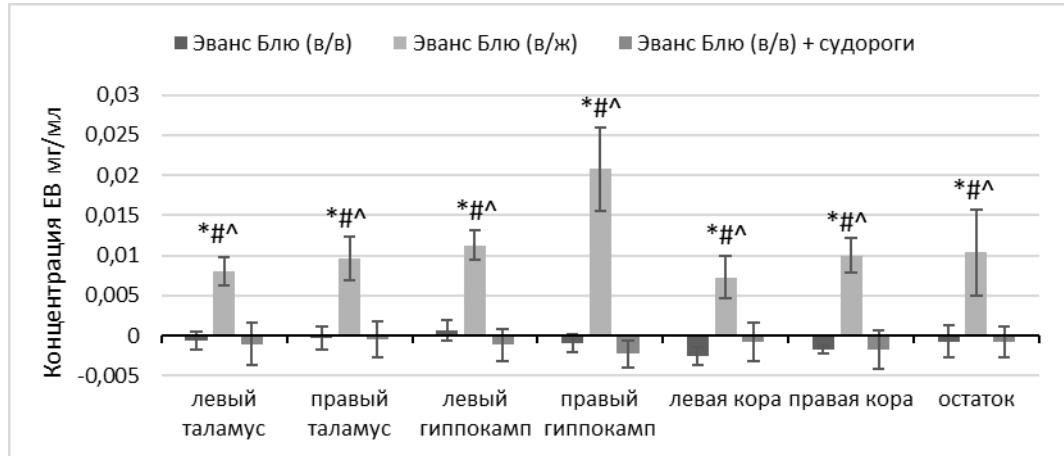


Рис. 14. Рассчитанное количество Эванс Блю в экстракте головного мозга крыс при различных способах введения: в/в-внутривенное введение, в/ж – внутрижелудочковое введение. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; # $p < 0.05$ и ## $p < 0.1$ по сравнению с внутривенным введением красителя; ^ $p < 0.05$ и ^^ $p < 0.1$ по сравнению внутривенным введением Эванс Блю и последующими судорогами; по критерию Тьюки.

В группе животных, которым вводили Эванс Блю в правый желудочек головного мозга, количество красителя достоверно выше, чем в других группах во всех областях головного мозга и составляет от 0,008 до 0,021 мг/мл супернатанта. Наибольшее количество красителя наблюдалось в правом гиппокампе. Это связано с тем, что гиппокамп расположен близко к желудочку, в который вводили краситель. Достоверность (p) различий между содержанием красителя в головном мозге крыс различных групп указана в табл. 10.

Данные, полученные фотометрическим методом полностью согласуются с визуальными наблюдениями, сделанными на срезах головного мозга. И качественный, и количественный методы подтверждают вывод и том, что во время судорог, вызванных ИЗН проницаемость ГЭБ не меняется.

Таблица 10. Значения коэффициента р при сравнение экспериментальных групп по содержанию Эванс Блю в экстракте различных областей головного мозга крыс.

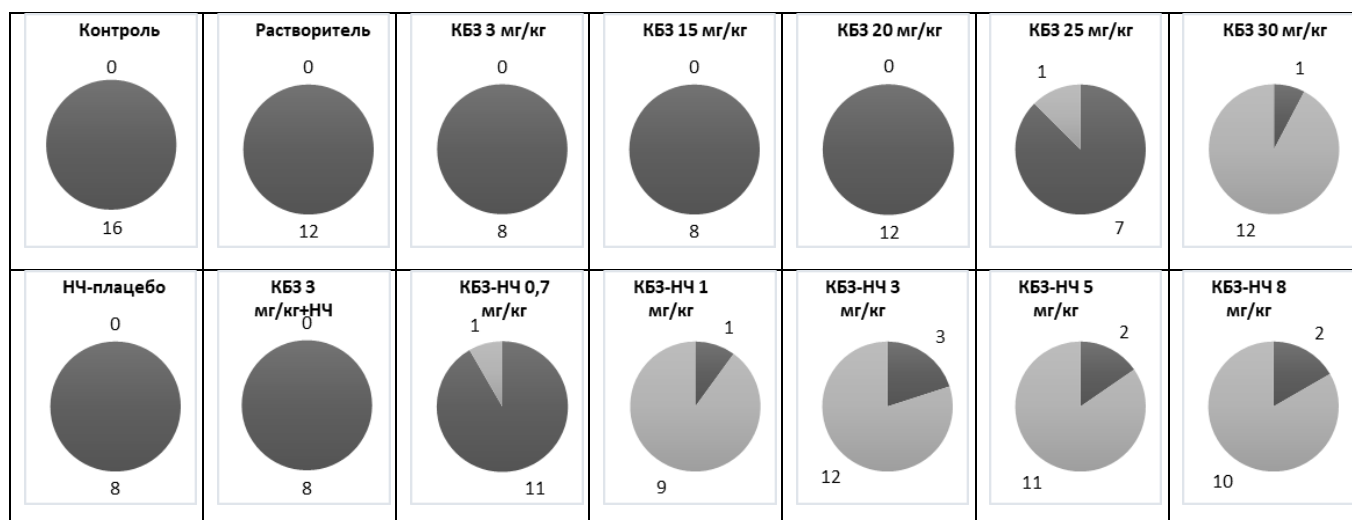
Группа 1	физиологический раствор			Эванс блю в/в		Эванс блю в/в+судороги
	Эванс блю в/в	Эванс блю в/ж	Эванс блю в/в+судороги	Эванс блю в/ж	Эванс блю в/в+судороги	Эванс блю в/ж
левый таламус	0,3367	0,0051	0,7488	0,0104	0,6310	0,0163
правый таламус	0,6310	0,0250	0,8728	0,0163	1,0000	0,0250
левый гиппокамп	0,4712	0,0039	0,4233	0,0039	0,5218	0,0039
правый гиппокамп	0,5218	0,0250	0,3367	0,0250	0,6889	0,0104
левая кора	0,1495	0,0104	0,7488	0,0065	0,2002	0,0782
правая кора	0,2002	0,0104	0,3367	0,0039	0,8728	0,0065
остаток	0,8728	0,0163	0,7488	0,0547	0,7488	0,0250

Глава 2

1. Антиэпилептическая эффективность нанокапсулированной формы карбамазепина.

Введение изониазида приводило к возникновению судорог у всех крыс контрольной группы (табл. 11), тяжесть которых в среднем составляла 4,9 баллов, латентный период наступления – 48,5 минут (медиана 51 мин), а продолжительность судорог – 7,2 минуты (рис. 15). Схожий результат был получен в группах животных, которым вводили растворитель (10% Pluronic F-68, №2 в табл. 5) или НЧ плацебо (10 мг/кг в 1% Pluronic F-68, №8 в табл. 5, является эквивалентным количеством частиц, вводимых с 1 мг/кг КБЗ). У всех крыс в этих группах возникали тяжелые судороги более 5 баллов (табл. 11). Эти группы не имели достоверных отличий по сравнению с контролем. Тяжесть судорог в среднем в них составляла 5 и 4,75; латентный период их наступления – 46 и 43 минут (медианы 46 и 44,6), а продолжительность судорог – 6 и 5,75 минут соответственно (рис.15).

Таблица 11. Количество крыс с тяжелыми судорогами (темно-серый) и без судорог (светло-серый) в экспериментальных группах.



Внутривенное введение карбамазепина оказывало эффективное противосудорожное действие в дозе 30 мг/кг. Введение КБЗ в дозе 30 мг/кг приводило к купированию судорог, вызванных изониазидом. Кратковременные четырехбалльные судороги возникли лишь у 1 из 13 крыс на 42 минуте эксперимента. Такой результат можно считать индивидуальной

нечувствительностью животного к КБЗ. В целом, КБЗ в дозе 30 мг/кг приводил к снижению средней тяжести судорог до 1,3 баллов и их продолжительности до 0,08 минут (рис. 15). Все исследуемые параметры имеют достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0.001$) и группы «растворитель» (№2 в таблице 5) ($p < 0.001$). КБЗ в дозах 3, 15 и 20 мг/кг не купировал судороги, и они возникали у всех экспериментальных животных. КБЗ в дозе 25 мг/кг также нельзя считать эффективным, так как тяжелые судороги возникали у 7 животных из 8 (табл. 11). Все три вышеперечисленные группы не имели достоверных отличий от контроля или растворителя по тяжести судорог и латентному периоду их наступления. Однако, даже неэффективные дозы КБЗ приводили к достоверному снижению продолжительности судорожных припадков. При этом, доза КБЗ 3 мг/кг имела достоверные отличия только от контрольной группы ($p = 0.033$ от контроля и $p = 0.105$ от растворителя), а в дозах 15, 20 и 25 мг/кг имеют достоверные отличия и от контрольной группы, и от группы с растворителем (для дозы 15 мг/кг $p < 0.01$ от контроля и $p = 0.015$ от растворителя, для дозы 20 мг/кг $p < 0.001$ от контроля и $p = 0.011$ от растворителя, для дозы 25 мг/кг $p < 0.001$ от контроля и $p < 0.01$ от растворителя) (рис. 15).

Таким образом, результаты нашего эксперимента показали, что минимальной эффективной дозой КБЗ, купирующей судороги при внутривенном введении, является 30 мг/кг, меньшие дозы приводят лишь к снижению продолжительности судорог, но не отменяют полностью судорожные проявления.

Исследуемая форма КБЗ-НЧ оказывала выраженный антиэпилептический эффект в минимальной дозе 1 мг/кг. У 9 из 10 животных тяжелых судорожных проявлений выявлено не наблюдали (табл. 11). У одной крысы судороги наступили на 54-ой минуте. При этом средняя тяжесть судорог снижалась до 1,2 баллов, а продолжительность – до 0,05 мин (рис. 15). Все параметры достоверно отличались от контрольной группы, которой вводили физиологический раствор ($p < 0.001$), от группы с НЧ-плацебо ($p < 0.001$) и не отличались от группы КБЗ 30 мг/кг.

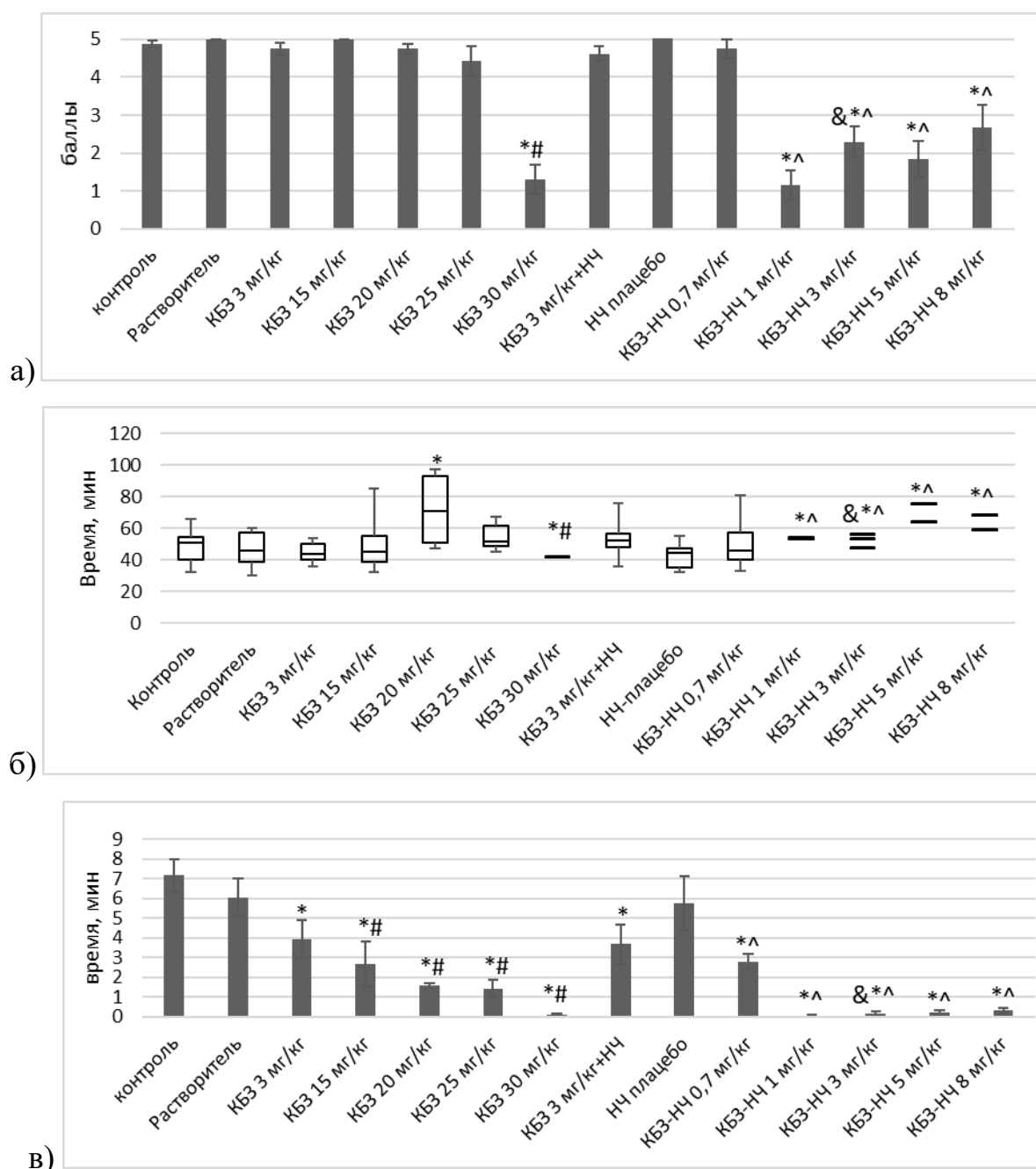


Рис. 15. Дозозависимые антиэпилептические эффекты карбамазепина (КБЗ) и его наносомальной формы (КБЗ-НЧ): а) тяжесть судорог, б) латентный период наступления судорог, в) продолжительность судорог. Если в группе судороги возникали только у отдельных животных, их ЛП обозначен на графике отдельно. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой по критериям Даннета и Тьюки, # $p < 0,05$ по сравнению с группой «растворитель», ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой с НЧ плацебо, & $p < 0,05$ по сравнению с группой с КБЗ-НЧ 3 мг/кг по критерию Тьюки.

КБЗ-НЧ в дозах 3, 5 и 8 мг/кг снижал количество крыс, у которых возникли судороги и имел достоверные отличия по всем трем параметрам от контрольной группы и группы с НЧ-плацебо (табл.11, рис. 15). КБЗ-НЧ в дозе 0,7 мг/кг оказался неэффективным в купировании тяжелых судорог, которые были выявлены у 11 животных из 12. Эта группа не отличалась от контрольной группы и группы с НЧ-плацебо по тяжести судорог (4,75 баллов) и латентному периоду их наступления (46 минут) (рис. 15). Продолжительность судорог в этой группе достоверно снижалась по сравнению с контрольной группой ($p=0.005$) и группой с НЧ-плацебо ($p=0.02$) до 2,8 минут.

Таким образом, можно сделать вывод, что минимальной дозой препарата КБЗ-НЧ, полностью купирующей тяжелые судороги, является 1 мг/кг. Эффективная доза КБЗ-НЧ оказалась что в 30 раз ниже, по сравнению с КБЗ (30 мг/кг). Более низкие дозы лишь вызывают снижение продолжительности судорог, однако не приводят к изменениям в тяжести или латентном периоде наступления приступа. Их эффект сходен с действием подпороговых (15-25 мг/кг) доз КБЗ.

Чтобы выяснить, действительно ли включение карбамазепина в наночастицы приводит к усилению антиэпилептического эффекта карбамазепина мы исследовали группу животных, которым внутривенно вводили смесь из наночастиц-плацебо и КБЗ (3 мг/кг) (НЧ+КБЗ). В этой группе средняя тяжесть моторных судорог составила 4,6 баллов, латентный период их наступления – 54 минуты (медиана 52,5 мин), а продолжительность судорог – 3,7 минут (рис. 15). Группа НЧ+КБЗ не отличалась от группы КБЗ в дозе 3 мг/кг ($p=0.67$ для тяжести, $p=0.67$ для продолжительности судорог и $p=0.13$ для ЛП) и достоверно отличалась от группы КБЗ-НЧ 3 мг/кг по всем трем параметрам ($p=0.001$ для тяжести, $p=0.0002$ для продолжительности судорог и $p=0.021$ для ЛП).

Таким образом, можно сделать вывод, что именно включение карбамазепина в наночастицы приводит к увеличению антиэпилептической активности препарата до 30 раз. Физическая смесь из частиц и КБЗ не имеет выраженного антиэпилептического эффекта.

2. Сравнение эффективности парентеральных форм КБЗ с «Финлепсином».

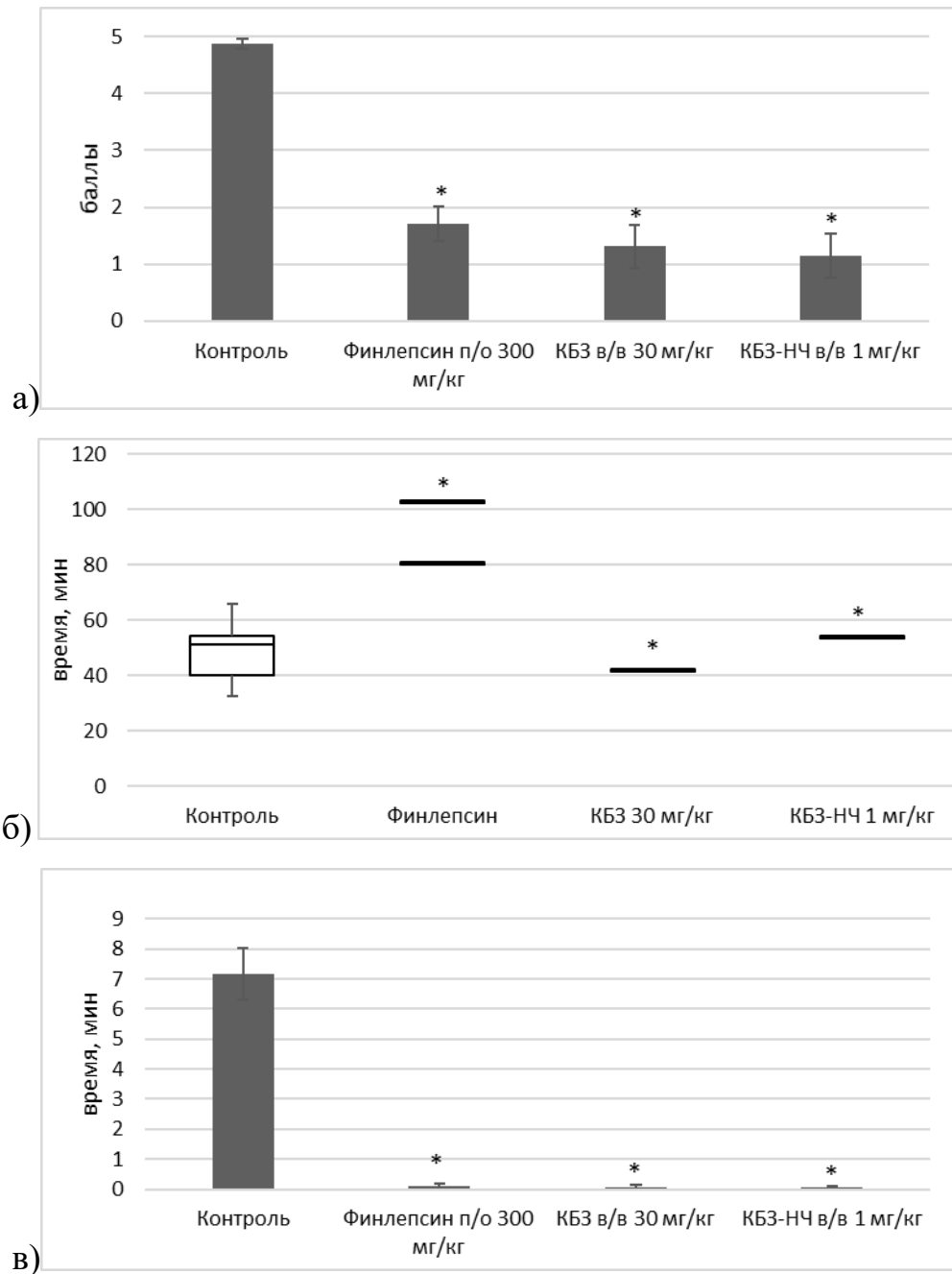
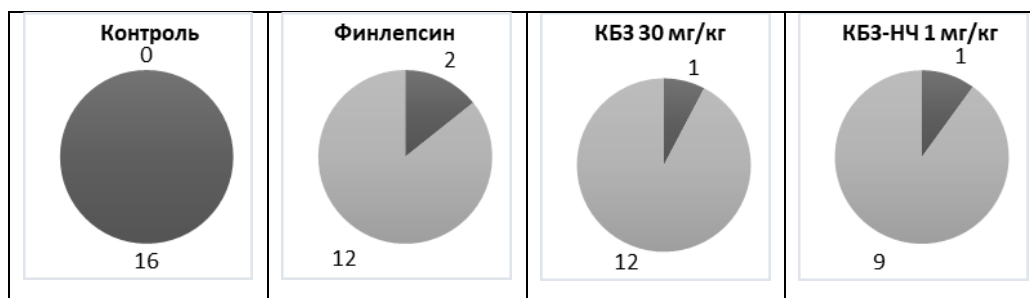


Рис. 16. Сравнение антиэпилептической активности эффективных доз препаратов «Финлепсин» (п/о), карбамазепин (КБЗ) (в/в) и его наносомальной формы (КБЗ-НЧ) (в/в): а) тяжесть судорог, б) латентный период наступления судорог, в) продолжительность судорог. Если в группе судороги возникали только у отдельных животных, их ЛП обозначен отдельно. * $p < 0,05$ в отличие от контрольной группы по критериям Даннета и Тьюки.

Таблица 12. Количество крыс с тяжелыми судорогами (темно-серый) и без судорог (светло-серый) в экспериментальных группах.



«Финлепсин» является распространенной таблетированной формой КБЗ. Поэтому мы провели сравнение выявленных нами в предыдущем эксперименте минимальных эффективных доз КБЗ и КБЗ-НЧ с «Финлепсином».

В контрольной группе животных (введение физиологического раствора вместо АЭП) средняя тяжесть моторных судорог составила 4,9 баллов, латентный период наступления – 48,5 минут (медиана 51 мин), а продолжительность – 7,2 минуты (рис. 16). У животных, которым вводили препараты «Финлепсин» (300 мг/кг п/о), КБЗ (30 мг/кг в/в) и КБЗ-НЧ (1 мг/кг в/в) тяжелые судороги возникали только у отдельных особей (табл. 12): в группе «Финлепсин» у 2 из 14: на 59-ой и 80-ой минутах; в группе КБЗ у 1 из 13 на 42-ой минуте; в группе КБЗ-НЧ у 1 из 10 на 54-ой минуте (рис. 16б). Средняя тяжесть судорог в этих группах составила 1,7, 1,3 и 1,2 балла, а продолжительность – 0,09, 0,08 и 0,05 минут соответственно. Все три группы достоверно отличаются от контрольной по всем трем анализируемым параметрам ($p < 0.001$ по трем параметрам для всех групп).

Группы животных, которым вводили «Финлепсин», КБЗ или КБЗ-НЧ не имеют достоверных отличий друг от друга, и отличаются от контрольной группы. Следовательно, все три формы препарата обладают сопоставимой эффективностью против эпилептических приступов.

3. Анализ ЭКоГ животных.

В фоновой записи ЭКоГ, а также в 45-минутной записи после введения АЭП проявлений пароксизмальной активности не было зарегистрировано. Регистрация ЭКоГ на следующий, 3 и 7 дни после введения препаратов также не

выявила изменений в ЭКоГ. Пароксизмальная активность появлялась только после введения ИЗН и была проанализирована на двухчасовой записи ЭКоГ.

Пароксизмальные эпизоды активности на ЭКоГ после введения ИЗН (рис. 17) наступали в среднем 9 раз (рис. 18в). Их продолжительность составляла от 55-ти до 2000 сек, в среднем 627 сек (рис. 18б). Такая вариабельность, вероятнее всего, обусловлена индивидуальной чувствительностью животных к препарату. Латентный период появления первых пароксизмальных эпизодов на ЭКоГ составил от 22-х до 65-ти минут, в медиана 32 минуты (рис. 18а). Частота разрядов пароксизмальной активности составляло в среднем от 1,5 до 6,1 Гц. В группах животных, которым вводили АЭП, пароксизмов в основном не наблюдалось. Но если даже такая активность и присутствовала на ЭКоГ, то ее количества было недостаточно для проведения сравнения частотных характеристик между разными группами.

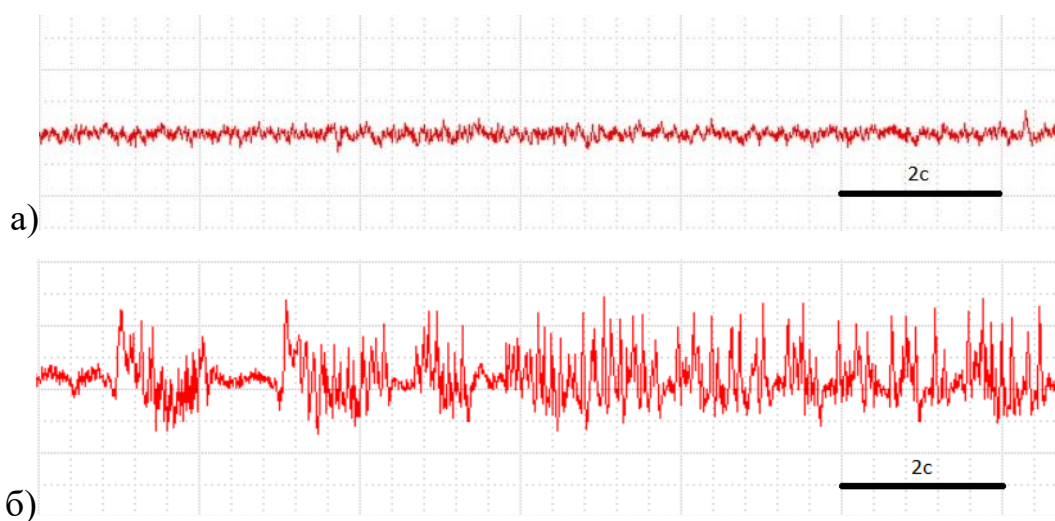


Рис. 17. Примеры нормальной (а) и пароксизмальной (б) активности на ЭКоГ.

Сопоставив факты появления пароксизмальных эпизодов на ЭКоГ с наблюдениями за поведением животных, мы выяснили, что пароксизмальная активность может появляться уже при 2-3 баллах моторных проявлений эпилептического приступа по шкале Racine. Поскольку такая активность заметна уже при эпилептических проявлениях средней тяжести, она наблюдалась у некоторых животных, которым вводили АЭП, но у которых при этом не было тяжелых судорог (табл.13).

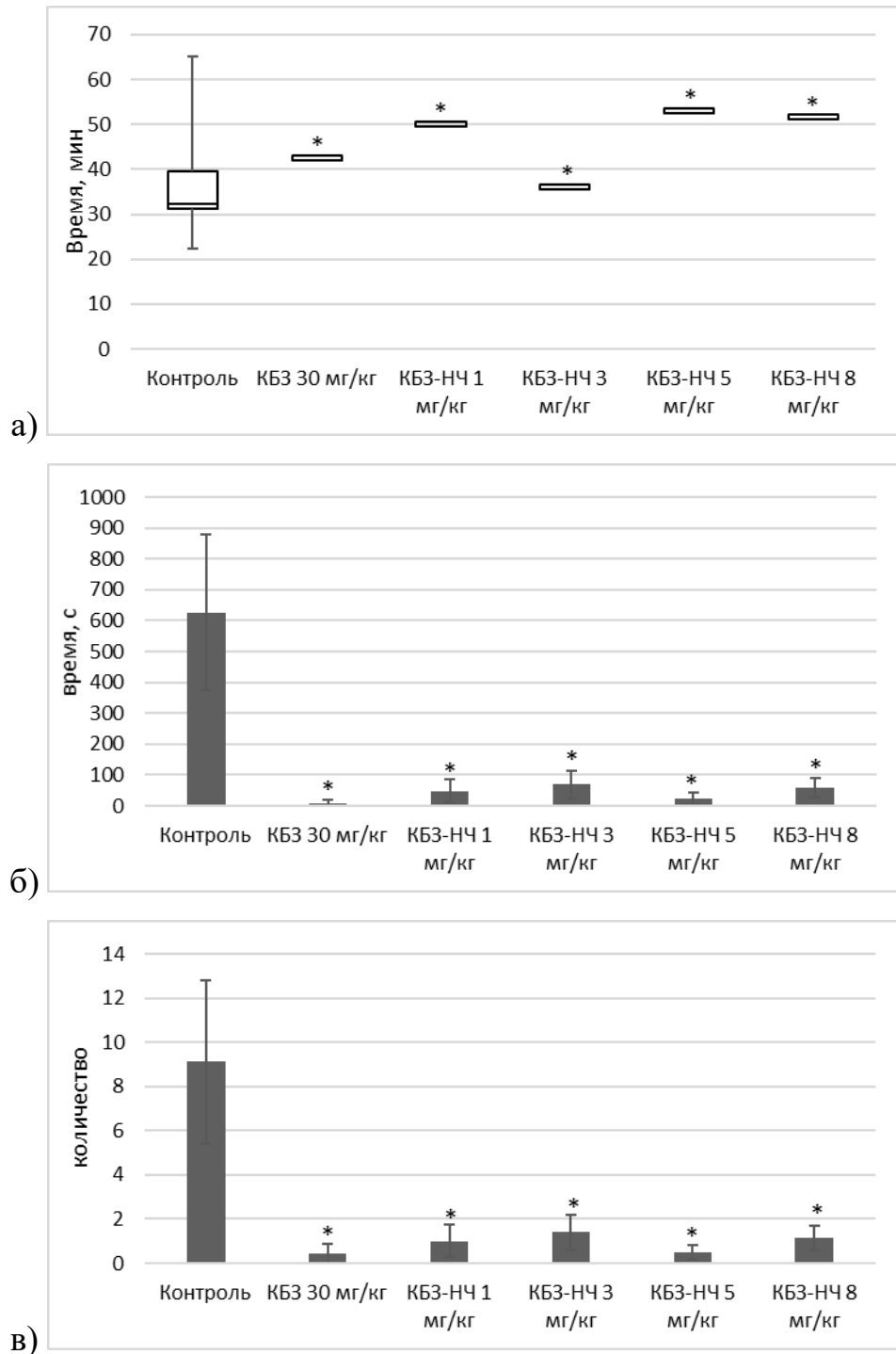
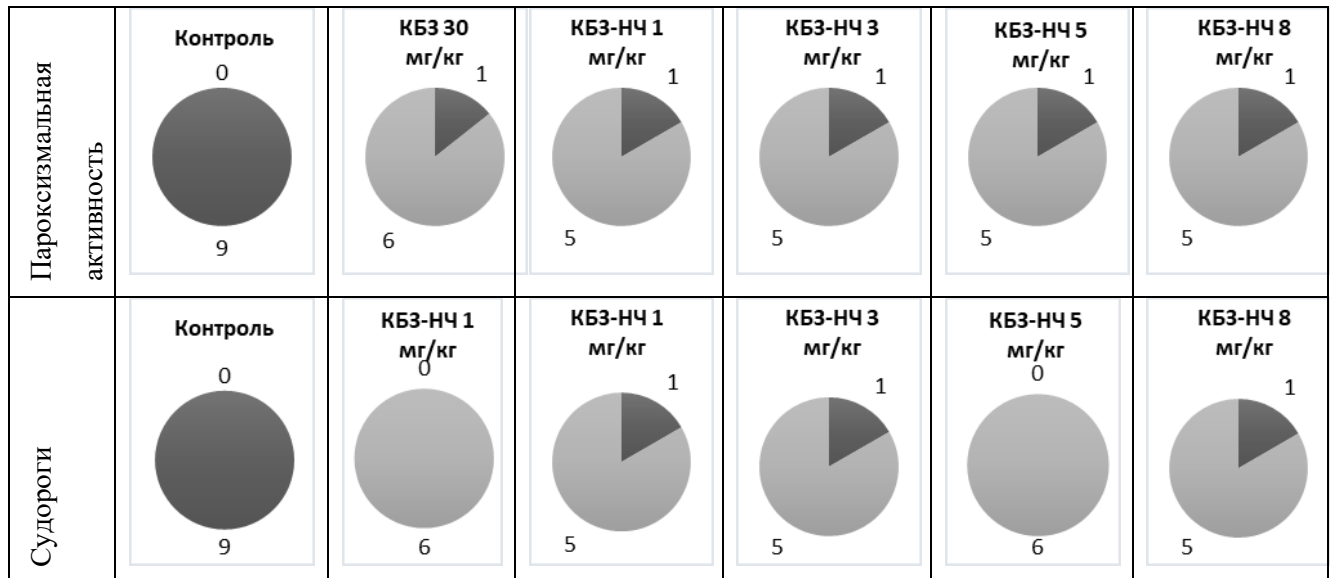


Рис. 18. Результаты анализа ЭКоГ крыс различных групп. а) латентный период наступления пароксизмальной активности, б) продолжительность и в) количество пароксизмов. Если в группе возникала пароксизмальная активность только у отдельных животных, их ЛП обозначен отдельно. * $p < 0,05$ в отличие от контрольной группы по критерию Даннета.

Таблица 13. Количество крыс с пароксизмальной активностью на ЭКоГ и судорогами (темно-серый) и без пароксизмальной активности и судорог (светло-серый) в экспериментальных группах.



Карбамазепин в дозе 30 мг/кг приводил к подавлению пароксизмов у 6-ти животных из 7-ми (табл. 13). У седьмого животного 3 эпизода пароксизмальной активности были зарегистрированы на 43 минуте, а их общая продолжительность составила 65 сек. КБЗ-НЧ в различных дозах блокировал пароксизмальную активность в 5-ти случаях из 6-ти (табл. 13). У оставшихся животных наблюдались кратковременные пароксизмы при 2-балльных моторных судорогах (рис. 18). При этом тяжелые судороги не развивались.

Все группы крыс, которым вводили АЭП, достоверно отличаются от контрольной группы ($p < 0.05$) и не отличаются друг от друга по всем трем исследуемым параметрам (рис. 18).

Мы провели сравнение латентных периодов наступления пароксизмальных эпизодов и непосредственно самих судорог. Пароксизмальная активность появляется при судорожных проявлениях тяжестью 2-3 балла, а тяжелыми судорогами считаются 4-х балльные изменения. Следовательно, пароксизмальная активность предшествует тяжелым судорогам. Латентный период наступления судорог достоверно отличается от латентного периода наступления пароксизмальной активности лишь в контрольной группе ($p = 0.007$). В группах с

АЭП различие недостоверно, так как у большинства животных не было ни эпизодов пароксизмальной активности, ни судорожных приступов (рис. 19).

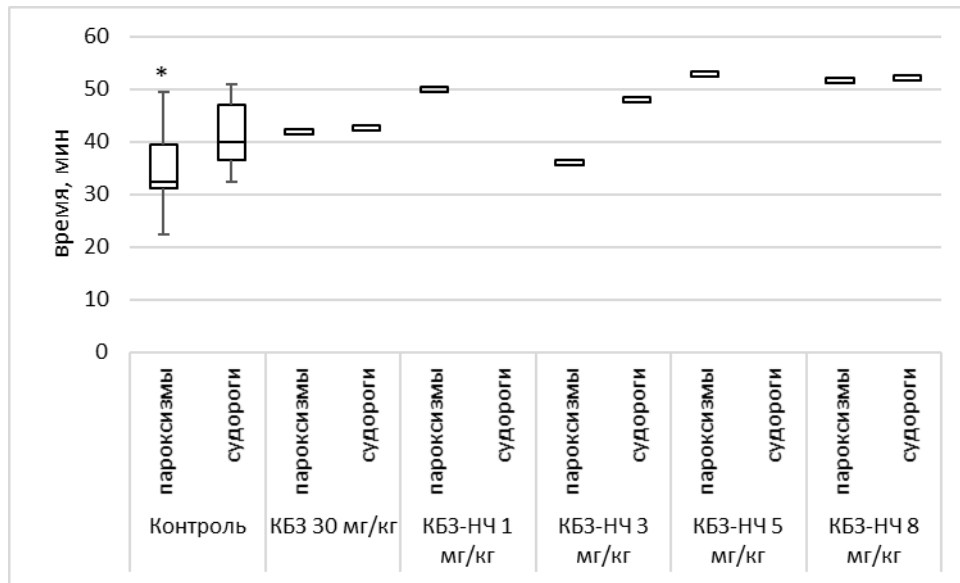


Рис. 19. Сравнение латентных периодов наступления судорог и пароксизмальной активности в экспериментальных группах крыс. Если в группе пароксизмальная активность или судороги возникали только у отдельных животных, их ЛП обозначен отдельно. * $p < 0.05$ времени наступления судорог по сравнению с пароксизмальной активностью по критерию Вилкоксона.

Таким образом, мы показали, что препараты КБЗ устраняют не только моторные проявления судорог, но и нормализуют активность головного мозга.

4. Влияние хронического введения КБЗ на поведение

Открытое поле

Латентный период выхода животного из центра открытого поля является важным параметром, который характеризует тревожность грызунов. При этом, помимо самого значения параметра, важно отметить, как себя животные вели в этот момент. Таким образом, возможны две причины повышения ЛП: 1) у животных понижена тревожность, в таком случае они осматриваются вокруг и могут крутиться в центральном секторе, а также проявлять другие виды исследовательской активности; 2) у крыс повышена тревожность, в таком случае в центре животное замирает.

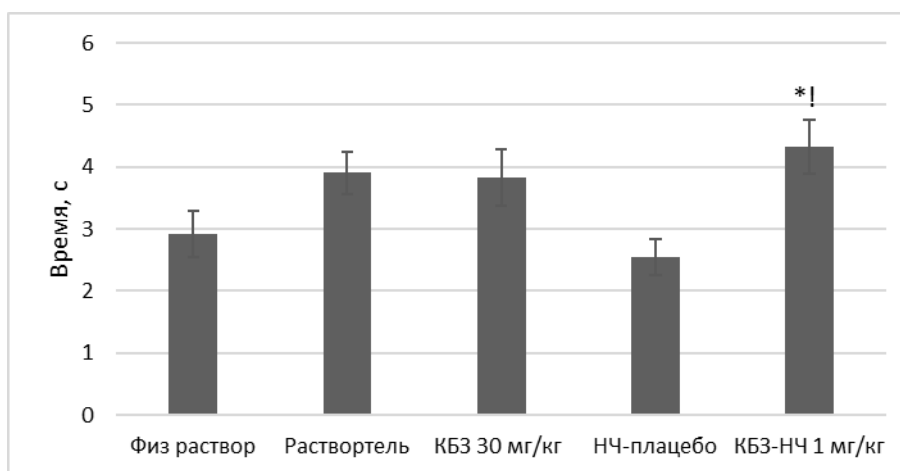


Рис. 20. Латентный период выхода крысы из центра открытого поля. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ! $p < 0.05$ по сравнению с НЧ-плацебо по критерию Тьюки.

Время выхода животных из центра ОП в контрольных группах с физиологическим раствором, растворителем и НЧ-плацебо в среднем составляло от 2.5 до 3.9 секунд (рис. 20). Все три группы не имели достоверных отличий друг от друга. В группе животных, которым вводили КБЗ, латентный период составил 3.8 сек, что не отличалось от контрольных групп. Введение КБЗ-НЧ приводило к увеличению времени выхода животного из центра до 4.3 сек, что достоверно отличалось от группы с НЧ-плацебо ($p = 0.017$) и имеет тенденцию к отличию от контроля ($p = 0.08$) (рис. 20). При этом, животные этой группы, находясь в центре, не замирали, а осматривались, и некоторые из них делали стойки. Следовательно, увеличение ЛП скорее всего связано со снижением тревожности.

Горизонтальная активность животного оценивается по количеству секторов ОП, которые они преодолевают за каждую минуту теста. Это параметр, позволяющий оценить двигательную активность крыс. Горизонтальная активность животных в группах контроль, растворитель и НЧ-плацебо не отличалась друг от друга (рис. 21а). КБЗ в дозе 30 мг/кг незначительно снижал горизонтальную активность, и эта группа не отличалась от контрольных групп ($p = 0.157$ от физиологического раствора, $p = 0.44$ от растворителя). Хроническое введение КБЗ-НЧ приводило к значительному увеличению двигательной

активности. Эта группа достоверно отличалась от физиологического раствора ($p < 0.01$) и НЧ-плацебо ($p < 0.01$).

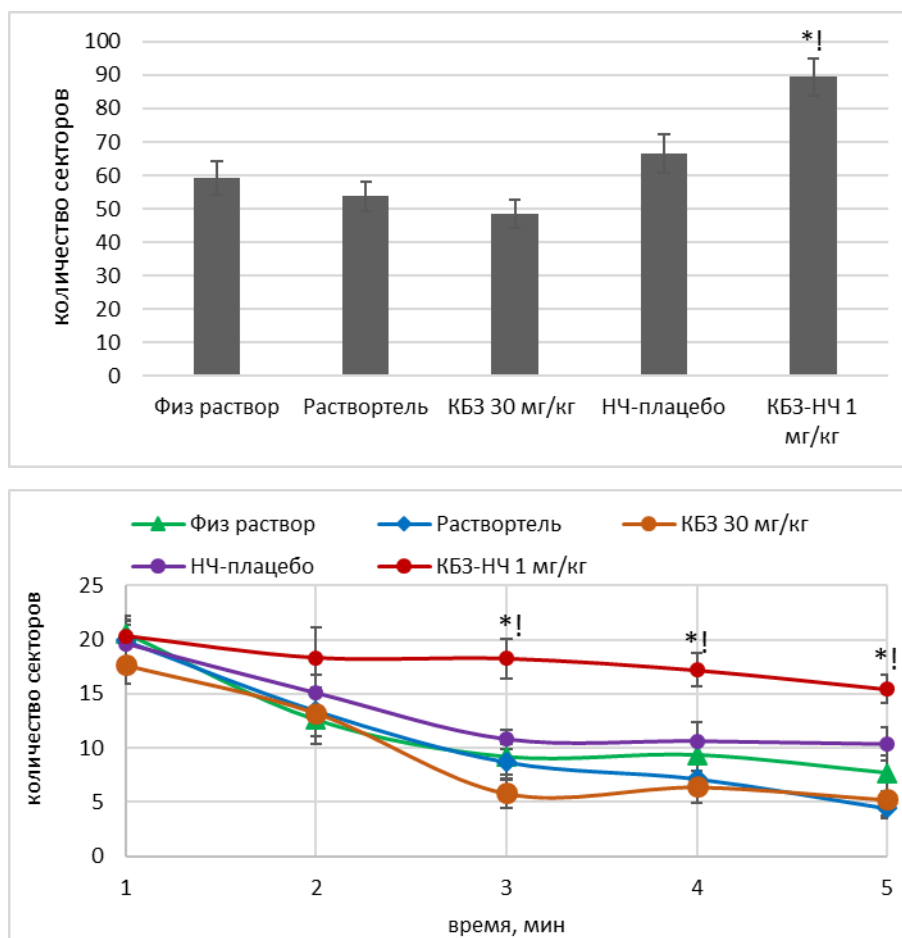


Рис. 21. Горизонтальная активность животных в тесте «Открытое поле». а) суммарно за 5 минут, б) по минутно. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, ! $p < 0.05$ по сравнению с группой НЧ-плацебо по критерию Тьюки.

Динамика горизонтальной активности в контрольной группе при введении физиологического раствора выглядела следующим образом: в первую минуту крыса занималась поиском убежища в новой обстановке, поэтому ее двигательная активность была высокой (рис. 21б). Далее количество пройденных секторов постепенно снижалась. С 3-ей по 5-ую минуту, когда новая обстановка обследована, горизонтальная активность находилась на одинаковом уровне. При введении растворителя, НЧ-плацебо, а также препарата КБЗ в дозе 30 мг/кг, динамика горизонтальной активности не изменялась и находилась на одном уровне. Хроническое введение препарата КБЗ-НЧ в дозе 1 мг/кг изменило динамику горизонтальной активности животных. В первую минуту количество

секторов, пройденных животными этой группы, не отличалось от других. Со второй по пятую минуты снижение горизонтальной активности животных из группы с КБЗ-НЧ было менее выраженным по сравнению со всеми остальными группами. Более того, количество секторов, пройденных за каждую минуту, практически не отличалось от первой. Достоверные отличия группы с КБЗ-НЧ от группы животных, получавших физиологический раствор и НЧ-плацебо, выявлены на 3-ей ($p < 0.01$ от контроля и НЧ-плацебо), 4-ой ($p < 0.01$ от контроля и НЧ-плацебо) и 5-ой ($p < 0.05$ от НЧ-плацебо) минутах (рис. 21б).

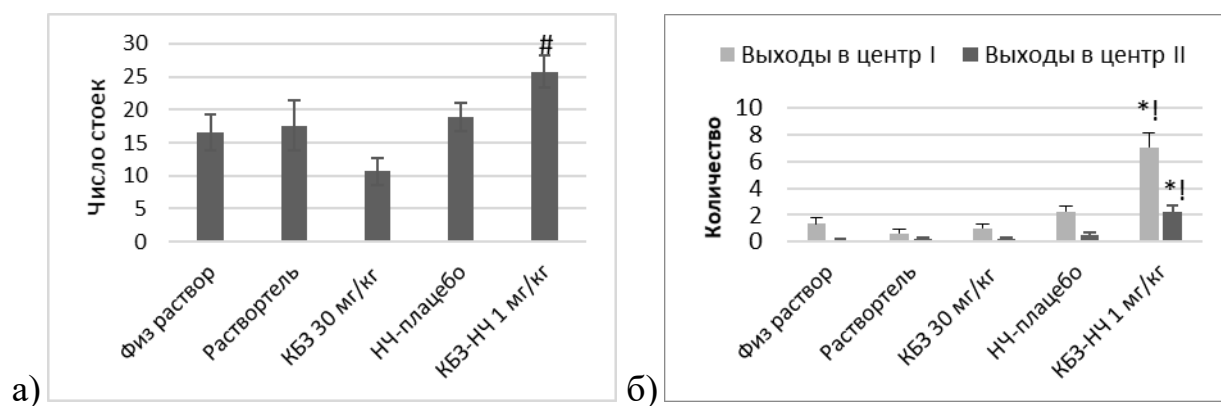


Рис. 22. Вертикальная активность животных (а) количество выходов в центр (б). * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, ! $p < 0.05$ по сравнению с группой НЧ-плацебо, # $p < 0.05$ по сравнению с группой КБЗ по критерию Тьюки.

Вертикальную активность крыс можно оценить по количеству стоек. Чем их больше, тем выше их уровень исследовательской активности (рис. 22а). Количество стоек в группах физиологический раствор, растворитель и НЧ-плацебо не отличалось друг от друга и в среднем составляло от 17 до 19. Хроническое введение КБЗ в дозе 30 мг/кг вызывало снижение количества стоек до 11, однако, достоверности выявлено не было. Введение КБЗ-НЧ в дозе 1 мг/кг повышало количество стоек животных в среднем до 26 стоек, что достоверно отличается от группы КБЗ ($p = 0.0015$). Однако, от контроля эта группа только имеет тенденцию отличия от контроля ($p = 0.1$). Полученные данные позволяют предположить, что КБЗ-НЧ способен усиливать исследовательскую активность.

Выходы в центр является еще одним параметром, позволяющим оценить тревожность животных. Чем больше выходов в центр, тем менее тревожно

животное. С другой стороны, этот параметр напрямую зависит от двигательной активности, повышение которой может искажать результаты по этому параметру.

Количество выходов в центр I и II в группах животных, которым вводили физиологический раствор, растворитель, КБЗ и НЧ-плацебо, достоверных отличий друг от друга не имеют. Животные из группы КБЗ-НЧ выходили в центр более чем в 2 раза чаще по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор ($p < 0.01$ для выходов в центр I и II) и НЧ-плацебо ($p < 0.05$ для выходов в центр I и II) (рис. 22б). Как было упомянуто выше, повышение двигательной активности может увеличивать этот параметр. Двигательная активность у животных из группы КБЗ-НЧ была повышена примерно в 1.5 раз, в то время как повышение выходов в центр достигало больше, чем в 2 раза. То есть, в данном случае, увеличение количества выходов в центр складывается из двух компонентов: повышение двигательной активности вместе со снижением тревожности.

Параметры груминга и количества дефекаций также обязательны для оценки тревожности. Хотя они являются сложными поведенческими параметрами. Количество дефекаций может усиливаться не только вместе с тревожностью, но быть побочным эффектом препарата. Некоторые медикаменты способны запускать автоматии, груминг является одной из таких автоматий. Именно поэтому эти два параметра следует рассматривать только в сопоставлении с другими данными.

Продолжительность груминга во всех пяти группах колебалась в среднем от 11 до 17 секунд (рис. 23а). Количество актов груминга в различных группах составляло в среднем от 0,5 до 1,5 (рис. 23б). Однако, по обоим параметрам, которыми оценивали груминг, различий между группами выявлено не было.

Количество дефекаций в группах колебалось от 1,2-х до 2-х раз за эксперимент (рис. 23в). Достоверных различий по этому параметру выявлено не было.

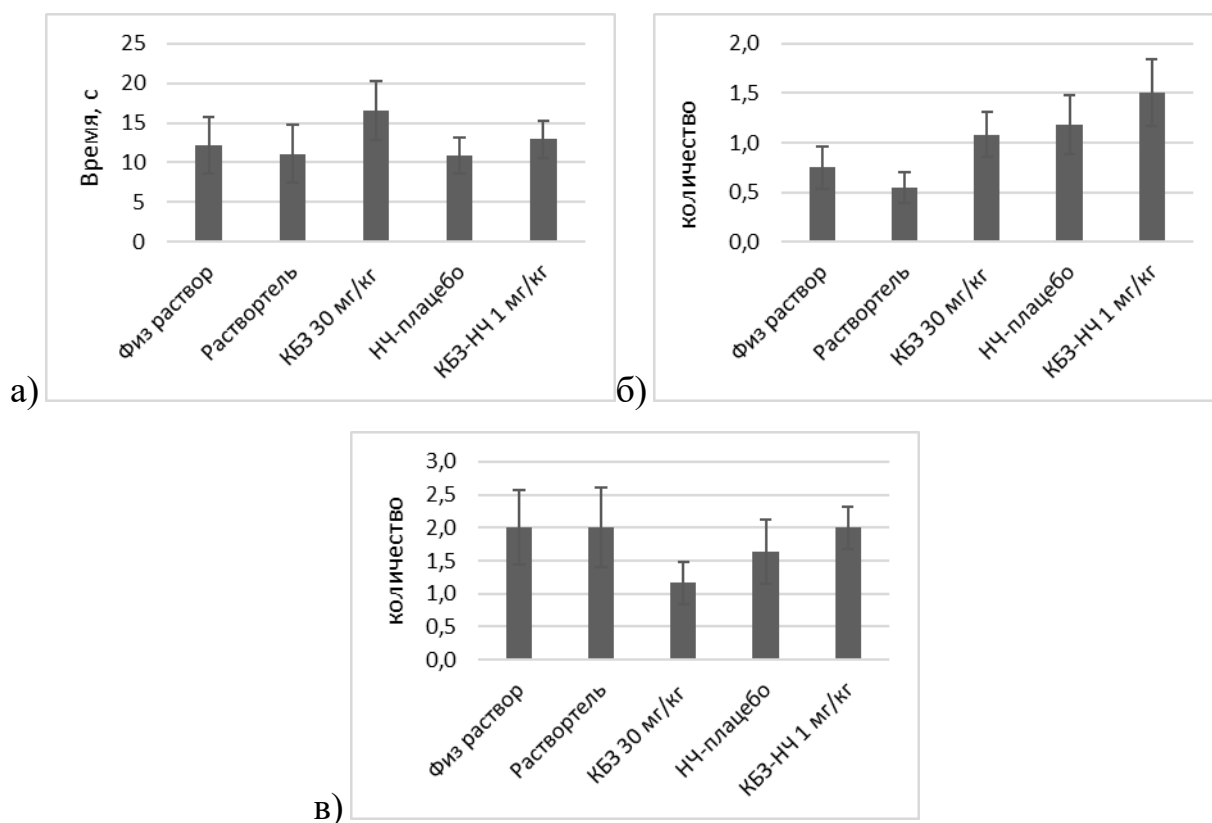


Рис. 23. Длительность (а) и количество актов (б) груминга и количество дефекаций (в).

Таким образом, тест «Открытое поле» не выявил различий между группами, которым хронически вводили физиологический раствор, растворитель (Р-188) и НЧ-плацебо. Хроническое введение КБЗ в дозе 30 мг/кг также не вызывало достоверных изменений по всем параметрам, которые исследовали в тесте «Открытое поле». Регулярные инъекции препарата КБЗ-НЧ приводили к достоверному снижению тревожности и повышению двигательной, и, вероятно, исследовательской активности. В отличие от двигательной активности, о которой нам говорит подсчет секторов, и исследовательской активности, о которой говорит количество стоек, о снижении тревожности мы можем судить косвенно. В пользу анксиолитического эффекта говорит повышение ЛП, отсутствие замиранья в начале тестирования, а также повышение количества выходов в центр, которое превосходит изменение в двигательной активности.

Приподнятый крестообразных лабиринт

Крысы являются норными ночными животными, поэтому яркий свет является для них сильным стрессорным фактором, которого они стараются

избегать. Латентный период входа крыс в темный рукав и время нахождения животных на светлых рукавах лабиринта является параметрами, позволяющими оценить тревожность крыс. Чем быстрее животное убегает в темноту и чем меньше времени оно проводит на свету, тем сильнее его тревожность.

Латентный период входа крыс в темные рукава лабиринта в разных группах колебался от 14 до 22 секунд, однако, достоверных различий между группами выявлено не было (рис. 24).

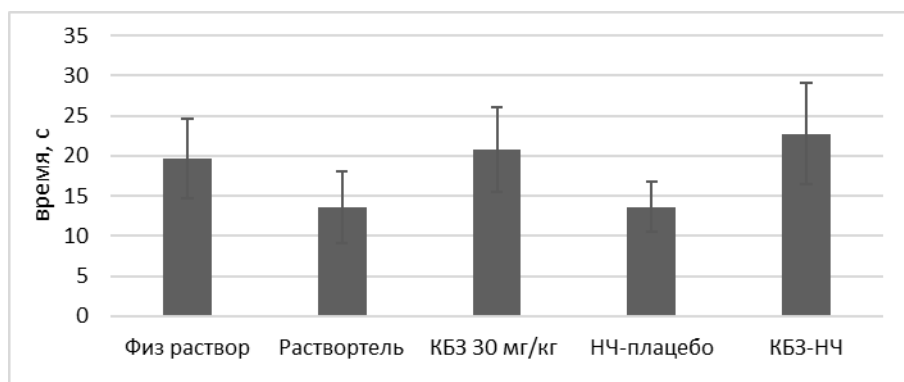


Рис. 24. Латентный период входа крыс в темный рукав камеры в тесте приподнятый крестообразный лабиринт.

Время нахождения в светлых рукавах лабиринта у животных из групп с физиологическим раствором, растворителем и НЧ-плацебо не отличалось друг от друга, следовательно, ни растворитель, ни полимер наночастиц не оказывал влияния этот параметр (рис. 25а).

Введение карбамазепина увеличивало время нахождения животного на свету. Хроническое применение КБЗ-НЧ приводило к более выраженному увеличению этого параметра, что достоверно отличалось от контрольной группы ($p=0.016$), и имело тенденцию к отличию от группы НЧ ($p=0.1$).

Несмотря на увеличение времени на свету в группах КБЗ и КБЗ-НЧ, большую часть экспериментального времени животные проводили в темноте. Таким образом, можно заключить, что введение этих препаратов не приводило к изменениям базовых поведенческих установок животных.

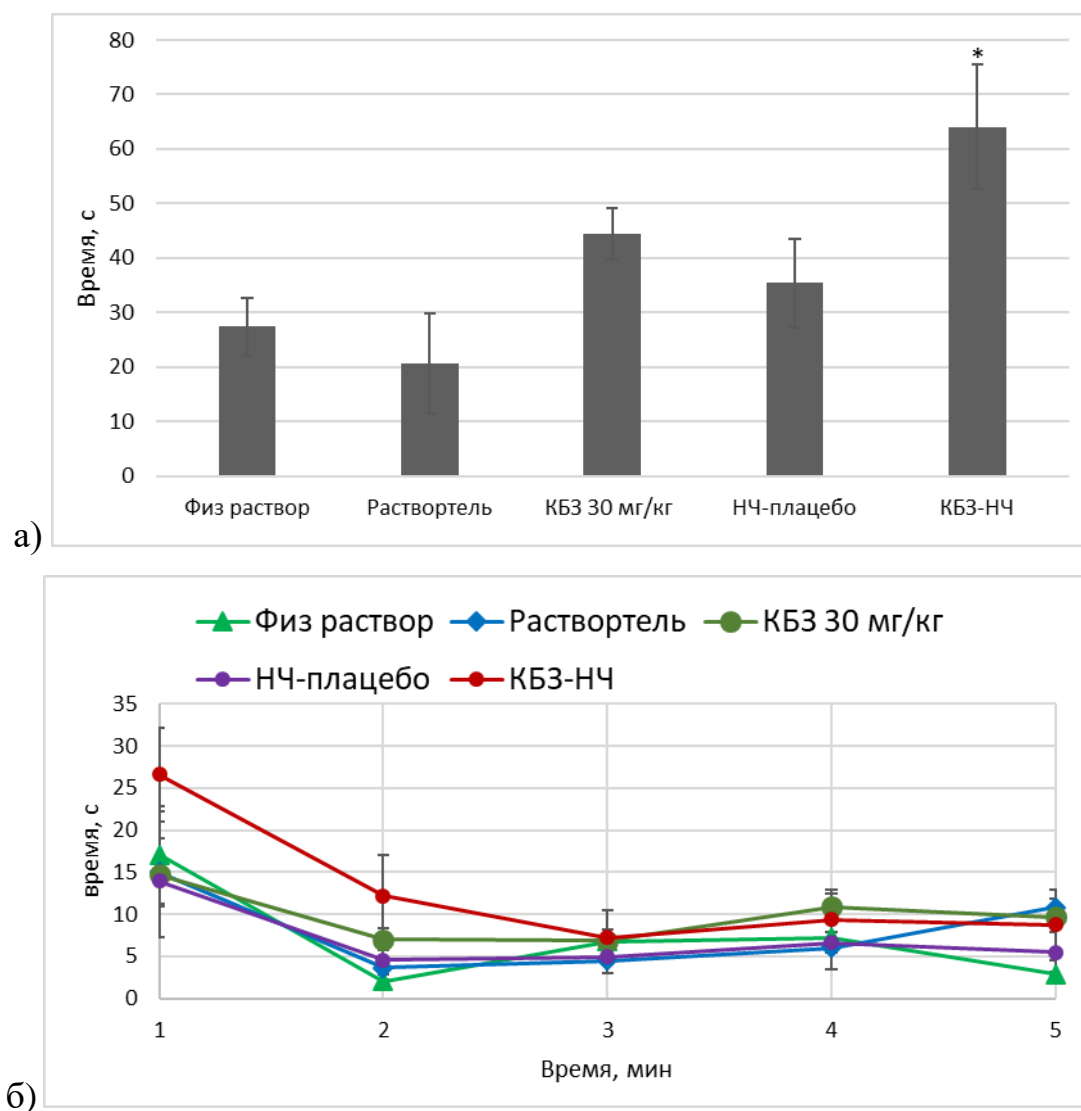


Рис. 25. Суммарное время нахождения животных в светлых рукавах камеры (а) его динамика поминутно (б). * $p < 0.05$ в отличие от контрольной группы по критерию Тьюки.

Динамика нахождения животных на открытых рукавах за каждую минуту не изменялась при хроническом введении исследуемых препаратов. Максимальное время нахождения в светлой части лабиринта было отмечено на первой минуте. Это связано с тем, что животное высаживали в центр на светлую часть лабиринта и крыса вынуждена какое-то время провести там (рис. 25в). В остальное время животное выходило на свет только по собственному желанию. На 2-ой и 3-ей минуте теста животные проводили больше времени в темной камере. Время на свету незначительно увеличивалось на 4-й и 5-й минутах. Это связано с тем, что обстановка в темной части теста к этому времени уже

исследована и животные вновь выходят на свет. Группы животных, которым вводили физиологический раствор, растворитель, КБЗ и НЧ-плацебо показали схожие поминутные результаты и их графики совпадают по динамике. Группа животных с КБЗ-НЧ не имеет достоверных отличий от остальных групп животных, однако, на графике можно заметить, что животные этой группы больше времени проводили на освещенных участках теста на 1-й и 2-й минутах тестирования (рис. 25в).

Таким образом, введение карбамазепина приводит к незначительному увеличению времени на свету, включение КБЗ в наночастицы усиливает этот эффект и делает его достоверным. Тем не менее, препараты не изменяют предпочтения и динамику поведения животного в тесте. Такой результат может свидетельствовать об анксиолитической активности препарата.

При исследовании поведения крыс в ПКЛ анализировали и дополнительные параметры.

Количество актов и длительность груминга, а также количество дефекаций могут изменяться в зависимости от уровня тревожности. Однако эти параметры в группах не имели различий (табл. 14).

Количество стоек, или вертикальная активность, позволяет оценить исследовательский интерес животных. Однако эти параметры не отличались в группах исследованных групп.

Выглядывания и свешивания позволяют оценить исследовательскую активность животных. Количество выглядываний не имеет достоверных различий во всех пяти группах (табл. 14). Количество свешиваний с края платформы не отличается в группах животных, получавших физиологический раствор, растворитель, КБЗ и НЧ-плацебо. Введение КБЗ-НЧ приводило к увеличению этого параметра ($p < 0.001$).

Количество выходов в светлые части ПКЛ свидетельствует об уровне тревожности крыс, а также об их двигательной активности. Светлые участки лабиринта достаточно крупные, поэтому по степени удаленности от темных участков их разбили на 3 группы: центр (перекрест темных и светлых участков),

выходы на ближайшую к темноте 1/2 светлого рукава, и выходы на дальнюю 1/2 рукава. Во всех группах количество выходов на центральную часть лабиринта не имело достоверных отличий (табл. 14).

Таблица 14. Исследование дополнительных параметров поведения у крыс различных групп в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». * $p < 0.05$ в отличие от контрольной группы, ! $p < 0.05$ в отличие от группы НЧ-плацебо по критерию Тьюки.

группа	Физ раствор	Растворитель	КБЗ 30 мг/кг	НЧ-плацебо	КБЗ-НЧ
Вертикальная активность	5,92±1,12	4,91±0,83	5,25±0,63	6,18±0,78	9,17±0,6
Количество актов груминга	0,92±0,19	0,91±0,21	0,92±0,19	1,09±0,28	1,67±0,33
Длительность груминга, с	18,08±4,47	18,27±5,34	12,75±3,68	18,09±4,57	15,67±3,19
Количество дефекаций	0,33±0,33	0,27±0,27	0,17±0,11	0,36±0,15	0,17±0,11
Выглядывания	5,5±0,73	4,45±0,86	6±0,87	4,9±0,8	6,08±0,51
Свешивания	4,25±0,72	3,54±0,5	5,08±0,79	5,73±0,94	10±0,99*!
Выходы в центр	0,23±0,23	0,36±0,28	1,5±0,31	1,18±0,33	1,5±0,36
Выходы на ближнюю 1/2 светлого рукава	0,92±0,26	0,36±0,28	1,17±0,21	1,18±0,42	2,33±0,59
Выходы на дальнюю 1/2 светлого рукава	0,42±0,19	0,09±0,09	0,42±0,15	0,64±0,24	0,92±0,4
Выход в светлые рукава/ число переходов в любой другой рукав (%)	59±12	52±14	72±8	65±13	71±9

После выхода в центр, животное могло либо вернуться в темноту, либо дальше исследовать светлые части лабиринта и попасть сначала на ближнюю, а, затем, на дальнюю половину открытого рукава ПКЛ. Количество таких выходов достоверно не отличалось в группах (табл. 14). Тем не менее, можно заметить, что КБЗ-НЧ повышал количество выходов на все три освещенных участка. Достоверности выявлено не было из-за большого разброса в группах. Вероятно,

можно получить достоверные данные при увеличении количества животных в группе или времени хронического введения препарата.

Чтобы исключить влияние изменения двигательной активности на оценку предпочтения светлого и темного отсеков камеры, мы вычислили процентное соотношение числа выходов животного в светлые рукава к общему числу перемещений из одного рукава в другой. Оказалось, что все группы в 52-72% производили перемещение на светлые части лабиринта и они не отличаются друг от друга. Таким образом, в тесте ПКЛ была выявлена анксиолитическая эффективность КБЗ и КБЗ-НЧ. Карбамазепин приводил к увеличению времени, пребывания животного на освещенных рукавах лабиринта. Препарат КБЗ-НЧ показал схожее влияние на поведение. Несмотря на отсутствие достоверных отличий по сравнению с группой животных с КБЗ, изменения в группе с КБЗ-НЧ более выражены. Вероятно, при увеличении длительности хронического введения препарата или размера групп, эту разницу станет возможно выявить. Также, КБЗ-НЧ приводил к увеличению количества стоек и свешиваний животных с края платформы, что свидетельствует об усилении проявления исследовательской активности.

Тест лабиринт «Барнса»

Тест «Лабиринт Барнса» используют для оценки когнитивных функций животного. В тесте для нахождения нужной норки животное должно использовать пространственную ориентацию. Кроме того, тест дает возможность оценить обучаемость животных. В отличие от «водного лабиринта Морриса», на результаты животного в «Лабиринте Барнса» оказывает влияние уровень тревожности, так как в качестве основного стрессирующего фактора здесь используется яркий свет, к которому животное успевает привыкнуть за время эксперимента. Так, если в первые высадки обстановка новая и стрессирующая, то на 4-5-ые дни эксперимента она становится знакомой, и животные меньше избегают свет, при этом, некоторые из них намеренно продолжают перемещаться по столу и обследовать ложные норки.

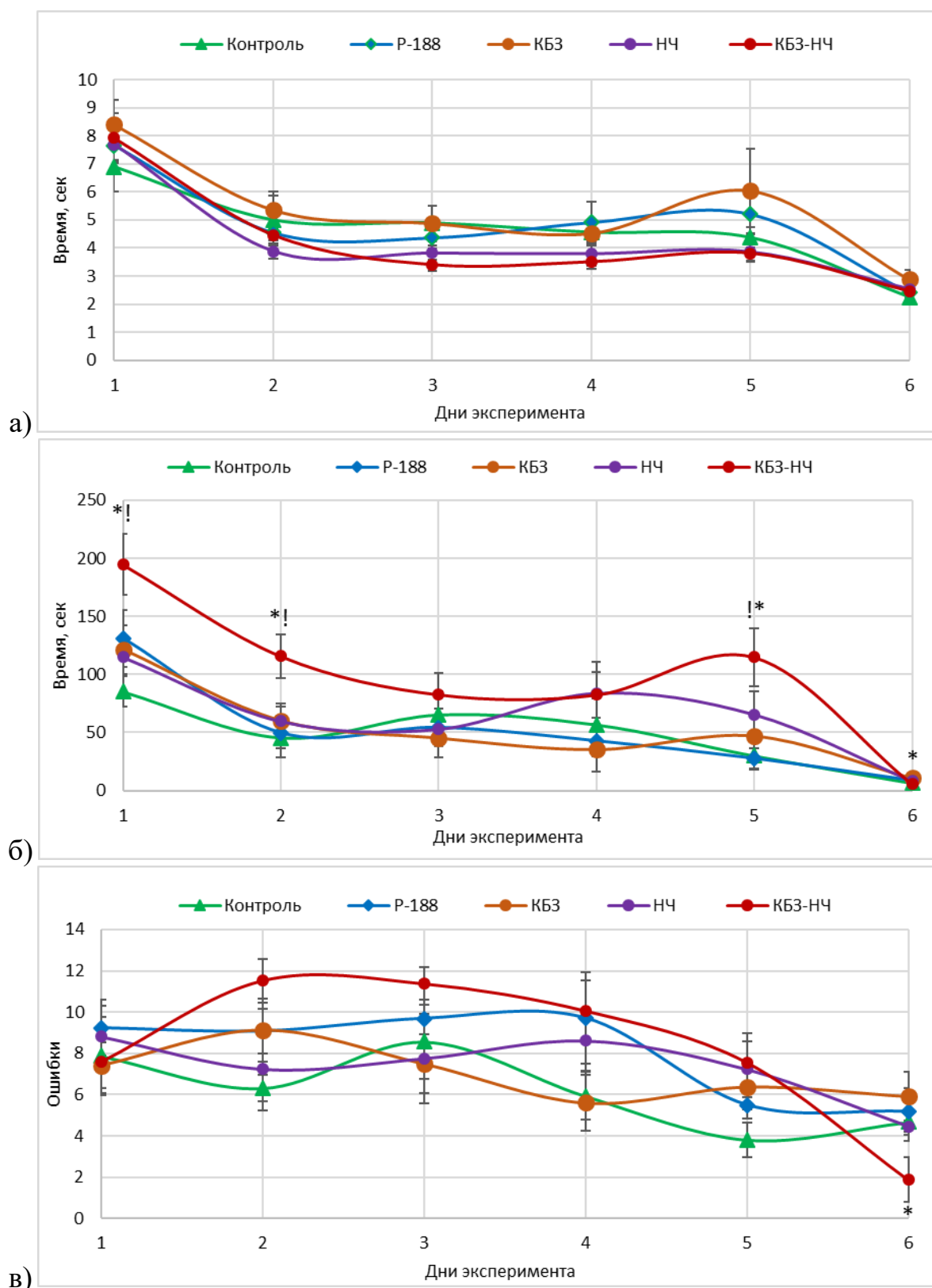


Рис. 26. Среднее время достижения первой норки (а), убежища (б), а также число ошибок (в) в разных группах в тесте «Лабиринт Барнса». * $p < 0.05$ в отличие от контрольной группы по критерию Тьюки, ! $p < 0.05$ по сравнению с НЧ-плацебо по критерию Даннета.

Время достижения первой норки в контрольной группе с первого по четвертый день эксперимента снижалось с 6,9 до 4,5 секунд (рис. 26а). Этот показатель был максимален в первый день. Это связано с тем, что попадало в новую обстановку и ему требовалось время, чтобы осмотреться и понять, куда можно двигаться. В последующие дни обстановка оказывалась более привычна, что приводило к снижению времени, проведенного в центре лабиринта. На пятый день эксперимента время достижения первой норки в среднем не изменялось по сравнению с четвертым днем (4,4 сек), однако, у некоторых животных наблюдалось его повышение. Это связано с привыканием к яркому свету и обстановке. На 6-ой день наблюдалось еще большее снижение времени достижения первой норки (до 2,3 сек), так как был использован дополнительный стрессирующий фактор: громкий звонок (рис. 27а).

В других группах наблюдается схожая динамика: в первый день время достижения первой норки оказывалось максимальным и постепенно снижалось к 4 дню эксперимента и недостоверно увеличивалось на 5ый день (рис. 26а). На 6-й день эксперимента из-за дополнительного стрессирующего фактора в виде громкого звука, время достижения первой норки снижается во всех группах (рис. 26а и 27а). При этом, животные из группы КБЗ тратили больше времени на выход из центра лабиринта, однако, это отличие было недостоверно (рис. 27а).

Таким образом, можно сказать, что вводимые препараты, растворители и плацебо не оказывали выраженного влияния на время выхода животного из центра. Достоверное повышение времени показала лишь группа с КБЗ в первый день эксперимента.

Задачей животных было найти убежище. В первый день время, затраченное на его нахождение было наибольшим. Это можно объяснить тем, что в первый день крысы еще знали о существовании и расположении убежища (рис. 26б). Животные из группы с КБЗ-НЧ дольше всех искали убежище, и, даже если находили быстро, то оставались на поверхности лабиринта и продолжали исследовать ложные норки. Поэтому, время поиска убежища в этой группе выше

и имеет достоверное отличие от животных, которым ввели физиологический раствор ($p=0.035$) и НЧ-плацебо ($p=0.014$).

На второй день эксперимента наблюдается снижение времени достижения убежища во всех группах (рис. 26б). При этом, в группе с КБЗ-НЧ заметно более плавное снижение этого параметра и в общем это время все еще достоверно выше, чем в других группах ($p=0.017$ по сравнению с контрольной группой и $p=0.044$ с НЧ-плацебо).

На 3-ий и 4-ый дни эксперимента все животные показали примерно одинаковое время и достоверных отличий не выявлено.

На 5-ый день все группы, кроме КБЗ-НЧ показали схожий с двумя предыдущими днями результат. Крысы, которым вводили КБЗ-НЧ дольше всех искали убежище, для них показано достоверное отличие от контрольной группы ($p=0.001$) и группы с НЧ-плацебо ($p=0.008$). Такое отличие в поведении может быть связано с показанным в тестах ОП и ПКЛ анксиолитическим эффектом препарата. Действительно, животные могли не входить в убежище не потому, что его не нашли, а потому, что хотели лучше исследовать окружающую обстановку.

На 6-й день эксперимента при тестировании со звонком, животные из групп контроль, растворитель и НЧ-плацебо показали схожие результаты. Крысы с хроническим введением КБЗ показали достоверное повышение времени поиска убежища ($p=0.049$ по сравнению с контролем). Животные с КБЗ-НЧ наоборот, быстрее всех добивались до убежища, однако, их результат не имеет достоверных отличий от контроля (рис. 27б).

Быстрое достижение убежища на 6-й день эксперимента в группе с КБЗ-НЧ подтверждает тот факт, что животные эффективно обучались в течение предыдущих 5-ти дней. При этом, вероятно, обследование обстановки было более тщательным по сравнению с другими группами, так как животные дольше оставались на поверхности экспериментального стола. Животные из группы с КБЗ дольше искали убежище на 6-й день, несмотря на то, что эта группа не отличалась от контрольной группы в течение первых 5-ти дней эксперимента.

Количество ошибок (рис. 26в и 27в) постепенно уменьшается с 1-ого по 6-ой дни эксперимента во всех группах животных. Дело в том, что в первый день животные не знают о существовании убежища. Количество ошибок в исследованных группах в первый день составило от 7 до 9. Разброс данных в этот день наибольший, так как животные выбирали случайное направление и могли как сразу оказаться рядом с убежищем, так и пойти в противоположную сторону. В последующие дни животные в первых попытках находили убежище достаточно быстро. Однако, в последние две попытки они могли задерживаться на поверхности стола более длительное время и исследовать соседние ложные норки.

По количеству ошибок крысы из разных групп за все время обучения не показали достоверных отличий. Однако, в группе КБЗ-НЧ в течении всего обучения наблюдается повышенное число ошибок. Большее число обследованных норок в этой группе связано с большей длительностью нахождения этих животных на поверхности лабиринта. В свою очередь, это могло им позволить лучше обследовать и запомнить окружающую обстановку. Это предположение подтверждает тот факт, что на 6-й день эксперимента эта группа животных показала наименьшее число ошибок при поиске нужной норки, достоверно отличающееся от контроля ($p=0.045$).

В данном тесте обе формы КБЗ и КБЗ-НЧ оказывали влияние на некоторые параметры поведения крыс. Хроническое введение КБЗ не изменяло поведение во время периода обучения, при этом, этот препарат повышал время нахождения убежища при наличии дополнительного стрессорного фактора. Хроническое введение КБЗ-НЧ повышало исследовательскую активность в период обучения и снижал время нахождения убежища при наличии непривычного источника стресса.

После тестирования животных в лабиринте Барнса было обработано видео и исследовано расположение животных в различных частях лабиринта: в секторе с убежищем, в противоположной стороне от убежища, а также в нейтральных

секторах. В таблице 15 представлено процентное соотношение времен, которые животные проводили в этих секторах.

В первый день эксперимента животные проводили примерно равные доли времени в секторе убежища и противоположном. Примерно половину времени они провели в нейтральном секторе, так как он является суммой правого и левого секторов и по площади больше, чем сектор убежища и противоположный. Отмечу, что правый и левый сектор были обчислены отдельно, однако, различия между ними выявлено не было. Достоверных отличий по предпочтению секторов между группами выявлено не было (табл. 15).

Со второго по пятый день эксперимента пропорции времени, проведенного в различных секторах, у животных разных групп не отличались (табл. 15). То есть, доли времени в различных секторах схожи несмотря на то, что крысы из группы КБЗ-НЧ в первый, второй и пятый дни находились на поверхности лабиринта дольше.

На шестой день эксперимента в финальном тестировании все животные предпочитали сектор убежища (табл.15). Это свидетельствует о том, что обучение животных во всех группах прошло успешно. Доля (табл. 15) и количество (рис. и 28) времени, проведенного крысами из группы с КБЗ-НЧ в секторе убежища в среднем достоверно выше ($p=0.024$), а в противоположном секторе – достоверно ниже ($p=0.03$) по сравнению с контрольной группой. Доля времени нахождения в нейтральном секторе в этой группе также снижена, однако, значимых отличий от контрольной группы нет. Это свидетельствует о том, что животные этой группы лучше находили убежище в присутствии дополнительного стресса. Этот факт подтверждает и меньшее число ошибок в этой группе ($p=0.045$ по сравнению с контролем).

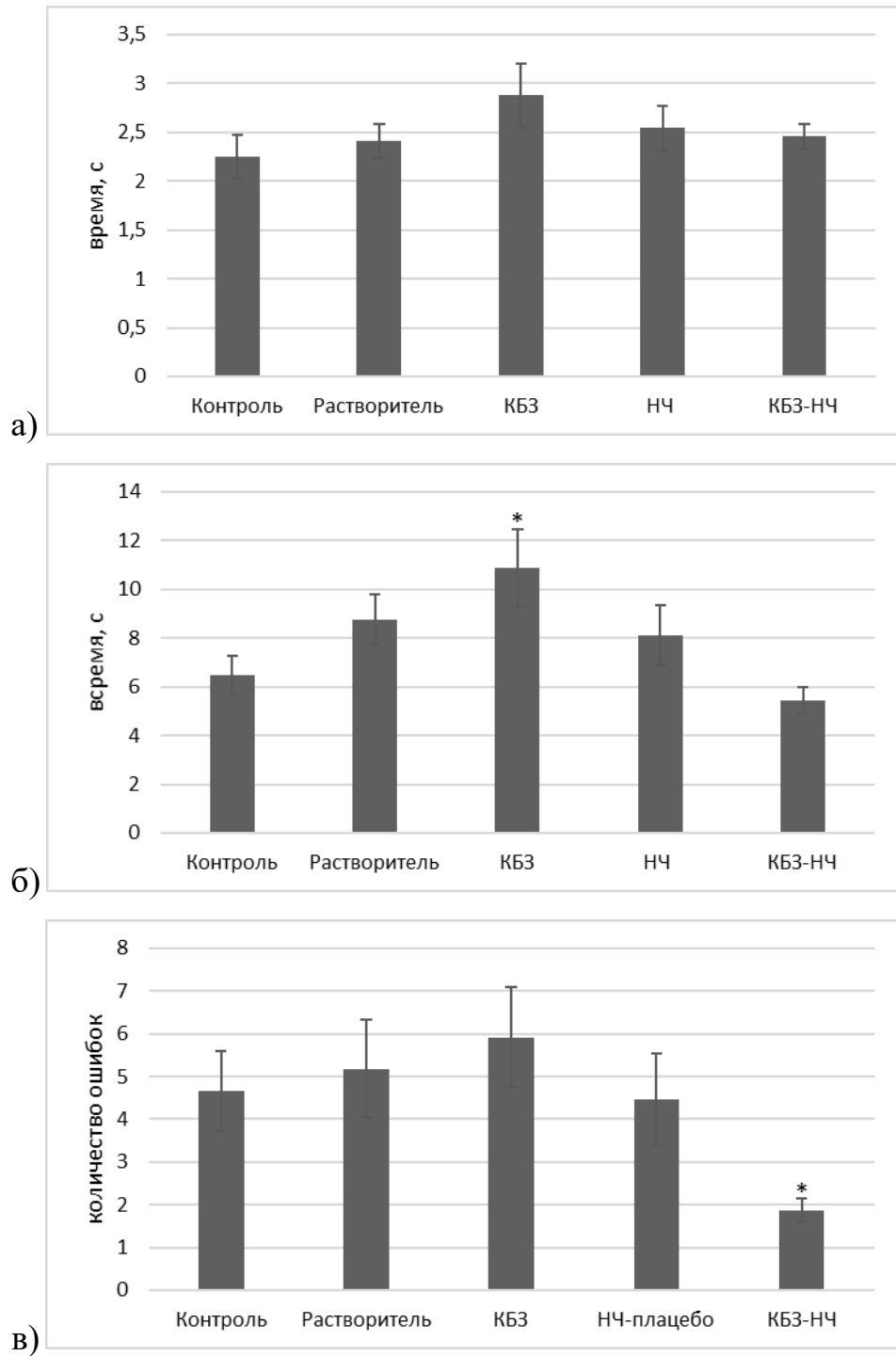


Рис. 27. Среднее время достижения первой норки (а), убежища (б), а также количество ошибок (в) в разных группах теста «Лабиринт Барнса» на 6-й день эксперимента. * $p < 0.05$ в отличие от контрольной группы по критерию Тьюки.

Таблица 15. Процентное соотношение расположения животных в различных секторах. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем по критерию Манна-Уитни.

Группа	Контроль	Растворитель	КБЗ 30 мг/кг	НЧ-плацебо	КБЗ-НЧ
1-й день					
2-й день					
3-й день					
4-й день					
5-й день					
6-й день					

сектор убежища
 противоположный
 нейтральный

Животные группы с КБЗ на шестой день эксперимента проводили достоверно больше времени в секторе убежища ($p=0.028$) и нейтральном секторе по сравнению с контрольной группой (рис. 28). Это может быть связано с увеличением общего времени поиска норки у этих животных на 6 день. Полученные данные могут свидетельствовать о менее эффективном обучении

животных этой группы. Группы с НЧ и с растворителем не отличаются от контрольной группы.

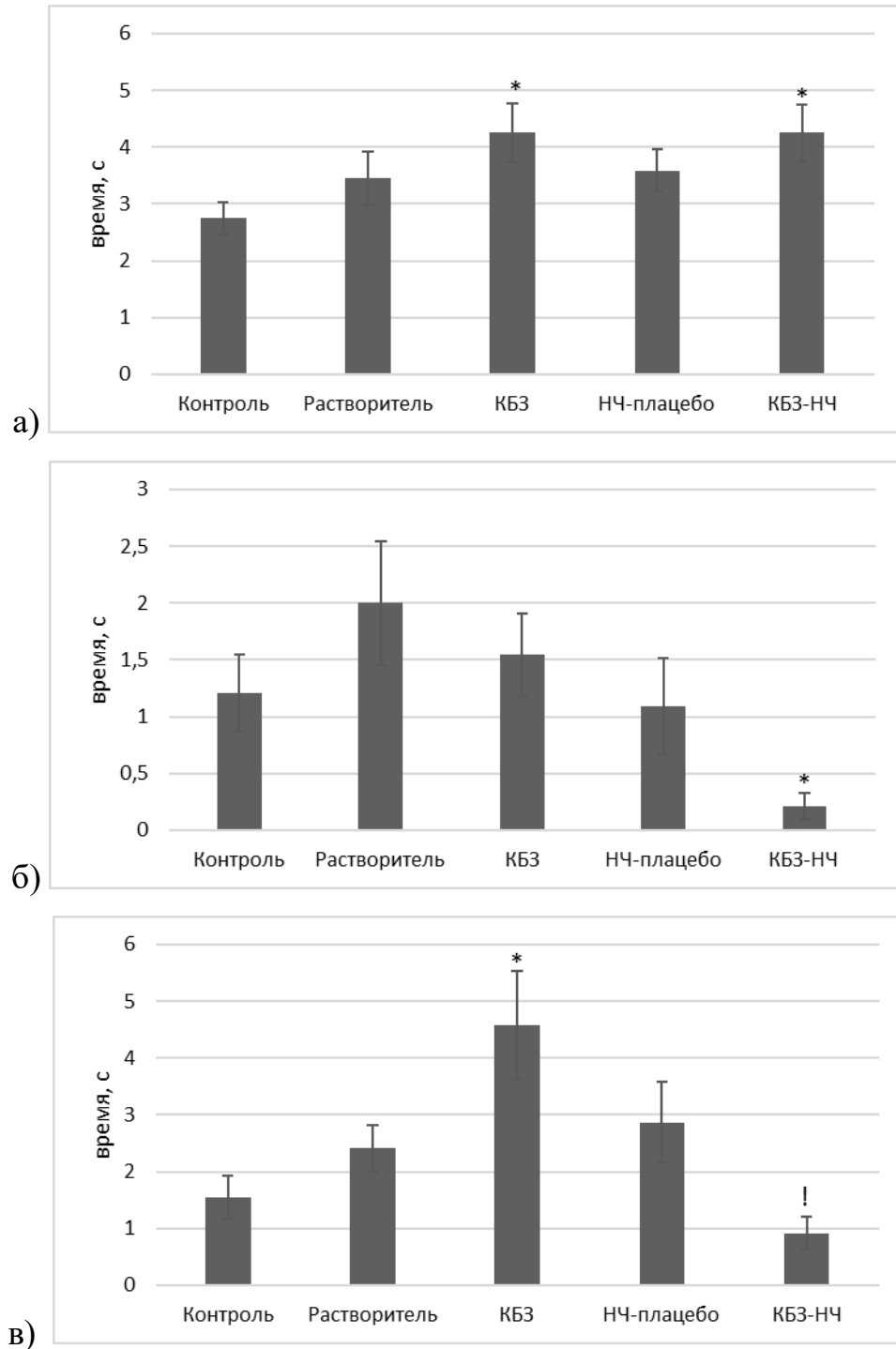


Рис. 28. Время нахождения в секторе убежище (а), противоположном (б) секторе и нейтральном (в) секторах. * $p < 0.05$ в отличие от контрольной группы, ! $p < 0.05$ в отличие от группы с НЧ по критерию Тьюки.

Таким образом, можно заключить, что ни растворитель, ни наночастицы-плацебо не оказывали влияние на поведение животных в тесте «Лабиринт

Барнса». Все эффекты, полученные при тестировании, связаны только с действием различных форм карбамазепина.

Хроническое введение КБЗ не изменяло поведение животных в процессе обучения. Однако, в финальный день тестирования при наличии дополнительного стресса эта группа показала наихудший результат: животные дольше искали убежище и больше времени проводили в правом секторе. Изменения в поведении не были существенными, однако, можно говорить о небольшой заторможенности или дезориентации животных в условиях дополнительного стресса.

Хроническое введение КБЗ-НЧ имело более выраженное влияние на поведение крыс в тесте «Лабиринт Барнса» по сравнению с группой животных, которым вводили КБЗ. При этом, КБЗ-НЧ оказывал влияние как в процессе обучения, так и в день финального тестирования. В процессе тренировки пространственной памяти, животные дольше находились на поверхности теста. Однако, это скорее связано со сниженной тревожностью крыс, нежели с их заторможенностью. Кроме того, на фоне действия препарата КБЗ-НЧ животные быстрее привыкали к обстановке и проводили больше времени на поверхности лабиринта на пятый день обучения. В финальный день тестирования животные этой группы лучше всех справились с задачей. Они быстрее и точнее находили нужную норку. В улучшение обучаемости могли внести вклад три фактора. Во-первых, животные проводили больше времени на поверхности лабиринта и могли лучше осмотреться, лучше запомнить пространственные ориентиры. Во-вторых, сам КБЗ-НЧ мог напрямую улучшить пространственную память. В-третьих, как было показано выше, это могли быть анксиолитические эффекты КБЗ-НЧ. Обучение на фоне сниженной тревожности могло проходить эффективнее.

Глава 3

1. Влияние антагониста P-гр верапамила на проницаемость ГЭБ для карбамазепина *in vivo*.

Введение ИЗН в контрольной группе приводило к возникновению судорог. Группа крыс, которым вводили верапамил перед ИЗН не отличается от контрольной группы по тяжести, продолжительности и латентному периоду наступления судорог (рис. 29, табл.16).

Интересные результаты показали животные, которым вводили КБЗ в различных дозах. Оказалось, что этот препарат в дозах 15, 20 и 25 мг/кг не влиял на максимальную тяжесть судорог, вызванных изониазидом и эти группы не отличаются от контроля. Таким образом, минимальная доза, которая оказалась по эффективности эквивалентна препарату «Финлепсин», составила 30 мг/кг (рис. 16), далее мы использовали КБЗ в этой дозе как контроль эффективности препаратов. Введение верапамила приводило к повышению эффективности АЭП. Достоверное снижение тяжести судорог по сравнению с контрольной группой было показано для 20 и 25 мг/кг КБЗ, введенных на фоне верапамила ($p < 0.0001$ для обеих групп) (рис. 29а). При этом, опытные группы крыс не отличаются от эффективной дозы 30 мг/кг ($p = 0.85$ и $p = 0.99$ соответственно). Введение КБЗ в дозе 15 мг/кг на фоне верапамила не приводило к снижению тяжести судорог, и эта группа имела достоверные отличия от крыс с эффективной дозой КБЗ (30 мг/кг) ($p < 0.001$) и не имела отличий от контрольной группы ($p = 1$).

Латентный период наступления судорог (4-5 стадия) (рис. 29б) в группе с КБЗ 20 мг/кг оказался достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p = 0.02$). При этом, группа КБЗ 25 мг/кг не отличалась от контроля из-за большого разброса данных ($p = 0.16$). Латентный период наступления тяжелых судорог при применении обеих доз был достоверно ниже, чем при введении КБЗ 30 мг/кг ($p < 0.0001$). Введение тех же доз на фоне верапамила приводило к полному купированию судорог, сравнимому с дозой 30 мг/кг. Эти группы отличаются от контрольной группы ($p < 0.0001$ для обеих групп) и не отличаются от эффективной дозы КБЗ ($p = 0.99$ для обеих групп).

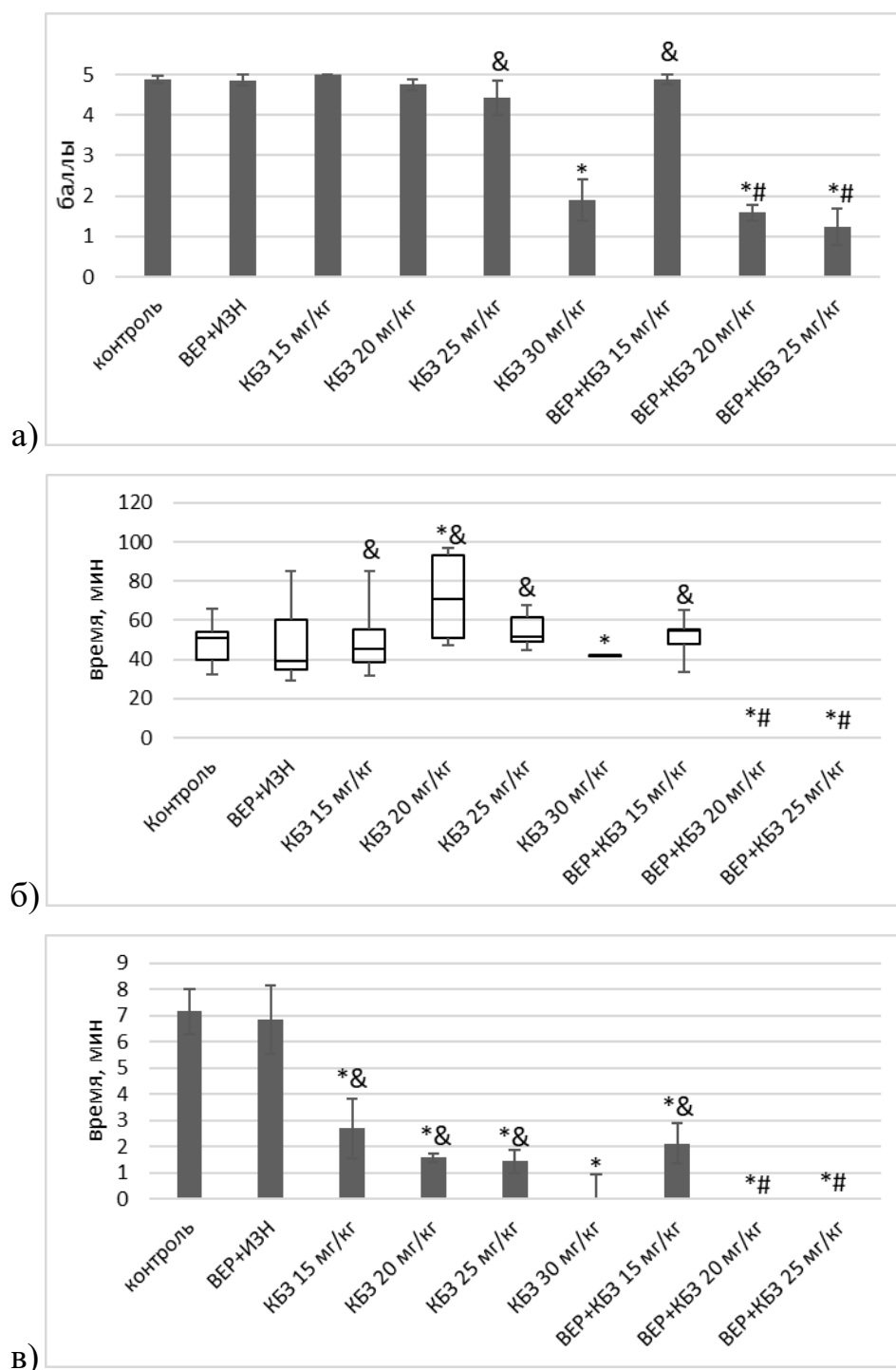
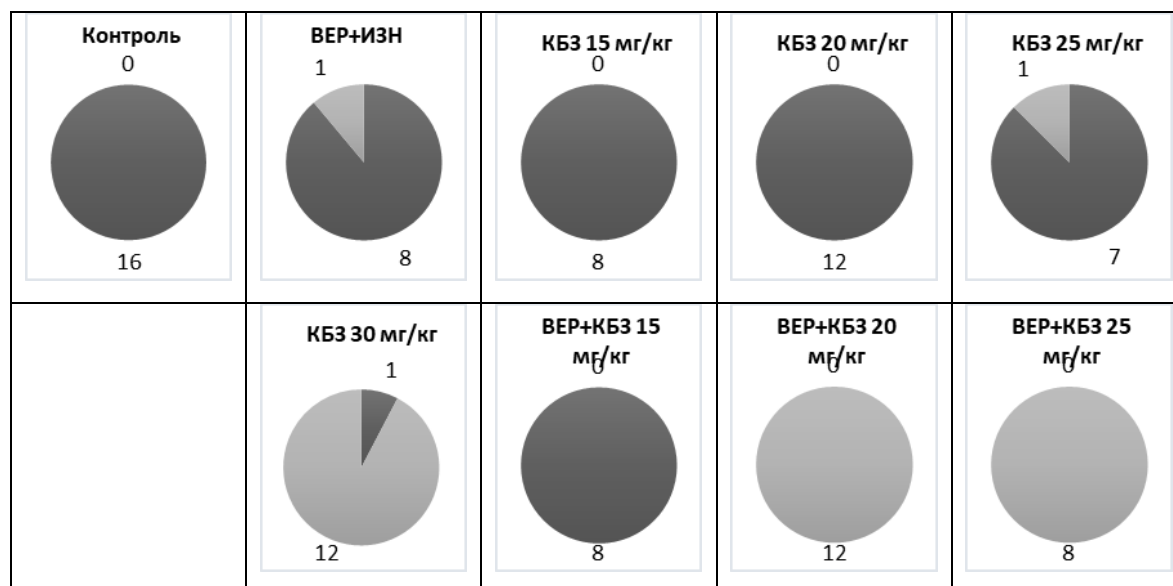


Рис. 29. Дозозависимые антиэпилептические эффекты карбамазепина (КБЗ) на фоне и без верапамила: а) тяжесть судорог, б) латентный период наступления судорог, в) продолжительность судорог. Если в группе судороги возникали только у отдельных животных, то их латентный период наступления судорог обозначен полосой. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # $p < 0,05$ по сравнению с аналогичной дозой КБЗ без верапамила (ВЕР), & $p < 0,05$ в отличие от группы с КБЗ 30 мг/кг по критерию Тьюки.

Таблица 16. Количество крыс с судорогами (темно-серый) и без судорог (светло-серый) в экспериментальных группах.



Латентный период наступления судорог в группах животных, которым вводили карбамазепин в дозе 15 мг/кг на фоне физиологического раствора или верапамила не отличался от контрольной группы по латентному периоду наступления судорог ($p=0.99$) и имел достоверные отличия от КБЗ в дозе 30 мг/кг ($p<0.0001$).

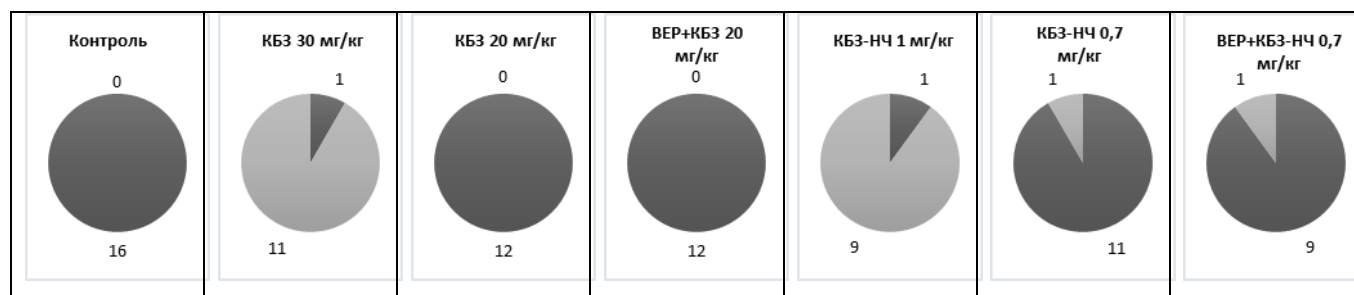
Продолжительность судорог была снижена во всех группах животных, которым вводили КБЗ. При этом, продолжительность судорог при введении КБЗ в дозах 15, 20 и 25 мг/кг достоверно ниже контроля ($p<0.0007$ в группе 15 мг/кг и $p<0.0001$ в группах 20 и 25 мг/кг) (рис. 29в). КБЗ в дозе 15 мг/кг, инъекционный на фоне верапамила, также снижал продолжительность судорог, однако, она оставалась выше, чем при применении эффективных доз. Введение КБЗ 20 и 25 мг/кг на фоне верапамила приводит к еще большему снижению продолжительности судорог, которое не отличается от эффективной дозы 30 мг/кг и отличается от контроля ($p<0.0001$ для обеих групп).

Таким образом, введение КБЗ на фоне верапамила приводит к снижению эффективной дозы АЭП с 30 мг/кг до 20 мг/кг. Введение КБЗ в дозе 15 мг/кг на фоне верапамила приводило только к некоторому облегчению судорог. Следовательно, блокада Р-гликопротеина повышает эффективность карбамазепина *in vivo* на 30%.

2. Влияние блокады Р-гликопротеина на эффективность КБЗ-НЧ

Как было показано ранее, минимальной эффективной дозой карбамазепина является доза 30 мг/кг. Она достоверно отличается от контрольной группы по всем трем параметрам. Введение верапамила приводит к снижению эффективной дозы до 20 мг/кг (рис.30).

Таблица 17. Количество крыс с судорогами (темно-серый) и без судорог (светло-серый) в экспериментальных группах.



Форма КБЗ-НЧ имеет эффективную дозу 1 мг/кг, эта доза отличается от контрольной группы по всем трем параметрам и не отличается от дозы КБЗ 30 мг/кг. Сниженная доза на 30% до 0,7 мг/кг является неэффективной (табл.17). Эта доза не отличается от контрольной группы по тяжести ($p=0.99$) и латентному периоду наступления судорог ($p=0.99$), и достоверно отличается от эффективной дозы препаратов КБЗ-НЧ 1 мг/кг ($p<0.0001$ для тяжести и ЛП судорог) (рис. 30). При этом, неэффективная доза КБЗ-НЧ 0,7 мг/кг приводит к снижению продолжительности судорог по сравнению с контролем ($p=0.0001$), как и неэффективные дозы препарата КБЗ. Введение этой дозы на фоне верапамила не приводит к повышению эффективности препарата. Данные, полученные в этой группе не отличаются по тяжести и продолжительности судорог от контроля ($p=0.94$ для тяжести судорог, $p=0.96$ для ЛП) и от аналогичной группы без верапамила ($p=0.99$ для тяжести и ЛП судорог). Следовательно, блокада Р-гр не влияет на динамику прохождения КБЗ-НЧ проходит ГЭБ.

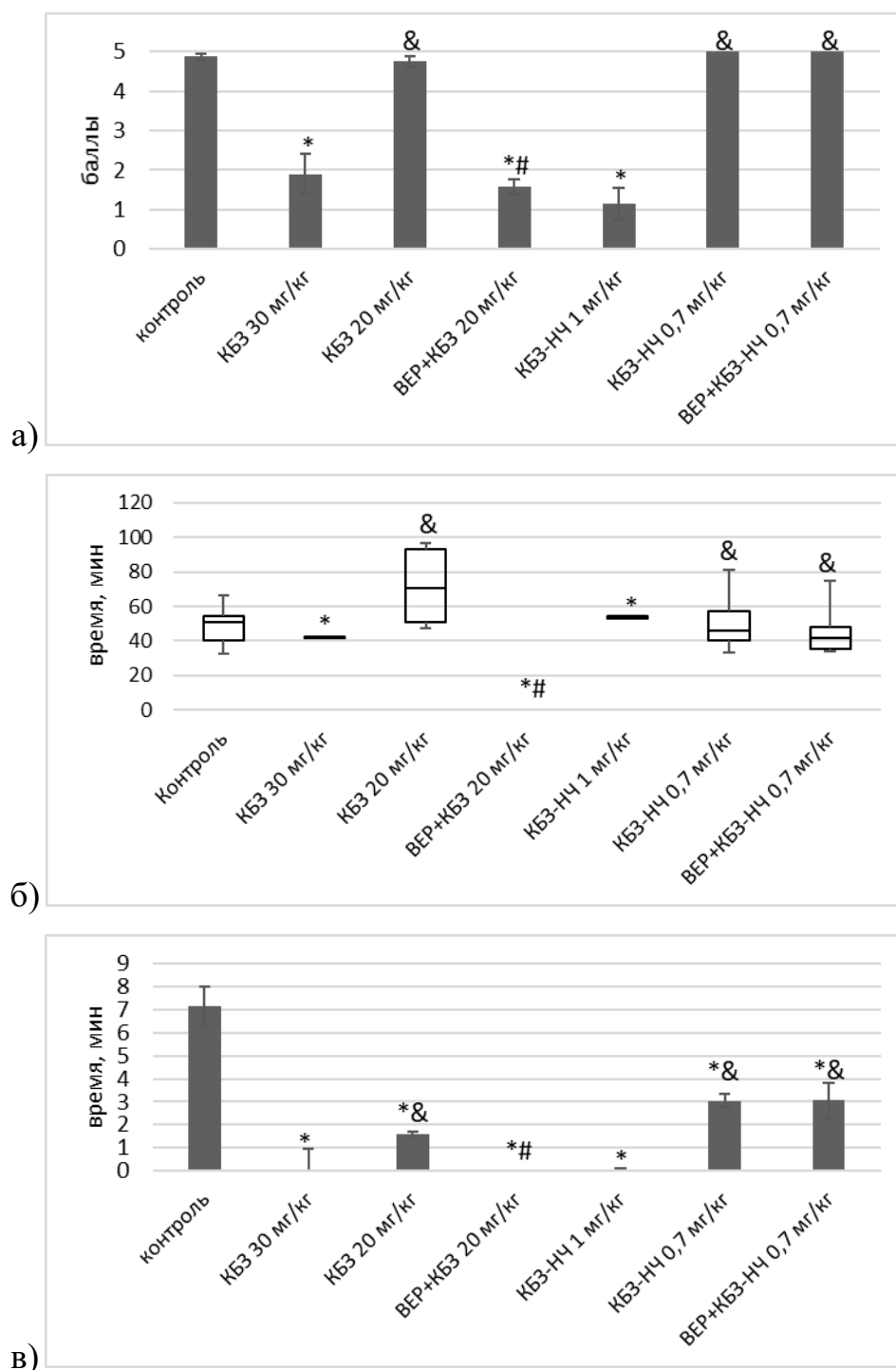


Рис. 30. Антиэпилептические эффекты карбамазепина (КБЗ) и карбамазепина в наночастицах (КБЗ-НЧ) на фоне и без верапамила: а) тяжесть судорог, б) латентный период наступления судорог, в) продолжительность судорог. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # $p < 0,05$ по сравнению с аналогичной дозой КБЗ без верапамила (ВЕР), & $p < 0,05$ в отличие от КБЗ 30 мг/кг по критерию Тьюки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 1

1. Исследование эффективности карбамазепина на ПТЗ-модели

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний (Panayiotopoulos, 2009). Именно поэтому очень важен эффективный поиск противосудорожных препаратов. Однако, ни одна из моделей не является идеальной. Именно поэтому, даже в настоящее время появляются новые модели эпилепсии, которые требуют более подробного изучения.

Наше исследование показало, что карбамазепин неэффективен для купирования судорог, вызванных хемоконвульсантом пентилентетразолом. Результаты этого эксперимента полностью согласуются с литературными данными и подтверждают недостатки ПТЗ-модели эпилепсии (Smith et al., 2007). Применение хемоконвульсантов для моделирования эпилептических приступов наиболее быстро, удобно и не требует специального оборудования. Однако, несмотря на эти преимущества, хемоконвульсанты провоцируют судороги, затрагивая определенную медиаторную систему, причем зачастую, только один аспект этой системы, например, один тип рецепторов. Таким образом, эти модели не затрагивают все изменения во время эпилептического приступа. Вероятно, это и ограничивает круг эффективных препаратов.

ПТЗ является блокатором ГАМК_A рецепторов. Действие ИЗН является более широким: он тормозит ГАМК-аминотрансферазу – лимитирующий фермент в синтезе ГАМК (Nair et al. 2012). Таким образом, действуя на одну и ту же систему разными способами, эти модели судорог имеют различный спектр купирующих препаратов. Снижение синтеза ГАМК является более обширным воздействием на тормозную систему головного мозга, по сравнению с воздействием на один тип рецептора. Поэтому, вероятно, диапазон АЭП, эффективных на ИЗН-модели может быть шире. Это относительно новая модель эпилептических приступов и многие ее аспекты, в том числе и препараты,

купирующие ИЗН-судороги, могут быть предметом дальнейших исследований. Однако, уже сейчас известно, что спектр препаратов, эффективных на этой модели дополняет ПТЗ-модель (Katyal et al., 2012; Rabinovitz et al., 2004).

Из-за несовершенств каждого отдельного хемоконвульсанта, для быстрого скрининга АЭП необходимо использовать несколько хемоконвульсантов с различными механизмами действия. Особенно это необходимо для препаратов, механизм действия которых связан с блокадой быстрых натриевых каналов, и эффективность которых невозможно выявить с помощью ПТЗ-тестирования (Nair et al., 2012). Таким образом, мы сможем увидеть эффективность препаратов, которые могут быть исключены из-за погрешности только одной модели. Именно поэтому, в работах последних лет все больше находит применение ИЗН-модель эпилепсии как дополнение к ПТЗ- или МЭШ тестированию (Chindo et al., 2014; Mahendran et al., 2014).

2. Гистологические и фотометрические исследования проницаемости ГЭБ.

Распространение применения ИЗН-модели для тестирования АЭП (Chindo et al., 2014; Mahendran et al., 2014) приводит к необходимости ее более подробного изучения. Как упоминалось ранее, проницаемость ГЭБ является очень важной характеристикой модели эпилепсии. В частности, если она будет повышаться, то прогнозируемая доза эффективности препарата может быть выше обычной, особенно, если в норме препарат не способен преодолеть ГЭБ. Более того, несмотря на то, что во время эпилептических приступов проницаемость ГЭБ может увеличиваться, в эпилептогенных очагах барьер локально усилен, что затрудняет лечение пациентов (Gottesman, Pastan, 1993). Именно поэтому мы изучили ИЗН-модель с точки зрения изменения проницаемости ГЭБ.

Данные нашего исследования выявили, что при применении ИЗН в качестве хемоконвульсанта проницаемость ГЭБ не изменяется. Этот факт мы подтвердили при помощи красителя Эванс Блю. Он не был обнаружен в ткани головного мозга

крыс после судорог, вызванных изониазидом на визуальных, флуоресцентных и фотометрических исследованиях.

Таким образом, ИЗН-модель эпилепсии является перспективным дополнением к ПТЗ-модели. ИЗН-модель обладает всеми преимуществами ПТЗ-модели, и при этом на ней проявляется эффективность тех препаратов, механизмы действия которых связаны с блокадой натриевых каналов, и, в частности, карбамазепина. Более того, в отличие от ПТЗ-модели (Danjo et al., 2013), проницаемость ГЭБ при введении ИЗН не изменяется. Это является преимуществом, так как при неизменном ГЭБ препараты, которые не способны в норме попасть в головной мозг, не покажут ложной эффективности. Это значит, что данные, полученные на модели судорог без нарушения ГЭБ, будут более точны.

Глава 2

1. Антиэпилептическая эффективность нанокапсулированной формы карбамазепина.

На сегодняшний день карбамазепин входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 7 декабря 2011 г. N 2199-р) и является одним из важнейших препаратов при лечении фокальной эпилепсии (идиопатической и симптоматической) с и без генерализованных тонико-клонических судорог. Несмотря на множество положительных качеств антиконвульсанта, при его регулярном приеме появляется необходимость постоянно повышать дозу, вследствие чего увеличивается вероятность возникновения побочных эффектов. Во-первых это связано с индукцией собственного метаболизма в печени (Panayiotopoulos, 2009). Во-вторых, несмотря на то, что взаимодействие карбамазепина с Р-гликопротеином вызывает активные споры, хронический прием КБЗ также может привести к возникновению фармакорезистентности, которую связывают с повышением экспрессии ABC-транспортера в эпилептогенных очагах головного мозга (Gottesman, Pastan, 1993).

Другим существенным недостатком карбамазепина является отсутствие его парентеральной формы. Она необходима, поскольку в некоторых ситуациях, например, при заболеваниях ЖКТ, травмах, в коме, а также при нестабильном психическом статусе пероральный прием лекарственных средств может быть затруднен или ограничен (Franco et al., 2014). В случае, если такой пациент ранее хронически принимал карбамазепин, необходимо поддержание его уровня в плазме крови, так как при его снижении повышается вероятность развития эпилептических приступов. При смене препарата и переводе больного на другой препарат также есть риск возникновения судорог. Именно поэтому, в настоящее время ведется активный поиск безопасной парентеральной формы КБЗ (Brewster et al., 1991; Madhusudhan et al., 2007; Müller et al., 2004).

Одним из перспективных направлений в снижении дозы препарата при сохранении его лекарственного действия является включение лекарственных веществ в полимерные биodeградируемые наночастицы. Такой подход позволяет решить сразу несколько проблем. Во-первых, наночастицы позволяют спрятать гидрофобный КБЗ от воды, при этом они сами оказываются растворимыми, что позволяет получить парентеральную форму препарата. Во-вторых, существует множество данных о том, что полимерные наночастицы, модифицированной ПАВ поверхностью, способны доставлять через ГЭБ препараты, которые в норме являются субстратом Р-гр. Такой эффект был показан для противоопухолевых препаратов и анальгетиков (Балабаньян, Гельперина, 2012; Gelperina et al., 2010; Kreuter, 2012). Несмотря на успех в лечении глиобластомы, такие полимерные НЧ не применялись ранее для доставки АЭП.

Полученные нами результаты показали, что включение карбамазепина в наночастицы позволяет снизить эффективную дозу до 30-ти раз: минимальная эффективная доза для субстанции КБЗ, введенной внутривенно, составляет 30 мг/кг, а для его наносомальной формы - 1 мг/кг. Побочные эффекты карбамазепина в основном связаны с применением высоких доз этого препарата. Включение КБЗ в наночастицы позволяет значительно снизить минимальную эффективную дозу, и, следовательно, уменьшить вероятность возникновения нежелательных побочных эффектов, в частности, аутоиндукции метаболизма (Panayiotopoulos, 2009). Для повышения эффективности КБЗ оказалось важным именно включение препарата в наночастицы, так как при совместном его введении с НЧ-плацебо его эффективность не изменялась по сравнению с группой без НЧ.

Из литературных данных известно, что наночастицы, модифицированные ПАВ, беспрепятственно преодолевают ГЭБ (Kreuter, 2012). Существует несколько вероятных механизмов их проникновения. ПАВ на поверхности НЧ может взаимодействовать с апополипротеинами крови, которые в норме покрывают ЛПНП, после чего эти апополипротеины взаимодействуют со

специфическими рецепторами на эндотелии ГЭБ, что приводит к облегченному транспорту частицы в головной мозг. С другой стороны, НЧ могут задерживаться на поверхности эндотелия ГЭБ и разрушаться, образуя комплекс с переносимым веществом и таким образом проникать через барьер. Также применение ПАВ приводит к увеличению времени циркуляции частиц в крови, в результате чего увеличивается биодоступность препарата в органе-мишени. Причем, все три предложенных механизма могут работать одновременно (Балабаньян, Гельперина, 2012; Gelperina et al., 2010; Zensi et al., 2009). Облегченная доставка, маскирование КБЗ от ГЭБ, а также увеличение биодоступности препарата за счет увеличения времени циркуляции, значительно повышает эффективность препарата. Облегченная транспортировка препарата позволяет не только усилить эффект от препарата, но и снизить его накопление в других органах и тканях. Для КБЗ это особенно важно, так как этот препарат обладает аутоиндукцией метаболизма (Panayiotopoulos, 2009; Reith et al., 2001). Снижение дозы препарата приведет к снижению его накопления в печени, что, в свою очередь, снизит необходимость в постоянном повышении дозы карбамазепина.

Важной проблемой применения АЭП является развитие фармакорезистентности, или устойчивости судорог ко многим фармакологическим препаратам. Хроническое применение карбамазепина не исключает возникновения такого рода устойчивости. Одной из главных причин возникновения устойчивости ко многим АЭП является повышенная экспрессия специфических трансмембранных белков - ABC-транспортеров, в частности, Р-гликопротеина в структурах головного мозга (Lazarowski et al., 2007; Potschka, 2012). При этом, прохождение АЭП через ГЭБ оказывается затрудненным (Remy, Beck, 2006). Поскольку НЧ позволяют препаратам проникать в мозг, минуя Р-гр, они являются перспективной разработкой для преодоления фармакорезистентности к различным АЭП.

Таким образом, новая парентеральная форма карбамазепина, основанная на его включении в полимерные наночастицы, модифицированные ПАВ, позволяет

решить сразу несколько задач, связанных с применением КБЗ. Во-первых – это эффективная парентеральная форма. Во-вторых, такая форма позволяет снизить дозу КБЗ до 30 раз. И, в-третьих, эта форма является перспективной разработкой для преодоления фармакорезистентности.

2. Сравнение эффективности парентеральных форм КБЗ с «Финлепсином».

Препарат «Финлепсин» является пероральной формой препарата КБЗ, широко применяемой для лечения эпилептических приступов. Биодоступность этого препарата относительно высока, однако, всасывается он медленно. Именно поэтому для достижения эффективной концентрации этого препарата в крови требуется достаточно длительное время: более 2-х часов. Кроме того, после всасывания из ЖКТ кровь проходит через воротную систему печени, где КБЗ взаимодействует с ферментом цитохром Р450 и частично метаболизируется (Panayiotopoulos, 2009). В отличие от перорального, внутривенное введение препарата не позволяет ему обойти печень и избежать распада, вследствие чего его биодоступность составляет 100%. Поскольку препарат не метаболизируется в печени еще до достижения очага, снижается и вероятность аутоиндукции метаболизма. По этим причинам возникает разница во вводимых эффективных противосудорожных дозах (300 мг/кг п/о для «Финлепсина» и 30 мг/кг в/в для суспензии КБЗ). Эффективность обеих форм не отличается друг от друга ни по одному из параметров. Поэтому внутривенная доза КБЗ 30 мг/кг является адекватной для сравнения и оценки эффективности внутривенной формы КБЗ-НЧ.

Форма КБЗ-НЧ в дозе 1 мг/кг по антиэпилептической эффективности не отличается от «Финлепсина». Следовательно, новая внутривенная форма КБЗ по степени купирования судорог не уступает старой пероральной форме. Влияние скорости всасывания и метаболизма в печени приводит к увеличению пероральной дозы в 10 раз по сравнению с внутривенной формой. Однако, КБЗ-НЧ дополнительно снижает дозу еще в 30 раз. И это снижение обеспечивается именно за счет инкапсуляции КБЗ в наночастицы.

3. Анализ ЭКоГ животных

Анализ ЭКоГ животных является важной частью, характеризующей модель эпилепсии. Пентилентетразол, как и другие агонисты ГАМК_A рецепторов, в малых дозах вызывает появление пик-волновых разрядов на ЭЭГ. Такие разряды свойственны для абсансной эпилепсии. Антиабсансные препараты неэффективны против судорожных форм эпилепсии. И наоборот, противосудорожные препараты не только не купируют, но и усугубляют течение абсансных приступов (McLean et al., 2004). Введение различных доз ПТЗ позволяет моделировать оба типа эпилепсии. На этой модели эффективны и противоабсансные, и противосудорожные препараты. Тем не менее, АЭП, механизм которых связан с модулированием деятельности быстрых натриевых каналов, например, карбамазепин и фенитоин, на ПТЗ-модели неэффективны (McLean et al., 2004; Smith et al., 2007).

Введение изониазида не вызывало развития пик-волновых разрядов. В отсутствие купирования приступа развивалась пароксизмальная активность на ЭКоГ, схожая с разрядами, возникающими при введении высоких доз ПТЗ (рис. 31).

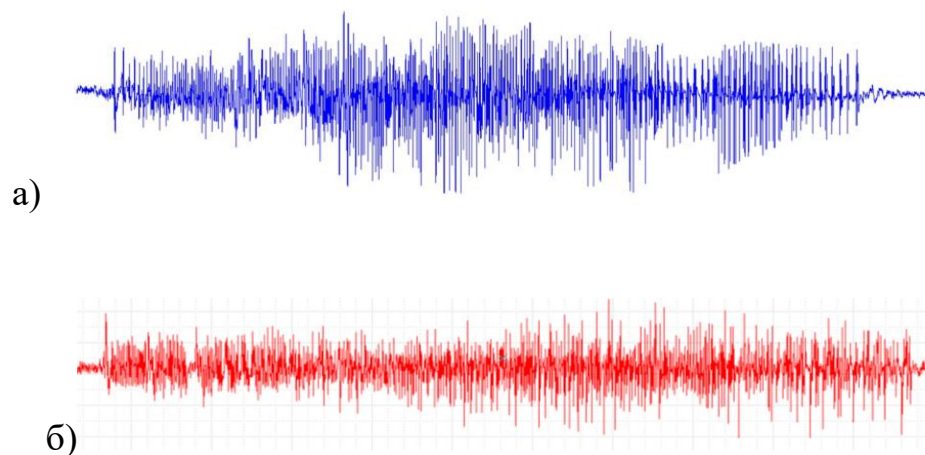


Рис. 31. Пароксизмальная активность в коре головного мозга крыс при введении а) ПТЗ (65 мг/кг) (Oztas et al., 2016) и б) ИЗН (300 мг/кг) (наши данные).

Пароксизмальная активность на ЭКоГ могла возникать при 2-балльных изменениях моторных проявлениях судорог по пятибалльной шкале. При 3-х

балльных приступах и выше всегда наблюдались изменения на ЭЖоГ. Как правило, появление пароксизмальных эпизодов на записи электрической активности коры предшествовало развитию тяжелых тонико-клонических приступов. То есть, пароксизмальная активность предшествует развитию тяжелых эпилептических приступов.

Введение КБЗ в свободной или включенной в наночастицы форме, также не изменяло электрической активности головного мозга. Кроме того, КБЗ эффективно купировал судороги. У некоторых отдельных крыс тяжесть приступов достигала 2-х баллов и появлялась короткая пароксизмальная активность, которая не переросла в тяжелые приступы. У большинства животных ЭЖоГ не отличалась от нормальной ЭЖоГ.

Таким образом, было показано, что КБЗ в дозе 30 мг/кг, а также КБЗ-НЧ в дозе более 1 мг/кг купирует не только внешние проявления судорог, но и изменения в электрической активности головного мозга.

4. Влияние хронического введения КБЗ на поведение

Карбамазепин – это препарат, который принимают хронически. Именно поэтому важно исследовать не только его противоэпилептические свойства, но и оценить его влияние на когнитивные функции. Мы показали, что ни растворитель, ни наночастицы-пустышки не влияют на поведение. Соответственно, все описанные эффекты полностью вызваны действием КБЗ.

При тестировании в «Открытом поле» мы показали повышение двигательной активности и снижение тревожности при введении препарата КБЗ-НЧ (табл. 18). Подобных изменений в поведении при введении самого КБЗ не наблюдалось. Интересно, что для карбамазепина описанные эффекты касаются в основном снижения локомоторной активности, например, при принудительном плавании или в клетке с фотоэлементами (Nowakowska et al., 2011).

Таблица 18. Суммарные данные по всем поведенческим тестам.

параметр	отличие от контроля в группах			
	растворитель (P-188)	КБЗ	НЧ- плацебо	КБЗ-НЧ
тест "Открытое поле"				
ЛП выхода из центра	=	=	=	↑
Горизонтальная активность	=	=	=	↑
Количество стоек	=	=	=	=
Количество выходов в центр I	=	=	=	↑
Количество выходов в центр II	=	=	=	↑
Количество актов груминга	=	=	=	=
Длительность груминга	=	=	=	=
Количество дефекаций	=	=	=	=
Тест "Приподнятый крестообразный лабиринт"				
ЛП перехода в темный отсек	=	=	=	=
Время на свету	=	=	=	↑
Время на свету/время в темноте	=	=	=	↑
Количество стоек	=	=	=	=
Количество актов груминга	=	=	=	=
Длительность груминга	=	=	=	=
Количество дефекаций	=	=	=	=
Количество выглядываний	=	=	=	=
Количество свешиваний	=	=	=	↑
Количество выходов на светлые участки	=	=	=	=
Выходы на светлые участки/общее число переходов	=	=	=	=
тест "Лабиринт Барнса" 1-5 дни				
ЛП подхода к первой норке	=	↑ в первый день	=	=
ЛП нахождения убежища	=	=	=	↑ на 1, 2 и 5 дни
Число ошибок	=	=	=	↑ на 4 и 5 дни
Доля времени в секторе убежища	=	=	=	=
Доля времени в нейтральном секторе	=	=	=	=
Доля времени в противоположном от убежища секторе	=	=	=	=
тест "Лабиринт Барнса" 6 день (финальный тест)				
ЛП подхода к первой норке	=	=	=	=
ЛП нахождения убежища	=	↑	=	=
Число ошибок	=	=	=	↓
Доля времени в секторе убежища	=	=	=	↑
Доля времени в нейтральном секторе	=	=	=	=
Доля времени в противоположном секторе	=	=	=	↓

В тесте «Открытое поле» токсическая доза КБЗ при однократном введении снижала вертикальную и горизонтальную активность, а также пройденную дистанцию (Barker-haliski et al., 2016). Полученные нами данные отличаются от литературных. Такая разница может быть связана сразу с несколькими факторами. Мы показали, что хроническое введение КБЗ не оказывало влияния на двигательную активность животных. Вероятнее всего, это связано с тем, что мы применяли умеренную, а не высокую дозу КБЗ. КБЗ-НЧ вызывал обратный эффект, то есть повышал двигательную активность животных. Такое изменение может быть связано со снижением тревожности. Животные на фоне КБЗ-НЧ проявляли больше интереса к окружающей обстановке, не замирали и не затаивались, поэтому итоговая двигательная активность оказалась выше. Крысы из Группы КБЗ-НЧ показали повышенный латентный период выхода из центра поля. С одной стороны такое изменение может быть связано с понижением тревожности, то есть животное осматривается, прежде, чем начать перемещение. С другой стороны, это может свидетельствовать о повышении тревожности, так как на открытом пространстве животное впадает в ступор. Из этих двух вариантов, более вероятен первый, так как анксиолитические свойства препарата были подтверждены во всех трех тестах. Действие препарата КБЗ-НЧ более выражено, по сравнению с КБЗ, так как наночастицы могут изменять распределение препарата в головном мозге. Именно поэтому, эффекты от препарата могут отличаться от его свободной формы.

Исследование поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте также выявило анксиолитический эффект карбамазепина (табл. 18). В группе с КБЗ оказались повышенными время, проведенное животным на свету. Полученные нами данные согласуются с литературой. Поскольку ПКЛ является стандартным тестом для определения тревожности, анксиолитический эффект КБЗ в нескольких его модификациях был показан во многих исследованиях (Joshi et al., 2015; Rezvanfard et al., 2009; Zangrossi, Leite, 1992). В случае хронического введения препарата, включенного в наночастицы, наблюдались схожие

изменения. Количество времени, проведенного на свету и свешиваний оказались достоверно повышены.

Как было показано ранее, КБЗ положительно влияет на различные виды памяти, в том числе и на пространственную (Nowakowska et al., 2007, 2011; Zhang et al., 2017). В большинстве исследований для изучения пространственной памяти используют водный лабиринт Морриса. Его сухопутным аналогом считается лабиринт Барнса (Mcateer et al., 2016). Этот тест основан на естественном избегании животными яркого света. В отличие от водного лабиринта Морриса в данном тесте на разброс данных вносит гораздо больший вклад тревожность животного. Литературных данных о тестировании эффектов КБЗ в лабиринте Барнса нет. Однако, можно провести аналогию с водным лабиринтом Морриса. В лабиринте Барнса группа КБЗ отличалась от контрольной группы и группы с введением растворителя на 1-й и 6-й дни эксперимента (табл. 15). В первый день животные дольше находились в центре, что, вероятно, может быть связано с пониженной тревожностью. На шестой день эксперимента животные больше времени тратили на достижение норки, при этом они предпочитали сектор норки. То есть, они выбирали верное направление. Увеличение времени достижения своей норки может быть связано со сниженной локомоторной активностью животных, которая была показана в других тестах (Nowakowska et al., 2011; Smith, 1983).

Гораздо больше отличий от контрольной группы имеет группа с КБЗ-НЧ. В первые пять дней, пока проводили обучение, животные показывали сниженный результат: они дольше выходили из центра, искали убежище и совершали больше ошибок (табл. 15). Вероятно, такой результат связан вовсе не с тем, что животные хуже обучались, а с пониженной тревожностью. Свет для крыс этой группы не являлся сильным стрессирующим фактором, и они продолжали исследование поверхности лабиринта. На шестой день эксперимента, во время финального тестирования животные этой группы показали наилучший результат. Несмотря на недостоверное снижение времени достижения убежища, количество ошибок было

меньше. Более того, у крыс этой группы доля времени, проведенного в секторе убежища была выше, а в противоположном – ниже, чем в контрольной группе животных. Причем, в финальный день не показано повышения времени достижения сектора убежища, в отличие от группы с КБЗ.

Таким образом, можно сказать, что в форме КБЗ-НЧ наночастицы не только усиливают действие КБЗ на память, но и изменяют некоторые его эффекты. Это может быть связано с тем, что наночастицы изменяют биодоступность и распределение препаратов в головном мозге. При применении КБЗ-НЧ не наблюдается снижения локомоторной активности ни в тесте «Открытое поле», ни в «лабиринте Барнса», в отличие от литературных данных, полученных при введении КБЗ (Nowakowska et al., 2011; Smith, 1983).

Побочные эффекты от КБЗ-НЧ нельзя назвать негативными, скорее, наоборот. В частности, к ним относятся снижение тревожности, повышение исследовательской активности и улучшение пространственной памяти. Это свидетельствует о повышении биодоступности КБЗ для головного мозга, что приводит к усилению нормотимических свойств препарата. КБЗ в настоящее время уже применяется не только как антиэпилептический препарат (Nowakowska et al., 2007, 2011). Вероятно, за счет изменения эффективности препарата наночастицы позволят расширить область применения карбамазепина и использовать его для лечения других нейродегенеративных заболеваний.

Глава 3

1. Влияние антагониста P-gp верапамила на проницаемость ГЭБ для карбамазепина *in vivo*.

Фармакорезистентная эпилепсия является одной из важнейших проблем современной медицины. Если не удастся взять под контроль судороги при помощи одного АЭП, то вероятность того, что сработает другой – менее 20% (Kwan et al., 2000). Последствия возникновения неконтролируемых судорог тяжелые и могут приводить к сокращению продолжительности жизни, травмам, неврологическим и психиатрическим заболеваниям и к нетрудоспособности (Sperling, 2004). Поэтому, для развития терапии таких пациентов, важным является исследование механизмов фармакорезистентности.

Для многих антиэпилептических препаратов уже было показано взаимодействие с P-gp, но вопрос с карбамазепином до сих пор не решен окончательно. Однако, было показано взаимодействие его аналогов и активного метаболита с P-гликопротеином (Zhang, 2011). В этом исследовании взаимодействие карбамазепина напрямую с P-гликопротеином не было показано. Но нашлось доказательство транспортировки его активного метаболита карбамазепина-10,11-эпоксида и других структурных аналогов P-гликопротеином. Это важный факт, так как карбамазепин обладает аутоиндукцией собственного метаболизма в печени и при регулярном приеме его эффективность может значительно снижаться именно из-за его быстрой трансформации в печени в свои метаболиты, неспособные проникнуть через ГЭБ.

Наши данные подтверждают, что, так или иначе, блокада P-гликопротеина усиливает антиэпилептический эффект карбамазепина. Можно предположить, что усиление происходит из-за облегченного проникновения его активных метаболитов в головной мозг. Такое предположение справедливо, но, во-первых, препарат был введен животному впервые, следовательно, еще нет аутоиндукции метаболизма, во-вторых – карбамазепин был введен внутривенно, следовательно,

если он и проник в печень, то в значительно меньшем количестве по сравнению с пероральным введением. А значит, доля метаболитов была минимальна.

С другой стороны, наши данные могут свидетельствовать о том, что карбамазепин может быть субстратом Р-гликопротеина. Это согласуется с данными многих исследований (Ma et al., 2013; Summers et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Исследования транспорта АЭП между апикальной и базолатеральной мембраной на поляризованных культурах клеток кишечника (Caco-2) и почек (MDCKII, LLC), трансфицированных человеческим геном *MDR1* и *ABCB1*, не показали взаимодействия между исследованными АЭП и Р-гликопротеином (Baltes et al., 2007a,b). Однако, поскольку многие АЭП, в том числе карбамазепин, являются липофильными молекулами, они способны свободно диффундировать через мембрану клетки. В вышеупомянутых исследованиях препараты загружали только с одной стороны, однако, с течением времени, препарат оказывался с обеих сторон клеточной культуры. Если исследуемое вещество не обладает высоким сродством к конкретному АЭП, то в такой системе их взаимодействие может быть маскировано трансмембранным транспортом препарата (FDA, 2006; Luna-Tortós et al., 2008).

Кроме того, в исследованиях на клеточных культурах работа Р-гликопротеина не была повышенной (Baltes et al., 2007a,b). Вероятно, при нормальной работе транспортер значимо не влияет на транспорт КБЗ. Однако, во время эпилептического приступа и тем более при хронической эпилепсии, повышается не только активность Р-гр, но и его экспрессия. Можно предположить, что именно в таком состоянии карбамазепин активнее взаимодействует с Р-гр. Эта гипотеза требует дополнительных исследований сравнения взаимодействия карбамазепина с Р-гр в эпилептическом и неэпилептическом головном мозге.

Верапамил является антиаритмическим препаратом и блокатором кальциевых каналов. Сердечная мышца, как и нервная ткань, является возбудимой, и для генерации ПД важны ионы натрия, калия и кальция. Поэтому нельзя исключать влияния верапамила на кальциевые каналы в нервной ткани. Более того, АЭП, которые модифицируют натриевую проводимость, также способны влиять на сердечную деятельность (Borowicz et al., 2014). Однако, в нашем эксперименте противосудорожной активности верапамила выявлено не было. Его совместное введение с ИЗН не приводило ни к купированию судорог, ни к снижению их продолжительности. Кроме того, верапамил используют как блокатор P-гр во многих экспериментах как *in vitro* (Loshner et al., 2004; Baltés et al., 2006), так и *in vivo* (Alvariza et al., 2013; Ma et al., 2013). Также было показано, что совместное применение КБЗ и фенитоина с верапамилем приводит к повышению концентрации обоих АЭП в головном мозге животных с резистентной эпилепсией (Ma et al., 2013). Поэтому мы можем предположить, что повышение противосудорожной активности КБЗ в нашем эксперименте связано именно с блокадой P-гр.

Результаты нашего исследования также заставляют задуматься о возможности совместного применения КБЗ с верапамилем у пациентов с устойчивыми формами эпилепсии. Действительно, в настоящее время проводятся доклинические исследования этого вопроса. Однако, верапамил является блокатором кальциевых каналов и в первую очередь является антиаритмическим препаратом. В исследованиях на людях, ежедневная доза препарата составляла от 120 до 240 мг/день, при этом, эффективная антиаритмическая доза верапамила составляет 120 мг/кг. Поэтому, такой способ преодоления ГЭБ может сопровождаться появлением побочных эффектов, связанных как с самим препаратом, так и с его взаимодействием с АЭП (Asadi-Pooya et al., 2013; Borlot et al., 2014).

2. Влияние блокады P-гликопротеина на эффективность КБЗ-НЧ

Полученные нами данные подтверждают взаимодействие КБЗ с P-гр. Транспортёр играет существенную роль в снижении проницаемости ГЭБ для КБЗ,

значительно (на 30%) ограничивая его поступление в мозг. Тем не менее, эффективная доза КБЗ-НЧ при внутривенном введении снижается не на 30%, а в 30 раз по сравнению в КБЗ. Следовательно, помимо участия Р-гр есть и другие причины для такого значительного снижения дозы.

Мы можем предположить, что наночастицы могут изменить распределение КБЗ в организме. Известно, что та часть КБЗ, которая проникла через ГЭБ, равномерно распределяется в головном мозге. На модели судорог, вызванных пенициллином, было показано, что на распределение препарата в головном мозге не влияет наличие фокуса эпилепсии (Monaco et al., 1982). То есть, КБЗ не привлекается в области, где идут активные метаболические процессы, а распределение происходит пассивно. Более того, проникновение КБЗ в головной мозг заметно снижается во время судорог (Monaco et al., 1982). Эти исследования были сделаны на нормальных животных и приступы индуцировали искусственно. В случае фармакорезистентной эпилепсии, концентрация КБЗ и других АЭП в очаге эпилепсии снижается. Этот факт согласуется с повышением плотности АВС-транспортёров в клетках, образующих ГЭБ (Loscher, Potschka, 2005b). Наши эксперименты были проведены на здоровых животных без причин для повышения количества транспортёра в головном мозге, поэтому последний факт можно не учитывать при рассмотрении наших результатов.

Распределение наночастиц заметно отличается от распределения КБЗ. Как было выше показано, наночастицы позволяют доставить в головной мозг препараты, проникая ГЭБ (Alyautdin et al., 1997; Bennewitz, Saltzman, 2009; Kurakhmaeva et al., 2009). Наночастицы покрываются апополипротеинами и, связываясь с соответствующими рецепторами, проходят через барьер (Kreuter et al., 2002). В очаге эпилепсии обычно наблюдается повышенная метаболическая активность клеток, кровотока и нарушение ГЭБ (Librizzi et al., 2016). Изменение метаболизма может привлечь в эту область липопротеины в качестве строительного материала или источника энергии. Поскольку наночастицы для прохождения через ГЭБ покрываются апополипротеинами, они могут также направляться в очаг эпилепсии. Известно, что повышенная метаболическая

активность и кровоток раковой опухоли привлекает наночастицы, что приводит к их накоплению в очаге (Caster et al., 2017). Вероятно, подобный механизм может работать и в случае эпилептического очага.

Таким образом, на эффективность препарата оказывает существенное влияние не только количество, но и его распределение в тканях. Вероятно, эта разница и приводит к повышению эффективности КБЗ-НЧ по сравнению с КБЗ, и, следовательно, к снижению дозы. В нашем исследовании мы уже сталкивались с признаками отличия в распределении КБЗ и КБЗ-НЧ. Например, одинаково эффективные против эпилепсии дозы показали изменения в поведении различной выраженности, а, иногда, и направленности. Вопрос о разнице распределения препаратов в свободном виде и включенных в наночастицы остается открытым и требует более подробного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпилепсия является довольно распространенным неврологическим заболеванием, поэтому актуален поиск новых эффективных методов лечения. Использование наночастиц является перспективным методом транспортировки КБЗ через ГЭБ. Возможность такого транспорта очень важна, особенно для лечения фармакорезистентных форм эпилепсии. Кроме того, КБЗ нерастворим в воде и в настоящее время не существует его парентеральной формы. Поскольку включение препарата в наночастицы приводит к изменению его фармакокинетики и фармакодинамики, важным вопросом является исследование противосудорожной эффективности и побочных эффектов формы КБЗ-НЧ.

В нашей работе впервые было показано, что однократные судороги, вызванные изониазидом не приводят к изменениям проницаемости ГЭБ. Дальнейшее использование этой модели позволило нам оценить долю КБЗ, которую связывает и выводит Р-gr. Мы показали, что в неэпилептическом мозге происходит выведение 30% КБЗ, в то время взаимодействия КБЗ-НЧ с этим транспортером выявлено не было. При развитии эпилепсии в очаге судорожной активности постепенно повышается экспрессия Р-gr, вследствие чего возникает резистентность ко множеству АЭП. Отсутствие взаимодействия КБЗ-НЧ с этим транспортером может помочь устойчивым пациентам и сделать терапию вновь эффективной.

Помимо преодоления ГЭБ без взаимодействия с Р-gr, включение КБЗ в наночастицы снижало его минимальную эффективную дозу в 30 раз. При этом, мы анализировали не только моторные проявления судорог, но и записи ЭКоГ. Таким образом, увеличение эффективности КБЗ при его включении в наночастицы достигается не только за счет беспрепятственного прохождения через Р-gr, но и за счет других механизмов. Мы предполагаем, что может существовать направленный транспорт КБЗ-НЧ в очаг эпилепсии, так как эта область обладает высокой метаболической активностью. Однако, точные механизмы такого транспорта требуют дополнительных исследований.

КБЗ используют не только как АЭП, но и как нормотимический препарат. Более того, пациенты вынуждены принимать этот препарат хронически. Именно поэтому часть нашего исследования была посвящена влиянию КБЗ-НЧ на поведение. Оказалось, что хронический прием препарата КБЗ-НЧ приводил к снижению тревожности у крыс, а также повышению двигательной и исследовательской активности. Кроме того, было показано улучшение пространственной памяти животных в финальном тестировании в «Лабиринте Барнса».

Таким образом, препарат КБЗ-НЧ имеет множество преимуществ по сравнению с КБЗ и имеет потенциал для клинического применения, особенно при фармакорезистентных формах заболевания. Он не только позволяет перевести КБЗ в растворимую форму, но и проходит через ГЭБ минуя Р-рр, а также снижает эффективную дозу АЭП. Кроме того, этот препарат обладает положительными эффектами на поведение, что потенциально может расширить область его применения в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. КБЗ не проявляет противосудорожных свойств на ПТЗ модели и является эффективным против приступов, вызванных изониазидом. Препарат КБЗ, введенный внутривенно, обладает схожей с «Финлепсином» (300 мг/кг п/о) противосудорожной эффективностью в минимальной дозе 30 мг/кг. Препарат КБЗ-НЧ проявляет эквивалентную эффективность уже в дозе 1 мг/кг.

2. Введение судорожной дозы ИЗН приводило к появлению пароксизмальной активности на ЭКоГ крыс. Применение КБЗ в дозе 30 мг/кг и КБЗ-НЧ в дозе 1 мг/кг предотвращало их появление. При этом оба препарата не изменяли фоновую ЭКоГ.

3. Качественная и количественная оценка не выявила проникновение красителя Evans Blue в головной мозг во время судорог, вызванных изониазидом.

4. В поведенческих тестах было показано анксиолитическое действие при хроническом введении препаратов КБЗ и КБЗ-НЧ. Эффекты КБЗ-НЧ оказались более выраженными, по сравнению с КБЗ. Также КБЗ-НЧ повышал исследовательскую активность и улучшал пространственную память животных.

5. При введении КБЗ на фоне блокады Р-гр верапамилом эффективная доза препарата снижается на 30% (с 30 мг/кг до 20 мг/кг). При этом блокада транспортера не влияет на эффективность КБЗ-НЧ. Следовательно, эта форма не взаимодействует с Р-гр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабаньян, В. Ю., Гельперина С. Э. Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц // Фармакокинетика и фармакодинамика 2012 №. 2. С. 3–9.
2. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 7 декабря 2011 г. N 2199-р. "РГ" - Федеральный выпуск №5660 (284). г. Москва: Российская газета (16 декабря 2011).
3. Полетаева И.И., Костына З.А., Сурина Н.М., Федотова И.Б., Зорина З.А. Генетическая линия крыс Крушинского–Молодкиной как уникальная экспериментальная модель судорожных состояний // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. №4. С. 427-434.
4. Чепурнов С.А., Сулейманова Е.М., Гуляев М.В., Аббасова К.Р., Пирогов Ю.А., Чепурнова Н.Е. Нейропротекторы И Эпилепсия // Успехи физиологических наук. 2012. Т. 43. №2. С. 55-71.
5. Abbott N.J. Astrocyte-Endothelial Interactions and Blood-Brain Barrier Permeability // Journal of Anatomy. 2002. V. 200. N. 6. P. 629–38.
6. Abbott N.J. Rönnbäck L., Hansson E. Astrocyte–endothelial Interactions at the Blood–brain Barrier // Nature Reviews Neuroscience. 2006. V. 7. N. 1. P. 41–53.
7. Akkar A. Müller R.H. Formulation of Intravenous Carbamazepine Emulsions by SolEmuls® Technology // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2003. V. 55. N. 3. P. 305–312.
8. Alvariza S., Fagiolino P., Vázquez M., Rosillo de la Torre A., Suárez S.O., Rocha L. Verapamil Effect on Phenytoin Pharmacokinetics in Rats // Epilepsy Research. 2013. V. 107 N. 1–2. P. 51–55.
9. Alyautdin R.N. Petrov, V.E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D.A., Kreuter, J. Delivery of Loperamide across the Blood-Brain Barrier with Polysorbate 80-Coated Polybutolcyanoacrylate Nanoparticles // Pharm Res. 1997. V. 14. N. 3. P. 325–328.
10. Alyautdin, R. N., Gothier, D., Petrov V., Kharkevich D., Kreuter J.

Analgesic Activity of the Hexapeptide Dalargin Adsorbed on the Surface of Polysorbate 80-Coated Poly(butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 1995. V. 41. N. 1. P. 44–48. Ambrósio A.F., Soares-Da-Silva P., Carvalho C.M., Carvalho A.P. Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024 // *Neurochem Res*. 2002. V. 27. N. 1-2. P. 121–130.

11. Arora T., Mehta A.K., Sharma K.K., Mediratta P.K., Banerjee B.D., Garg G.R., Sharma A.K. Effect of Carbamazepine and Lamotrigine on Cognitive Function and Oxidative Stress in Brain during Chemical Epileptogenesis in Rats // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2010. V. 106. N. 5. P. 372–377.

12. Asadi-Pooya A.A., Razavizadegan S.M.A., Abdi-Ardekani A., Sperling M.R. Adjunctive Use of Verapamil in Patients with Refractory Temporal Lobe Epilepsy: A Pilot Study // *Epilepsy and Behavior*. 2013. V. 29. N. 1. P. 150–54.

13. Baltés S., Gastens A.M., Fedrowitz M., Potschka H., Kaeffer V., Löscher W., Differences in the Transport of the Antiepileptic Drugs Phenytoin, Levetiracetam and Carbamazepine by Human and Mouse P-Glycoprotein // *Neuropharmacology*. 2007. V. 52. N. 2. P. 333–346.

14. Baltés S., Fedrowitz M., Luna Tortos C., Potschka H., Löscher W. Valproic Acid Is Not a Substrate for P-Glycoprotein or Multidrug Resistance Proteins 1 and 2 in a Number of *in Vitro* and *in Vivo* Transport Assays // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. V. 320. N. 1. P. 331–343.

15. Barbieri V., Car Bennewitz le F., Gozzo F., Pelliccia V., Nobili L., Casaceli G., Fuschillo D., Castana L., Cossu M., Lo Russo G., Tassi L., Gambini O. Risk Factors for Postoperative Depression: A Retrospective Analysis of 248 Subjects Operated on for Drug-Resistant Epilepsy // *Epilepsia*. 2015. V. 56. N. 10. P. 149–155.

16. Barker-haliski M.L., Vanegas F., Mau M.J., Underwood T.K., White H.S. Acute Cognitive Impact of Antiseizure Drugs in Naive Rodents and Corneal-Kindled Mice // *Epilepsia*. 2016. V. 57. N. 9. P. 1–12.

17. Begley, D., Brightman M. Structural and Functional Aspects of the Blood-Brain Barrier // *Progress in Drug Research*. 2003. V. 61. P. 40–78.

18. Bennewitz M.F. Saltzman W.M. Nanotechnology for Delivery of Drugs to the Brain for Epilepsy // *Neurotherapeutics*. 2009. V. 6. N. 2. P. 323–336.
19. Bernardi R.B., Barros. H.M.T. Carbamazepine Enhances Discriminative Memory in a Rat Model of Epilepsy // *Epilepsia*. 2004. V. 45. N. 11. P. 1443–1447.
20. Bertram, E. H. Temporal Lobe Epilepsy: Where Do the Seizures Really Begin? // *Epilepsy and Behavior*. 2009. V. 14. N. 1. P. 32–37.
21. Bialer M., White H.S. Key Factors in the Discovery and Development of New Antiepileptic Drugs // *Nat. Rev. Drug. Discov*. 2010. V. 9. P. 68–82.
22. Boer K., Spliet W.G.M. Van Rijen P.C., Redeker S., Troost D., Aronica E. Evidence of Activated Microglia in Focal Cortical Dysplasia // *Journal of Neuroimmunology*. 2006. V. 173. N. 1–2. P. 188–95.
23. Borlot F., Wither R.G., Ali A., Wu N., Verocai F., Andrade D.M. A Pilot Double-Blind Trial Using Verapamil as Adjuvant Therapy for Refractory Seizures // *Epilepsy Research*. 2014. V. 108. N. 9. P. 1642–51.
24. Borowicz K.K. Banach M. Antiarrhythmic drugs and epilepsy // *Pharmacological Reports*. 2014. V. 66. N. 4. P. 545-554.
25. Brewster M.E., Anderson W.R., Estes K.S., Bodor N. Development of Aqueous Parenteral Formulations for Carbamazepine through the Use of Modified Cyclodextrins // *Journal of pharmaceutical sciences*. 1991. V. 80. N. 4. P. 380–383.
26. Butt A.M., Hazel C.J., Abbott N.J. Electrical Resistance across the Blood-Brain Barrier in Anaesthetized Rats: A Developmental Study // *J. Physiol*. 1990. V. 429. N. 1. P. 47–62.
27. Castel-Branco M.M., Alves G.L., Figueiredo I.V, Falcão C., Caramona M.M. The Maximal Electroshock Seizure (MES) Model in the Preclinical Assessment of Potential New Antiepileptic Drugs // *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2009. V. 31. N. 2. P. 101–106.
28. Caster, Joseph M. et al. 2017. “Effect of Particle Size on the Biodistribution, Toxicity, and Efficacy of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles in Chemoradiotherapy.” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963417300448>).

29. Chang B.S. Lowenstein D.H. Epilepsy // The new England journal of medicine. 2003. V. 349. N. 13. P. 1257–1266.
30. Chen C., Chin J.E. Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M. Roninson I.B. Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the *mdr1* (P-Glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells // Cell. 1986. V. 47. N. 3. P. 381–389.
31. Chindo B.A., Ya'U J., Danjuma N.M., Okhale S.E., Gamaniel K.S., Becker A. Behavioral and Anticonvulsant Effects of the Standardized Extract of *Ficus Platyphylla* Stem Bark // Journal of Ethnopharmacology. 2014. V. 154. N. 2. P. 351–60.
32. Consroe P., Edmonds H.L. Jr. Genetic animal models of epilepsy. Introduction. // Fed Proc. 1979. P. 38. N. 10. P. 2397-2398.
33. Conway J.M. White J.R., Birnbaum A.K., Eugene Ramsay R., Pennell P.B. Rarick J.O., Musib L., Leppik I.E., Cloyd J.C. Safety of an IV Formulation of Carbamazepine // Epilepsy Research. 2009. V. 84. N. 2–3. P. 242–244.
34. Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L., Melamed M.R., Bertino J.R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. N. 1. P. 695-698.
35. Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R., Melamed M.R. Expression of the Multidrug Resistance Gene Product (P-Glycoprotein) in Human Normal and Tumor Tissues // The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 1990. V. 38. P. 1277–1287.
36. Daneman R., Zhou L., Kebede A.A., Barres B.A. Pericytes Are Required for Blood-Brain Barrier Integrity during Embryogenesis // Nature. 2010. Vol. 468. N. 7323. P. 562–566.
37. Danjo S., Ishihara Y., Watanabe M., Nakamura Y., Itoh K. Pentylentetrazole-Induced Loss of Blood-Brain Barrier Integrity Involves Excess Nitric Oxide Generation by Neuronal Nitric Oxide Synthase // Brain Research. 2013. V. 1530. P. 44–53.
38. Dombrowski S.M., Desai S.Y., Marroni M., Cucullo L., Goodrich K.,

Bingaman W., Mayberg M.R., Benghez L., Janigro D. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy // *Epilepsia*. 2001. Vol. 42. N. 12. P.1501-1506.

39. Erdlenbruch B., Jendrossek V., Eibl H., Lakomek M. Transient and Controllable Opening of the Blood-Brain Barrier to Cytostatic and Antibiotic Agents by Alkylglycerols in Rats // *Experimental Brain Research*. 2000. V. 135. N. 3. P. 417–22.

40. Eyo U.B., Murugan M., Wu L.J. Microglia–Neuron Communication in Epilepsy // *Glia*. 2017. V. 65. N. 1. P. 5–18.

41. Fisher R.S., Boas W.V.E. Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., Engel J. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) // *Epilepsia*. 2005. V. 46. N. 4. P. 470–472.

42. Franco V., Iudice A., Grillo E., Citraro R., De Giovambattista S., Russo E. Perspective on the Use of Perampanel and Intravenous Carbamazepine for Generalized Seizures // *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2014. V. 15. N. 5. P. 637.

43. Friedman A. Blood-Brain Barrier Dysfunction, Status Epilepticus, Seizures, and Epilepsy: A Puzzle of a Chicken and Egg? // *Epilepsia*. 2011. V. 52. P. 19–20.

44. Fukata Y., Fukata M. Epilepsy and Synaptic Proteins // *Current Opinion in Neurobiology*. 2017. V. 45. P. 1–8.

45. Garcia-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. // *Hear Res*. 2002. V. 168. N. 1-2. P. 208-222.

46. Gelperina S. Brain Delivery by Nanoparticles // in: *Nanoparticle technology for drug delivery*. (edited by Gupta R. and Kompella U.) Taylor & Francis Group, NY, USA, 2006: 273-318.

47. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug Delivery to the Brain Using Surfactant-Coated Poly(lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Influence of the Formulation Parameters // *European Journal of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics. 2010. V. 74. N. 2. P. 157–163.

48. Georgieva J.V., Hoekstra D., Zuhorn I.S. Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier // *Pharmaceutics*. 2014. V. 6. N. 4. P. 557–583.

49. Golyala A., Kwan P. Drug Development for Refractory Epilepsy: The Past 25 Years and beyond // *Seizure*. 2017. V. 44. P. 147–156.

50. Gorter J.A., van Vliet E.A., Aronica E. Status Epilepticus, Blood–brain Barrier Disruption, Inflammation, and Epileptogenesis // *Epilepsy & Behavior*. 2015. V. 49 P. 13–16.

51. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters // 2002. *Macmillan Magazines*. V. 2 P. 1–11.

52. Gottesman M.M., Pastan I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter // *Annual Review of Biochemistry*. 1993. V. 62. P. 385–427.

53. Gulyaev A.E., Gelperina S.E., Skidan I.N., Antropov A.S., Kivman G.Y., Kreuter J. Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles // *J. Pharm. Biopharm.* 1995. V. 41. P. 44–48.

54. Hawkins R., Peterson D.R., Viña J.R. The Complementary Membranes Forming the Blood-Brain Barrier // *IUBMB life*. 2002. V. 54. N. 3. P. 101–107.

55. Hori S., Ohtsuki S., Hosoya K.I., Nakashima E., Terasaki T. A Pericyte-Derived Angiotensin-1 Multimeric Complex Induces Occludin Gene Expression in Brain Capillary Endothelial Cells through Tie-2 Activation *in Vitro* // *Journal of Neurochemistry*. 2004. V. 89. N. 2. P. 503–513.

56. Jo, S. Bean B.P. Sidedness of Carbamazepine Accessibility to Voltage-Gated Sodium Channels // *Molecular Pharmacology*. 2014. V. 85. N. 2. P. 381–87.

57. Joshi R., Reeta K.H., Sharma S.K., Tripathi M., Gupta Y.K. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Interaction of Panchagavya Ghrita with Phenytoin and Carbamazepine in Maximal Electroshock Induced Seizures in Rats // *Ayu*. 2015. V. 36. N. 2. P. 196–202.

58. Kandratavicius L., Alves Balista P., Lopes-Aguiar C., Ruggiero R.N.,

Umeoka E.H., Garcia-Cairasco N., Bueno-Junior L.S., Leite J.P. Animal Models of Epilepsy: Use and Limitations // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2014. V. 10. P. 1693–1705.

59. Katyal J., Sarangal V., Gupta Y.K. Interaction of Hydroalcoholic Extract of *Acorus Calamus* Linn. with Sodium Valproate and Carbamazepine // *Indian Journal of Experimental Biology*. 2012. V. 50. N. 1. P. 51–55.

60. Khaspekov L.G., Frumkina L.E. Molecular Mechanisms Mediating Involvement of Glial Cells in Brain Plastic Remodeling in Epilepsy // *Biochemistry* 2017. V. 82. N. 3. P. 380–91.

61. Khazipov R., Valeeva G., Khalilov I. Depolarizing GABA and Developmental Epilepsies // *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2015. V. 21. N. 2. P. 83–91.

62. Kniesel U., Wolburg H. Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier // *Cellular and molecular neurobiology*. 2000. V. 20. N. 1. P. 57–76.

63. Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V., Range P., Cychutek K., Koch-Brandt C., Alyautdin R. Apolipoprotein-Mediated Transport of Nanoparticle-Bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier // *Journal of Drug Targeting*. 2002. V. 10. N. 4. P. 317–325.

64. Kreuter J. Nanoparticulate Systems for Brain Delivery of Drugs // *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012. V. 64 P. 213–22.

65. Kurakhmaeva K.B., Djindjikhashvili I., Petrov V.E., Balabanyan V.U., Voronina T., Trofimov S.S., Kreuter J., Gelperina S., Begley D., Alyautdin R. Brain Targeting of Nerve Growth Factor Using Poly(butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles // *Journal of drug targeting*. 2009. V. 17. N. 8. P. 564–574.

66. Kwan P., Brodie. M.J. Early Identification of Refractory Epilepsy // *The New England Journal of Medicine*. 2000. V. 342. N. 5. P. 314–319.

67. Kwan P., Brodie M.J. Potential Role of Drug Transporters in the Pathogenesis of Medically Intractable Epilepsy // *Epilepsia*. 2005. V. 46. N. 2. P. 224–235.

68. Lam J., Koren G. P-Glycoprotein in the Developing Human Brain: A

Review of the Effects of Ontogeny on the Safety of Opioids in Neonates // Therapeutic drug monitoring. 2014. V. 36. N. 6. P. 699–705.

69. Lazarowski A., Czornyj L., Lubienieki F., Girardi E., Vazquez S., D'Giano C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy // *Epilepsia*. 2007. V. 48. P. 140–149.

70. Librizzi L., de Cutis M., Janigro D., Runtz L., de Bock F., Barbier E.L., Marchi N. Cerebrovascular Heterogeneity and Neuronal Excitability // Elsevier. 2016.

71. Ling V. Does P-Glycoprotein Predict Response to Chemotherapy? // *Journal of the National Cancer Institute*. 1989. V. 81. N. 2. P. 84–85.

72. Loscher, W. Potschka H. Drug Resistance in Brain Diseases and the Role of Drug Efflux Transporters // *Nature Reviews Neuroscience*. 2005a. V. 6. N. 8. P. 591–602.

73. Loscher, W., Potschka H. Role of Drug Efflux Transporters in the Brain for Drug Disposition and Treatment of Brain Diseases // *Progress in Neurobiology* 2005b. V. 76. N. 1. P. 22–76.

74. Lothman E.W., Bertram E.H. Epileptogenic Effects of Status Epilepticus // *Epilepsia*. 1993. V. 34. N. 1. P. 59–70.

75. Luna-Tortós C., Fedrowitz M., Löscher W. Several Major Antiepileptic Drugs Are Substrates for Human P-Glycoprotein // *Neuropharmacology*. 2008. V. 55. N. 8. P. 1364–1375.

76. Ma A., Wang C., Chen Y., Yuan W. P-Glycoprotein Alters Blood-Brain Barrier Penetration of Antiepileptic Drugs in Rats with Medically Intractable Epilepsy // *Drug Design, Development and Therapy*. 2013. V. 7. P. 1447–1454.

77. Madhusudhan B., Rambhau D., Apte S.S., Gopinath D. 1-O-Alkylglycerol Stabilized Carbamazepine Intravenous O/w Nanoemulsions for Drug Targeting in Mice // *Journal of drug targeting*. 2007. V. 15. N. 2. P. 154–161.

78. Mahendran G., Thamocharan G., Sengottuvelu S., Narmatha Bai V. Evaluation of Anticonvulsant, Sedative, Anxiolytic, and Phytochemical Profile of the Methanol Extract from the Aerial Parts of *Swertia Corymbosa* (Griseb.) Wight Ex C.B. Clarke // *BioMed Research International* 2014.

79. Marino S.E., Birnbaum A.K., Leppik I.E., Conway J.M., Musib L.C., Brundage R.C., Ramsay R.E., Pennell P.B., White J.R., Gross C.R., Rarick J.O., Mishra U., Cloyd J.C. Steady-State Carbamazepine Pharmacokinetics Following Oral and Stable-Labeled Intravenous Administration in Epilepsy Patients: Effects of Race and Sex // *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012. V. 91. N. 3. P. 483–88.
80. Mathern G.W., Adelson P.D., Cahan L.D., Leite J.P. Hippocampal Neuron Damage in Human Epilepsy: Meyer ' S Hypothesis Revisited // *Progress in brain research*. 2002. V. 135.P. 237-251.
81. McAteer K.M., Corrigan F., Thornton E., Turner R.J., Vink R. Short and Long Term Behavioral and Pathological Changes in a Novel Rodent Model of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury // *Plos One*. 2016. V. 11. N. 8. P. 1–18.
82. McLean K.J., O'Brien T.J., Cook M.J., Vajda F.J.E. The Influence of Gender on the Aggravation of Absence Seizures by Carbamazepine in the Low-Dose Pentylentetrazol Rat Model // *Seizure*. 2004. V. 13. N. 4. P. 208–216.
83. Monaco F., Piredda S., Sechi G.P., Frassetto M., Mutani R. Normal Brain Distribution of Carbamazepine in Cat Penicillin Focal Epilepsy // *Epilepsia*. 1982. V. 23. N. 6. P. 615–618.
84. Monaco F., Piredda S., Traccis M., Frassetto M., Mutani R. “Generalized Penicillin Epilepsy in the Cat and the Brain Uptake of Carbamazepine.” *The Italian Journal of Neurological Sciences*. 1982. V. 3. N. 2. P. 107–109.
85. Müller R.H., Schmidt S., Buttle I., Akkar A., Schmitt J., Brömer S. SolEmuls® - Novel Technology for the Formulation of i.v. Emulsions with Poorly Soluble Drugs // *International Journal of Pharmaceutics*. 2004. V. 269. N. 2. P. 293–302.
86. Nair R., Kumar A., Priya V.K., Yadav C.M., Raju P.Y. Formulation and Evaluation of Chitosan Solid Lipid Nanoparticles of Carbamazepine // *Lipids in Health and Disease*. 2012. V. 11. N. 1. P. 72.
87. Marchi N. InVivo and InVitro Effects of Pilocarpine: Relevance to Ictogenesis // *Epilepsia*. 2007. V. 48. N. 10. P. 1934–1946.
88. Nowakowska E., Kus K., Polański A., Burda K., Nowakowska A.,

Sadowski C. Concomitant Use of Carbamazepine and Olanzapine and the Effect on Some Behavioral Functions in Rats // *Pharmacological Reports*. 2011. V. 63. N. 2. P. 372–380.

89. Nowakowska E., Kus K., Czubak A., Glowacka D., Matschay A. Some Behavioural Effects of Carbamazepine - Comparison with Haloperidol // *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007. V. 58. N. 2. P. 253–264.

90. Olivier J.C. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles// *NeuroRx*/ 2005. V. 2. P. 108–119.

91. Owen A. Pirmohamed M. Tetley J.N., Morgan P., Chadwick D., Kevin P.B. Carbamazepine Is Not a Substrate for P-Glycoprotein // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2001. V. 51. N. 4. P. 345–349.

92. Oztas B., Sahin D., Kir H., Eraldemir F.C., Musul M., Kuskay S., Ates N. The Effect of Leptin, Ghrelin, and Neuropeptide-Y on Serum Tnf-A, Il-1 β , Il-6, Fgf-2, Galanin Levels and Oxidative Stress in an Experimental Generalized Convulsive Seizure Model // *Neuropeptides*. 2016. V. 61. P. 31-37.

93. Panayiotopoulos C.P., *A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and Their Treatment*. Second Edition, 2009.

94. Patel S.I., Birnbaum A.K., Cloyd J.C., Leppik I.E. Intravenous and Intramuscular Formulations of Antiseizure Drugs in the Treatment of Epilepsy // *CNS Drugs*. 2015. V. 29. N. 12. P. 1009–1022.

95. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* // Academic press, 1998.

96. Petri B., Bootz A., Khalansky A., Hekmatara T., Muller R., Uhl R., Kreuter J., Gelperina S. Chemotherapy of Brain Tumour Using Doxorubicin Bound to Surfactant-Coated Poly(butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles: Revisiting the Role of Surfactants // *Journal of Controlled Release*. 2007. V. 117. N. 1. P. 51–58.

97. Potschka H. Animal Models of Drug-Resistant Epilepsy // *Epileptic Disorders*. 2012. V. 14 N. 2. P. 132–137.

98. Potschka H., Fedrowitz M., Löscher W. P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Are Involved in the Regulation of Extracellular Levels of

the Major Antiepileptic Drug Carbamazepine in the Brain // *Neuroreport*. 2001. V. 12. N. 16. P. 3557–3560.

99. Putnam T.J., Merrit H.H. Experimental Determination of the Anticonvulsant Properties of Some Phenyl Derivates // *Science*. 1937. Vol. 85. N. 2213. P. 525–528.

100. Rabinovitz S., Mostofsky D.I., Yehuda S. Anticonvulsant Efficiency, Behavioral Performance and Cortisol Levels: A Comparison of Carbamazepine (CBZ) and a Fatty Acid Compound (SR-3) // *Psychoneuroendocrinology*. 2004. V. 29. N. 2. P. 113–124.

101. Racine R.J. Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation: Cortical Areas 1 // *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1975. V. 38. P. 1–12.

102. Racine R., Okujava V., Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation: III. Mechanisms // *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1972. V. 32. P. 281-294.

103. Rambeck B., Jürgens U.H., May T.W., Wolfgang Pannek H., Behne F., Ebner A., Gorji A., Straub H., Speckmann E.J., Pohlmann-Eden B., Löscher W. Comparison of Brain Extracellular Fluid, Brain Tissue, Cerebrospinal Fluid, and Serum Concentrations of Antiepileptic Drugs Measured Intraoperatively in Patients with Intractable Epilepsy // *Epilepsia*. 2006. V. 47. N. 4. P. 681–694.

104. Ramge P., Petrov V., Hamm S., Gelperina S.E., Engelhardt B., Alyautdin R., Von H., Begley D. Direct Evidence That Poly (Butylcyanoacrylate) Nanoparticles Deliver Drugs to the CNS via Specific Mechanisms Requiring Prior Binding of Drug to the Nanoparticles // *Pharmaceutical Research*. 2003. V. 20. N. 3. P. 409–416.

105. Reeta K.H., Mehla J., Pahuja M., Gupta Y.K.. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions of Valproate, Phenytoin, Phenobarbitone and Carbamazepine with Curcumin in Experimental Models of Epilepsy in Rats // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011. V. 99. N. 3. P. 399–407.

106. Reith D.M., Hooper W.D., Parke J., Charles B. Population Pharmacokinetic Modeling of Steady State Carbamazepine Clearance in Children,

Adolescents, and Adults // *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2001. V. 28. N. 1. P. 79–92.

107. Remy S., Heinz B. Molecular and Cellular Mechanisms of Pharmacoresistance in Epilepsy // *Brain*. 2006. V. 129. N. 1. P. 18–35.

108. Rezvanfard M., Zarrindast M.R., Bina P. Role of Ventral Hippocampal GABAA and NMDA Receptors in the Anxiolytic Effect of Carbamazepine in Rats Using the Elevated Plus Maze Test // *Pharmacology*. 2009. V. 84. N. 6. P. 356–366.

109. Rizzi M., Caccia S., Guiso G., Richichi C., Gorter J., Aronica E., Aliprandi M., Bagnati R., Fanelli R., D'Incalci M., Samanin R., Vezzani A., Limbic Seizures Induce P-Glycoprotein in Rodent Brain: Functional Implications for Pharmacoresistance // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002. V. 22. N. 14. P. 5833–5839.

110. Rowley N.M., White H.S. Comparative Anticonvulsant Efficacy in the Corneal Kindled Mouse Model of Partial Epilepsy: Correlation with Other Seizure and Epilepsy Models // *Epilepsy Research*. 2010. V. 92. N. 2–3. P. 163–169.

111. Sakaue A., Honda M., Tanabe M., Ono H. Antinociceptive Effects of Sodium Channel-Blocking Agents on Acute Pain in Mice. *Journal of pharmacological sciences*. 2004. V. 95. N. 2. P. 181–188.

Samara M., Nasser A., Mingelgrin U. Chemosphere Mechanochemical Removal of Carbamazepine // *Chemosphere*. 2016. V. 160. P. 266–72.

112. Schmidt D., Loscher W. Drug Resistance in Epilepsy: Putative Neurobiologic and Clinical Mechanisms // *Epilepsia*. 2005. V. 46. N. 6. P. 858–877.

113. Shigemoto-Mogami Y., Hoshikawa K., Goldman. J.E., Sekino Y., Sato K. Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014. V. 34. N. 6. P. 2231–2243.

114. Shorvon S.D. The Etiologic Classification of Epilepsy // *Epilepsia*. 2011. V. 52. N. 6. P. 1052–1057.

115. Sipe G.O., Lowery R.L., Tremblay M.È., Kelly E., Lamantia C.E., Majewska K. Microglial P2Y₁₂ Is Necessary for Synaptic Plasticity in Mouse Visual

Cortex // Nature communications. 2016. V. 7. P. 1-15.

116. Sisodiya S.M., Lin W.R., Harding B.N., Squier M.V., Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy // Brain. 2002. Vol. 125. N. 1. P.22-31.

117. Smith D.F. Lithium and Carbamazepine: Effects on Learned Taste Aversion and Open Field Behavior in Rats // Pharmacol. Biochem. Behav. 1983. V. 18. N. 4. P. 483–488.

118. Smith M., Wilcox K.S., White H.S. Discovery of Antiepileptic Drugs // Neurotherapeutics. 2007. V. 4. N. 1. P. 12–17.

119. Sperling M.R. The Consequences of Uncontrolled Epilepsy // CNS Spectr. 2004. V. 9 N. 2. P. 98–101, 106–9.

120. Sudha, S., Lakshmana M.K., Pradhan N. Changes in Learning and Memory, Acetylcholinesterase Activity and Monoamines in Brain after Chronic Carbamazepine Administration in Rats // Epilepsia. 1995. V. 36. N. 4. P. 416–422.

121. Sun J.J., Xie L., Liu X.D. Transport of Carbamazepine and Drug Interactions at Blood-Brain Barrier // Acta. Pharmacologica. Sinica. 2006. V. 27. N. 2. P. 249–253.

122. Tishler D.M., Weinberg K.I., Hinton D.R., Barbaro N., Annett G.M., Raffel C. MDR1 Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy // Epilepsia. 1995.V. 36. N. 1. P. 1–6.

123. Tulloch J.K., Carr R.R., Ensom M.H. A Systematic Review of the Pharmacokinetics of Antiepileptic Drugs in Neonates with Refractory Seizures // J. Pediatr. Pharmacol. Ther. 2012. V. 17. N. 1. P. 31–44.

124. Van Veen H.W., Konings W.N. Multidrug Transporters from Bacteria to Man: Similarities in Structure and Function // Seminars in cancer biology. 1997. V. 8. N. 3. P. 183–191.

125. Van Vliet E.A., Araújo S.D.C., Redeker S., Van Schaik R., Aronica E., Gorter J.A. Blood-Brain Barrier Leakage May Lead to Progression of Temporal Lobe Epilepsy // Brain. 2007. V. 130. N. 2. P. 521–534.

126. Vossel K.A., Tartaglia M.C., Nygaard H.B., Zeman A.Z., Miller B.L.

Epileptic Activity in Alzheimer's Disease: Causes and Clinical Relevance // *The Lancet Neurology*. 2017. V. 16. N. 4. P. 311–322.

127. Löscher W., Hönack D., Rundfeldt C. Antiepileptogenic Effects of the Novel Anticonvulsant Levetiracetam (Ucb L059) in the Kindling Model of Temporal Lobe Epilepsy 1 // *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 1998. V. 284. N. 2. P. 474–479.

128. Wang Y.C., Wang E.N., Wang C.C., Huang C.L., Huang A.C.W. Effects of Lithium and Carbamazepine on Spatial Learning and Depressive Behavior in a Rat Model of Bipolar Disorder Induced by Ouabain // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013. V. 105. P. 118–127.

129. Weiss J., Kerpen C.J., Lindenmaier H., Dormann S.M.G., Haefeli W.E. Interaction of Antiepileptic Drugs with Human P-Glycoprotein *in Vitro* // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003. V. 307. N. 1. P. 262–267.

130. Wosik K., Cayrol R., Dodelet-Devillers A., Berthelet F., Bernard M., Mouldjian R., Bouthillier A., Reudelhuber T.L., Prat A. Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007. V. 27. N. 34. P. 9032–9042.

131. Yang H., Liu H., Liu X., Zhang D., Liu Y., Liu X., Wang G., Xie L. Increased P-Glycoprotein Function and Level after Long-Term Exposure of Four Antiepileptic Drugs to Rat Brain Microvascular Endothelial Cells *in Vitro* // *Neuroscience Letters*. 2008. V. 434. N. 3. P. 299–303.

132. Yong V.W. Metalloproteinases: Mediators of Pathology and Regeneration in the CNS // *Nature reviews. Neuroscience*. 2005. V. 6. N. 12. P. 931–944.

133. Zangrossi H.J., Leite J.R., Graeff F.G. Anxiolytic Effect of Carbamazepine in the Elevated plus-Maze: Possible Role of Adenosine // *Psychopharmacology (Berl)*. 1992. V. 106. N. 1. P. 85–89.

134. Zara G.P., Cavalli R., Bargoni A., Fundarò A., Vighetto D., Gasco M.R. Intravenous Administration to Rabbits of Non-Stealth and Stealth Doxorubicin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles at Increasing Concentrations of Stealth Agent:

Pharmacokinetics and Distribution of Doxorubicin in Brain and Other Tissues // Journal of drug targeting. 2002. V. 10. N. 4. P. 327–335.

135. Zensi A., Begley D., Pontikis C., Legros C., Mihoreanu L., Wagner S., Büchel C., von Briesen H., Kreuter J. Albumin Nanoparticles Targeted with Apo E Enter the CNS by Transcytosis and Are Delivered to Neurons // Journal of Controlled Release. 2009. V. 137. N. 1. P. 78–86.

136. Zhang C., Kwan P., Zuo Z., Baum L. The Transport of Antiepileptic Drugs by P-Glycoprotein // Advanced Drug Delivery Reviews. 2012. V. 64. N. 10. P. 930–942.

137. Zhang L., Wang L., Wang R., Che H., Fu P. Evaluating the Effectiveness of GTM-1 , Rapamycin , and Carbamazepine on Autophagy and Alzheimer Disease // Med. Sci. Monit. 2017. V. 23. P. 801–808.