



С.В. Романенко¹, П.Г. Костюк², Е.П. Костюк²

¹ Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ

² Інститут фізіології ім. А. А. Богомольця НАН України, Київ

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «ГАБАГАММА» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ПОЛИНЕЙРОПАТИЙ



Исследовано влияние антиболевого препарата нового поколения «габагамма» для лечения нейропатических нарушений при сахарном диабете. Показана специфическая избирательность препарата «габагамма». Сделаны выводы о возможности длительного применения габагаммы как самостоятельного анальгетика для лечения болевых синдромов.

Ключевые слова: габагамма, нейропатия, диабет, нейроны дорсальнокорешковых ганглиев.

Габагамма — вещество, которое было синтезировано как химический аналог гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и относится к классу ГАМК-подобных блокаторов кальциевых каналов. Изначально этот препарат использовался для лечения эпилептических припадков и спазматических состояний. Однако эффективность *габагаммы* как антиэпилептического препарата оказалась низкой. Было замечено также, что *габагамма* проявляет анальгетические свойства и при этом демонстрирует низкий уровень побочных эффектов. Так, было установлено, что этот агент аттенюирует болевые ощущения в экспериментах на животных при формалиновом тесте (вторая фаза), тесте на одергивание хвоста, тесте «горячая поверхность», а также в моделях раковой боли, послеоперационных болях и при болевых синдромах, обусловленных воспалением (карадженовая модель). Также *габагамма* был эффективен при применении в экспериментальных моделях нейропатических болей,

обусловленных перерезанием спинальных нервов, неполным перерезанием седалищного нерва, перетягиванием нервов, а также постгерпетических болей [1]. Четкий механизм действия данного агента в данное время остается не выясненным, однако известно, что *габагамма* блокирует потенциалзависимые кальциевые каналы плазматической мембраны нейронов. Интратекальное введение препарата *габагамма*, а также исследования на нейронах заднего рога спинного мозга показали высокую эффективность препарата при подавлении болевых ощущений и трансмембранных токов соответственно [2]. Исследования на нейронах спинальных ганглиев также продемонстрировали подавление кальциевых токов в условиях аппликации *габагаммы* в микромолярных концентрациях [3]. Однако нет достаточно данных о действии *габагаммы* на разные типы нейронов дорсальнокорешковых ганглиев (ДКГ). По своим свойствам нейроны ДКГ разделяются на низкопороговые проприорецепторы и высокопороговые ноцицепторы. Первые проводят неболевую сенсорную информа-



цию и имеют большой размер сомы, последние обладают рядом рецепторов с высоким порогом возбудимости или специфичностью к эндогенным болевым агентам и обладают малым и средним размером сомы. Ноцицептивные нейроны этих двух групп, в свою очередь, также имеют существенные отличия. Так, ноцицептивные нейроны малого размера представляют волокна С-типа, а нейроны среднего размера — волокна Аδγ-типа [4]. Кроме того, нейроны этих двух групп отличаются миелинизацией терминалей, скоростью проведения импульсов, характером экспрессии каналов и рецепторов и, следовательно, чувствительностью к анальгетическим агентам [5]. Целью наших исследований было изучение особенностей влияния препарата *габагамма* на различные типы нейронов ДКГ в норме и при полинейропатических расстройствах, обусловленных развитием стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета, а также выяснение перспективы использования данного агента при нарушении функции нейронов ДКГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наших экспериментах мы использовали нейроны ДКГ самцов крыс линии Вистар в возрасте 6–8 недель (в условиях острого эксперимента). Для проведения исследований при экспериментальном сахарном диабете использовали крыс той же линии, но предварительно в возрасте 21 дня получивших инъекцию стрептозотина (80 мг на кг массы тела). Через 3 недели после инъекции животные диагностировались на факт развития диабета по показаниям уровня глюкозы крови и внешним признакам развития заболевания.

Выделенные нейроны ДКГ разделяли на три группы: нейроны с малым диаметром сомы (менее 25 мкм), нейроны со средним диаметром сомы (от 25 до 25 мкм) и нейроны с большим диаметром сомы (более 35 мкм) [6].

Исследование влияния *габагаммы* на данные группы нейронов проводили при помощи флуоресцентного метода регистрации концентра-

ции внутриклеточного кальция. Для этого в исследуемые нейроны вводили кальцийчувствительный флуоресцентный зонд Fura-2 в его мембранпроницаемой ацетоксиметильной форме. В результате приложения к нейронам гиперкалиевого раствора (50 мМ) регистрировали кривые изменения внутриклеточной концентрации кальция — кальциевые транзисты, что позволяло оценить состояние функционирования внутриклеточных кальцийрегулирующих структур. Влияние исследуемого препарата на нейроны ДКГ оценивалось по изменениям соответствующих кальциевых транзистов после предварительной инкубации клеток в нормальном физиологическом растворе (раствор Тироде) с добавлением *габагаммы* (25 мкМ) на протяжении 5 мин перед деполяризацией [7]. Для сравнения использовался предварительный контрольный транзист, а для оценки постаппликационного эффекта *габагаммы* на нейроны использовали дополнительный транзист, получаемый после 3-минутного отмывания клеток в нормальном физиологическом растворе.

Результаты экспериментов на здоровых животных приведены в табл. 1. Аппликация *габагаммы* на нейроны большого размера не обнаружила каких-либо значимых изменений в амплитуде кальциевых транзистов. Такой же результат наблюдался и для значений общей длительности транзиста, а также длительности транзиста на уровне половины амплитуды для этой группы нейронов. Для группы средних нейронов было обнаружено значительное снижение амплитуды транзистов на 27,5 % по сравнению с соответствующим контрольным значением. Изменения длительности транзиста составило 34 % увеличения, а изменения ширины на уровне половины амплитуды показали 6 % увеличения, однако данные изменения временных характеристик не были достоверными согласно критерию Стьюдента. Среди малых нейронов изменения в значениях аналогичных параметров относительно контрольных были незначительными и составляли со-

ответственно 5 % уменьшения амплитуды транзиентов, 14 % увеличения их длительности и 6 % увеличения длительности на уровне половины амплитуды. Таким образом, наиболее характерные изменения наблюдались в значениях амплитуды транзиентов, что указывает на потенциалуправляемые кальциевые каналы как основную причину изменений в транзиентном повышении внутриклеточного кальция. Это говорит о том, что эффект аппликации *габагаммы* на нейроны ДКГ обусловлен действием этого агента на потенциалуправляемые кальциевые каналы нейронов. Учитывая, что сколь-либо значительного эффекта аппликации препарата на большие нейроны обнаружено не было, можно заключить, что среди мишеней *габагаммы* нет кальциевых каналов *L*-типа, так как эти каналы характерно экспрессируются в сомах нейронов ДКГ разных типов. Кроме того, это может объяснить низкий уровень побочных эффектов вызываемых действием *габагаммы*. Кальциевые каналы *L*-типа широко распространены среди разных тканей организма. Препараты, влияющие на активность этих каналов, приводят к существенным вазодилататорным или вазоконстрикторным эффектам и могут влиять на работу

сердца и нервной системы. Исследования других авторов показывают, что характерной особенностью *габагаммы* является способность этого агента связываться не с порообразующей головной субъединицей канала, а с вспомогательной $\alpha_2\delta$ и таким образом влиять на активность кальциевого канала. Разные типы этой субъединицы с разной аффинностью связываются с *габагаммы* [8]. Так, третий и четвертый типы не реагируют с *габагаммы*. Наиболее эффективно *габагамма* связывается с первым типом $\alpha_2\delta$ субъединицы и меньше — со вторым типом. В то же время эти два типа вспомогательной субъединицы образуют каналные комплексы кальциевых каналов *T*- и *N*-типов.

В экспериментах мы использовали 20-миллимолярный гиперкалиевый раствор, который приводит к незначительному смещению мембранного потенциала. Заметных изменений в кальциевых транзиентах, соответствующих данному уровню деполяризации, нами замечено не было. Этот результат может указывать на то, что *T*-тип кальциевых каналов не является мишенью для *габагаммы*. Таким образом, наиболее вероятным кандидатом для взаимодействия с *габагаммой* является *N*-тип

Таблица 1

Значения характерных параметров кальциевых транзиентов нейронов ДКГ здоровых животных

Группы нейронов ДКГ	Характеристики кальциевых транзиентов	Контрольный транзиент	Транзиент под действием габагаммы	Транзиент после отмывания
Большие	Амплитуда	396,91 ± 64,6	380,7 ± 70,3	381,6 ± 72,7
	Длительность	55,3 ± 14,8	63,2 ± 14,8	50,4 ± 14,7
	Длительность на уровне половины амплитуды	17,3 ± 5,8	18,4 ± 3,7	19,9 ± 6,2
Средние	Амплитуда	391,6 ± 30,6	284 ± 59,5	351,2 ± 43,3
	Длительность	31,3 ± 11,2	42 ± 13,5	40,1 ± 12
	Длительность на уровне половины амплитуды	12 ± 4,1	12,75 ± 3,8	13,7 ± 4,3
Малые	Амплитуда	408,7 ± 16,2	381,5 ± 50,1	411,6 ± 22,6
	Длительность	44,5 ± 14,2	54,5 ± 17,5	62,6 ± 19,9
	Длительность на уровне половины амплитуды	12,4 ± 3,8	13,7 ± 5,1	11,8 ± 3,5

кальциевых каналов [9]. Этот тип кальциевых каналов характерен для нервной ткани, что согласуется с фактом низких побочных эффектов, однако эти каналы представлены как в средних, так и в малых нейронах ДКГ. Слабый эффект *габагаммы* на нейронах малого размера может быть результатом особенностей экспрессии каналообразующих и вспомогательных субъединиц кальциевых каналов в разных нейронах ДКГ. Важным результатом данного исследования является тот факт, что *габагамма* проявляет специфическое действие на ионоцептивные нейроны, что делает этот препарат весьма перспективным для дальнейшего использования в медицинских целях.

Развитие полинейропатического болевого синдрома является одним из сопутствующих осложнений при диабете [10]. Для выяснения эффективности действия препарата *габагаммы* на нейроны ДКГ при нейропатических нарушениях в периферических нервах была проведена серия опытов на крысах со стрептозотин-индуцированным сахарным диабетом. Протокол проведения опытов был аналогичен протоколу для здоровых животных. Результаты приведены в табл. 2.

Значение изменения амплитуды кальциевого транзиента под действием *габагаммы* по сравнению с контрольным транзиентом для малых нейронов составило 7,8 % уменьшения. Значения длительности транзиента, а также его длительности на уровне половины амплитуды уменьшились на 7,5 % и 27,6 % соответственно по сравнению с контрольными значениями, что сходно с данными, полученными для здоровых животных. Следует отметить, что наибольшие изменения наблюдались в длительности транзиента на уровне половины амплитуды. Это факт примечателен тем, что в условиях развития диабета в нейронах ДКГ наблюдается характерное затягивание временной протяженности транзиента. В группе средних нейронов изменение величины амплитуды составило 20 % уменьшения, для длительности — 1,5 % уменьшения и для длительности на уровне половины амплитуды — 8,1 % уменьшения. Сравнительно с эффектом действия *габагаммы* на нейроны ДКГ здоровых животных эффективность действия препарата оказалась пониженной. Более детальный анализ данных и разделение животных с сахарным диабетом по типу невропатического расстрой-

Таблица 2

Значения характерных параметров кальциевых транзиентов нейронов ДКГ животных со стрептозотин-индуцированным сахарным диабетом

Группы нейронов ДКГ	Характеристики кальциевых транзиентов	Контрольный транзиент	Транзиент под действием <i>габагаммы</i>	Транзиент после отмывания
Большие	Амплитуда	445,4 ± 35,5	285,9 ± 36,0	428,1 ± 24,3
	Длительность	198,6 ± 35,5	59,6 ± 18,6	144,5 ± 29,6
	Длительность на уровне половины амплитуды	15 ± 4,4	13,1 ± 3,5	12,2 ± 2,5
Средние	Амплитуда	439,9 ± 25,2	352,1 ± 87,78	395,7 ± 50,7
	Длительность	135,1 ± 27,9	133,5 ± 33,1	133,3 ± 35,7
	Длительность на уровне половины амплитуды	14,1 ± 2,1	12,9 ± 2,4	15,6 ± 3,8
Малые	Амплитуда	442,4 ± 34,7	407,9 ± 34,2	439,3 ± 13,5
	Длительность	113 ± 18,1	104,6 ± 10,7	90,2 ± 14,1
	Длительность на уровне половины амплитуды	18,4 ± 3,2	13,1 ± 1,2	13,7 ± 2,8

ства показал, что в случае развития гипералгезии у этой группы животных эффективность действия *габагаммы* намного выше по сравнению с показателями для здоровых животных. И для группы больших нейронов аналогичные изменения амплитуды, полной длительности и длительности на уровне половины амплитуды составили 35,9 %, 70 % и 22,3 % уменьшения соответственно. Этот результат в отличие от предыдущих двух не подобен аналогичному для больших нейронов ДКГ здоровых крыс. Несмотря на это, полученный результат согласуется с результатами других исследований, показавших, что в условиях развития стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета большие нейроны ДКГ приобретают способность к аномальной сигнальной активности и могут принимать участие в формировании нейропатических болевых ощущений [11, 12]. Одной из причин таких аномальностей является изменение характера экспрессии трансмембранных белковых структур, что в свою очередь может быть причиной эффективного действия *габагаммы* на больших нейронах ДКГ животных с сахарным диабетом.

На основе проведенных исследований можно заключить, что *габагамма* имеет высокую специфичность к первичным ноцицептивным нейронам с миелинизированными волокнами как в нормальных условиях, так и в условиях нейропатических расстройств при сахарном диабете. Изменения временных характеристик кальциевых транзиентов диабетических животных под действием *габагаммы* указывают на нормализующий эффект этого агента на кальциевую динамику в нейронах ДКГ. Таким образом, этот препарат может быть эффективен для обезболивания при острых болевых ощущениях. *Габагамму* также можно эффективно использовать при развивающейся болевой гиперчувствительности у больных диабетом. Отличительным свойством *габагаммы* является отсутствие влияния на нейроны, не принимающие участия в формировании болевых ощущений, в результате чего этот агент имеет ми-

нимум побочных эффектов по сравнению с другими блокаторами кальциевых каналов. Это означает, что препарат *габагамма* может применяться длительное время в широком диапазоне дозирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jen-Kun Cheng, Lih-Chu Chio*. Mechanisms of the Antinociceptive Action of Gabapentin // *J Pharmacol Sci.* — 2006. — № 10. — P. 471–486.
2. *Shimoyama N., Shimoyama M., Davis A.M.* Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test // *Neurosci. Lett.* — 1997. — № 1(222). — P. 65–67.
3. *Романенко С.В., Костюк П.Г., Костюк Е.П.* Вплив габапентину на кальцієві транзиенти в нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв щурів // *Нейрофізіологія.* — 2008. — № 4(40). — С. 281–287.
4. *Ганюг В.Ф.* Фізіологія людини. — Львів. — БаК, 2002. — 784 с.
5. *Guyton A., Hall J.* *Medical physiology.* — Elsevier. — Printed in China, 2006. — P. 1116.
6. *Scroggs R.S., Fox A.P.* Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size // *The J. Physiology.* — 1992. — № 1(442). — P. 639–658.
7. *Sutton K.G., Martin D.J., Pinnock R.D.* Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones // *British J. Pharm.* — 2002. — № 1(135). — P. 257–265.
8. *Marais E., Klugbauer N., Hofmann F.* Calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits-structure and gabapentin binding // *Mol Pharmacol.* — 2001. — № 5(59). — P. 1243–1248.
9. *Luo Z. D., Chaplan S. R., Yaksh T. N.* Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha_2\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats // *J. Neurosci.* — 2001. — №. 6(21). — P. 1868–1875.
10. *Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О.* Іони кальцію у функції мозку — від фізіології до патології. — К.: Наук. думка, 2005. — 198 с.
11. *Hong S., Wiley J.W.* Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in expression and function of vanilloid receptor 1 // *J. Biol. Chem.* — 2005. — № 1 (280). — P. 618–627.
12. *Hong S., Agresta L., Guo C.* The TRPV1 is associated with peripheral stress in large dorsal root ganglion neurons in early diabetic sensory neuropathy // *J. Neurochem.* — 2008. — № 4(105). — P. 1212–1222.



С.В. Романенко, П.Г. Костюк, О.П. Костюк

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТУ
«ГАБАГАММА» ПРИ ЛІКУВАННІ ДІАБЕТИЧНИХ
ПОЛІНЕЙРОПАТІЙ

Досліджено вплив антибольового препарату нового покоління «габагаммы» для лікування нейропатичних розладів при цукровому діабеті. Показана специфічна вибірковість препарату «габагаммы». Зроблено висновки про можливість застосування «габагаммы» як самостійного анальгетика для лікування больових синдромів.

Ключові слова: габагама, нейропатія, діабет, нейрони дорсальнокорінцевих гангалієв.

S.V. Romanenko, P.G. Kostyuk, E.P. Kostyuk

«GABAGAMMA» APPLICATION PROSPECTS
IN DIABETIC NEUROPATHY TREATMENT

The effects of new generation analgetic drug «Gabagamma» for neuropathic disorders treatment in diabetes was studied. «Gabagamma» specific selectivity was shown. Conclusions on the possibility of «Gabagamma» application as self-sufficient pain reliever in pain syndrome treatment were made.

Key words: «Gabagamma», neuropathy, diabetes, dorsal root ganglion neurons.

Надійшла до редакції 10.04.09.

