

Katarzyna CHWALCZUK¹
 Andrzej RUBAJ²
 Mariusz ŚWIĄDER³
 Stanisław J. CZUCZWAR^{1,5}

Wpływ antagonisty receptorów adenozynowych A1, 8-cyklopentylo-1,3-dipropyloksantyny, na przeciwdrgawkowe działanie leków przeciwpadaczkowych u myszy

Influence of the antagonist of adenosine A1 receptors, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, upon the anticonvulsant activity of antiepileptic drugs in mice

¹Katedra i Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny, Lublin
 Kierownik Katedry i Zakładu:
 Prof. dr hab. Stanisław J. Czuczwar

²Katedra i Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Lublin
 Kierownik Katedry i Kliniki:
 Prof. dr hab. n. med. Andrzej Wysokiński

³Katedra i Zakład Farmakologii, Toksykologii i Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Lublin
 Kierownik Katedry i Zakładu:
 Prof. dr hab. n. med. Marian Wielosz

⁴Zakład Fizjopatologii, Instytut Medycyny Wsi, Lublin
 Kierownik Zakładu:
 Prof. dr hab. Stanisław J. Czuczwar

Dodatkowe słowa kluczowe:

receptory adenozynowe
 leki przeciwpadaczkowe
 drgawki

Additional key words:

adenosine receptors
 antiepileptic drugs
 seizures

Wprowadzenie: Pochodne metyloksantyny (teofilina, kofeina), będące nieselektywnymi antagonistami receptorów adenozynowych, osłabiają przeciwdrgawkowe działanie leków przeciwpadaczkowych w doświadczalnych modelach padaczki. Cel pracy: Odpowiedź na pytanie, czy wybiórczy antagonist receptorów adenozynowych A1, 8-cyklopentylo-1,3-dipropyloksantyna (CPX), ma niekorzystny wpływ na ochronne działanie leków przeciwpadaczkowych (fenobarbitalu, fenytoiny, karbamazepiny i walproinianu) w teście maksymalnego elektrowstrząsu u myszy. Wyniki: CPX zastosowana w układzie ostrym do dawki 10 mg/kg nie wpłynęła na próg drgawkowy dla drgawek wywołanych elektrowstrząsem, natomiast stosowana w układzie przewlekłym przez dwa tygodnie, w dawkach 2,5 i 5 mg/kg obniżała istotnie próg drgawkowy. Podana jednorazowo, CPX (2,5 mg/kg) osłabiała jedynie przeciwdrgawkowy efekt fenobarbitalu, a w układzie przewlekłym również w dawce 2,5 mg/kg, nie zmniejszała tylko działania ochronnego karbamazepiny. W odniesieniu do układu ostrego CPX nie wpłynęła na stężenie fenobarbitalu w mózgu. Co ciekawe, w układzie przewlekłym – nie wpłynęła na powyższe stężenia fenytoiny a istotnie zwiększała stężenia fenobarbitalu i walproinianu. Wnioski: CPX w układzie przewlekłym wykazuje podobieństwo do teofiliny i kofeiny, jednakże te nieselektywne pochodne ksantyny osłabiały przeciwdrgawkowe działanie wszystkich podstawowych leków przeciwpadaczkowych. W układzie ostrym niekorzystny efekt CPX był słabszy w porównaniu do teofiliny i kofeiny.

Background: Methylxanthine derivatives (theophylline, caffeine), non-selective antagonists of adenosine receptors, impair the anticonvulsant activity of antiepileptic drugs in experimental models of epilepsy. The aim of the study: To answer a question whether the selective antagonist of adenosine A1 receptors, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX), shares this negative propensity of methylxanthines upon the protective activity of antiepileptic drugs (carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, valproate) against maximal electroshock-induced seizures in mice. Results: Acute CPX (up to 10 mg/kg) did not affect the electroconvulsive threshold but administered chronically for two weeks, it significantly lowered the threshold at 2.5 and 5 mg/kg. CPX (2.5 mg/kg) given acutely reduced only the protection offered by phenobarbital whilst injected chronically in the same dose, it did not only decrease the anticonvulsant action of carbamazepine. Acute CPX did not affect the brain concentration of phenobarbital but, interestingly, the selective adenosine A1 antagonist given chronically elevated the brain concentrations of phenobarbital and valproate, being only ineffective upon that of phenytoin. Conclusions: When given chronically, CPX is somewhat similar to theophylline and caffeine, however, these non-selective xanthine derivatives reduced the protective activity of all conventional antiepileptic drugs. Acute CPX expressed weaker negative effects when compared to theophylline or caffeine.

Adres do korespondencji:
 Prof. dr hab. Stanisław J. Czuczwar
 Katedra i Zakład Patofizjologii
 20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
 Tel.: (+48 81) 718
 e-mail: czuczWarsj@yahoo.com

Wstęp

Stwierdzono, że podczas napadów padaczkowych dochodzi do znacznego zwiększenia synaptycznego stężenia adenozy

w ośrodkowym układzie nerwowym [9]. Adenozyna i jej analogi (głównie agoniści receptorów A1) wykazują działanie przeciwdrgawkowe w różnych modelach doświadczalnej

padaczki. Na przykład agoniści A1 hamowali drgawki wywołane pikrotoksyną [11], kwasem N-metylo-D-asparaginowym [30], kwasem kainowym oraz kwiskwalinowym [35] a także pilokarpiną [27]. Ponadto substancje te hamowały drgawki rozniecane z jądra migdałowatego u szczurów [25] i podnosiły próg drgawkowy w drgawkach wywołanych elektrowstrząsem u myszy [4].

Zaproponowano szereg mechanizmów dla przeciwdrgawkowego działania analogów adenozyminy-hamowanie neuroprzekaznictwa pobudzającego w hipokampie [12] i jądrach migdałowatych [18], zmniejszenie neuroprzekaznictwa cholinergicznego [10], hamowanie cykazy adenylanowej [33] i aktywacja kanałów potasowych w błonie postsynaptycznej [19]. Co więcej, receptory adenozynowe A1, które są zlokalizowane w dużej liczbie na piramidowych neuronach hipokampa, zmniejszają pobudliwość nerwową, poprzez hamowanie presynaptycznego uwalniania pobudzających aminokwasów oraz poprzez hiperpolaryzację błony postsynaptycznej neuronów hipokampa [13].

Co do selektywnych i nieselektywnych antagonistów receptorów adenozynowych A1 istnieją dane na temat ich działania prokonwulsyjnego [8,29,30], chociaż w odniesieniu do ich chronicznego podawania wyniki badań nie są jednoznaczne [17,26,31]. Z drugiej strony antagoniści receptorów adenozynowych A1 i A2 – pochodne metylkoksantyny, teofilina i kofeina osłabiają działanie przeciwdrgawkowe podstawowych leków przeciwpadaczkowych w teście maksymalnego elektrowstrząsu u myszy [6, 15,16] a po przewlekłym podawaniu pochodnych metylkoksantyny, ten niekorzystny efekt był dodatkowo wzmacniany wobec niektórych leków przeciwpadaczkowych [15].

Cel pracy

Celem badań było sprawdzenie, czy wybiórczy antagonist receptorów adenozynowych A1, 8-cyklopentyl-1,3-dipropylkoksantyna (CPX) po podaniu jednorazowym i przewlekłym wpłynie na działanie przeciwdrgawkowe podstawowych leków przeciwpadaczkowych, fenobarbitalu, fenytoiny, karbamazepiny i walproinianu, w teście maksymalnego elektrowstrząsu u myszy. Dodatkowo zbadano wpływ kombinacji CPX z lekami przeciwpadaczkowymi na koordynację ruchową w teście komina i pamięć długotrwałą w teście biernego unikania. W celu wykluczenia ewentualnych interakcji farmakokinetycznych pomiędzy CPX i lekami przeciwpadaczkowymi zbadano mózgowie stężenia leków przeciwpadaczkowych.

Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzono na samcach myszy Swiss o masie ciała 20-25 g. Zwierzęta przebywały w standardowych warunkach laboratoryjnych ze stałym dostępem do wody i paszy i w naturalnym cyklu dobowym. Po okresie adaptacji 6 dni zwierzęta podzielono w sposób zrandomizowany na grupy liczące 8-10 zwierząt. Każde ze zwierząt było użyte do doświadczeń tylko jeden raz. Wszystkie procedury doświadczeń zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie.

Zastosowano następujące substancje i leki: 8-cyklopentyl-1,3-dipropylkoksantynę (CPX; Sigma, St. Louis, MO, USA), walproinian magnezowy (ICN-Polfa, Rze-

szów), karbamazepinę (Polfa, Warszawa), fenytoinę (Polfa, Warszawa) i sól sodową fenobarbitalu (Polfa, Kraków). Walproinian i fenobarbital rozpuszczano w wodzie destylowanej, podczas gdy pozostałe substancje i leki zawieszano w 1% roztworze emulgatora Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Wszystkie substancje i leki podawano dootrzewnowo w objętości 10 ml/kg masy ciała zwierząt, walproinian i karbamazepinę - 30 minut, CPX i fenobarbital - 60 minut, fenytoinę -120 minut przed testami. Wszystkie testy wykonywano albo w układzie ostrym albo po przewlekłym stosowaniu CPX (dwa razy na dobę o 8 rano i wieczorem przez dwa tygodnie). W układzie przewlekłym podawano CPX 15-go dnia rano i po wyżej wymienionym czasie leki przeciwpadaczkowe.

Elektrowstrząsy wywoływano za pomocą prądu zmiennego (50 Hz) poprzez elektrody uszne. Generatorem elektrowstrząsów było urządzenie firmy Hugo Sachs (Hugo Sachs Rodent Shocker, type 221, Freiburg, Niemcy) a czas pojedynczego wstrząsu wynosił 0,2 sekundy. Toniczny wyprost kończyn tylnych traktowano jako kryterium wystąpienia aktywności drgawkowej.

Do wyznaczenia progu drgawkowego używano przynajmniej 4 grup myszy (po 8 zwierząt w każdej), w których stosowano elektrowstrząsy o różnym natężeniu. Następnie wyznaczano zależność natężenie-efekt drgawkowy zgodnie z metodą *Litchfielda* i *Wilcoxona* [20] i obliczano wartość CS50 (*current strength 50*), która odpowiada natężeniu prądu potrzebnemu do wywołania aktywności drgawkowej u 50% zwierząt.

Przeciwdrgawkowe działanie badanych leków przeciwpadaczkowych oznaczono w teście maksymalnego elektrowstrząsu i wyrażono w postaci wartości ED50 (w mg/kg), tj. w dawkach potrzebnych do ochrony 50% myszy przed aktywnością drgawkową. Podobnie, jak podczas wyznaczania progu drgawkowego, używano do wyznaczenia jednej wartości ED50 przynajmniej 4 grup zwierząt po 8 mysz każda. Myszy, którym podano różne dawki danego leku przeciwpadaczkowego, były poddawane elektrowstrząsom o natężeniu 25 mA (przy maksymalnym napięciu do 500 V) i czasie trwania wstrząsu 0,2 sekundy. Na podstawie odsetka chronionych w każdej grupie zwierząt wyznaczano zależność dawka-efekt a następnie odpowiednie wartości ED50, zgodnie z metodą *Litchfielda* i *Wilcoxona* [20].

Wpływ leków przeciwpadaczkowych w kombinacji z CPX na koordynację ruchową wyznaczano za pomocą testu komina, zgodnie z metodą Boissier i wsp. [3]. Zwierzęta musiały wspinać się tyłem przez ustawioną pionowo plastikową rurę (3 cm średnicy, 25 cm długości) i przyjęło, że niemożność wykonania tego zadania w ciągu 60 sekund świadczy o upośledzonej koordynacji ruchowej. Każda grupa doświadczalna składała się z 10 zwierząt a wynik przedstawiono w postaci odsetka myszy z upośledzoną koordynacją ruchową.

Test biernego unikania wg *Venault'a* i wsp. [28] można przyjąć za ocenę pamięci długotrwałej. Zwierzęta, po podaniu badanych substancji i leków, wprowadzano do oświetlonego pomieszczenia (10x13x15 cm), które było połączone z większym zaciemnionym pomieszczeniem (25x20x15 cm), wyposażonym w podłogę z metalowych prętów. Wejście do zaciemnionego pomieszczenia było związane ze wstrząsem elektrycznym (0,6 mA przez 2 sekundy). Zwierzęta, które nie weszły do zaciemnionego pomieszczenia w ciągu 60 sekund były eliminowane z dalszej części doświadczenia. Następnego dnia (po upływie doby) te same zwierzęta, bez podawania substancji i leków, wprowadzano ponownie do oświetlonego pomieszczenia i te, które nie wchodziły do zaciemnionego pomieszczenia przez okres 180 sekund miały całkowicie zachowaną pamięć długotrwałą. Wyniki przedstawiono jako mediany (z 25 i 75 percentylem) czasu potrzebnego do wejścia do zaciemnionego pomieszczenia. Jeśli każde zwierzę w grupie unikało wejścia przez okres 180 s wtedy i mediana i oba percentyle wynosiły 180.

Stężenie leków przeciwpadaczkowych w surowicy krwi oznaczono zgodnie z metodą *Czuczvara* i wsp. [9]. Mysiom podawano CPX (lub 1% roztwór Tweenu 80 – grupa kontrolna) w pojedynczej dawce lub przez okres dwóch tygodni a następnie podawano jednorazowo lek przeciwpadaczkowy. Po upływie odpowiedniego czasu dla danego leku przeciwpadaczkowego myszy dekapi-

towano i pobierano próbki krwi w objętości około 1 ml do heparynizowanych probówek typu Eppendorf. Następnie krew wirowano przy 10 tys. obrotów/min (Abbott centrifuge, Irving, TX, USA) przez 3 minuty i próbki osocza pipetowano do probówek filtrujących typu MPS-1 (Amicon, Danvers, MA, USA) i wirowano kolejny raz przez 5 minut. Stężenia leków w otrzymanej w ten sposób surowicy oznaczano metodą immunofluorescencji przy użyciu aparatu Abbott TDx analyzer (Abbott, Irving, TX, USA). Firmowe próbki o znanym stężeniu odpowiedniego leku zawsze dodawano do próbek doświadczalnych celem weryfikacji kalibracji urządzenia pomiarowego. Stężenia leków w surowicy przedstawiono w µg/ml jako średnie arytmetyczne ± SD (odchylenia standardowe) przynajmniej 8 oznaczeń.

W celu oznaczenia stężenia leków przeciwpadaczkowych w mózgu, mózgi ważono i homogenizowano w buforze Abbott (Abbott, Irving, TX, USA) w stosunku 2:1 (objętość:masa) za pomocą homogenizatora Ultra-Turax T8 (Staufen, RFN). Homogenaty wirowano przy 10 tys. x g (wirówka MPW-360, Mechanika Precyzyjna, Warszawa) przez 10 minut. Supernatanty w objętości 75 µl pipetowano do probówek Abbott i umieszczono w rotorze wirówki mieszczącym 20 próbek. Pomiar całkowitego stężenia leków przeciwpadaczkowych był dokonywany także metodą immunofluorescencji z każdorazową weryfikacją kalibracji. Stężenia leków przedstawiono w µg/ml mózgowego supernatantu w postaci średnich arytmetycznych ± SD przynajmniej 8 oznaczeń.

Wartości CS50 i ED50 wyznaczono i porównano statystycznie zgodnie z metodą *Litchfielda* i *Wilcoxona* [20] lub według *Łuszczkiego* i *Czuczvara* [21] w przypadku wielokrotnych porównań do tej samej grupy kontrolnej. Dane otrzymane w teście komina zostały porównane dokładnym testem *Fishera* a w teście biernego unikania-testem *Kruskala-Wallis* a następnym testem *Dunna*. Stężenia leków przeciwpadaczkowych oceniono statystycznie testem *t-Studenta* dla danych rozłącznych.

Wyniki

Substancja CPX podana jednorazowo 60 minut przed testem do dawki 10 mg/kg nie wpłynęła istotnie na próg drgawkowy. Jednakże zastosowana przewlekle w dawkach 2,5 i 5 mg/kg istotnie obniżyła próg (tabela I).

Po podaniu jednorazowym substancja CPX w dawce 2,5 mg/kg osłabiła jedynie przeciwdrgawkowe działanie fenobarbitalu, nie wpływając na efekt ochronny pozostałych leków przeciwpadaczkowych (tabela II). Po podaniu przewlekłym CPX (2,5 mg/kg) także znacznie zmniejszyła przeciwdrgawkowy efekt fenobarbitalu i dodatkowo także istotnie zredukowała ochronne efekty fenytoiny i walproinianu. Co ciekawe, nie wpłynęła na przeciwdrgawkowe działanie karbamazepiny (tabela II).

W odniesieniu do pamięci długotrwałej, ocenianej w teście biernego unikania, ani leki przeciwpadaczkowe w dawkach odpowiadających ich wartościom ED50 w teście drgawkowym ani kombinacje leków przeciwpadaczkowych z CPX (2,5 mg/kg) w układzie ostrym i przewlekłym nie wpłynęły istotnie na badany parametr. Tendencję do osłabienia pamięci obserwowano jedynie w odniesieniu do fenobarbitalu (tabela III).

Podobną zależność stwierdzono w teście komina i okazało się, że same leki przeciwpadaczkowe oraz ich kombinacje z CPX (2,5 mg/kg) w układzie ostrym i przewlekłym nie zaburzyły istotnie koordynacji ruchowej (tabela IV).

Oceniano jedynie stężenia leków przeciwpadaczkowych, których działanie zostało zmniejszone przez CPX. W układzie ostrym

Tabela I

Wpływ jednorazowego i przewlekłego podawania 8-cyklopentyl-1,3-dipropylksantyny (CPX) na próg drgawkowy w drgawkach wywołanych elektrostrząsem u myszy.

Influence of single and chronic administration of 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) on the electroconvulsive threshold in mice.

	Dawka (mg/kg) CS 50	
	po jednorazowym podaniu CPX	po przewlekłym podaniu CPX
1% Tween 80	6,4 (5,9-6,9)	5,8 (5,8-6,5)
CPX (1,25)	6,5 (6,1-6,9)	4,6 (4,2-5,2)
CPX (2,5)	6,3 (5,9-6,8)	4,3 (3,9-4,7)**
CPX (5,0)	5,8 (5,4-6,1)	4,4 (4,0-4,9)**
CPX (10)	5,8 (5,4-6,1)	NB

CS 50 (w mA) odpowiada natężeniu prądu potrzebnemu do wywołania aktywności drgawkowej u 50% badanych zwierząt. Wartości CS50 z 95% poziomami ufności obliczono metodą Litchfielda i Wilcoxon [20] a porównano według Łuszczkiego i Czuczvara [21]. CPX podawano dootrzewnowo 60 min przed testem w układzie ostrym oraz przez 14 dni dwa razy dziennie (o godz. 8 i 20) oraz 15-go dnia 60 minut przed testem drgawkowym. NB, nie badano.

** P<0,01 wobec grupy kontrolnej otrzymującej 1% roztwór Tweenu 80 (podłoże).

Tabela II

Efekt jednorazowego lub przewlekłego podawania CPX na przeciwdrgawkowe działanie leków przeciwpadaczkowych u myszy w teście maksymalnego elektrostrząsu.

Influence of a single dose and chronic administration of CPX upon the protective action of antiepileptic drugs in mice against maximal electroshock in mice.

	Dawka (mg/kg)	
	po jednorazowym podaniu CPX	po przewlekłym podaniu CPX
PB + podłoże	21,8 (19,5-24,5)	18,2 (16,3-20,3)
PB + CPX (2,5)	31,8 (29,4-34,3) **	26,1 (24,2-28,1)***
PB + CPX (1,25)	25,7 (23,5-28,2)	NB
PB + CPX (0,625)	24,0 (21,9-26,2)	NB
VPA + podłoże	239,9 (219,3-262,4)	246,9 (219,0-278,4)
VPA + CPX (2,5)	246,9 (219,0-278,4)	230,7 (212,3-250,6)*
CBZ+ podłoże	13,7 (12,1-15,4)	9,8 (8,3-11,5)
CBZ + CPX (2,5)	14,5 (12,3-17,2)	11,6 (10,5-12,9)
PHT + podłoże	8,8 (8,2-9,4)	9,6 (8,1-11,4)
PHT + CPX (2,5)	10,6 (8,8-12,8)	12,9 (11,0-15,2)*

Wyniki podano w wartościach ED50 (dawki leków w mg/kg potrzebne do ochrony 50% myszy) z 95% poziomami ufności w nawiasach. Wartości te obliczono i porównano według metody Litchfielda i Wilcoxon [20] oraz Łuszczkiego i Czuczvara [21]. Wszystkie leki przeciwpadaczkowe podawano dootrzewnowo, fenytoinę (PHT) 120 min, fenobarbital (PB) 60 min, karbamazepinę (CBZ) i walproinian (VPA) 30 min a CPX - 60 min przed testem. NB, nie badano.

*P<0,05; **P<0,001; *** P<0,001 wobec odpowiednich grup kontrolnych, które stanowiły leki przeciwpadaczkowe + podłoże.

Sposób podawania CPX podano w przypisach do tabeli I.

Tabela III

Wpływ ostrego i przewlekłego podawania CPX w kombinacjach z lekami przeciwpadaczkowymi na pamięć długoterminową w teście biernego unikania u myszy.

Influence of a single dose and chronic administration of CPX in combination with antiepileptic drugs on long term memory in mice in passive avoidance test.

Wyniki przedstawiono jako mediany (z 25 i 75 percentylem) czasu wejścia zwierząt do zaciemnionego pomieszczenia (szczegóły podano w metodyce). Porównań statystycznych dokonano testem Kruskala-Wallis z następowym testem Dunna. Dawki leków przeciwpadaczkowych są równe odpowiednim wartościom ED50. Szczegóły podawania leków i CPX oraz stosowane skróty są w przypisach do tabeli II.

Ostre podanie CPX (mg/kg)		Przewlekłe podawanie CPX (mg/kg)	
	Czas wejścia (s)		Czas wejścia (s)
Podłoże	180 (180-180)	Podłoże	180 (180-180)
CPX(2,5)+podłoże	180 (140-180)	CPX(2,5)+podłoże	180 (101-180)
VPA(239,9)+podłoże	180 (119-180)	VPA(202,3)+podłoże	180 (115-180)
VPA(246,9)+podłoże	180 (180-180)	VPA(230,7)+podłoże	180 (170-180)
VPA(246,9)+CPX(2,5)	180 (148-180)	VPA(230,7)+CPX(2,5)	180 (148-180)
PHT(8,8)+podłoże	180 (165-180)	PHT(9,6)+podłoże	180 (151-180)
PHT(10,6)+podłoże	180 (119-180)	PHT(12,9)+podłoże	180 (110-180)
PHT(10,6)+CPX(2,5)	180 (128-180)	PHT(12,9)+CPX (2,5)	180 (128-180)
CBZ(10,7)+podłoże	180 (150-180)	CBZ(9,8)+podłoże	180 (120-180)
CBZ(12,8)+podłoże	180 (148-180)	CBZ(11,6)+podłoże	180 (120-180)
CBZ(12,8)+CPX(2,5)	180 (101-180)	CBZ(11,6) CPX(2,5)	180 (101-180)
PB(21,8)+podłoże	180 (101-180)	PB(18,2)+podłoże	101 (70-180)
PB(31,8)+podłoże	101 (67-180)	PB(26,1)+podłoże	180 (101-180)
PB(31,8)+CPX(2,5)	180 (90-180)	PB(26,1)+CPX(2,5)	180 (90-180)

CPX nie wpłynął na stężenie fenobarbitalu w surowicy krwi i w mózgu. W układzie przewlekłym nie zanotowano zmian stężenia leków przeciwpadaczkowych w surowicy. W mózgu natomiast CPX podwyższał w układzie przewlekłym stężenia fenobarbitalu i walproinianu, pozostając bez wpływu na stężenie fenytoiny (tabela IV).

Dyskusja

Wyniki wskazują, iż CPX obniżał próg drgawkowy w układzie przewlekłym ale nie ostrym. Co prawda istnieją wyniki wskazujące, iż antagoniści receptorów A1 w układzie ostrym obniżają próg drgawkowy [8,29,30], dotyczy to jednak innych modeli drgawkowych. Warto jest zaznaczyć, iż w drgawkach wywołanych elektrostrząsem progę nie obniżyły również inne po-

chodne ksantyny podawane jednorazowo - kofeina, diprofilina i pentoksyfilina [6]. Z drugiej strony istnieje szereg danych wskazujących na przeciwdrgawkowe działanie agonistów receptorów adenylinowych A1 [4,30,34].

Jednakże przewlekłe podawanie antagonistów receptorów A1 może skutkować działaniem przeciwnym do ostrego i powodować efekt przeciwdrgawkowy [30]. Po-

Tabela IV

Wpływ ostrego i przewlekłego stosowania CPX w kombinacjach z lekami przeciwpadaczkowymi na koordynację ruchową w teście kolumna.

Influence of a single dose and chronic administration of CPX in combination with antiepileptic drugs on motor performance of mice in the chimney test.

Wyniki przedstawiono jako procent zwierząt w grupie wykazujących zaburzenia koordynacji ruchowej. Dawki leków przeciwpadaczkowych są ich odpowiednimi wartościami ED50. Porównania statystyczne przeprowadzono dokładnym testem Fishera. Zasady podawania leków przeciwpadaczkowych i CPX oraz zastosowane skróty podano w przypisach do tabeli II.

Ostre podanie CPX (mg/kg)		Przewlekłe podanie CPX (mg/kg)	
	Deficyt koordynacji (%)		Deficyt koordynacji (%)
Podłoże	0	Podłoże	0
CPX (2,5) + podłoże	0	CPX (2,5) + podłoże	0
VPA (239,9) + podłoże	10	VPA (202,3) + podłoże	10
VPA (246,9) + podłoże	20	VPA (246,9) + podłoże	20
VPA (246,9) + CPX (2,5)	10	VPA (230,7) + CPX (2,5)	20
PHT (8,8) + podłoże	10	PHT (9,6) + podłoże	0
PHT (10,6) + podłoże	10	PHT (12,9) + podłoże	10
PHT (10,6) + CPX (2,5)	10	PHT (12,9) + CPX (2,5)	10
CBZ (10,7) + podłoże	0	CBZ (9,8) + podłoże	0
CBZ (12,8) + podłoże	10	CBZ (11,6) + podłoże	10
CBZ (12,8) + CPX (2,5)	10	CBZ (12,8) + CPX (2,5)	10
PB (21,8) + podłoże	0	PB (18,2) + podłoże	10
PB (31,8) + podłoże	20	PB (26,1) + podłoże	20
PB (31,8) + CPX (2,5)	10	PB (26,1) + CPX (2,5)	20

Tabela V

Wpływ ostrego i przewlekłego podawania CPX na stężenie leków przeciwpadaczkowych w surowicy krwi i w mózgu myszy.

Influence of acute and chronic CPX on free plasma and brain concentration of antiepileptic drugs in mice.

Lek (mg/kg)	Stężenie w mózgu (µg/ml)	Stężenie w surowicy krwi (µg/ml)
Ostre podanie CPX (mg/kg)		
PB (31,8) + podłoże	8,10 ± 0,48	9,2 ± 0,42
PB (31,8) + CPX (2,5)	8,41 ± 0,87	9,8 ± 0,68
Przewlekłe podawanie CPX (mg/kg)		
PB (26,1) + podłoże	7,27 ± 0,92	21,14 ± 1,44
PB (26,1) + CPX (2,5)	8,65 ± 0,63*	21,0 ± 1,40
PHT (9,6) + podłoże	0,43 ± 0,065	0,56 ± 0,67
PHT (9,6) + CPX (2,5)	0,48 ± 0,08	0,82 ± 0,29
VPA (230,7) + podłoże	28,52 ± 8,94	62,4 ± 10,2
VPA (230,7) + CPX (2,5)	40,0 ± 6,22*	70,7 ± 12,2

Wyniki są średnimi arytmetycznymi z wartościami odchylenia standardowego i zostały wyrażone w µg/ml surowicy lub supernatantu mózgowego. Grypy doświadczalne liczyły przynajmniej 8 myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta dla danych rozłącznych. Dawki leków przeciwpadaczkowych są odpowiednimi wartościami ED50 z testu maksymalnego elektrowstrząsu. Szczegóły podawania leków przeciwpadaczkowych i CPX oraz odpowiednie skróty podano w przypisach do tabeli II.

* P<0,05 wobec odpowiedniej grupy kontrolnej.

dobnie, przewlekłe podawanie nieselektywnych antagonistów receptorów adenozytowych, kofeiny i teofiliny wywierało działanie przeciwdrgawkowe w drgawkach wywołanych bikukulina, pentylenetetrazolem i kwasem N-metylo-D-asparaginowym [17,26,31], podczas gdy ich podanie ostre powoduje efekt prodrgawkowy w drgawkach chemicznych i rozniecanych z jądra migdałowego [1,9,27]. Co ciekawe, przewlekłe stosowanie kofeiny nie miało większego wpływu na próg drgawkowy dla elektrowstrząsu u myszy [15].

Powstaje pytanie, czy obserwowany efekt prodrgawkowy CPX w niniejszej pracy może mieć związek z gęstością receptorów adenozytowych. Wydaje się to mało prawdopodobne, ponieważ przewlekłe stosowanie kofeiny zmieniało odpowiedź drgawkową na zastosowany kwas N-metylo-D-asparaginowy, jednakże nie zaobserwowano wpływu kofeiny na gęstość receptorów A1 [17].

Jak już wspomniano wcześniej, substancja CPX osłabiała po zastosowaniu przewlekłym ochronne działanie trzech leków przeciwpadaczkowych – fenobarbitalu, fenyto-

iny i walproinianu, nie wpływając na efekt przeciwdrgawkowy karbamazepiny. Warto w tym miejscu pokrótce scharakteryzować mechanizmy działania w/w leków przeciwpadaczkowych. Głównym mechanizmem działania fenobarbitalu jest aktywacja kompleksu receptorowego GABA-A poprzez specyficzne miejsce wiążące barbiturany oraz hamowanie neuroprzekaznictwa glutaminianoergicznego poprzez subpopulację receptorów – tzw. receptory AMPA/KA [5]. Nieselektywny antagonist receptorów adenozytowych (A1 i A2), kofeina, po podaniu ostrym i przewlekłym istotnie osłabiał przeciwdrgawkowy efekt fenobarbitalu w teście maksymalnego elektrowstrząsu u myszy. To niekorzystne działanie kofeiny było silniejsze po podaniu przewlekłym [6,15]. Do chwili obecnej wpływ selektywnej blokady receptorów A1 na działanie fenobarbitalu został zbadany w układzie ostrym. Wybiórczy antagonist receptorów A1, DPCTX osłabiał przeciwdrgawkowy efekt tego leku przeciwpadaczkowego w drgawkach wywołanych toksyną mitochondrialną – kwasem 3-nitropropionowym [36] i nie wpłynął na działanie ochronne fenobarbitalu w drgawkach pen-

tetrazolowych [22]. Warto jest podkreślić, iż substancja CPX po podaniu ostrym nie wpłynęła na stężenie fenobarbitalu w mózgu a po podaniu przewlekłym wręcz je zwiększała, więc mechanizm farmakokinetyczny nie leży u podłoża obserwowanej interakcji farmakodynamicznej. Można stwierdzić, że antagonist farmakodynamiczny pomiędzy CPX a fenobarbitem jest tak silny, że nie jest w stanie mu przeciwdziałać podniesienie stężenia tego leku w mózgu.

Fenytoina blokuje zależny od potencjału kanał sodowy [5] a także uważa się, że hamuje wchłanianie zwrotne adenozyne ze szczeliny synaptycznej [23,24]. We wcześniejszych badaniach okazało się, że kofeina zmniejszała efekt przeciwdrgawkowy fenytoiny w teście maksymalnego elektrowstrząsu u myszy zarówno w układzie ostrym jak i przewlekłym [6,16]. Ponieważ osłabiający efekt substancji CPX na przeciwdrgawkowe działanie fenytoiny nie był związany z modyfikacją stężenia tego leku w mózgu, wynik interakcji nie ma podłoża farmakokinetycznego.

Przeciwdrgawkowe działanie walproinianu wydaje się być sumą kilku mechanizmów,

z których na plan pierwszy wysuwają się: blokada zależnych od potencjału kanałów sodowych i wapniowych typu T, zwiększona synteza i zwolniony rozkład GABA i hamowanie odpowiedzi z receptorów glutamianeroergicznymi dla kwasu N-metylo-D-asparaginowego [5]. Pomimo wielokierunkowego mechanizmu działania, walproinian był wrażliwy na niekorzystne działanie kofeiny w układzie ostrym i przewlekłym, przy czym przewlekle stosowana kofeina istotnie silniej odwracała efekt przeciwdrgawkowy tego leku w drgawkach wywołanych maksymalnym elektrowstrząsem u myszy [6,15]. Podobnie jak w przypadku fenobarbitalu, stężenie walproianu w mózgu było zwiększane przez CPX w układzie przewlekłym a więc był to efekt przeciwny w stosunku do obserwowanego efektu końcowego, którym było obniżenie efektywności walproinianu. Interakcja farmakokinetyczna nie może więc leżeć u podłoża niekorzystnej interakcji pomiędzy CPX i walproinianem. Podanie selektywnego antagonisty A1, substancji DPCPX, osłabiło także działanie przeciwdrgawkowe walproinianu w drgawkach wywołanych kwasem 3-nitropropionowym u myszy [36]. Może to świadczyć o wrażliwości walproinianu na niekorzystne działanie pochodnych ksantyny, tym bardziej, że nieselektywny antagonistą receptorów adenozytowych, CGS 15943A, nie będący pochodną ksantyny, nie zmieniał przeciwdrgawkowej efektywności walproinianu w teście maksymalnego elektrowstrząsu u myszy [7]. Ta ciekawa zależność może także świadczyć, że niekorzystna interakcja pochodnych ksantyny z lekami przeciwpadaczkowymi nie musi być w pełni zależna od blokady receptorów A1. Z drugiej strony substancja ta osłabiła efekt ochronny fenytoiny [7], więc w odniesieniu do tego leku blokada receptorów adenozytowych A1 może mieć znacznie.

Karbamazepina stabilizuje nieaktywną formę zależnego od potencjału kanału sodowego i blokuje kanały wapniowe typu L [7]. Warto jest także podkreślić, iż karbamazepina posiada własność liganda receptorów adenozytowych A1 i A2 [14,32] a według *Biber* i wsp. [2] jest wręcz antagonistą receptorów adenozytowych A1. W związku z tym przeciwdrgawkowa efektywność karbamazepiny byłaby wypadkową mechanizmów korzystnych (blokada kanałów sodowych i wapniowych) oraz niekorzystnych (blokada receptorów adenozytowych). Blokowanie przez karbamazepinę receptorów adenozytowych A1 mogłoby częściowo tłumaczyć jej oporność na niekorzystny efekt CPX. Częściowo dlatego, ponieważ kofeina zarówno w układzie ostrym jak i przewlekłym osłabiła efekt przeciwdrgawkowy tego leku przeciwpadaczkowego [6,16].

CPX poza niekorzystnym wpływem na ochronne działanie fenobarbitalu, fenytoiny i walproinianu nie wpływał na neurotoksyczne efekty leków przeciwpadaczkowych oceniane w teście komina i biernego unikania.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że pochodna ksantyny wybiórczo blokująca receptory adenozytowe A1, CPX, generalnie potwierdza niekorzystną interakcję innych pochodnych ksantyny-kofeiny i teofiliny z lekami przeciwpadaczkowymi, chociaż blokada receptorów adenozytowych A1 prawdopodobnie jest zaangażowana jedynie w osłabianie efektu przeciwdrgawkowego fenytoiny. Ponadto w układzie ostrym niekorzystne działanie CPX było słabsze w porównaniu z kofeiną i teofiliną, które zmniejszały efektywność wszystkich podstawowych leków przeciwpadaczkowych.

Piśmiennictwo

1. **Albertson T.E., Stark L.G., Joy R.M., Bowyer J.F.:** Aminophylline and kindled seizures. *Exp. Neurol.* 1983, 81, 703.
2. **Biber K., Fiebich B.L., Gebicke-Harter P., van Calker D.:** Carbamazepine-induced upregulation of adenosine A1-receptors in astrocyte cultures affects coupling to the phosphoinositid signaling pathway. *Neuropsychopharmacology* 1999, 20, 271.
3. **Boissier J.R., Tardy J., Diverres J.C.:** Une nouvelle methode simple pour explorer l'action tranquilisante: le test de la cheminee. *Med. Exp. (Basel)*, 1960, 3, 81.
4. **Borowicz K.K., Luszczycki J., Czuczwar S.J.:** 2-Chloroadenosine, a preferential agonist of adenosine A1 receptors, enhances the anticonvulsant activity of carbamazepine and clonazepam in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2002, 12, 173.
5. **Czapiński P., Błaszczyk B., Czuczwar S.J.:** Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, 5, 3.
6. **Czuczwar S.J., Gašior M., Janusz W. et al.:** Influence of different methylxanthines on the anticonvulsant action of common antiepileptic drugs in mice. *Epilepsia* 1990, 31, 318.
7. **Czuczwar S.J., Janusz W., Szczepanik B., Kleinrok Z.:** Influence of CGS 15943 A (a nonxanthine adenosine antagonist) on the protection offered by a variety of antiepileptic drugs against maximal electroshock-induced seizures in mice. *J. Neural Transm.* 1991, 86, 127.
8. **De Sarro G., De Sarro A., Di Paola E.D., Bertorelli R.:** Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible DBA/2 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 371, 137.
9. **Dragunow M.:** Adenosine receptor antagonism accounts for the seizure-prolonging effects of aminophylline. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1990, 36, 751.
10. **Dragunow M., Faull R.L.:** Neuroprotective effects of adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988, 9, 193.
11. **Dunwiddie T.V., Worth T.:** Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982, 1, 70.
12. **Dunwiddie T.V.:** Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia* 1980, 21, 541.
13. **Fredholm B.B., Dunwiddie T.V.:** How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol. Sci.* 1988, 9, 130.
14. **Fujiwara Y., Sato M., Otsuki S.:** Interaction of carbamazepine and other drugs with adenosine (A1 and A2) receptors. *Psychopharmacology* 1986, 90, 332.
15. **Gašior M., Borowicz K., Buszewicz G. et al.:** Anticonvulsant activity of phenobarbital and valproate against maximal electroshock in mice during chronic treatment with caffeine and caffeine discontinuation. *Epilepsia* 1996, 37, 262.
16. **Gašior M., Borowicz K., Kleinrok Z., Czuczwar S.J.:** Chronic caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs against maximal electroshock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996, 54, 639.
17. **Georgiev V., Johansson B., Fredholm B.B.:** Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice with-

out changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Res.* 1993, 612, 271.

18. **Heinbockel T., Pape H.C.:** Modulatory effects of adenosine on inhibitory postsynaptic potentials in the lateral amygdala of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1999, 128, 190.
19. **Lee K.S., Schubert P., Heinemann U.:** The anticonvulsant action of adenosine: a postsynaptic, dendritic action by a possible endogenous anticonvulsant. *Brain Res.* 1984, 321, 160.
20. **Litchfield J.T., Wilcoxon F.:** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1949, 96, 99.
21. **Luszczycki J.J., Czuczwar S.J.:** How significant is the difference between drug doses influencing the threshold for electroconvulsions? *Pharmacol. Rev.* 2005, 57, 782.
22. **Malhotra J., Gupta Y.K.:** Effect of adenosinergic modulation on the anticonvulsant effect of phenobarbitone and carbamazepine. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1999, 21, 79.
23. **Phillis J.W., Wu P.H.:** The effect of various centrally active drugs on adenosine uptake by the central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol. C* 1982, 72, 179.
24. **Phillis J.W.:** Interactions of the anticonvulsants diphenylhydantoin and carbamazepine with adenosine on cerebral cortical neurons. *Epilepsia* 1984, 25, 765.
25. **Pourgholami M.H., Mirnajafi-Zadeh J., Behzadi J.:** Effect of intraperitoneal and intrahippocampal (CA1) 2-chloroadenosine in amygdaloid kindled rats. *Brain Res.* 1997, 751, 259.
26. **Sanders R.C., Murray T.F.:** Temporal relationship between A1 adenosine receptor upregulation and alterations in bicuculline seizure susceptibility in rats. *Neurosci. Lett.* 1989, 101, 325.
27. **Turski W.A., Cavalheiro E.A., Ikonomidou C.:** Effects of aminophylline and 2-chloroadenosine on seizures produced by pilocarpine in rats: morphological and electroencephalographic correlates. *Brain Res.* 1985, 361, 309.
28. **Venault P., Chapouthier G., De Carvalho L.P. et al.:** Benzodiazepines impair and beta-carbolines enhance performance in learning and memory task. *Nature* 1986, 321, 864.
29. **Vianna E.P., Ferreira A.T., Dona F. et al.:** Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia* 2005, 46, 166.
30. **Von Lubitz D.K., Paul I.A., Carter M., Jacobson K.A.:** Effects of N6-cyclopentyl adenosine and 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 249, 265.
31. **Von Lubitz D.K., Paul I.A., Ji X.D. et al.:** Chronic adenosine A1 receptor agonist and antagonist: effect on receptor density and N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 253, 95.
32. **Weir R.L., Padgett W., Daly J.W., Anderson S.M.:** Interaction of anticonvulsant drugs with adenosine receptors in the central nervous system. *Epilepsia* 1984, 25, 492.
33. **Yokoyama N., Mori N., Kumashiro H.:** Chemical kindling induced by cAMP and transfer to electrical kindling. *Brain Res.* 1989, 492, 158.
34. **Zhang G., Franklin P.H., Murray T.F.:** Activation of adenosine A1 receptors underlies anticonvulsant effect of CGS21680. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 255, 239.
35. **Zhang G., Franklin P.H., Murray T.F.:** Activation of adenosine receptors suppresses behavioral seizures induced by kainic acid in the rat prepiriform cortex. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 1989, 32, 149.
36. **Zuchora B., Wielosz M., Urbańska E.M.:** Adenosine A1 receptors and the anticonvulsant potential of drugs effective in the model of 3-nitropropionic acid-induced seizures in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2005, 15, 85.