
COMPARATIVE STUDY OF THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF ETIFOXINE AND RETIGABINE IN RATS

Vesela Kokova

Department of Pharmacology and Drug Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv, Bulgaria, vesela_uk@abv.bg

Elisaveta Apostolova

Department of Pharmacology and Drug Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv, Bulgaria, apostolova1212@gmail.com

Lyudmil Peychev

Department of Pharmacology and Drug Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv, Bulgaria, peych@propolisbg.com

Zhivko Peychev

Department of Medical Informatics, Biostatistics and e-learning, Faculty of Public Health, Medical University – Plovdiv, Bulgaria, jivko_p@yahoo.com

Kostadin Kanalev

Department of Physical Education and Sport, Faculty of Medicine, Medical University – Plovdiv, Bulgaria, kostadin.kanalev@abv.bg

Abstract: Introduction: Etifoxine is a nonbenzodiazepine anxiolytic and anticonvulsant drug. It enhances GABAergic transmission directly by binding to $\beta 2$ and/or $\beta 3$ subunits of the GABAA receptor complex and indirectly via stimulation of neurosteroid production after the activation of 18 kDa translocator protein (TSPO). Retigabine is an anticonvulsant drug which activates low-threshold voltage-gated potassium channels. Anticonvulsant drugs reduce hyperexcitability and are currently extensively studied for possible antinociceptive activity. The aim of this study is to compare the antinociceptive effect of etifoxine and retigabine in rats. Materials and methods: The research included forty male Wistar rats, divided into five groups ($n = 8$). They were treated intraperitoneally with: 1st group (control) – saline 0.1ml/100g bw, 2nd group–metamizole natrii 150 mg/kg bw, 3rd group – etifoxine 50 mg/kg bw, 4th group –retigabine 5 mg/kg bw and 5th group – retigabine 15 mg/kg bw. The antinociceptive effect was evaluated with hot plate test and analgesy-meter test. The statistical analysis was performed using SPSS.17. Results: Etifoxine did not prolong the latency time in hot plate test and did not increase the withdrawal latency in analgesy-meter test, compared to the animals treated with saline. In hot plate test, retigabine in dose 15 mg/kg bw significantly increased the latency time at the second and third hour, compared to the control group ($p<0.05$). In analgesy-meter test, a significant increase of the withdrawal latency between retigabine and control animals occurred only at dose 15 mg/kg bw at first hour after single administration ($p<0.05$). Conclusions: The obtained experimental data show that etifoxine in dose 50 mg/kg bw does not have antinociceptive effect. Single administration of retigabine 15 mg/kg bw reduced painful thermal and mechanical stimuli in rats. The presence of KCNQ channels in the neuronal pathways of pain suggests that the antinociceptive effect of retigabine is maybe based on the activation of low-threshold potassium channels.

Keywords: etifoxine, retigabine, nociceptive pain, analgesia, rats.

СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ НА АНТИНОЦИЦЕПТИВНИЯ ЕФЕКТ НА ЕТИФОКСИН И РЕТИГАБИН ПРИ ПЛЪХОВЕ

Весела Кокова

Катедра Фармакология и лекарствена токсикология, Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет – Пловдив, България, vesela_uk@abv.bg

Елисавета Апостолова

Катедра Фармакология и лекарствена токсикология, Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет – Пловдив, България, apostolova1212@gmail.com

Людмил Пейчев

Катедра Фармакология и лекарствена токсикология, Фармацевтичен Факултет, Медицински Университет – Пловдив, България, peych@propolisbg.com

Живко Пейчев

Катедра Медицинска информатика, биостатистика и електронно обучение, Факултет по обществено здраве, Медицински Университет – Пловдив, България, jivko_p@yahoo.com

Костадин Каналев

Секция по Физическо възпитание и спорт, Катедра по Физиология, Медицински Факултет, Медицински Университет – Пловдив, България, kostadin.kanalev@abv.bg

Резюме: Въведение: Етифоксин е небензодиазепинов анксиолитик и антиепилептично лекарство средство. Той улеснява ГАМК-ергичната медиация директно чрез свързване с $\beta 2$ и/или $\beta 3$ субединиците на ГАМК-А рецепторния комплекс и индиректно чрез повишения синтез на невростероиди след свързването му за транслокатор протеин 18 kDa (TSPO). Ретигабин е антиепилептичен медикамент, който активира потенциал-зависимите калиеви канали. Антиепилептичните лекарствени средства намаляват свръхвъзбудимостта и понастоящем са обект на подробно изучаване за възможна антиноцицептивна активност. Цел на настоящето проучване е да се сравни антиноцицептивният ефект на етифоксин и ретигабин при плъхове. Материали и методи: Опитите са проведени с 40 мъжки бели плъхове порода Wistar, разделени на пет групи (n=8). Животните бяха третирани интраперитонеално с: 1ва група (контрола) – физиологичен разтвор 0,1ml/100g т.м., 2ра група – метамизол натрий 150 mg/kg т.м., 3та група – етифоксин 50 mg/kg т.м., 4та група – ретигабин 5 mg/kg т.м. и 5та група – ретигабин 15 mg/kg т.м. Антиноцицептивният ефект беше изследван с теста „гореща плоча” и с апарата аналгезиметър. Статистическият анализ на резултатите е проведен с програмата SPSS.17. Резултати: Етифоксин не удължава латентното време при теста „гореща плоча” и не увеличава механичния натиск при апарата аналгезиметър, в сравнение с опитните животни третирани с физиологичен разтвор. При теста с топлинен болков стимул ретигабин в доза 15 mg/kg т.м. значимо удължава реакционното време на втория и третия час, в сравнение с контролните животни (p<0.05). При теста с механичен болков стимул значима разлика в увеличаването на механичния натиск при животните третирани с ретигабин спрямо контролата се установява само при доза на медикамента 15 mg/kg т.м. на първия час след еднократното му приложение (p<0.05). Заключение: Получените експериментални данни показват, че етифоксин в доза 50 mg/kg т.м. не притежава антиноцицептивен ефект. Еднократното приложение на ретигабин в доза 15 mg/kg т.м. проявява аналгетично действие при тестове с топлинен и механичен болков стимул при плъхове. Активирането на KCNQ каналите от ретигабин най-вероятно има ключова роля в неговия антиноцицептивен ефект.

Ключови думи: етифоксин, ретигабин, ноцицептивна болка, аналгезия, плъхове.

ВЪВЕДЕНИЕ

Антиепилептичните лекарствени средства (АЕЛ) се използват широко за лечение на епилепсия, в терапията на множество разстройства в неврологията и психиатрията. Някои от новите индикации на АЕЛ са одобрени, докато други- все още са обект на проучвания. Неврологични заболявания, при които АЕЛ са показали клинично значение, са есенциален тремор, невропатична болка, мигрена, а в психиатрията АЕЛ се прилагат при тревожност, шизофрения, биполарно разстройство, социална фобия, посттравматично стресово разстройство и др. В патофизиологията на тези заболявания се включва и нарушена невронална възбудимост в централна, периферна нервна система или скелетни мускули, която може да бъде повлияна чрез модулиране активността на ГАМК-ергичната или глутаматергичната трансмисия, на вотлаж-зависими йонни канали или вътреклетъчни сигнални пътища. Тези механизми са основни таргети и във фармакодинамиката на различни АЕЛ, което обяснява тяхната клинична ефикасност, освен при епилепсия, и при други неепилептични неврологични и психиатрични разстройства [1,2].

Тъй като АЕЛ намаляват свръхвъзбудимостта, понастоящем те са обект на подробно изучаване за възможна антиноцицептивна активност.

Етифоксин е небензодиазепинов анксиолитик и антиепилептично лекарство средство. Той улеснява ГАМК-ергичната медиация директно чрез свързване с $\beta 2$ и/или $\beta 3$ субединиците на ГАМК-А рецепторния комплекс. Освен това етифоксин осъществява и индиректно действие след свързването му за транслокатор протеин 18 kDa (TSPO) и повишаване синтеза на невростероиди, които са алостерични активатори на ГАМК-А рецепторите [3,4].

Ретигабин е нов антиепилептичен медикамент, който активира потенциал-зависими калиеви канали (KCNQ, Kv7 канали), предизвиквайки хиперполяризация. Освен това, ретигабин повлиява медиацията

на ГАМК, глутамат, глутамин и допамин [5,6,7]. Цел на настоящето проучване е да се сравни антиноцицептивният ефект на етифоксин и ретигабин при плъхове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Опитите са проведени с 40 бели мъжки плъхове порода *Wistar* с тегло 160-180 g, отглеждани при стандартни лабораторни условия и свободен достъп до храна и вода. Животните, разделени по равно чрез случаен подбор в 5 групи ($n=8$), бяха третирани интраперитонеално (i.p.) респективно с:

1^{-ва} група (контрола) - физиологичен разтвор (0,1ml/100g т.м.);

2^{-ра} група - метамизол натрий 150 mg/kg т.м.;

3^{-та} група- етифоксин 50 mg/kg т.м.;

4^{-та} група– ретигабин 5 mg/kg т.м.;

5^{-та} група – ретигабин 15 mg/kg т.м.

Антиноцицептивният ефект беше изследван с два теста:

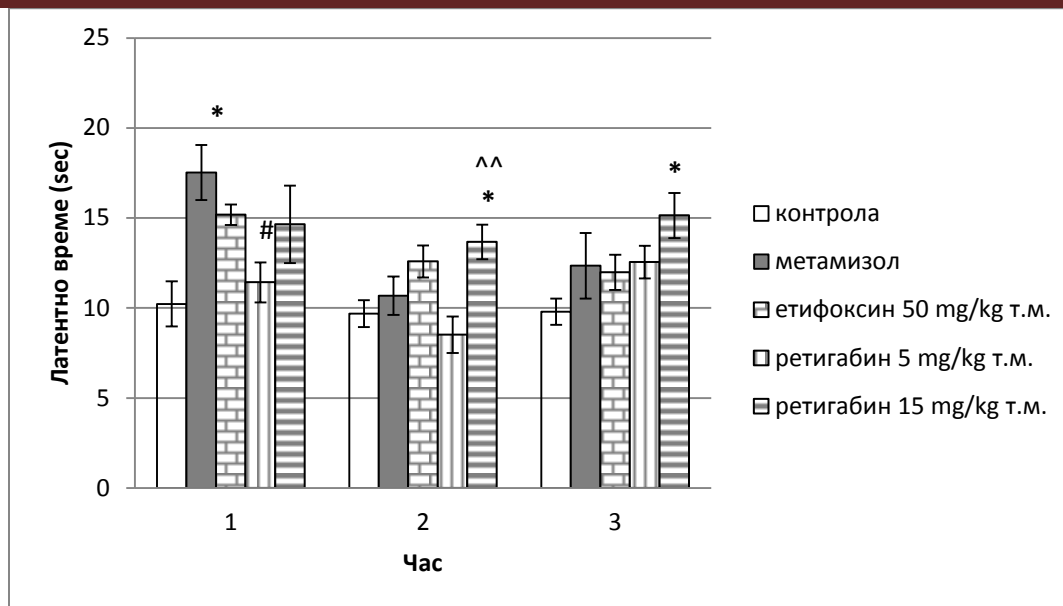
- „гореща плоча” - с апарат hot plate (Ugo Basile, Italy) при постоянна температура на плочата (55 ± 5) °C на 1-ви, 2-ри и 3-ти час след третирането;

- *тест с механичен натиск на лапата*- с апарат *analgesy-meter* (Ugo Basile, Italy) при прилагане на постепенно увеличаващ се механичен натиск върху задната лапа на плъх на 1-ви, 2-ри и 3-ти час след третирането.

За обработка на данните е използвана статистическата програма SPSS 17.0. За всеки показател е изчислена средната аритметична стойност (mean) и средната ѝ грешка ($\pm$ SEM) при уroveň на значимост $p \leq 0,05$. След определяне на разпределението на получените резултати, при нормално разпределение са приложени вариационният анализ One-way ANOVA и Tukey's Post Hoc multiple comparisons test, а в случай на нехомогенно разпределение- непараметричните Wilcoxon Signed-Rank test and Mann-Whitney U test.

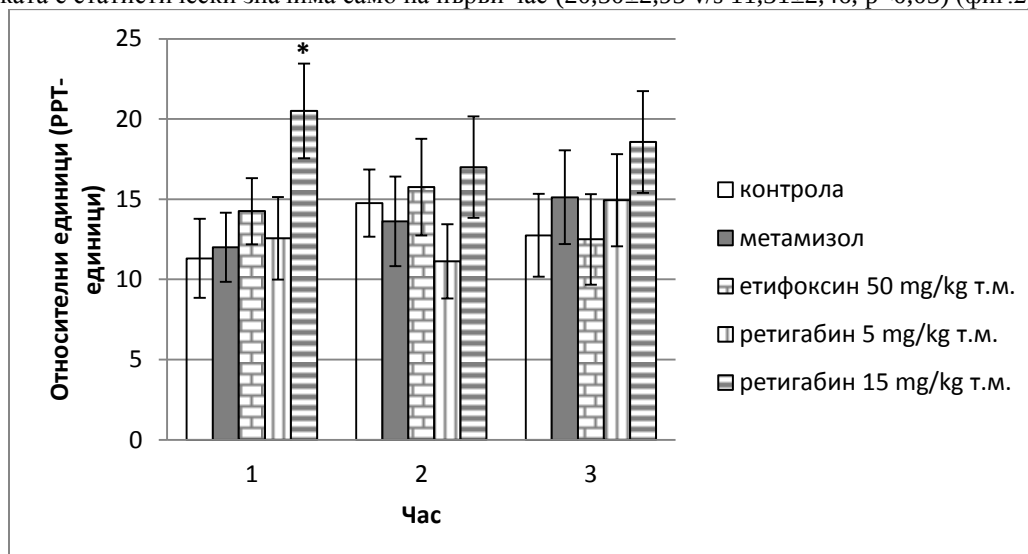
РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от теста „гореща плоча” показват, че при животните третирани с метамизол натрий се установява статистически значимо удължаване на латентното време в сравнение с контролата на 1-ви час ($17,53\pm 1,53$ v/s $10,23\pm 1,26$, $p<0,05$). Приложението на етифоксин в доза 50 mg/kg не променя статистически значимо изследвания показател спрямо контролата и при трите тествания. При групата животни третирани с ретигабин в доза 5 mg/kg се отчита статистически достоверно по-кратко реакционно време в сравнение с животните инжектирани с метамизол на 1-ви час ($11,43\pm 1,11$ v/s $17,53\pm 1,53$, $p<0,05$). Еднократното приложение на ретигабин 15 mg/kg доведе до удължаване времето на престой върху плочата и при трите тествания спрямо контролата, като сигнификантна разлика се наблюдава на 2-ри ($13,68\pm 0,96$ v/s $9,69\pm 0,74$, $p<0,05$) и 3-ти час ($15,14\pm 1,25$ v/s $9,79\pm 0,73$, $p<0,05$). При сравняване на времето за реакция между групите третирани с различни дози ретигабин се установява сигнификантно удължаване при по-високата доза 15 mg/kg спрямо 5 mg/kg на 2-ри час след инжектирането ($13,68\pm 0,96$ v/s $8,51\pm 1,01$, $p<0,005$) (фиг. 1).



Фигура 1. Ефект на етифоксин в доза 50 mg/kg и ретигабин в дози 5 mg/kg и 15 mg/kg върху латентното време при тест с топлинен болков стимул. * $p < 0,05$ спрямо контролата за съответния час; # $p < 0,05$ спрямо метамизол за съответния час; ^ $p < 0,005$ спрямо ретигабин 5 mg/kg за съответния час.

При теста с механичен натиск на лапата няма статистически различия в наблюдавания ефект между групата третирана с етифоксин в доза 50 mg/kg и контролата. При изследване на антиноцицептивния ефект с апарата аналгезиметър, резултатите на животните инжектирани с ретигабин в доза 5 mg/kg не се различават значимо от тези на контролната група третирана с физиологичен разтвор. Приложението на ретигабин в доза 15 mg/kg увеличи стойността на натиска, необходим за отдръпване на лапата, спрямо контролата на 1-ви, 2-ри и 3-ти час след интраперитонеалното му приложение, но разликата е статистически значима само на първи час ($20,50 \pm 2,95$ v/s $11,31 \pm 2,46$, $p < 0,05$) (фиг.2).



Фигура 2. Ефект на етифоксин в доза 50 mg/kg и ретигабин в дози 5 mg/kg и 15 mg/kg върху механичния натиск при апарат аналгезиметър. * $p < 0,05$ спрямо контролата за съответния час.

ОБСЪЖДАНЕ

В достъпната литература данните за антиноцицептивен ефект на етифоксин са ограничени. Етифоксин проявява антихипералгезичен ефект в модел на възпалителна болка при експериментален моноартрит на плъхове [8]. Juif и съавт. установяват, че етифоксин проявява антиноцицептивна активност при интактни плъхове и плъхове с модел на възпалителна хипералгезия при адювантен артрит на Фройнд. Посочените автори наблюдават този ефект при остро интратекално инжектиране в лумбалните сегменти на гръбначния мозък и концентрации по-високи от 30 μM [9]. Получените от нас резултати показват липсата на антиноцицептивен ефект на етифоксин 50 mg/kg след неговото еднократно интраперитонеално приложение и при двата проведени теста- с топлинен и механичен болков стимул.

Данните от нашите изследвания регистрират антиноцицептивен ефект на ретигабин след еднократното му приложение в по-високата изследвана доза 15 mg/kg. В литературата се откриват данни за аналгетичното му действие в различни модели. Munro G. и сътр. установяват аналгетичен ефект на ретигабин след интраперитонеалното му приложение в дози 3, 6 и 10 mg/kg през първата фаза на формалинов тест и в дози 6 и 10 mg/kg през втората фаза на опита [10]. Ретигабин 1, 3 и 10 mg/kg (i.p.) повлиява висцерална болка, предизвикана от капсаицин при мишки. Изследване на локомоторната функция на животните показва, че ефектът не се дължи на общо потискане на моторните функции [11].

Dost R. и сътр. регистрират наличието на антиноцицептивен ефект на ретигабин при Tail-flick тест и дози на медикамента 10 mg/kg (i.p.) и 5, 10 и 15 mg/kg (p.o.). Тези автори установяват, че антиноцицептивният ефект на ретигабин в доза 10 mg/kg не се променя при приложение на линопиридин (блокатор на Kv7 каналите) [12]. Отговорът на термичен стимул в този случай най-вероятно не е свързан с повлияване на Kv7 каналите.

Xu W. и сътр. описват положителното повлияване от ретигабин на алодиния, предизвикана от възпаление на мандибуларната става при плъхове. Този ефект се антагонизира при прилагането на блокатор на KCNQ каналите (XE-991), което показва, че аналгетичният ефект на ретигабин при този модел на болка се дължи на активиране на KCNQ каналите [13]. *In vitro* експерименти разкриват значението на Kv7 каналите за хиперполяризацията на аферентните фибри. Изследванията показват, че най-вероятно всички типове фибри в спиналния заден рог могат да бъдат хиперполяризирани при приложение на ретигабин [14]. Антиноцицептивният ефект на ретигабин се дължи на активиране на K^+ канали, съдържащи Kv7.2-5 субединици и разположени в задния рог на гръбначния мозък и неговите ганглии. Активирането на тези канали води до хиперполяризация, повишаване прага на възбудимост и инхибиране провеждането на нервните импулси по сигналните пътища на болката. Това показва ключовата роля на този подтип K^+ канали в регулацията на отговорите на ноцицептивните неврони [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените експериментални данни показват, че от двата изследвани медикамента с антиепилептично действие, етифоксин в доза 50 mg/kg т.м. не притежава антиноцицептивен ефект. Еднократното приложение на ретигабин в доза 15 mg/kg т.м. проявява аналгетично действие при тестове с топлинен и механичен болков стимул при плъхове. Активирането на KCNQ каналите от ретигабин най-вероятно има ключова роля в неговия антиноцицептивен ефект.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Landmark, C. J. (2008). Antiepileptic Drugs in Non-Epilepsy Disorders. Relations between Mechanisms of Action and Clinical Efficacy. *CNS Drugs*, 22(1), 27-47.
- [2] Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med*, 10, 685–92.
- [3] Schlichter, R., Rybalchenko, V., Poisbeau, P., Verleye, M., & Gillardin, J. (2000). Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine. *Neuropharmacology*, 39, 1523-35.
- [4] Nothdurfter, C., Rammes, G., Baghai, T. C., Schüle, C., Schumacher, M., Papadopoulos, V., & Rupprecht, R. (2011). Translocator Protein (18 kDa) as a Target for Novel Anxiolytics with a Favourable Side-Effect Profile. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), 82-92.

- [5] Rundfeldt, C., & Netzer, R. (2000). Investigations into the mechanism of action of the new anticonvulsant retigabine. Interaction with GABAergic and glutamatergic neurotransmission and with voltage gated ion channels. *Arzneimittelforschung*, 50, 1063-1070.
- [6] Splinter, M. Y. (2012). Ezogabine (Retigabine) and its role in the treatment of partial-onset seizures: a review. *Clinical Therapeutics*, 34(9), 1845-1855.
- [7] Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, 1, 21–30.
- [8] Aouad, M., Zell, V., Juif, P. E., Lacaud, A., Goumon, Y., Darbon, P., et al. (2014). Etifoxine analgesia in experimental monoarthritis: a combined action that protects spinal inhibition and limits central inflammatory processes. *Pain*, 155, 403-12.
- [9] Juif, P., Melchior, M., Poisbeau, P. (2015). Characterization of the fast GABAergic inhibitory action of etifoxine during spinal nociceptive processing in male rats. *Neuropharmacology*, 91, 117-22.
- [10] Munro, G., Erichsen, H. K., Mirza, N. R. (2007). Pharmacological comparison of anticonvulsant drugs in animal models of persistent pain and anxiety. *Neuropharmacology*, 53, 609-618.
- [11] Hirano, K., Kuratani, K., Fujiyoshi, M., Tashiro, N., Hayashi, E., Kinoshita, M. (2007). Kv7.2-7.5 voltage-gated potassium channel (KCNQ2-5) opener, retigabine, reduces capsaicin-induced visceral pain in mice. *Neuroscience Letters*, 413, 159-162.
- [12] Dost, R., Rostock, A., Rundfeldt, C. (2004). The anti-hyperalgesic activity of retigabine is mediated by KCNQ potassium channel activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 382-390.
- [13] Xu, W., Wu, Y., Bi, Y., Tan, L., Gan, Y., Wang, K. W. (2010). Activation of voltage-gated KCNQ/Kv7 channels by anticonvulsant retigabine attenuates mechanical allodynia of inflammatory temporomandibular joint in rats. *Mol Pain*, 6, 49.
- [14] Rivera-Arconada, I., Lopez-Garcia, J. A. (2006). Retigabine-induced population primary afferent hyperpolarisation in vitro. *Neuropharmacology*, 51, 756-763.
- [15] Hirano, K., Kuratani, K., Fujiyoshi, M., Tashiro, N., Hayashi, E., Kinoshita, M. (2007). Kv7.2-7.5 voltage-gated potassium channel (KCNQ2-5) opener, retigabine, reduces capsaicin-induced visceral pain in mice. *Neuroscience Letters*, 413, 159-162.