

УДК: 615.213 : 615.015

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12510258>

ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ АКСИТИНІБУ ТА ПІОГЛІТАЗОНУ З МЕТОЮ ПРИГНІЧЕННЯ ХРОНІЧНОЇ ЕПІЛЕПТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Первак М.П.

Одеський національний медичний університет
e-mail: lashelgo@gmail.com

PATHOGENETIC RATIONALE FOR THE USE OF AXITINIB AND PIOGLITAZONE TO SUPPRESS CHRONIC EPILEPTIC ACTIVITY

Pervak M.P.

Odesa National Medical University
e-mail: lashelgo@gmail.com

Summary/Резюме

Data are assessed by the authors on the effectiveness of modulators of neurophysiological functions – axitinib, the inhibitor tyrosine-kinase, and pioglitazone, an activator of PPAR γ receptors, for experimental chronic epileptic activity control. The results were analyzed while exploiting neuropharmacological research, histological, pathophysiological, and statistical methods. The pharmacological control of epileptogenic excitation is determined using the concept of a functional unit of nervous tissue, which, in addition to a neuron, includes vessels and microglia. The review provides data on the pathogenetic significance of blood-brain barrier dysfunction and angiogenesis in forming chronic epileptic activity. It is proposed that a complex of neurotropic drugs with a broad spectrum of action be used to achieve a synergistic anticonvulsant effect. Data on the anticonvulsant effect of axitinib on the pentylenetetrazol (PTZ)-induced kindling model, carried out against the background of preventing angiogenesis in the cerebral cortex, are presented. Thus, the use of axitinib (10,0 mg/kg) reduced the number of newly formed microvessels by 38,5% compared to rats with kindling syndrome ($P < 0,05$). Against the background of the use of a complex of drugs - the blocker of tyrosine kinase axitinib (10,0 mg/kg) and the agonist of PPAR- γ receptors pioglitazone (50,0 mg/kg), the number of newly formed microvessels decreased by 2,34 times ($P < 0,05$). The conclusion was made that the combined use of neuromodulators, which affect neuron excitability indirectly through the components of the functional unit of nervous tissue, provided a synergistic anticonvulsant effect, which is explained by the involvement of various links of intracellular signaling pathways. Further studies using the specified complex of drugs and anticonvulsant pharmacological agents are promising from the point of view of achieving a more pronounced synergistic therapeutic effect.

Key words: *epileptic activity, angiogenesis, antiepileptic pharmacies*

В роботі наведена оцінка ефективності поєднаного застосування препаратів, які впливають на різні ланки регуляції нейрофізіологічних функцій – інгібітора тирозинкінази акситинібу, а також активатора рецепторів PPAR γ пітолізанту на прояви експериментальної хронічної епілептичної активності. Наведено аналіз результатів, отриманих при застосуванні нейрофармакологічного аналізу, гістологічних, патофізіологічних та статистичних методів. Визначено перспективність застосування концепції

функціональної одиниці нервової тканини, яка крім нейрона включає судини та мікроглію, в фармакологічному контролі епілептогенного збудження. В огляді наведено дані щодо патогенетичного значення дисфункції гемато-енцефалічного бар'єру, ангиогенезу у формуванні хронічної епілептичної активності. Запропоновано застосування комплексу нейротропних препаратів широкого спектру дії задля досягнення синергічного протисудомного ефекту. Наведено дані щодо протисудомної дії акситинібу на моделі пентиленететразол (ПТЗ)-індукованого кіндлінгу, яка здійснюється на тлі попередження ангиогенезу в корі головного мозку. Так, застосування акситинібу (10,0 мг/кг) зменшувало число новоутворених мікросудин на 38,5% порівняно до щурів з кіндлінг-синдромом ($P < 0,05$). На тлі застосування комплексу препаратів – блокатора тирозин-кінази акситинібу (10,0 мг/кг) та агоніста рецепторів PPAR- γ піоглітазону (50,0 мг/кг) число новоутворених мікросудин зменшувалось в 2,34 рази ($P < 0,05$). Зроблено висновок, що сумісне застосування нейромодуляторів, які впливають на збудливість нейрона опосередковано через складові функціональної одиниці нервової тканини, забезпечує синергічний протисудомний вплив, що пояснюється залученням різних ланок внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Подальші дослідження із застосуванням зазначеного комплексу препаратів та протисудомних фармакологічних засобів є перспективними з позицій досягнення більш виразного синергічного лікувального впливу.

Ключові слова: епілептична активність, ангиогенез, антиепілептичні фармакологічні засоби

На епілепсію сьогодні в усьому світі хворіє близько 70 млн людей [14]. В Україні розповсюдженість епілепсії складає близько 2,5 - 4,5 на 1000 [1]. Незважаючи на появу нових, більш ефективних антиепілептичних препаратів (АЕП), до 40 % пацієнтів, є нечутливими до АЕП [4, 14].

Сучасна концепція пошуку та дослідження фармакологічних агентів, які здатні пригнічувати надмірну (патологічну) збудливість нервової тканини базується на уявленні щодо безпосередніх впливів препарату, чи його метаболітів на нейрон. В той же час, подібний підхід, який на сьогодні залишається універсальним в нейрофармакології, не вичерпує існуючі проблеми, так як донині прояви епілепсії залишаються погано контрольованими через наявність фармакологічної резистентності до АЕП у значної частини хворих на епілепсію. Проблема вирішення фармакологічної резистентності потребує патогенетичного обґрунтування та розробки нових протіепілептичних засобів, визначення нових стратегічних підходів до її лікування [2].

У відповідності до концепції нейро-

васкулярної функціональної одиниці (НВО), нейрональна активність є регульованою не тільки власне нейронами, але й іншими клітинами, які розташовані периваскулярно – перицитами, гліальними, а також ендотеліальними клітинами [7]. Гліальні клітини, зокрема астроцити, забезпечують нейрони лактатом та киснем. Перицити містять актино-міозинову систему, яка забезпечує скорочення клітин, регулює діаметр судини пропорційно до потреб нейрона. Ендотеліальні клітини продукують вазоактивні речовини, які теж регулюють діаметр судин, що також забезпечує активність нейрона [2, 7]. Подібна кооперація клітинної активності є відповідальною за стабільність мікрооточення нейрона, порушення якої можуть супроводжуватись порушеннями біоелектрогенезу та виникненням епілептичної активності.

Виходячи із концепції НВО важливу роль в контролі збудливості нейронів відіграє процес ангиогенезу в тканині мозку. Так, щільність судин в гіпокампі у пацієнтів із скроневою епілепсією є в два рази більш високою порівняно з тканиною гіпокампу за відсутності епілепсії та

її виразність та частота судом [3]. Щільність судин у щурів із епілептичним статусом, викликаним пілокарпіном є вищою порівняно до контролю, особливо на етапі хронічної епілептизації мозку [2, 3].

Ангіогенез забезпечується ефектами ендотеліального фактора росту судин (VEGF), який продукується декількома типами клітин, такими як фібробласти, міоцити, астроцити за умов патологічних змін тканин [2]. Слід зазначити, що крім негативних ефектів активація сигнального шляху VEGF/VEGFR також спричинює нейротрофічні ефекти в ЦНС та в епілептизованому мозку, яке спостерігається у вигляді росту нейритів а також попередженні загибелі нейронів [5]. Також встановлено протисудомну ефективність застосування VEGF на пілокарпін-індукованій моделі епілептичного статусу у щурів [5]. Крім того, VEGF редукує спонтанну нейрональну активність і в зрізах мозку і призводить до нейрогенезу в структурах гіпокампу *in vivo* [2].

Метою дослідження було вивчення щільності новоутворених мікросудин в структурах мозку щурів із модельованою методом пентилентетразолового кіндлінгу хронічним епілептичним синдромом та за умов експериментального лікування із застосуванням інгібітора тирозин-кінази Б акситинібу та піоглітазону – агоніста PPAR-г рецепторів.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальне дослідження виконано в умовах гострого експерименту на 27 щурах-самцях лінії Вістар масою 180 - 250 г, що утримувались за стандартних умов на базі віварію Одеського національного медичного університету. Досліди проводили згідно вимог GLP та комісії з питань біоетики при Одеському національному медичному університеті (протокол №13 від 11.05.2023 р.).

Дослідження протисудомної активності здійснювалось у відповідності до методичних рекомендацій з доклінічного вивчення лікарських засобів ДФЦ МОЗ

України [9].

Стан кіндлінгу відтворювали за допомогою щоденних внутрішньоочеревинних (в/очер.) ін'єкцій ПТЗ («Sigma Aldrich», США) в дозі 35,0 мг/кг на протязі трьох тижнів [9]. Критерієм включення щурів до спостереження було виникнення генералізованих клоніко-тонічних судомних нападів у відповідь на останні дві ін'єкції епілептогену. Тяжкість судом оцінювали за 6 – бальною шкалою [9].

Препарати вводили через 24 г з моменту останнього застосування епілептогену. Акситиніб («Sigma Aldrich», США) застосовували в дозі 2,0 мг/кг, в/очер протягом 10 діб. Піоглітазон (Lilly S.A, Іспанія) застосовували в дозі 100,0 мг/кг, в/очер однократно разом із застосуванням останньої дози акситинібу за 60,0 хв до введення тестуючої дози ПТЗ (35,0 мг/кг, в/очер). Препарати вводили в 0,3-0,5 мл розчину DMSO. Щурам контрольної групи за аналогічних умов вводили 0,3-0,5 мл DMSO.

Статистичну обробку значень латентних періодів судом проводили з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA) та критерію Newman-Keuls. Оцінки тяжкості судом та значення тривалості іктальних потенціалів порівнювали із результатами застосування критерію Kruskal Wallis. Число щурів із генералізованими судомними в групах нападами порівнювали із використанням критерію z порівняння двох пропорцій. Числові результати наведено у вигляді середньої величини та її похибки.

Критерієм, за яким мікросудини відносили до новоутворених була наявність біфуркацій у формі бруньок росту з ознаками мітозу ядер ендотеліальних клітин (Рис. 1).

Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що у щурів із сформованим кіндлінговим синдромом зросло число подібних мікросудин (Рис. 2). Досліджуваний показник перевищував такий в групі контролю (тритижневе вве-

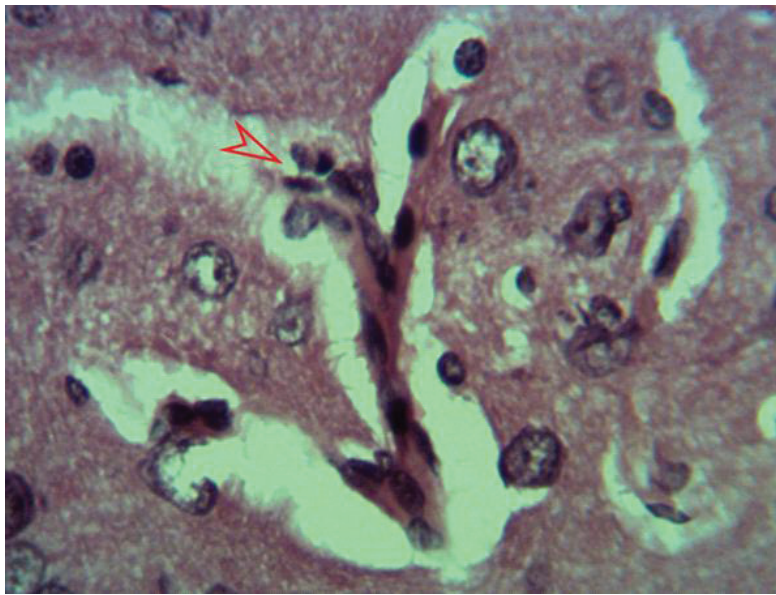


Рис. 1. Критерій ідентифікації неоангіогенезу – наявність ядер ендотелію у фазі мітозу (позначено червоною стрілочкою).
Фарбування – гематоксилін- еозин, збільшення x400.

дення 0,9% розчину NaCl) на 66,2% ($P < 0.05$) (Рис. 3). Разом з тим, застосування акситинібу на протязі останнього тижня відтворення кіндлінгу (10,0 мг/кг, в/очер) попереджало формування мікросудин (Рис. 2, В). Число новоутворених судин зменшувалось порівняно до кіндлінгових тварин на 72,5% ($P < 0,05$), хоча і перевищувало на 45,0% показник в групі контролю ($P < 0,05$) (Рис. 3). Одночасно у щурів попереджались генералізовані тоніко-клонічні судомні напади.

На тлі застосування комплексу препаратів – акситинібу (10,0 мг/кг) та піоглітазону (50,0 мг/кг, в/очер) число новоутворених судин зменшувалось (Рис. 2, Г). Порівняно до аналогічного показника в групі кіндлінгових тварин зменшення склало 2,34 рази ($P < 0.05$) і не відрізнялось від показника в групі

контролю ($P > 0,05$) (Рис. 3). За умов застосування комплексу препаратів у щурів спостерігались окремі міоклонічні судоми.

Тяжкість судом суттєво знижувалась на тлі застосування акситинібу (на 21,2% у порівнянні до кіндлінгових щурів ($P < 0,05$)). За цих умов лікування генералізовані судомні напади попереджались у половини експериментальних тварин (4 із 8). На тлі застосування піоглітазону спостерігалась редукція тяжкості судом на 10,0% ($P > 0,05$), а генералізовані судомні напади були

відсутніми у 2 із 8 щурів. Комбіноване застосування акситинібу та піоглітазону супроводжувалось зниженням тяжкості судом на 37,4% порівняно до такої у кіндлінгових щурів ($P < 0,05$) (Рис. 4). Крім того, тяжкість судом була достовірно нижчою (на 20,5%, $P < 0,05$) порівняно зі щурами, яким застосовували акситиніб.

Таким чином, наведені результати

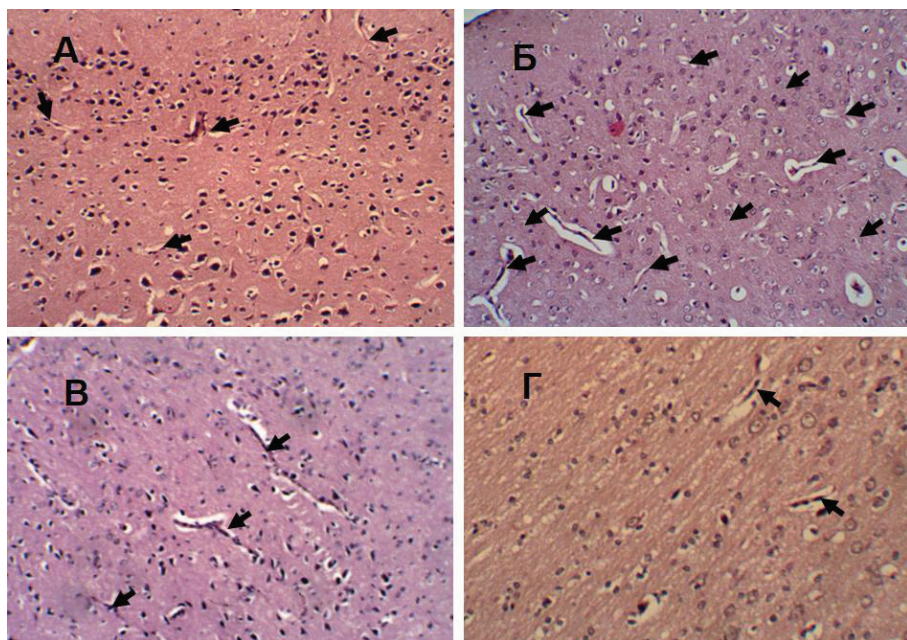


Рис. 2. Фронтальна кора головного мозку щурів: групи контролю (А), розвинені кіндлінгові судоми (Б), введення акситинібу (В), введення комплексу акситинібу та піоглітазону (Г).
Фарбування гематоксилін-еозин, збільшення x100. Стрілками вказані новоутворені мікросудини

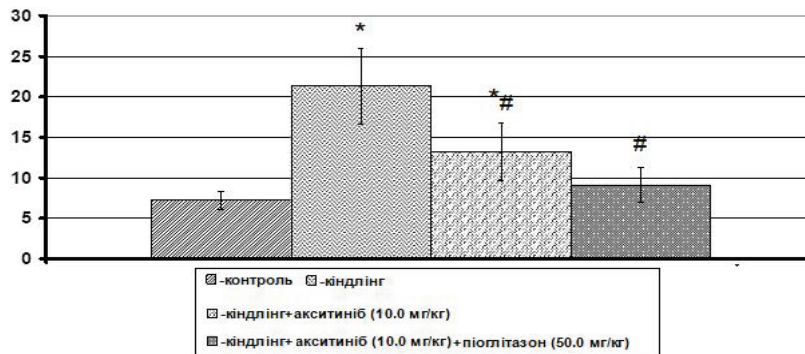


Рис. 3. Вплив фармакологічних нейротропних модуляторів на щільність новоутворених мікросудин в корі головного мозку щурів із ПТЗ-індукованим кіндлінгом.

Примітки: по вісі ординат – число новоутворених мікросудин на 2500 мкм². По вісі абсцис – групи спостереження. (*-P<0,05 у порівнянні до контролю; #-P<0,05 у порівнянні до щурів із кіндлінг-синдромом) (ANOVA+ Newman-Keuls тест) M±SEM.

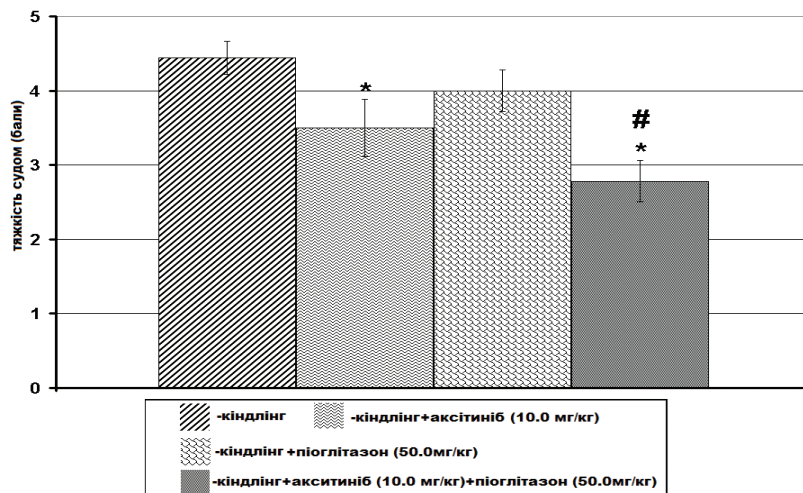


Рис. 4. Вплив акситинібу та піоглітазону на тяжкість судом у щурів із пентилентетразоловим кіндлінгом.

Позначки: ордината – тяжкість судом; абсциса – групи спостереження; *-P<0,05 у порівнянні до кіндлінгових щурів; #-P<0,05 порівняно до кіндлінгових щурів, яким застосовували акситиніб (Kruskal Wallis тест) M±SEM.

свідчать щодо посилення протисудомної дії акситинібу піоглітазоном у відношенні до судом, викликаних методом пентилентетразолового кіндлінгу.

Приймаючи до уваги отримані результати попередження новоутворених мікросудин, слід зазначити, що агоністи PPARγ гальмують неоангіогенез [15] та викликають протисудомні впливи [12]. Акситиніб також викликає пригнічення неоангіогенезу та демонструє протисудомну активність [8, 9]. Наведені дані також свідчать щодо важливого значення VEGF та VEGFR сигнальних шляхів в якості мішеней для розробки методів фармакологічного контролю проявів епілепсії, яке може здійснюватись опосе-

редковано через зміну функціональної активності НВО.

Таким чином, зазначені модулятори, які мають різні мішені впливу, на рівні забезпечення функціонування НВО потенційно здатні здійснювати сумісний синергічний вплив при комбінованому застосуванні. Можливо припустити, що для виникнення синергії важливою є здатність інгібіторів тирозин-кінази (акситинібу) активувати рецептори PPARγ [6], в результаті чого виникають протисудомні ефекти, які також є притаманними класичному агоністу цих рецепторів піоглітазону [11].

Слід також зазначити, що раніше було встановлено синергічну протисудомну активність застосування рапаміцину та акситинібу [8, 10]. Цей резуль-

тат- синергію рапаміцину та інгібіторів тирозин кінази пізніше було підтверджено в дослідженні [13], що вказує на доцільність розширення числа фармакологічних компонентів – дослідженого комплексу препаратів за рахунок включення до нього рапаміцину.

Таким чином, за сучасних умов накопичення фундаментальних даних щодо ролі внутрішньоклітинних сигнальних систем в контролі збудливості нервової тканини, концепція НВО має значну перспективу щодо пошуку найбільш ефективного контролю епілептогенного збудження шляхом комплексного застосування нейромодуляторів широкого спектру дії.

Висновки

1. Відтворення хронічної епілептичної активності методом пентиленететразолоого кіндлінга активує ангиогенез в корі головного мозку.
2. Застосування інгібітору тирозин-кінази Б акситинібу та піоглітазону – агоніста PPAR-г рецепторів викликає синергічний протисудомний вплив та попереджає ангиогенез у щурів із хронічним епілептичним синдромом.

References/Література

1. Dubenko AE, Smolanka VI, Sazonov SO, Oros MM, Grabar VV, Babkina YuA et al. Psychiatric aspects of epilepsy according to the data of the epilepsy register in the Kharkiv and Transcarpathian regions for 2017. *Ukrainian Herald of Psychoneurology*. 2018; 26(4): 10-15 [In Ukrainian].
2. Aronica E, Mьhlebnеr A. *Neuropathology of epilepsy*. Handbook Clin Neurol. Elsevier. 2018; 145: 193-216.
3. Castaceda-Cabral JL, Beas-Zórate C, Rocha-Arrieta LL, Orozco-Suárez SA, Alonso-Vanegas M, Guevara-Guzmán R, Ureca-Guerrero ME. Increased protein expression of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and their receptors in the temporal neocortex of pharmacoresistant temporal lobe epilepsy patients. *J Neuroimmunol*. 2019; 328: 68–72.
4. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien T, Jette N, Scheffer IE, de Curtis M, Perucca P. *Epilepsy*. Nat Rev Dis Primers. 2018; 4: 18024. Doi: 10.1038/nrdp.2018.24
5. Lenzer-Fanara JR, Li T, Salerni EA, Payen F, Croll SD. VEGF treatment during status epilepticus attenuates long-term seizure-associated alterations in astrocyte morphology. *Epilepsy Behav*. 2017; 70(PtA): 33–44.
6. Mazumder M, Ponnann P, Das U, Gourinath S, Khan HA, Yang J, Sakharkar MK. Investigations on Binding Pattern of Kinase Inhibitors with PPAR γ : Molecular Docking, Molecular Dynamic Simulations, and Free Energy Calculation Studies. *PPAR Res*. 2017; 2017: 6397836. Doi: 10.1155/2017/6397836.

7. Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol*. 2014; 210: 790–798.
8. Pervak M, Yehorenko O, Poshyvak O. et al. Combined Neuro-Vascular Modulators in the Control of Epileptic Activity. In: *Advances in Health and Diseases*. 2024; 79(4). Ed. by L.T. Dunkan. New York: Nova Science Publishers. 133-163.
9. Poshyvak OB, Pinyazhko OR, Godlevsky LS. Axitinib displays antiseizure activity on pentylentetrazol - Induced kindling model. *Pharmacologyonline*. 2021; 1: 200–213.
10. Poshyvak OB, Pinyazhko OR, Godlevsky LS. Oxidative stress suppression contributes to antiseizure action of axitinib and rapamycin in pentylentetrazol-induced kindling. *Ukr Biochem J*. 2021; 93: 53–60.
11. San YZ, Liu Y, Zhang Y, Shi P-P, Zhu Y-L. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist inhibits the mammalian target of rapamycin signaling pathway and has a protective effect in a rat model of status epilepticus. *Mol Med Rep*. 2015; 12(2): 1877-1883.
12. Simeone TA, Matthews SA, Simeone KA. Synergistic protection against acute flurothyl-induced seizures by adjuvant treatment of the ketogenic diet with the type 2 diabetes drug pioglitazone. *Epilepsia* 2017; 58: 1440-1450.
13. Su YK, Bamodu OA, Su IC, Pikatan NW, Fong I-H, Lee W-H. et al. Combined treatment with acalabrutinib and rapamycin inhibits glioma stem cells and promotes vascular normalization by downregulating BTK/mTOR/VEGF signaling. *Pharmaceuticals*. 2021; 14: 876. Doi: 10.3390/ph14090876.
14. Thijs R, Surges TJ, O'Brien T, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019; 393(10172): 689-701. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0.
15. Wagner N, Wagner KD. PPARs and angiogenesis - implications in pathology. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(16): 5723. Doi: 10.3390/ijms21165723.

Вперше надійшла до редакції 120.03.2024 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування