

М. Я. Головенко<sup>1</sup>, С. Ю. Штриголь<sup>2</sup>, В. Б. Ларіонов<sup>1</sup>,  
Д. В. Литкін<sup>2</sup>, І. П. Валіводзь<sup>1</sup>, А. С. Редер<sup>1</sup>

## Визначення альфа ізоформ рецептора ГАМК у реалізації фармакологічної дії пропоксазепаму

<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, м. Одеса

<sup>2</sup>Національний фармацевтичний університет, м. Харків

*Ключові слова:* діазепам, пропоксазепам, рецептори ГАМК, ізоформи, фармакологічна дія

Основною мішенню фармакологічної дії бензодіазепінів (БДЗ) є рецептори (ГАМК-Р), медіатором яких є гамма-аміномасляна кислота [1]. Механізм дії БДЗ полягає не в прямій стимуляції ГАМК-Р, а в алостеричній модуляції спорідненості рецептора до ГАМК. БДЗ, які застосовуються в клініці, проявляють певний спектр фармакологічних ефектів (анксіолітичний, седативний, снодійний, протисудомний, міорелаксантий) і вважаються повними агоністами. Баланс між окремими компонентами в фармакологічному спектрі кожного з препаратів віддзеркалює притаманні їм властивості та визначає переважні показання до клінічного застосування, а також прояв побічної дії.

Зв'язування лігандів з окремими підтипами ГАМК-Р викликає різні клінічні ефекти. Більшість класичних БДЗ мають спорідненість до  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  або  $\alpha 5\beta 2$  субодиноць ГАМК-Р, викликаючи відповідні поведінкові ефекти. Оскільки всі зазначені субодиноць мають однакову структуру  $\beta 2$ , то в науковій літературі їх визначають як  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  та  $\alpha 5$ . Отже, індивідуальна фармакологічна дія БДЗ в основному визначається субодиноцями  $\alpha$ , що містяться в цьому рецепторі, та їхнім анато-

мічним розподілом у нервовій тканині. Генетичні та фармакологічні дослідження на мутантних лініях мишей  $\alpha 1(H101R)$ ,  $\alpha 2(H101R)$ ,  $\alpha 3(H126R)$ ,  $\alpha 5(H105R)$  і синтез нових лігандів, селективних до кожного підтипу, допомогли віднести певні поведінкові реакції до конкретних підтипів рецепторів ГАМК [2]. Седативна та протисудомна дія в основному викликана зв'язуванням БДЗ з підтипом  $\alpha 1$ , тоді як анксіолітична з  $\alpha 2$ - і  $\alpha 5$ -вмісними ГАМК-Р. Розслаблення м'язів є результатом зв'язування БДЗ з підтипами  $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$  ГАМК-Р, а координація рухів порушується модуляцією підтипів рецепторів з субодиноцями  $\alpha 1$  або  $\alpha 3$ . Крім того, субодиноця  $\alpha 5$  бере участь у навчанні та пам'яті. Нарешті, нещодавно виявлено антигіпералгетичну дію БДЗ, яка залежить головним чином від  $\alpha 2$ -вмісних ГАМК-Р у спинному мозку [3].

До періоду встановлення механізму дії БДЗ і особливо молекулярної організації ГАМК-Р існувала думка про неможливість розділити ці ефекти в одному препараті. Зростаюча обізнаність щодо фармакологічної відповіді окремих субодиноць  $\alpha$ -підтипу ГАМК-Р відродила інтерес медичних хіміків до створення селективних препаратів похідних БДЗ. Селективність досягається залежною від підтипу субодиноць афінністю або ефективністю зв'язування. Результатом такої селективності може бути: повний або частковий агонізм в одному

підтипі ГАМК-Р, слабший агонізм або негативний агонізм в інших  $\alpha$ -підтипах, повний або частковий їхній антагонізм [4]. Серед найвдаліших наукових напрямів – створення неседативних анксиолітичних препаратів, націлених на субодиноцю  $\alpha 2$  [5]. Сполука L-838,417, похідне БДЗ, має мінімальну ефективність щодо підтипу  $\alpha 1$ , є частковим агоністом  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  і  $\alpha 5$  і діє як анксиолітик без седації в моделі на тваринах. Такі сполуки, як імідазеніл, ТРА123 і ТРА023 з низькою взаємодією з субтипом  $\alpha 1$  або її відсутністю мають значну анксиолітичну активність без седації, що свідчить про можливість створення селективних лікарських засобів.

З огляду на широке розповсюдження  $\alpha 2$ -вмісних ГАМК-Р у спінальному ганглії, які беруть участь у полегшенні болю та сприяють ноцицепції [3], нами було розроблено інноваційний аналгетик пропоксазепам [6, 7]. Сполука має фармакодинамічний профіль, відмінний від усіх аналгетиків, оскільки одночасно гальмує й гострий, і хронічний біль з компонентами протизапальної та протисудомної дії. Основною мішенню для знеболення сполуки є  $\alpha 2$  та  $\alpha 3$  субодиноці ГАМК-Р [8]. Тому нами було введено цей показник у загальну картину взаємодії сполуки з відповідними субодиноцями ГАМК-Р.

**Мета дослідження** – визначити методами фармакологічного аналізу на моделях емоційно-поведінкових реакцій у мишей участь деяких ізоформ ГАМК-Р (субодиноці  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  та  $\alpha 5\beta 2$ ) у реалізації фармакологічної дії пропоксазепаму. Провести порівняння з даними дослідів *in vitro* щодо взаємодії пропоксазепаму з відповідними субодиноцями ГАМК-Р.

**Матеріали та методи.** Експерименти виконано в Навчально-науковому

інституті прикладної фармації Національного фармацевтичного університету з дотриманням принципів біоетики відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради ЄС «Про охорону тварин, які використовуються з науковою метою» [9]. Білі безпорідні миші-самці (20–25 г,  $n = 21$ ) утримувались за стандартних умов з вільним доступом до води та їжі за температури +20–22 °С та вологості 60–65 % (співвідношення світлого та темного періоду доби 12/12 год).

Сполуки пропоксазепам і діазепам (позитивний контроль) синтезовано в ТДВ «ІНТЕРХІМ», їхню чистоту (> 99,8 %) та ідентичність доведено низькою фізико-хімічних методів. Засоби, які були попередньо приготовлені на фізіологічному розчині, вводили внутрішньоочеревинно, забезпечуючи питомий об'єм рідини для введення 0,1 мл/10 г маси тіла.

Відтворення фармакологічних тестів проводили на білих мишах-самцях одного віку. Досліджувані зразки вводили в еквімолярних дозах: пропоксазепам 10 мг/кг (М.м. 407,7) та діазепам 6,82 мг/кг (М.м. 284,74). Контрольні миші (негативний контроль, НК) отримували еквівалентний об'єм води. Через пів години після введення зразків тварин тестували відповідно до запланованого дизайну в тестах «відкрите поле», «стрижень, що обертається» («rotarod test»), «горизонтальна поперечина», «піднесений хрестоподібний лабіринт» («ПХЛ») та «гаряча пластина», які далі повторювали через 1, 2 та 4 год (після введення) задля отримання показників у динаміці.

Тест «відкрите поле» дозволяє оцінити поведінку тварин у незнайомих стресових умовах, локомоторну активність (кількість перетнутих за 3 хв квадратів), орієнтовно-дослідниць-

кі реакції (обстеження отворів і вертикальні стійки), емоційні реакції та їхній вегетативний супровід (кількість актів грумінгу, фекальних болюсів, уринацій) [10].

У тесті «ПХЛ» досліджували тривожність, визначаючи латентний період входу в затемнений рукав, час перебування тварин в освітлених (маркер анксиолітичної дії) і затемнених рукавах (маркер тривожності), кількість переходів протягом 5 хв перебування тварини в лабіринті [10].

Тест «стрижень, що обертається» є критерієм оцінки впливу препаратів на м'язовий тонус та координацію рухів. Показником вважається кількість мишей, що впали зі стрижня за певні проміжки часу – до 0,5, 1, 3 та 5 хв [11].

Критерієм оцінки впливу сполук на м'язовий тонус обрано тест «горизонтальна поперечина» (горизонтально орієнтований дерев'яний циліндр діаметром 0,5 см завдовжки 30 см, піднесений на 20 см) [10], де враховували кількість мишей, що підтягуються й утримуються на перекладині протягом 0,5 хв.

З урахуванням центральних механізмів реалізації фармакологічних ефектів вплив пропоксазепаму та діазепаму на больову реакцію мишей вивчали за умов моделювання соматичного болю в тесті «гаряча пластина» [12]. Мишей почергово вміщували до приладу Hot/Cold Plate (Bioseb, США) з розігрітою до 54 °C підлогою. За допомогою вмонтованого секундоміра з точністю до однієї десятої секунди фіксували латентний час облизування твариною однієї з задніх лапок. Максимальний час експозиції становив 60 с.

Отримані дані обробляли статистично [13]. Попередньо було використано інструменти дескриптивної ста-

тистики (W-критерій Шапіро-Вілка), за допомогою чого визначали нормальність розподілу у вибірках отриманих експериментальних даних. Результати представляли у вигляді середнього арифметичного значення ( $M$ ) та стандартного відхилення від середнього ( $m$ ). Для виявлення відмінності між експериментальними групами використовували непараметричний U-критерій Манна-Вітні, або t-критерій Стьюдента. Залежно від типу даних для порівняння відсоткових часток використовували кутове перетворення Фішера ( $\phi^*$ ). Статистичну значущість визначали при  $p < 0,05$  та  $p < 0,01$ . Для обчислювання застосовували стандартний пакет програми «STATISTICA 12.0».

Задля оцінки інтенсивності окремих нейрофармакологічних ефектів пропоксазепаму (порівняно з референтним препаратом – діазепамом) експериментальні дані було попередньо трансформовано в нормалізовані величини (відносно значень відповідної контрольної групи тварин) та представлено у вигляді відсотків ( $100 \cdot (E_{\text{експ.}} - E_{\text{контр.}}) / E_{\text{контр.}}$ ). Співставлення показників різних фармакологічних тестів здійснювали з використанням величин різниці відповідних ефектів пропоксазепаму та діазепаму з їхнім подальшим ранжуванням, де позитивні значення свідчать про перевищення відповідного ефекту пропоксазепаму над аналогічним показником діазепаму.

**Результати та їх обговорення.** Результати дослідження седативної та анксиолітичної дії пропоксазепаму та діазепаму наведено в таблиці 1.

Діазепам виявив пригнічувальну дію через 30 хв після внутрішньочеревинного введення. Показник локомоторної активності мишей на тлі введення діазепаму мав тенденцію до зменшення, проте достовірних

Таблиця 1

Показники поведінки мишей у тесті «відкрите поле» за впливу діазепаму та пропоксазепаму ( $M \pm m$ ,  $n = 7$ )

Група	Локомоторна активність (перетнуто квадратів)	Орієнтовно-дослідницька діяльність		Емоційні реакції та їхній вегетативний супровід			Сума всіх активностей	
		стійки	отвори	сума	болюси	ури-нації		грумінг
0,5 год								
Негативний контроль	41,86 ± 5,57	7,43 ± 1,48	17,86 ± 2,34	25,29 ± 3,16	1 ± 0	1,75 ± 0,48	3,75 ± 0,17	70,90 ± 1,29
Діазепам	26,57 ± 3,36	2,50 ± 0,87*	8,50 ± 2,81*	8,71 ± 2,89**	1,33 ± 0,33	1,33 ± 0,33	3,66 ± 0,18	41,23 ± 1,05*
Пропоксазепам	11,43 ± 4,74**,#	1 ± 0	2,25 ± 0,75**,#	1,57 ± 0,65**,#	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0**,#	1,05 ± 0
1 год								
Негативний контроль	36,86 ± 3,38	11,43 ± 1,53	17,14 ± 2,87	28,57 ± 2,72	1 ± 0	2,0 ± 0,71	4,0 ± 0,34	69,43 ± 0,87
Діазепам	40,14 ± 6,97	5,75 ± 1,75	12,14 ± 4,17	15,43 ± 5,58	1 ± 0	1 ± 0	3 ± 0	61,03 ± 2,35
Пропоксазепам	9,0 ± 2,64**,#	1,5 ± 0,5	2,75 ± 0,63*	2,0 ± 0,72**,#	1 ± 0	0 ± 0	1 ± 0*	14,25 ± 1,18**,#
2 год								
Негативний контроль	38,0 ± 3,22	8,0 ± 1,11	14,43 ± 2,31	22,43 ± 1,97	1,33 ± 0,33	0 ± 0	2,83 ± 0,25	63,26 ± 0,64
Діазепам	25,29 ± 7,87	7,33 ± 2,33	9,50 ± 2,72	8,57 ± 3,98*	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	44,12 ± 4,20
Пропоксазепам	5,43 ± 2,76**,#	1 ± 0	3 ± 0	0,57 ± 0,57**	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	11,43 ± 2,1*#
4 год								
Негативний контроль	38,86 ± 3,84	8,0 ± 1,57	20,14 ± 1,64	28,14 ± 1,81	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	69,0 ± 0,69
Діазепам	21,71 ± 6,23	4,50 ± 1,55	6,83 ± 1,83**	8,43 ± 2,89**	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	35,04 ± 2,89*
Пропоксазепам	8,42 ± 2,1**	2 ± 1	1,33 ± 0,33**,#	1,14 ± 0,4**,#	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	13,75 ± 0,96**

Примітка. Тут і в табл. 2, 3, 5:  $n$  – кількість тварин у групі, \* $r \leq 0,05$  порівняно з відповідним показником у групі негативного контролю, \*\* $r \leq 0,01$  порівняно з відповідним показником у групі негативного контролю, # $r \leq 0,05$  порівняно з відповідним показником у групі діазепаму, \*\* $r \leq 0,01$  порівняно з відповідним показником у групі діазепаму.

відмінностей порівняно з групою негативного контролю не визначалося. Водночас показники орієнтовно-дослідницької діяльності зменшувалися в 2,9 разу, а загальна сума всіх активностей знижувалась на 46,77 % щодо групи негативного контролю (табл. 1).

Седативна дія пропоксазепаму також почала спостерігатися через 30 хв після введення, втім виразність ефекту була більшою, ніж у референтній групі. Про наявність депримуючого впливу тест-зразка свідчило вірогідне зменшення значення локомоторної активності на 75,6 % порівняно з групою негативного контролю, на 93,79 % зменшувалася орієнтовно-дослідницька активність, а вегетативний супровід був відсутній. Вищенаведене підтверджувалось статистично значущим зменшенням середньої суми всіх активностей (у 5,3 разу) порівняно з аналогічним показником в групі негативного контролю. Водночас за проявом пригнічувальної дії пропоксазепам перевершував діазепам: локомоторна діяльність була меншою на 56,98 %, орієнтовно-дослідницька активність – на 81,97 %, а загальна активність знизилася на 64,45 % порівняно з діазепамом ( $p < 0,05$ ).

Через 1 год після введення діазепам не викликав вірогідних змін досліджуваних показників порівняно з контролем, проте зберігалася тенденція до депримуючого впливу. Натомість седативний ефект пропоксазепаму зберігався через 1 год після введення: показник локомоторної активності був меншим на 75,58 %, сума показників орієнтовно-дослідницької діяльності зменшилася в 14,29 разу, показники вегетативного супроводу достовірно зменшувалися в 13,29 разу, а загальна сума активностей тварин значуще скоротилася на 83,44 % порівняно з анало-

гічними показниками в групі негативного контролю. Водночас у групі, що отримувала пропоксазепам, відмічались вірогідно менші значення показників локомоторної, дослідницької діяльності та суми всіх активностей на 77,58 %, 87,04 % та 80,21 % відповідно порівняно з референтною групою. Цей приклад свідчить про наявність певного седативного ефекту пропоксазепаму через 1 год після введення, за яким ця сполука переважає діазепам (табл. 1).

Через 2 год після введення діазепаму достовірно зменшувався лише показник орієнтовно-дослідницької діяльності на 61,79 % порівняно з групою негативного контролю. Виразність пригнічувальної дії пропоксазепаму залишалася на стабільно високому рівні. У досліджуваній групі спостерігалось вірогідне зменшення локомоторної активності в 7 разів, суми показників дослідницької активності – на 97,5 %, а сумарна активність знижувалася в 10 разів щодо групи негативного контролю.

Порівняно з діазепамом на тлі застосування пропоксазепаму виявлено статистично вірогідне зниження локомоторної активності практично в 5 разів і загальної суми активностей майже в 10 разів. Таким чином, через 2 год після введення в пропоксазепаму спостерігається виразний седативний ефект (табл. 1).

На 4 год дослідження відповідна дія пропоксазепаму зберігалась. Порівняно з групою негативного контролю кількість перетнутих квадратів зменшилася суттєво – на 78,33 %, сума показників орієнтовно-дослідницької діяльності знизилась у 25 разів, а сума всіх активностей скоротилася на 85,4 %. Відносно діазепаму спостерігалось вірогідне зниження показників дослідницької активності на 86,5 %.

Статистично значущої різниці між досліджуваними показниками в групі пропоксазепаму на різних за часом етапах вимірювання не виявлено. Це свідчить про досягнення лінійного тривалого плато седативного ефекту сполуки.

Більш детальну та достовірну інформацію щодо анксиолітичної дії пропоксазепаму було отримано на моделі «ПХЛ» (табл. 2).

На противагу діазепаму пропоксазепам виявляв анксиолітичні властивості вже через 30 хв після застосування. На тлі введення препарату латентний час переходу в темний відсік мав тенденцію до збільшення в 7,5 разу, а тривалість перебування в світлій камері збільшувалася в 3 рази порівняно з аналогічними показниками групи контролю. Також тварини достовірно рідше відвідували темні відсіки та проводили в них сумарно менше часу, що вказує на виразні анксиолітичні властивості. Спостерігали деяку міорелаксацію в тварин: невпевнені, погано координовані рухи, тривалі епізоди завмирання на одному місці, що додатково підтверджується достовірним зменшенням кількості переходів між відсіками.

Найвиразніший ефект пропоксазепаму спостерігався через 1 год після введення, коли препарат з високим рівнем достовірності виявляв анксиолітичну дію. Під впливом тест-зразка на відміну від контролю кількість переходів у темний відсік збільшувалася в 100 разів, кількість відвідувань світлого відсіку – у 3 рази. Зменшувалася кількість відвідувань темних відсіків у 5 разів, а переходів між відсіками – у 6 разів, що є наслідком прояву виразнішої седації або міорелаксації. Також ці тварини в більшій кількості випадків відвідували саме світлий відсік, що додатково

вказує на виразну анксиолітичну дію (табл. 2).

Через 1 год спостереження також поступово розвивалися прояви ефектів діазепаму. Відмічали тенденційні зміни досліджуваних показників анксиолітичної спрямованості, але за виразністю вони поступалися ефектам пропоксазепаму.

Через 2 год після введення зразків активність діазепаму суттєво не відрізнялася від результату попереднього вимірювання (через 1 год). Проте активність пропоксазепаму в цей період поступово знижувалася. Суттєво зменшувався латентний час переходу в темний відсік і кількість відвідувань світлого відсіку порівняно з результатами першої години.

Через 4 год дослідження анксиолітична активність діазепаму не виявлялася. Також дещо зменшувалася сумарна активність пропоксазепаму, що однак переважала таку препарату порівняння. Така динаміка результатів тесту «ПХЛ» також вказує на наявність у пропоксазепаму здатності досягати сталого ефекту протягом 4 год.

Беручи до уваги наявність у класичних БДЗ виразного міорелаксантажного ефекту, досліджували вплив пропоксазепаму та діазепаму на тонус скелетних м'язів і координацію рухів мишею у тестах «стрижень, що обертається» та «горизонтальна поперечина» [4, 16].

Пропоксазепаму, як і діазепаму, притаманні сталі зіставні за виразністю міорелаксантажні властивості. Це встановлено за статистично значущим збільшенням кількості тварин, що впали з приладу за певні проміжки часу через 0,5, 1, 2 та 4 год після введення препаратів (табл. 3).

Результати дослідження впливу сполук на тонус скелетних м'язів мишею у тесті «горизонтальна попе-

Поведінкові реакції тварин у тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт» за впливу пропоксазепаму та діазепаму  
( $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ )

Група	Латентний час переходу в темний відсік, с	Тривалість перебування в світлому відсіку, с	Кількість відвідувань світлого відсіку	Тривалість перебування в центрі, с	Тривалість перебування в темному відсіку, с	Кількість відвідувань темного відсіку	Загальна кількість переходів
0,5 год							
Негативний контроль	23,71 ± 4,89	63,57 ± 23,64	3,14 ± 0,82	33,85 ± 7,82	202,57 ± 19,88	7,0 ± 1,32	10,14 ± 2,04
Діазепам	21,0 ± 9,71	136,71 ± 33,48	4,0 ± 0,92	17,85 ± 4,95	148,85 ± 33,17	6,14 ± 1,61	10,14 ± 2,28
Пропоксазепам	180,71 ± 56,63	180,85 ± 46,19	2,28 ± 0,60	72,0 ± 36,81	47,14 ± 30,09**, #	1,14 ± 0,70**, #	3,42 ± 1,08**, #
1 год							
Негативний контроль	2,14 ± 0,55	62,42 ± 15,49	4,14 ± 1,28	18,0 ± 2,82	219,57 ± 14,42	8,0 ± 0,37	12,14 ± 1,56
Діазепам	134,42 ± 57,57	127,57 ± 46,10	4,42 ± 1,61	44,71 ± 37,60	127,71 ± 46,74	6,57 ± 3,13	11,0 ± 4,62
Пропоксазепам	217,85 ± 53,07**	197,85 ± 51,52	1,42 ± 0,78*	57,14 ± 41,23	45,0 ± 42,21*	0,42 ± 0,29**	1,85 ± 1,03**
2 год							
Негативний контроль	2,0 ± 0,43	30,28 ± 15,77	2,14 ± 1,01	14,0 ± 4,46	255,71 ± 17,62	6,14 ± 1,72	8,28 ± 2,58
Діазепам	130,28 ± 60,01	81,85 ± 40,25	3,42 ± 1,95	104,28 ± 50,94	113,85 ± 49,80	5,71 ± 3,19	9,14 ± 5,01
Пропоксазепам	109,00 ± 45,52*	114,42 ± 48,35	1,28 ± 0,42	45,28 ± 31,60	140,28 ± 52,04	1,14 ± 0,34*	2,42 ± 0,68
4 год							
Негативний контроль	4,28 ± 2,27	82,0 ± 25,68	3,14 ± 0,63	28,57 ± 6,75	189,42 ± 27,87	7,0 ± 1,38	10,14 ± 1,88
Діазепам	1,28 ± 0,18	6,42 ± 6,42**	0,85 ± 0,85*	17,28 ± 8,67	276,28 ± 11,53**	3,28 ± 1,70	4,14 ± 2,53*
Пропоксазепам	26,0 ± 15,57	91,57 ± 43,84	1,42 ± 0,48	79,71 ± 46,23	128,71 ± 50,20#	2,14 ± 0,70*	3,57 ± 1,13*

*Показники м'язового тонусу та координації рухів мишей у тесті «стрижень», що обертається» за впливу діазепаму та пропоксазепаму (n = 7)*

Група	Кількість тварин, що впали з пристрою, n (%)			
	до 0,5 хв	до 1 хв	до 3 хв	до 5 хв
<i>0,5 год</i>				
Негативний контроль	1 (14 %)	2 (29 %)	5 (71 %)	5 (71 %)
Діазепам	5 (71 %)**	6 (86 %)**	7 (100 %)*	7 (100 %)*
Пропоксазепам	3 (43 %)	5 (71 %)*	6 (86 %)	7 (100 %)*
<i>1 год</i>				
Негативний контроль	0 (0 %)	1 (14 %)	5 (71 %)	5 (71 %)
Діазепам	6 (86 %)**	6 (86 %)**	7 (100 %)*	7 (100 %)*
Пропоксазепам	4 (57 %)**	4 (57 %)*	7 (100 %)*	7 (100 %)*
<i>2 год</i>				
Негативний контроль	0 (0 %)	1 (14 %)	4 (57 %)	4 (57 %)
Діазепам	4 (57 %)**	5 (71 %)**	6 (86 %)	7 (100 %)**
Пропоксазепам	7 (100 %)**,#	7 (100 %)**,#	7 (100 %)**	7 (100 %)**
<i>4 год</i>				
Негативний контроль	0 (0 %)	1 (14 %)	2 (29 %)	2 (29 %)
Діазепам	3 (43 %)**	5 (71 %)**	7 (100 %)**	7 (100 %)**
Пропоксазепам	5 (71 %)**	7 (100 %)**,#	7 (100 %)**	7 (100 %)**

речина» наведено в таблиці 4. Вони додатково свідчать про наявність сталого, співставного за виразністю міорелаксантажного ефекту пропоксазепаму та діазепаму, який верифіковано за статистично значущим відносно контролю зменшенням кількості тварин, що утримуються на перекладині через 0,5, 1, 2 та 4 год після введення препаратів.

Результати дослідження впливу пропоксазепаму та діазепаму на больову реакцію мишей у тесті «гаряча пластина» наведено в таблиці 5.

Встановлено, що пропоксазепам характеризується виразним аналгетичним ефектом, який було верифіковано за статистично значущим подовженням латентного періоду облизування задньої лапки тваринами в тесті «гаряча пластина». Діазепам також виявляє знеболювальні властивості, збільшуючи достовірно порівняно з контролем латентний період

облизування задньої лапки тварин через 0,5 та 1 год після введення препарату – у 1,8 та 2,2 разу відповідно. Пропоксазепам достовірно пролонгує цей показник через 0,5, 1 та 4 год після введення в середньому в 2–2,5 разу відносно негативного контролю. Крім того, виразна відмінність показників у дослідній і контрольній групах через 2 год після введення пропоксазепаму майже досягає рівня статистичної значущості ( $p = 0,055$ ).

Отже, обидва досліджувані препарати чинять достовірний ефект уже через 0,5 год після введення, що свідчить про аналогічну швидкість розвитку знеболювальної дії. За тривалістю аналгетичної дії пропоксазепам значно перевершує діазепам, який втрачає знеболювальний потенціал вже через 1 год (відмінності з контролем через 2 та 4 год після введення препарату не мають статистичної достовірності).



Показники м'язового тонуусу мишей у тесті «горизонтальна поперечина» за впливу діазепаму та пропоксазепаму ( $n = 7$ )

Група	Кількість мишей, що утримуються на поперечині, $n$ (%)			
	через 0,5 год	через 1 год	через 2 год	через 4 год
Негативний контроль	7 (100 %)	7 (100 %)	7 (100 %)	7 (100 %)
Діазепам	1 (14 %)**	2 (29 %)	1 (14 %)	1 (14 %)
Пропоксазепам	3 (43 %)**	2 (29 %)**	1 (14 %)**	1 (14 %)**

Примітка.  $n$  – кількість тварин що утримались на перекладині, \* $p \leq 0,05$  порівняно з відповідним значенням у групі негативного контролю, кутове перетворення Фішера ( $\phi^*$ ), \*\* $p \leq 0,01$  порівняно з відповідним значенням у групі негативного контролю, кутове перетворення Фішера ( $\phi^{**}$ ).

Показники больової реакції (латентний період, с) мишей у тесті «гаряча пластина» за впливу діазепаму та пропоксазепаму ( $M \pm SEM, n = 7$ )

Група	Латентний період реакції, с			
	через 0,5 год	через 1 год	через 2 год	через 4 год
Негативний контроль	13,81 $\pm$ 1,28	16,46 $\pm$ 1,99	20,84 $\pm$ 2,12	18,41 $\pm$ 2,48
Діазепам	24,70 $\pm$ 3,82**	36,94 $\pm$ 4,69**	28,83 $\pm$ 3,25	26,70 $\pm$ 4,53
Пропоксазепам	36,27 $\pm$ 6,17*	31,40 $\pm$ 5,55*	33,41 $\pm$ 4,95	35,77 $\pm$ 5,13*

Таким чином, наведені результати дослідження впливу пропоксазепаму на емоційно-поведінкові реакції мишей показали відповідність сполуки за цими показниками класичним бензодіазепінам. Більше того, у попередніх дослідженнях [14] за результатами поведінкових тестів пропоксазепам виявив себе як сполуку з помірним проявом нейроактивних компонентів у своєму фармакологічному спектрі дії, що залежить від дози. Так у тесті «відкрите поле» анксиолітичний ефект пропоксазепаму проявляється в дозах 2 і 5 мг/кг, тоді як інгібуючий ефект спостерігається лише в дозі 10 мг/кг. У діапазоні доз 2–5–10 мг/кг пропоксазепам не має статистично значущого впливу на функцію еталонної пам'яті, але більш суттєво впливає на оперативну пам'ять. Статистично значущий вплив на координацію рухів тварин при введенні пропоксазепаму в дозах 2–5–10 мг/кг, що проявляється в міорелаксантий дії, є дозозалежним і зумовленим посиленням гальмівної дії сполуки. Отже, доза пропоксазе-

паму 10 мг/кг є найпоказовішою для експериментальних тварин у зазначених тестах. Мета цієї роботи – визначити методами фармакологічного аналізу участь деяких ізоформ ГАМК-Р у перебігу (0,5–4 год) відповідних терапевтичних дій пропоксазепаму в дозі 10 мг/кг.

Як уже було відзначено, фармакологічна дія БДЗ є результатом взаємодії з різними підтипами ГАМК-Р [4]. Звідси, седативні та протисудомні ефекти БДЗ в основному залежать від підтипу  $\alpha 1$  ГАМК-Р, анксиолітична дія – від  $\alpha 2/\alpha 3$ . Антероградний ефект амнезії пов'язаний з підтипами  $\alpha 1/\alpha 5$ , а рухова координація порушується модуляцією підтипів рецепторів  $\alpha 1$  або  $\alpha 3$  [3, 4]. Нарешті, нещодавно виявлено антигіпералгетичну дію БДЗ, яка залежить головним чином від  $\alpha 2$ -вмісних ГАМК-Р у спинному мозку [4].

Для оцінки фармакологічних показників дії пропоксазепаму використовували різні тести, які можна віднести до наступних субодиноць ГАМК-Р: відкрите поле ( $\alpha 1$ ), піднесений хрестоподібний лабіринт ( $\alpha 2$  та

$\alpha 5$ ), стрижень, що обертається ( $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ ), горизонтальна поперечина ( $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ ) та гаряча пластина ( $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ ).

Діазепам є визнаним анксиолітичним препаратом з добре відомими ізоформами ГАМК-Р, з якими він взаємодіє, тому його використано як позитивний контроль у поведінкових експериментах з мишами.

Так, порівняно з діазепамом, найвиразнішими є аналгетична та анксиолітична дія, однак на 1 та 2 год після введення також виявляється вплив на м'язовий тонус (міорелаксація) та координацію рухів. За кількісними показниками фармакологічної дії, що реєструються, зазначені показники можуть бути розташовані в наступному порядку: аналгезія = седація > анксиолітична дія > порушення координації рухів > міорелаксація.

Зазначені показники є характерними для похідних 1,4-бенздіазепіну, в яких чітко простежується залежність ефектів від дози. Так, вплив на тонус м'язів і координацію рухів виникає за більш високих доз сполук, тоді як розвиток анксиолітичної дії спостерігається в разі менших.

Отже, враховуючи відповідність між використаними тестами та субодинами ГАМК-Р, можна запропонувати наступну послідовність активності пропоксазепаму відповідно до інтенсивності фармакологічного ефекту: ( $\alpha 2/\alpha 3$ , головний мозок) =  $\alpha 1$  > ( $\alpha 2/\alpha 5$ ) > ( $\alpha 2/\alpha 3$  спинний мозок).

За такої умови задля порівняльного зіставлення показників усього спектра фармакологічної дії пропоксазепаму їх попередньо було нормалізовано відносно відповідних значень тварин контрольних груп з подальшим ранжуванням величин прояву окремих ефектів.

Раніше нами було показано на ізольованих субодинамих ГАМК-Р, що

порядок зменшення  $EC_{50}$  є наступним:  $\alpha 1 = \alpha 5 > \alpha 2 > \alpha 3$ , а для  $E_{max}$   $\alpha 3 > \alpha 2 > \alpha 5 > \alpha 1$  [8].

Наведені результати свідчать про те, що співставлення показників поведінкових тестів та афінитету до різних субодинами ГАМК виявляє розбіжності, прояв яких вочевидь пов'язаний з різним рівнем складності та ізольованості систем, що вивчаються (окремі рецепторні системи або інтегральний ефект дії центральної нервової системи). Пояснюється це тим, що рецепторні дослідження виконані на ізольованих системах, а в організмі рецептори експресуються в різних клітинах, і кінцевий фармакологічний ефект є інтегральним результатом їхньої взаємодії, тоді як дослідження *in vitro* дозволяють охарактеризувати лише окремих тип рецепторів. Слід також зазначити, що не тільки природа білкових субодинами впливає на різноманітність функцій підтипів ГАМК-Р *in vivo*. Основними чинниками, які сприяють цій різноманітності, є такі пресинаптичні фактори, як імовірність вивільнення та кількість місць вивільнення трансмітера, а також активність дифузії та дії транспортерів ГАМК. Щодо постсинаптичних факторів, то вони регулюють розташування та кількість підтипів ГАМК-Р, їхню взаємодію з постсинаптичними білками та можливість модуляції ендogenousними сполуками [15].

Отже, надійну валідацію сполук, селективних до підтипу ГАМК-Р, необхідно проводити не тільки в дослідях *in vitro*, але й *in vivo* (фармакологічний скринінг) та, за можливості, на генетично модифікованих експериментальних тваринах, використання яких дасть більш якісну інформацію щодо подальших клінічних досліджень.

## Висновки

1. Методами фармакологічного аналізу (емоційно-поведінкові реакції в мишей) доведено, що новаторський анальгетичний засіб пропоксазепам, похідне бензодіазепіну, у дозі 10 мг/кг характеризується седативно-анксиолітичною та міорелаксантиною дією.

2. Проведено зіставлення показників усього спектра фармакологічної дії пропоксазепаму *in vivo* та *in vitro* (ізольованих окремих субодиноць ГАМК<sub>A</sub>-Р). Розглянуто причини розбіжностей, які залежать від пресинаптичних та постсинаптичних факторів.

1. Головенко М. Я. Субодиночні композиції ГАМК<sub>A</sub>-ергічних рецепторів, що визначають різноманітні фізіологічні процеси і нейротропні властивості лікарських засобів. *Clinical pharmacology*. 2021. Т. 25, № 1. С. 13–23.
2. Rudolph U., Crestani F., Möhler H. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci*. 2001. V. 22. P. 188–194.
3. Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABA<sub>A</sub> receptor subtype. W. T. Halvénus, D. Benke, M. A. Acuña et al. *Nat. Commun*. 2015. V. 6. P. 6803–6813.
4. Rudolph U., Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011. V. 10, No. 9. P. 685–697.
5. Atack J. R. GABA<sub>A</sub> receptor alpha2/alpha3 subtype-selective modulators as potential non-sedating anxiolytics. *Curr. Top Behav. Neurosci*. 2010. V. 2. P. 331–360.
6. Головенко М. Я. Пропоксазепам – новаторський анальгетичний засіб, що гальмує гострий та хронічний біль і має полімодальний механізм дії. *Вісник НАН України*. 2021. Т. 4. P. 76–90.
7. Use of 7-bromo-5-(4-chlorophenyl)-3-propoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one for inhibition of neuropathic pain and seizures of different etiology. Reder A. S., Adronati S. A., Golovenko M. Ya., Pavlovski V. I., Kabanova T. A., Khalimova O. I., Larionov V. B., Voloshchuk N. I. Patent No.: US 11,304,956 B2(45). Date of Patent: Apr. 19, 2022.
8. Reder A., Larionov V., Golovenko M. Subunit-dependent interaction of propoxazepam and its metabolite with the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor. *EUREKA: Health Sciences*. 2022. No. 5. P. 10–18.
9. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 20.10.2010. URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
10. Vogel H. G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2007. 2071 p.
11. Deacon R. M. Measuring motor coordination in mice. *J. Vis. Exp*. 2013. V. 75. P. e2609.
12. Deuis J. R., Dvorakova L. S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front. Mol. Neurosci*. 2017. V. 6. № 10. P. 284–236.
13. Indrayan A., Malhotra K. R. Medical biostatistics. 4<sup>th</sup> ed. Boca Raton: CRC Press/ 2018: 685 p.
14. Physiological aspects of rat activity, their anxiety and memory after administration of full GABA<sub>A</sub>-receptor complex agonist propoxazepam. M. Golovenko, I. Belenichev, V. Larionov et al. *Science Rise: Biological Science*. 2020. V. 2, No. 23. P. 42–48.
15. Cherubini E., Conti F. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci*. 2001. V. 24. P. 155–162.

**М. Я. Головенко, С. Ю. Штриголь, В. Б. Ларіонов, Д. В. Литкін, І. П. Валіводзь, А. С. Редер**

### **Визначення альфа ізоформ рецептора ГАМК у реалізації фармакологічної дії пропоксазепаму**

Пропоксазепам (похідне 1,4-бензодіазепіну) є новаторським анальгетиком, що одночасно гальмує гострий і хронічний біль з компонентами протизапальної та протисудомної дії, яка залежить від стану рецептора гамма-аміномасляної кислоти, ГАМК<sub>A</sub> (ГАМК-Р). Відомості щодо участі відповідних ізоформ (субодиноць альфа) цього рецептора в прояві спектра фармакологічної дії пропоксазепаму сьогодні відсутні.

*Мета дослідження* – визначити методами фармакологічного аналізу на моделях емоційно-поведінкових реакцій у мишей участь деяких ізоформ ГАМК-Р (субодиноць  $\alpha 1\beta\gamma 2$ ,  $\alpha 2\beta\gamma 2$ ,  $\alpha 3\beta\gamma 2$  та  $\alpha 5\beta\gamma 2$ ) у реалізації фармакологічної дії пропоксазепаму. Провести порівняння з даними дослідів *in vitro* щодо взаємодії пропоксазепаму з відповідними субодиноцями ГАМК-Р.

Дослідження проведено *in vivo* на білих безпородних мишах-самцях (20–25 г). Досліджувані сполуки вводили внутрішньоочеревинно в еквімолярних дозах: пропоксазепам – 10 мг/кг і діазепам –

6,82 мг/кг. Визначення поведінкових показників у тестах «відкрите поле», «стрижень, що обертається», «горизонтальна поперечина», «піднесений хрестоподібний лабіринт» та «гаряча пластина» проводили через 0,5, 1, 2 та 4 год після введення. Позитивним контролем був діазепам.

Діазепам у низці поведінкових тестів показав задовільні результати, які характеризують цей клас психотропних препаратів, що свідчить про належну якість тесту, який використовується при з'ясуванні ступеня достовірності вимірювання, тобто, має відповідну валідність. У всіх зазначених фармакологічних моделях пропоксазепам виявляв ансіолітичний, седативний, міорелаксантний та анагетичний ефекти, що дало можливість їх ранжувати залежно від ефективності.

За інтенсивністю фармакологічні ефекти можуть бути розташовані в наступному порядку: аналгезія = седация > ансіолітична дія > порушення координації рухів > міорелаксація, що загалом відповідає залежності ефектів похідних 1,4-бенздіазепіну від концентрації (вплив на тонус м'язів і координацію рухів виникає при більш високих дозах, тоді як розвиток ансіолітичної дії спостерігається при менших дозах). Враховуючи відповідність між тестами та субодинамиці ГАМК-Р, запропоновано наступну послідовність активності пропоксазепаму відповідно до інтенсивності ефекту: ( $\alpha 2/\alpha 3$ , головний мозок) =  $\alpha 1 > (\alpha 2/\alpha 5) > (\alpha 2/\alpha 3$  спинний мозок).

Розглянуто можливі причини розбіжностей результатів емоційно-поведінкових реакцій у мишей (*in vivo*) та афінітету до різних субодинамиці ГАМК- Р (*in vitro*).

*Ключові слова:* діазепам, пропоксазепам, рецептори ГАМК, ізоформи, фармакологічна дія

**M. Ya. Golovenko, S. Yu. Shtrygol', V. B. Larionov, D. V. Lytkin, I. P. Valivodz', A. S. Reder**

### **Evaluation of the alpha isoforms of the GABA receptor in the implementation of the pharmacological action of propoxazepam**

Propoxazepam (a benzodiazepine derivative) is an innovative analgesic that can inhibit both acute and chronic pain with anti-inflammatory and anticonvulsant components, which depends on the state of the GABA receptor. There is currently no information on the participation of the relevant isoforms (alpha subunits) of this receptor in the manifestation of the spectrum of pharmacological action of propoxazepam.

*The aim of the research* is to determine the participation of some GABA receptor isoforms (subunits  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 5\beta 2$ ) in the course (0,5–4 hours) of the corresponding therapeutic effects of propoxazepam using pharmacological analysis methods.

The studies were carried out *in vivo* on white outbred male mice (20–25 g). The studied compounds were administered intraperitoneally at equimolar doses: propoxazepam – 10 mg/kg and diazepam – 6.82 mg/kg. Determination of behavioral indicators in the «open field tests», «rotarod test», «horizontal crossbar», «elevated plus maze» and «hot plate» were carried out 0.5, 1, 2 and 4 hours after administration.

In the «open field» test, propoxazepam (10 mg/kg) when administered intraperitoneally, exhibits pronounced inhibiting and sedative effects that outweigh the effects of diazepam. In the «rotarod test» and «horizontal crossbar» test, propoxazepam showed a pronounced myorelaxant effect, which is comparable to the effect of diazepam and moderately exceeds it in some parameters. In the «elevated plus maze» test propoxazepam showed a moderate anxiolytic effect at the level of diazepam. In the «hot plate» test the analgesic effects of propoxazepam and diazepam were similar. The expressiveness of the sedative, anti-anxiety and, partially, myorelaxant effects of the test sample at a dose of 10 mg/kg exceeded that of diazepam at the equimolar dose (6.82 mg/kg).

According to the intensity, the pharmacological effects can be arranged in the following order: analgesia = sedation > anxiolytic action > impairment of movement coordination > myorelaxation, which generally corresponds to the dependence of the effects of 1,4-benzodiazepine derivatives on concentration (the effect on muscle tone and movement coordination occurs at higher doses, while the development of anxiolytic effect is observed at lower doses). Taking into account the correspondence between the tests and GABA-R subunits, the following order of activity of propoxazepam can be proposed according to the intensity of the effect: ( $\alpha 2/\alpha 3$ , brain) =  $\alpha 1 > (\alpha 2/\alpha 5) > (\alpha 2/\alpha 3$  spinal cord).

Discrepancies between the results of behavioral experiments and affinity to different subunits of GABA-R may be related to the fact that *in vitro* receptor studies were performed on isolated systems, and in the body receptors are expressed in different cells, and the final pharmacological effect is an integral result of their interaction.

*Key words:* diazepam, propoxazepam, GABA receptors, isoforms, pharmacological action

Надійшла: 10 травня 2023 р.

Прийнята до друку: 27 червня 2023 р.

**Контактна особа:** Головенко Микола Якович, Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, буд. 86, вул. Люстдорська дорога, м. Одеса, 65080. Тел.: + 38 0 50 415 40 91. Електронна пошта: n.golovenko@gmail.com