

Zbigniew ROLIŃSKI, Elżbieta KLIMONT, Piotr WLAŻ

Ocena leków przeciwpadaczkowych przy zapobieganiu napadom drgawkowym po flunaryzynie u królików

Evaluation of Antiepileptic Drugs Blocking Seizures Induced by Flunarizine in Rabbits

Flunaryzyna (Sibelium) lek antyhistaminowy, o właściwościach blokowania kanałów wapniowych i hamowania skurczów mięśniówki gładkiej naczyń, jest stosowany u ludzi w alergiach oraz zaburzeniach krążenia mózgowego i obwodowego (14, 15, 20). Wykazano również jego działanie przeciwdrgawkowe (3, 4). Okazało się jednak, że u pewnych gatunków zwierząt cynaryzyna i jej fluorowa pochodna flunaryzyna mogą powodować napady drgawkowe. W badaniach nad toksycznością podostrą cynaryzyny wykazano jej drgawkotwórcze działanie u psów (16), a ostatnio analogiczne efekty po stosowaniu flunaryzyny doustnym (12) i dożylnym (13) u królików.

Celem pracy było sprawdzenie, czy przy użyciu drgawek flunaryzynowych można ocenić zabezpieczające działanie leków przeciwpadaczkowych.

MATERIAL I METODY

Badania przeprowadzono na 57 królikach albinosach, samcach o średniej m.c. 1,57 kg. Dla wywołania drgawek flunaryzynę podawano dożylnie w roztworze o stężeniu 3,5 mg/ml w powolnym wlewie (1,5 ml/min.), w trzech frakcjonowanych dawkach w odstępach 15 min. Rozpiętość efektywnej dawki flunaryzyny u poszczególnych królików wahała się w granicach 11,8-23,8 mg/kg. Pierwszy wlew dożylny obejmował w przybliżeniu 1/2 całkowitej dawki drgawkotwórczej, a dwa następne podania wynosiły odpowiednio po 1/4 dawki efektywnej. Napady drgawkowe pojawiały się po upływie 5-10 min. od trzeciego podania podzielonej dawki, poprzedzone zawsze wystąpieniem objawów zwiastunowych. Objawy te pojawiają się już po drugim podaniu frakcjonowanej dawki flunaryzyny w postaci drżenia ciała, ataksji, potrząsania głową lub zarzucania jej na grzbiet. Natomiast bezpośrednio przed wystąpieniem napadów drgawkowych, po podaniu trzeciej części efektywnej dawki flunaryzyny obserwowano niedowład kończyn tylnych i wzrost liczby oddechów. Napady drgawkowe, utrzymujące się 2-3 h, charakteryzują się naprzemiennym występowaniem szybkich skurczów tonicznych i epizodów drgawek klonicznych. Obserwowano również drgawki kloniczno-toniczne z przemieszczaniem się królika po całej klatce.

Intensywność napadów drgawkowych rejestrowano według 5-punktowej skali (17): 0 — brak napadów, 1 — (słabe napady) 1-5 epizodów drgawek klonicznych, 2 — (napady umiarkowane) 6-10 epizodów drgawek klonicznych, 3 — (silne napady) 11-20 epizodów drgawek klonicznych, 4 — (bardzo silne napady) ponad 20 epizodów drgawek kloniczno-tonicznych obejmujących całe

ciało. W przypadku drgawek tonicznych rejestrowano wyłącznie u poszczególnych królików występowanie tych drgawek lub ich brak. Notowano również występowanie objawów ubocznych, takich jak: porażenie kończyn, sen narkotyczny, śmiertelność.

Leki przeciwpadaczkowe podawano (i.v. lub i.p.) w premedykacji 60 min. przed podaniem pierwszej części podzielonej, drgawkotwórczej dawki flunaryzyny. Wpływ leków przeciwpadaczkowych na występowanie i intensywność drgawek oceniano analogicznie jak w przypadku królików otrzymujących samą flunaryzynę (gr. kontrolna). Użyto następujących leków przeciwpadaczkowych: fenobarbital (Phenobarbital sodium, Gardenal-Specia) w dawkach: 7,5 mg/kg i 15,0 mg/kg; pentobarbital (Pentobarbital sodium, Vetbutal-Biowet) 17,5 i 25 mg/kg; diazepam (Valium-Roche) 1 i 1,5 mg/kg; klonazepam (Rivotril-Roche) 1,5 i 2 mg/kg; prymidon (Mizodin-Polfa) 5 i 15 mg/kg; fenytoina (Phenytoinum-Polfa) 18 i 36 mg/kg; sól magnezowa kwasu walproinowego (Dipromal-Polfa) 10 i 20 mg/kg. Fenobarbital, pentobarbital, diazepam, klonazepam stosowano dożylnie, pozostałe leki dootrzewnowo.

WYNIKI

Uzyskane wyniki potwierdziły możliwości oceny użytych leków w hamowaniu napadów drgawkowych wywoływanych flunaryzyną. W grupie siedmiu testowanych leków jedynie pochodne benzodiazepiny i walproinian magnezu w sposób selektywny (bez występowania objawów ubocznych) hamowały występowanie drgawek flunaryzynowych (tab. 1). Diazepam podany przed flunaryzyną w dawkach 1 i 1,5 mg/kg całkowicie zabezpieczał króliki przed wystąpieniem napadów klonicznych i redukował liczbę królików z drgawkami tonicznymi. Klonazepam w niższej dawce (1,5 mg/kg) osłabiał natężenie drgawek klonicznych (wg skali 1,10 punkta) w odniesieniu do grupy kontrolnej (tab. 1), a w dawce 2,0 mg/kg całkowicie zapobiegał występowaniu drgawek klonicznych i tonicznych.

Walproinian magnezu w dawce 10 mg/kg nie zabezpieczał królików przed wystąpieniem drgawek flunaryzynowych, natomiast podwojenie tej dawki zapewniało pełne zabezpieczenie przed wystąpieniem drgawek klonicznych i tonicznych. Wszystkie użyte dawki diazepamu, klonazepamu i walproinianu magnezu były dobrze tolerowane, nie obserwowano objawów ubocznych ani przypadków śmiertelnych (tab. 1).

Przy użytych pochodnych kwasu barbiturowego działanie zabezpieczające przed drgawkami obserwowano dopiero po dawkach działających silnie depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Po niższej dawce pentobarbitalu (17,5 mg/kg) stwierdzono zmniejszenie natężenia drgawek klonicznych w porównaniu z grupą kontrolną (średnio 1,80 wg skali). Dawka wyższa (25 mg/kg) całkowicie zabezpieczała przed wystąpieniem drgawek klonicznych i tonicznych z towarzyszącymi jednocześnie objawami depresji OUN w postaci snu narkotycznego. W przypadku pentobarbitalu obserwowano wzrost śmiertelności (tab. 2). Podobne obserwacje poczyniono z fenobarbitem. Dawka 7,5 mg/kg nie zapobiegała występowaniu drgawek flunaryzynowych, ich natężenie w przypadku skurczów klonicznych wynosiło średnio 2,45 punkta według

Tab. 1. Skuteczność diazepam, klonazepamu i walproinianu w zapobieganiu drgawkom flunaryzynowym u królików
The effect of diazepam, clonazepam and magnesium valproate on flunarizine seizures in rabbits

Badane leki (mg/kg)	Liczba króli- ków n	Masa ciała (kg) M $\pm$ SD	Flunaryzyna mg/kg M $\pm$ SD	Drgawki kloniczne wg skali 5-punktowej M $\pm$ SD	Drgawki to- niczne, liczba królików	Śmiertelność liczba (%)
Kontrola	8	1,64 $\pm$ 0,37	18,4 $\pm$ 2,10	3,12 $\pm$ 0,31	8	0 (0)
Diazepam 1,0	3	1,57 $\pm$ 0,49	16,7 $\pm$ 1,30	0 ^a	1	0 (0)
Diazepam 1,5	3	1,38 $\pm$ 0,51	17,9 $\pm$ 2,00	0 ^a	0	0 (0)
Klonazepam 1,5	4	1,43 $\pm$ 0,42	18,3 $\pm$ 1,30	1,10 $\pm$ 0,20 ^b	3	0 (0)
Klonazepam 2,0	3	1,62 $\pm$ 0,68	19,2 $\pm$ 0,90	0 ^a	0	0 (0)
Walproinian magnezu 10,0	3	1,48 $\pm$ 0,40	17,3 $\pm$ 0,89	2,33 $\pm$ 0,84	3	0 (0)
Walproinian magnezu 20,0	3	1,82 $\pm$ 0,38	19,3 $\pm$ 1,08	0 ^a	0	0 (0)

n – liczba królików; M – wartości średnie; SD – odchylenie standardowe; różnice w masie ciała królików i średniej dawce flunaryzyny pomiędzy kontrolą a pozostałymi grupami były nieistotne (test t-Studenta); ^a – różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli ($p < 0,01$, test t-Studenta);

^b – różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$, test t-Studenta).

n – number of rabbits; M – mean; SD – standard deviation; rabbits weight, flunarizine dose do not differ significantly between groups and control;

^a – significantly different from control ($p < 0.01$, t-test), ^b – significantly different from control ($p < 0.05$, t-test).

Tab. 2. Skuteczność pentobarbitalu, fenobarbitalu, prymidonu i fenytoiny w zapobieganiu drgawkom flunaryzynowym u królików
The effect of pentobarbital, phenobarbital, primidone and phenytoin on flunarizine seizures in rabbits

Badane leki (mg/kg)	Liczba królików n	Masa ciała (kg) M $\pm$ SD	Flunaryzyna mg/kg M $\pm$ SD	Drgawki kloniczne wg skali 5-punktowej (wartości średnie) M $\pm$ SD	Drgawki to- niczne, liczba królików	Śmiertelność liczba (%)
Kontrola	8	1,64 $\pm$ 0,37	18,4 $\pm$ 2,10	3,12 $\pm$ 0,31	8	0 (0)
Pentobarbital 17,5	5	1,60 $\pm$ 0,40	19,6 $\pm$ 1,28	1,80 - 0,46 *	5	0 (0)
Pentobarbital 25,0	4	1,39 $\pm$ 0,51	20,1 $\pm$ 0,98	0	0	2 (50)
Fenobarbital 7,5	5	1,74 $\pm$ 0,20	19,0 $\pm$ 1,90	2,45 $\pm$ 0,82	5	0 (0)
Fenobarbital 15,0	3	1,48 $\pm$ 0,62	17,6 $\pm$ 1,30	0	0	1 (33,3)
Prymidon 5,0	3	1,42 $\pm$ 0,72	19,0 $\pm$ 0,88	2,66 $\pm$ 0,38	3	0 (0)
Prymidon 15,0	4	1,43 $\pm$ 0,28	18,2 $\pm$ 1,20	1,25 $\pm$ 0,31 ^b	3	3 (75)
Fenytoina 18,0	3	1,52 $\pm$ 0,14	17,5 $\pm$ 2,05	3,33 $\pm$ 0,22	3	0 (0)
Fenytoina 36,0	3	1,59 $\pm$ 0,39	18,6 $\pm$ 1,11	3,66 $\pm$ 0,12 *	3	2 (66,6)

n – liczba królików; M – wartości średnie; SD – odchylenie standardowe; różnice w masie ciała królików i średniej dawce flunaryzyny pomiędzy kontrolą a pozostałymi grupami były nieistotne (test t-Studenta); * – różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$, test t-Studenta); ^b – różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli ($p < 0,01$, test t-Studenta).

n – number of rabbits; M – mean; SD – standard deviation; rabbits weight and flunarizine dose do not differ significantly between groups and control; * – significantly different from control ($p < 0.05$, t-test), ^b – significantly different from control ($p < 0.01$, t-test).

przyjętej skali, a drgawki toniczne odnotowano u wszystkich królików w grupie (tab. 2). Dawka 15 mg/kg tłumiała całkowicie występowanie drgawek klonicznych i tonicznych, wywołując jednocześnie sen narkotyczny. Zejście śmiertelne po wyższej dawce fenobarbitalu odnotowano u 1 królika.

Prymidon nie zapobiegał występowaniu drgawek. Niższa dawka tego leku nie wywierała istotnego wpływu na zmniejszenie natężenia drgawek klonicznych (2,66 punkta wg skali) w porównaniu do kontroli, a dawka 15 mg/kg redukowała liczbę napadów drgawkowych w porównaniu do dawki niższej i kontroli. Po dawce prymidonu 15 mg/kg obserwowano wysoki procent zejść śmiertelnych (tab. 2).

Fenytoina w dawkach 18 i 36 mg/kg nie zapobiegała występowaniu drgawek klonicznych i tonicznych. Po wyższej dawce rejestrowano niekiedy ponad 20 epizodów drgawek kloniczno-tonicznych z przemieszczaniem się królików po całej klatce (wg skali oceny średnio 3,66 punkta). Jednocześnie odnotowano wzrost śmiertelności (tab. 2).

DYSKUSJA

Uzyskane wyniki potwierdziły przyjęte założenie, że przy wywołaniu drgawek flunaryzynowych u królików można ocenić działanie zapobiegawcze potencjalnych leków przeciwdrgawkowych. Diazepam i klonazepam selektywnie, tzn. bez objawów ubocznych i występowania przypadków śmiertelnych, zabezpieczały przed pojawianiem się drgawek flunaryzynowych. Po podaniu pochodnych kwasu barbiturowego hamowanie drgawek uzyskiwano dopiero po dawkach wywołujących jednocześnie wystąpienie snu narkotycznego. Słabsze działanie pentobarbitalu w znoszeniu napadów drgawkowych w porównaniu do diazepamu zostało stwierdzone także na modelu drgawek wywołanych przy użyciu antagonistów GABA (11). Dawka pentobarbitalu dla zniesienia drgawek pikrotoksynowych jest 10 razy większa od diazepamu (11). W naszych badaniach zbliżoną skuteczność do pochodnych benzodiazepiny w zapobieganiu drgawkom kloniczno-tonicznym wykazywał walproinian magnezu. Działanie tego leku było również selektywne, bez wywoływania objawów ubocznych i zwiększonej śmiertelności zwierząt. Prymidon w dawce 15 mg/kg osłabiał natężenie drgawek klonicznych, ale jednocześnie wzrastało jego działanie toksyczne, prowadzące do bardzo wysokiej śmiertelności.

Fenytoina w dawce niższej (18 mg/kg) nie działała profilaktycznie, natomiast podwojenie dawki (36 mg/kg) powodowało ogromny wzrost natężenia drgawek kloniczno-tonicznych, nie notowany nigdy w grupie kontrolnej (średnio 3,66 punkta wg skali). Taki wzrost aktywności drgawkotwórczej w wyniku zastosowania w premedykacji fenytoiny i efektywnej dawki flunaryzyny jest trudny do wytłumaczenia. Według oceny niektórych autorów (3) przeciwdrgawkowe

działanie flunaryzyny w swoim profilu przypomina właśnie fenytoinę i karbamazepinę. Jednak dla wyjaśnienia tej paradoksalnej reakcji przy skojarzonym działaniu fenytoiny z flunaryzyną nie znaleźliśmy w literaturze żadnych dodatkowych informacji ułatwiających interpretację takiego działania.

Odrębnym zagadnieniem jest mechanizm zapobiegania napadom drgawkowym po flunaryzynie. Z badanych przez nas leków zarówno benzodiazepiny, jak też barbiturany mają zbliżony profil działania przeciwdrgawkowego. Benzodiazepiny (1, 5) i barbiturany (6, 8) przynajmniej w części działają przez nasilenie przekąźnictwa GABA-ergicznego. Wielu autorów wykazało, że działanie różnych leków przeciwpadaczkowych związane jest z różnymi miejscami receptorowymi kompleksu GABA-benzodiazepiny-jonofory (2, 9, 18). Kompleks ten jest również miejscem działania związków drgawkotwórczych (19).

Przyjmuje się, że efekt drgawkotwórczy pikrotoksyny związany jest z kanałem chlorkowym, a bikukulina działa poprzez miejsca wyznaczone dla GABA w tym kompleksie (19). Trudno jest na tym etapie badań wnioskować, jaki jest punkt uchwytu działania drgawkotwórczego flunaryzyny. Dotychczasowe obserwacje nad wpływem leków przeciwpadaczkowych na ten rodzaj drgawek mogą sugerować pojawianie się upośledzonego neuroprzekąźnictwa GABA-ergicznego po podaniu flunaryzyny w wysokich dawkach. Flunaryzyna jako bloker jonoforowy przede wszystkim dla kanałów wapniowych (20, 21) być może, że w wysokich dawkach upośledza również przepływ innych jonów hamujących przekąźnictwo GABA-ergiczne. Drgawkotwórcze działanie pikrotoksyny jest związane na przykład z kanałem chlorkowym (19). Sugestię wiążącą upośledzoną transmisję GABA-ergiczną z występowaniem drgawek flunaryzynowych wspierają nasze wyniki z walproinianem magnezu. Działanie przeciwdrgawkowe soli kwasu walproinowego wynika z usprawnienia przekąźnictwa GABA-ergicznego, które związane jest między innymi z oddziaływaniem tych leków na transport jonów chlorkowych (7). Walproinian magnezu był lekiem, który obok badanych pochodnych benzodiazepiny i pochodnych kwasu barbiturowego (mniej selektywne działanie) całkowicie zabezpieczał króliki przed wystąpieniem drgawek flunaryzynowych.

WNIOSKI

1. Wykazano przydatność drgawek flunaryzynowych do oceny profilaktycznego działania leków przeciwdrgawkowych.
2. Całkowite działanie zabezpieczające bez wywoływania objawów ubocznych obserwowano jedynie w przypadku diazepamu, klonazepamu i walproinianu magnezu. Pozostałe badane leki albo działały w dawkach wywołujących sen narkotyczny (pentobarbital i fenobarbital), albo wykazywały silne działanie toksyczne bez wyraźnego wpływu na natężenie drgawek (prymidon).

3. Fenytoina natomiast nie zapobiega występowaniu, ale nasila drgawki flunaryzynowe u królików.

PIŚMIENNICTWO

- Costa E., Guidotti A.: Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *A. Rev. Pharmac. Toxic.*, **19**, 351, 1979.
- Costa E., Guidotti A., Mao C. C., Suria A.: New concept on the mechanism of action of benzodiazepines. *Life Sci.*, **17**, 167, 1975.
- Desmedt L. K. C., Niemegeers C. J. E., Janssen P. A. J.: Anticonvulsant properties of cinnarizine and flunarizine in rats and mice. *Arzneimittel-Forsch.*, **25**, 1408, 1975.
- De Sarro G. B., Nistico G., Meldrum B. S.: Anticonvulsant properties of flunarizine on reflex and generalized models of epilepsy. *Neuropharmacology*, **25**, 695, 1986.
- Haefely W., Polc P., Schaffner R., Keller H. H., Pieri L., Möhler H.: Facilitation of GABAergic transmission by drugs. In: *GABA-Neurotransmitters*. Eds. Krosgaard-Larsen P., Scheel-Kruger J., Kofod H., Munksgaard, Copenhagen, 1978.
- Macdonald R., Barker J. L.: Benzodiazepines modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Nature*, **271**, 563, 1978.
- Nau H., Löscher W.: Valproic acid: metabolite concentrations in plasma and brain, anticonvulsant activity and effects on GABA during subacute treatment in mice. *Stch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **257**, 20, 1982.
- Nicoll R. A.: Pentobarbital: action on frog motoneurons. *Brain Res.*, **96**, 119, 1975.
- Olsen R. W.: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.*, **37**, 1, 1981.
- Polc P., Haefely W.: Effects of two benzodiazepines, phenobarbital and baclofen on synaptic transmission in the cat cuneate nucleus. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, **294**, 121, 1976.
- Rastogi S. K., Ticku M. K.: Anticonvulsant profile of drugs which facilitate GABAergic transmission on convulsions mediated by a GABAergic mechanism. *Neuropharmacology*, **25**, 175, 1986.
- Roliński Z., Klimont E., Tusińska E.: Convulsive action of flunarizine in rabbits. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **42**, 85, 1990.
- Roliński Z., Tusińska E., Klimont E.: Intravenous injection of flunarizine to elicit epileptiform convulsions and preliminary evaluation of anti-epileptic drugs. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **42**, 9, 1990.
- Schetz J., Bostoen H., Clement D., Dornhoff M., Haerens A., Roekaerts P., Staessen A. J.: Flunarizine in chronic peripheral arterial disease. *Curr. Ther. Res.*, **23**, 121, 1978.
- Staessen A. J.: Treatment of circulatory disturbances with flunarizine and cinnarizine. *Vasa*, **6**, 59, 1977.
- Staśkiewicz G., Roliński Z., Rubaj B.: Studies on the biological action of cinnarizine. *Annales UMCS, sec. DD*, **30**, 171, 1975.
- Śmiałowski A.: The influence in rabbits and rats of gammaacetylenic GABA on seizures generated by pentylenetetrazol. *Neurosci. Lett.*, **19**, 331, 1980.
- Ticku M. K.: Benzodiazepine- GABA receptor-ionophore complex: current concepts. *Neuropharmacology*, **22**, 1459, 1983.
- Ticku M. K., Maksay G.: Convulsant/depressant site of action at the allosteric benzodiazepine GABA receptor-ionophore complex. *Life Sci.*, **33**, 2363, 1983.

20. Van Nueten J. M., Van Beek J., Janssen P. A. J.: Effect of flunarizine on calcium-induced responses of peripheral vascular smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **42**, 232, 1978.
21. Van Nueten J. M., Wallens D.: Mechanism of vasodilatation and antivasoconstriction. *Angiology*, **30**, 440, 1979.

Wpl. 15 III 1990

SUMMARY

It has been found that flunarizine, an antagonist of Ca channels applied perorally at subtoxic doses (dogs and rabbits) or intravenously (rabbits) elicits alternate clonic, tonic or clonic-tonic seizures. The objective of the study was to establish if seizures induced by flunarizine, as an experimental model, may be used to evaluate the prophylactic action of anti-epileptic drugs. The antiepileptic drugs were applied 60 min before an effective dose of flunarizine (11.8-23.8 mg/kg). Clonic seizures were recorded quantitatively according to the five points scale whereas tonic seizures were registered as present or absent. The results confirmed the possibility to evaluate a prophylactic action of drugs in seizures induced by flunarizine. In the group of 7 tested drugs (diazepam, clonazepam, magnesium walproate, phenobarbital, prymidon, and phenytoin) used for premedication only benzodiazepine derivatives and magnesium walproate prevented the attacks of seizures without side effects.