

# Экспериментальная и клиническая **ФАРМАКОЛОГИЯ**



1  
—  
2009



ИЗДАТЕЛЬСТВО ФОЛИУМ  
МОСКВА

## **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор Д. А. ХАРКЕВИЧ**

В. П. ФИСЕНКО (заместитель главного редактора)  
Р. С. МИРЗОЯН (ответственный секретарь)

Т. А. ВОРОНИНА	Р. Д. СЕЙФУЛЛА
Ю. Д. ИГНАТОВ	С. Б. СЕРЕДЕНИН
В. Г. КУКЕС	А. К. СТАРОДУБЦЕВ
О. С. МЕДВЕДЕВ	В. В. ЧУРЮКАНОВ
В. И. МЕТЕЛИЦА	Н. Л. ШИМАНОВСКИЙ
В. В. ЯСНЕЦОВ	

## **РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

АКОПЯН В. П. (Ереван)  
АРУШАНЯН Э. Б (Ставрополь)  
АЛЛИКМЕТС Л. Х. (Тарту)  
БЕКЕТОВ А. И. (Симферополь)  
ГАБРИЕЛЯН Э. С. (Ереван)  
ГАЦУРА В. В. (Москва)  
ГУСЕЙНОВ Д. Я. (Баку)  
ДЕНИСЕНКО П. П. (Санкт-Петербург)  
ДУНАЕВ В. В. (Запорожье)

ЗАКИРОВ У. Б. (Ташкент)  
ЗАРУДИЙ Ф. С. (Уфа)  
ЗУРДИНОВ А. З. (Бишкек)  
КАРКИЩЕНКО Н. Н. (Москва)  
КОВАЛЕВ И. Е. (Москва)  
КОМИССАРОВ И. В. (Донецк)  
КУЗДЕНБАЕВА Р. С. (Актюбинск)  
ЛАЗАРЕВА Д. Н. (Уфа)  
ЛЕБЕДЕВ А. А. (Самара)

МАРКОВА И. В. (Санкт-Петербург)  
ОМАРОВ Ш. М. (Махачкала)  
ПЕТРОВ В. И. (Волгоград)  
РЕЗНИКОВ К. М. (Воронеж)  
САПРОНОВ Н. С. (Санкт-Петербург)  
СПАСОВ А. А. (Волгоград)  
УСОВ Л. А. (Иркутск)  
ЧЕКМАН И. С. (Киев)  
ШАБАНОВ П. Д. (Санкт-Петербург)

**Зав. редакцией В. Ф. СТРИЖОВА**

Адрес редакции: 125315 Москва, ул. Балтийская, 8, ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН,

Редакция журнала “Экспериментальная и клиническая фармакология”

Телефоны: 8-499-248-6575, (495) 601-2419

E-mail: ekf@folium.ru

**Журнал входит в перечень утвержденных ВАК РФ изданий  
для публикации трудов соискателей ученой степени кандидата и доктора наук**

---

Перепечатка материалов из журнала “Экспериментальная и клиническая фармакология” возможна при обязательном согласовании с редакцией журнала. При перепечатке материалов ссылка на журнал “Экспериментальная и клиническая фармакология” обязательна.

# Экспериментальная и клиническая ФАРМАКОЛОГИЯ

EXPERIMENTAL AND CLINICAL  
**PHARMACOLOGY**

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Том 72  
2009

январь – февраль № 1

ОСНОВАН В ИЮНЕ 1938 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

### Фармакология нового анксиолитика афобазола

Середенин С. Б., Воронин М. В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола . . . . .	3
Антипова Т. А., Сапожникова Д. С., Бахтина Л. Ю., Середенин С. Б. Селективный анксиолитик афобазол увеличивает содержание BDNF и NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 . . . . .	12
Середенин С. Б., Гарбова Т. А., Кузнецова А. Л., Воронин М. В., Яркова М. А., Воронина Т. А. Афобазол снижает двигательные расстройства, вызванные галоперидолом . . . . .	15
Середенин С. Б., Молодавкин Г. М., Воронин М. В., Воронина Т. А. Антидепрессивное действие афобазола в тестах Porsolt и Nomura . . . . .	19
Колик Л. Г., Жуков В. Н., Середенин С. Б. Влияние афобазола на антиноцицептивные свойства морфина . . . . .	22
Середенин С. Б., Крайнева В. А. Нейропротекторные свойства афобазола при экспериментальном моделировании геморрагического инсульта . . . . .	24
Антипова Т. А., Логвинов И. О., Курдюмов И. Н., Мирзоян Н. Р., Ганьшина Т. С., Турилова А. И., Мирзоян Р. С., Середенин С. Б. Влияние афобазола на содержание стресс-белка HSP70 в ткани мозга крыс при глобальной прходящей ишемии . . . . .	29
Каверина Н. В., Попова Е. П., Яркова М. А., Середенин С. Б. Влияние афобазола на вариабельность ритма сердца у крыс, отличающихся по поведению в teste “открытое поле” . . . . .	33
Цорин И. Б., Палка И. П., Чичканов Г. Г. Особенности действия селективного анксиолитика афобазола на сердечно-сосудистую систему . . . . .	41
Дурнев А. Д., Жанатаев А. К., Шредер О. В., Середенин С. Б. Антимутагенные и антиретарогенные свойства афобазола . . . . .	46

## CONTENTS

### Pharmacology of the new anxiolytic afobazole

S. B. Seredenin and M. V. Voronin Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole . . . . .	3
T. A. Antipova, D. S. Sapozhnikova, L. Yu. Bakhtina, and S. B. Seredenin Selective anxiolytic afobazole increases the content of BDNF and NGF in the culture of hippocampal HT-22 line neurons . . . . .	12
S. B. Seredenin, T. A. Garibova, A. L. Kuznetsova, M. V. Voronin, M. A. Yarkova, and T. A. Voronina Afobazole decreases motor side effects induced by haloperidol . . . . .	15
S. B. Seredenin, G. M. Molodavkin, M. V. Voronin, and T. A. Voronina Antidepressant properties of afobazole in the Porsolt and Nomura swim tests on rats . . . . .	21
L. G. Kolik, V. N. Zhukov, and S. B. Seredenin Afobazole effects on antinociceptive properties of morphine . . . . .	22
S. B. Seredenin and V. A. Kraineva Neuroprotective effects of afobazole on a hemorrhagic stroke model . . . . .	24
T. A. Antipova, I. O. Logvinov, I. N. Kurdyumov, N. R. Mirzoyan, T. S. Gan'shina, A. I Turilova, R. S. Mirzoyan, and S. B. Seredenin Effects of afobazole on stress protein HSP70 content in brain tissue of rats with global transient ischemia . . . . .	29
N. V. Kaverina, E. P. Popova, M. A. Yarkova, and S. B. Seredenin Afobazole effect on heart rate variability in rats with different behaviors in “Open Field” test . . . . .	33
I. B. Tsorin, I. P. Palka, and G. G. Chichkanov Specific features of the effect of selective anxiolytic afobazole on cardiovascular system . . . . .	41
A. D. Durnev, A. K. Zhanataev, O. V. Shreder, and S. B. Seredenin Antimutagenic and antiteratogenic properties of afobazole . . . . .	46

## **Нейрофармакология**

<i>Григорьев В. В., Гаривова Т. Л., Воронина Т. А., Литвинова С. А., Бачурин С. О.</i> Влияние димебона при хроническом применении на поведение и память мышей SAMP 10 . . . . .	52
<i>Бородкина Л. Е., Молодавкин Г. М., Тюренков И. Н.</i> Влияние фенибута на межполушарное взаимодействие мозга крыс . . . . .	57
<i>Бородкина Л. Е., Кудрин В. С., Клодт П. М., Наркевич В. Б., Тюренков И. Н.</i> Влияние фенибута на содержаниеmonoаминов и их метаболитов, а также нейротрансмиттерных аминокислот в структурах мозга крыс . . . . .	60
<i>Абаймов Д. А., Зимин И. А., Кудрин В. С., Ковалев Г. И.</i> Влияние противопаркинсонического препарата гимантана на содержание и metabolismus нейромедиаторных monoаминов в структурах головного мозга мышей линии C57BL/6 . . . . .	64
<i>Яснетцов Вик. В., Воронина Т. А.</i> Действие семакса и мексидола на моделях ишемии мозга у крыс . . . . .	68

## **Юбилей**

<i>Э. Б. Арушанян (к 75-летию со дня рождения)</i> . . . . .	71
--	----

## **Neuropharmacology**

<i>V. V. Grigor'ev, T. L. Garibova, T. A. Voronina, S. A. Litvinova, and S. O. Bachurin</i> Effects of the chronic administration of dimebon on the behavior and memory of SAMP 10 mice . . . . .	52
<i>L. E. Borodkina, G. M. Molodavkin, and I. N. Tyurenkov</i> Effect of phenibut on the interhemispheric transmission in rat brain . . . . .	57
<i>L. E. Borodkina, V. S. Kudrin, P. M. Klodt, V. B. Narkevich, and I. N. Tyurenkov</i> Effect of phenibut on the content of monoamines, their metabolites, and neurotransmitter amino acids in rat brain structures . . . . .	60
<i>D. A. Abaimov, I. A. Zimin, V. S. Kudrin, and G. I. Kovalev</i> Effects of antiparkinsonian drug hemantane on the level and metabolism of biogenic monoamines in brain structures of C57BL/6 mice . . . . .	64
<i>Vic. V. Yasnetsov and T. A. Voronina</i> Effect of semax and mexidol on brain ischemia models in rats . . . . .	68
<b>Anniversary</b>	
<i>É. B. Arushanyan (On his 75th birthday)</i> . . . . .	71

---

Подписано в печать 17.02.2009. Формат 60 × 80 1/8.

Оригинал-макет выполнен в издательстве “Фолиум”,  
127238, Москва, Дмитровское ш., 58, тел./факс (095) 482-5590, 482-5544  
Internet: <http://www.folium.ru>, E-mail: [ekf@folium.ru](mailto:ekf@folium.ru)  
Отпечатано в типографии издательства “Фолиум”

# ФАРМАКОЛОГИЯ НОВОГО АНКСИОЛИТИКА АФОБАЗОЛА

## НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АФОБАЗОЛА

С. Б. Середенин, М. В. Воронин<sup>1</sup>

Выполнен радиолигандный анализ взаимодействия афобазола {5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид} и его основного метаболита М-11 {2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид} с нейрорецепторами. Установлено взаимодействие афобазола с  $\sigma_1$  (sigma 1) ( $K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$  М), МТ<sub>1</sub> ( $K_i = 1,6 \cdot 10^{-5}$  М), МТ<sub>3</sub> ( $K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$  М) рецепторами, регуляторным участком МАО-А ( $K_i = 3,6 \cdot 10^{-6}$  М). Выявлены лигандные свойства М-11 по отношению к МТ<sub>3</sub> рецепторам ( $K_i = 3,9 \cdot 10^{-7}$  М). Методом конфокальной микроскопии показана транслокация  $\sigma_1$ -рецептора из эндоплазматического ретикулума в область наружной мембранны на модели иммортализированных клеток гиппокампа НТ-22 после 30 и 60 мин инкубации с афобазолом в концентрации  $10^{-8}$  М. Установлено, что афобазол является обратимым ингибитором МАО-А. Полученные данные соответствуют ранее зарегистрированным анксиолитическим и нейропротекторным свойствам афобазола.

**Ключевые слова:** афобазол,  $\sigma_1$ -рецептор, мелатониновые рецепторы, МАО-А, радиолигандное связывание, иммунофлюoresценция

## ВВЕДЕНИЕ

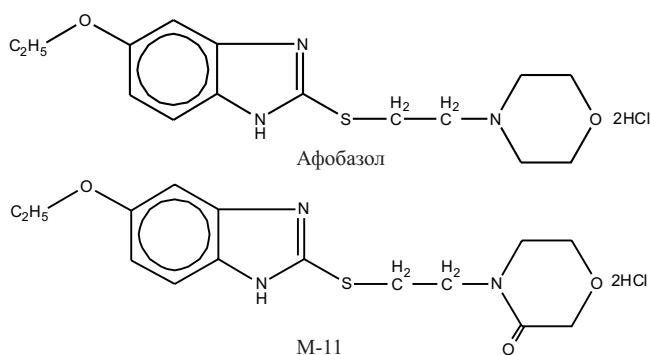
Афобазол — оригинальный селективный анксиолитик, разработан и внедрен в медицинскую практику ГУ НИИ им. В. В. Закусова РАМН в сотрудничестве с ЗАО Мастер Фарм (Рег. № ЛС-000861 от 03.11.2005). Механизм анксиолитического действия афобазола основан на его способности предотвращать стрессиндуцированное падение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК<sub>A</sub>-рецептора [5]. Вместе с тем попытки обнаружить связывание афобазола с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторным комплексом дали отрицательные результаты [6]. Таким образом, восстановление функций указанного рецептора следует рассматривать в качестве результирующего эффекта предшествующих нейрохимических событий. Не менее важным свойством афобазола оказалось его нейропротекторное действие, установленное в опытах *in vitro* и *in vivo* [1, 2], первичные механизмы которого оставались также невыясненными. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение связывания афобазола и его основного метаболита М-11 [4] с рецепторами, отобранными в качестве кандидатов для исследования на основе теоретического анализа фармакологических эффектов препарата. Работа выполнена в компании “Сереп” (Франция).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Препараты.** Субстанции афобазола и метаболита М-11 (рис. 1) синтезированы в ГУ НИИ фармакологии РАМН. Препараты исследовали в диапазоне концентраций  $10^{-3}$  М –  $10^{-9}$  М.

**Радиолигандный анализ.** Способность афобазола и М-11 вытеснять высокоаффинные лиганды нейрорецепторов из мест связывания изучена в соответствии с протоколами компании Сереп (<http://www.cerep.com>). Перечень отобранных для исследования рецепторов приведен в табл. 1.

Представляется целесообразным привести более подробное описание радиолигандных методов оценки



**Рис. 1.** Структурная формула афобазола {5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид} и его основного метаболита М-11 {2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид}.

<sup>1</sup> Лаборатория фармакогенетики (руководитель — акад. РАМН С. Б. Середенин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Таблица 1. Рецепторы, отобранные для изучения параметров связывания с афобазолом и M-11

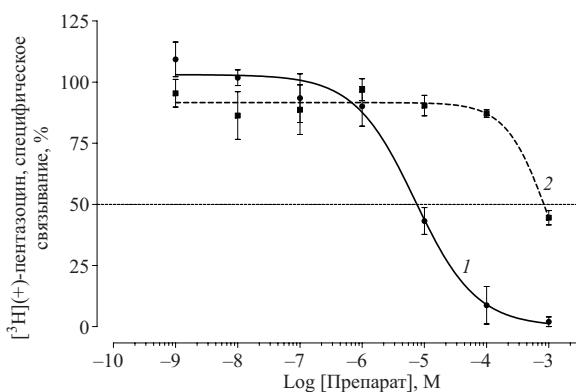
Типы рецепторов	Лиганд
<i>Непептидные рецепторы</i>	
A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>	Аденозин
σ <sub>1</sub> , α <sub>2</sub> , β <sub>1</sub> , β <sub>2</sub> , β <sub>3</sub>	Адреналин
BZD	Бензодиазепины (центральные рецепторы)
D1, D2S, D2L, D3, D4, D5	Дофамин
GABA <sub>A</sub> , GABA <sub>B</sub> (1b)	ГАМК ( $\gamma$ -аминомасляная кислота)
AMPA, Kainate, NMDA, Glycine (стрихнин-нечувствительный), PCP	Глутамат
H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> , H <sub>4</sub>	Гистамин
LPA <sub>1</sub> (Edg-2)	Липофосфолипиды
MT <sub>1</sub> , MT <sub>2</sub> , MT <sub>3</sub> (ML <sub>2</sub> )	Мелатонин
M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub>	Мускарин
α4 нейрональный α-BGTX-нечувствительный (α4β2), α7 нейрональный α-BGTX-чувствительный	Никотин
P2X, P2Y	Пурины
5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1D</sub> , 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> , 5-HT <sub>2C</sub> , 5-HT <sub>3</sub> , 5-HT <sub>4e</sub> , 5-HT <sub>5A</sub> , 5-HT <sub>6</sub> , 5-HT <sub>7</sub> , σ <sub>1</sub> , σ <sub>2</sub> (+)-пентазоцин, нейростероиды	Серотонин
<i>Пептидные рецепторы</i>	
AT <sub>1</sub> , AT <sub>2</sub>	Ангиотензин
CCK <sub>1</sub> , CCK <sub>2</sub>	Холецистокинин
CRF <sub>1</sub>	Кортикотропин рилизинг фактор
GAL <sub>1</sub> , GAL <sub>2</sub>	Галанин
NK <sub>1</sub> , NK <sub>2</sub> , NK <sub>3</sub>	Нейрокинин
Y <sub>1</sub> , Y <sub>2</sub>	Нейропептид Y
Неселективная рецепция нейротензина, NTS1	Нейротензин
Неселективная рецепция наркоксона, δ <sub>2</sub> (delta opioid receptor), μ (mu opioid receptor)	Опиоиды и опиоидоподобные вещества
Неселективная рецепция соматостатина (SST рецепторы)	Соматостатин
V1a, V1b, V2	Вазопрессин
<i>Рецепторы стероидных гормонов</i>	
GR	Глюкокортикоиды
PR	Прогестерон
<i>Рецепторы ферментов метаболизмаmonoаминов</i>	
MAO-A	Хлоргиллин
MAO-B	(R)-депренил
<i>Рецепторы ионных каналов</i>	
Потенциалчувствительный Ca <sup>2+</sup> канал	Дилтиазем
Ca <sub>v</sub> 1.1 (L-тип)	Глибенкламид
Потенциалчувствительный K <sup>+</sup> канал K <sub>IR</sub> 6 (K <sub>ATP</sub> )	Пикротоксин
ГАМК чувствительный Cl <sup>-</sup> канал	
<i>Рецепторы транспортеров monoаминов и аминокислот</i>	
Транспортер аденоцина	NBTI
Транспортер норадреналина (NET)	Низоксетин
Транспортер дофамина (DAT)	БТСР
Транспортер ГАМК (GAT)	ГАМК
Транспортер холина (СНТ)	Гемихолин
Транспортер серотонина (SERT)	Имипрамин

взаимодействия с рецепторами, по которым получены позитивные результаты.

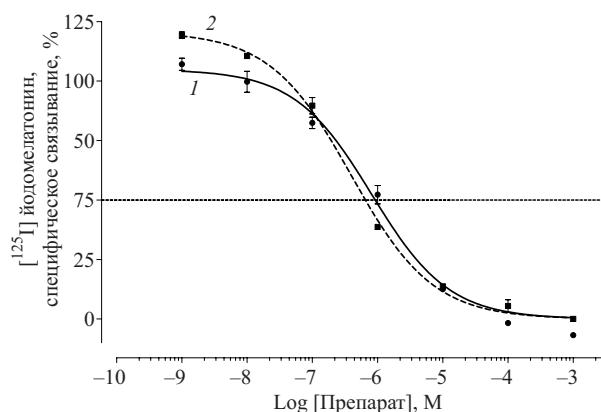
Взаимодействие афобазола и M-11 с σ<sub>1</sub> (sigma 1) рецепторами изучали на клеточной линии человека Jurkat [20]. В качестве меченого лиганда использовали [<sup>3</sup>H](+)-пентазоцин в концентрации 8 нМ. Препаратором сравнения служил галоперидол (IC<sub>50</sub> = 2,2 · 10<sup>-8</sup> М,

Ki = 1,3 · 10<sup>-8</sup> М, nH = 1,2). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10 мкМ галоперидола. Время инкубации с клеточной линией составляло 120 мин при температуре 22°C.

Взаимодействие веществ с MT<sub>3</sub> (ML<sub>2</sub>) рецепторами изучали на ткани мозга сирийского хомяка [49] с применением [<sup>125</sup>I]2-йодомелатонина в концентрации



**Рис. 2.** Взаимодействие афобазола с  $\sigma_1$ -рецептором. Для афобазола  $IC_{50} = 7,1 \cdot 10^{-6}$  М,  $K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$  М,  $nH = 0,9$ . Для M-11  $IC_{50} = 9,6 \cdot 10^{-4}$  М,  $K_i = 7,9 \cdot 10^{-4}$  М,  $nH = 1,3$ . Связывание афобазола с  $\sigma_1$ -рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Здесь и на рис. 3 – 5 данные представлены в виде  $M \pm S$ . Е. М. 1 — афобазол, 2 — M-11.



**Рис. 3.** Взаимодействие афобазола с  $MT_3$  рецептором. Для афобазола  $IC_{50} = 9,9 \cdot 10^{-7}$  М,  $K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$  М,  $nH = 0,8$ . Для M-11  $IC_{50} = 4,0 \cdot 10^{-7}$  М,  $K_i = 3,9 \cdot 10^{-7}$  М,  $nH = 0,7$ . Связывание афобазола с  $MT_3$  рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

0,1 нМ. В качестве вещества сравнения использовали мелатонин ( $IC_{50} = 6,2 \cdot 10^{-8}$  М,  $K_i = 6,1 \cdot 10^{-8}$  М,  $nH = 1,1$ ). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 30 мкМ мелатонина. Инкубация с образцами ткани мозга длилась 30 мин при температуре 4 °С.

Взаимодействие веществ с рекомбинантными  $MT_1$ -рецепторами человека изучали на овариальной клеточной линии китайского хомяка (CHO клетки) [64]. В качестве меченого лиганда использовали [ $^{125}$ I]2-йодомелатонин в концентрации 0,025 нМ. В качестве вещества сравнения использовали мелатонин ( $IC_{50} = 2,6 \cdot 10^{-10}$  М,  $K_i = 1,6 \cdot 10^{-10}$  М,  $nH = 1,2$ ). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 мкМ мелатонина. Время инкубации с клеточной линией составляло 60 мин при температуре 22 °С.

Взаимодействие веществ с моноаминоксидазой-А (MAO-A) изучали на ткани коры большого мозга крыс [12, 16]. В качестве меченого лиганда использовали [ $^3$ H]Ro 41-1049 в концентрации 10 нМ. Веществом сравнения служил ингибитор MAO-A хлоргиллин ( $IC_{50} = 2,7 \cdot 10^{-9}$  М,  $K_i = 1,6 \cdot 10^{-9}$  М,  $nH = 1,6$ ). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 мкМ хлоргиллина. Инкубация с образцами коры большого мозга крыс длилась 60 мин при температуре 37 °С.

Величины  $IC_{50}$  и коэффициент Хилла ( $nH$ ) были определены с использованием нелинейного регресси-

онного анализа кривых конкурентного вытеснения с аппроксимацией кривой уравнением Хилла. Величину  $K_i$  рассчитывали согласно уравнению Ченга — Прусоффа [14].

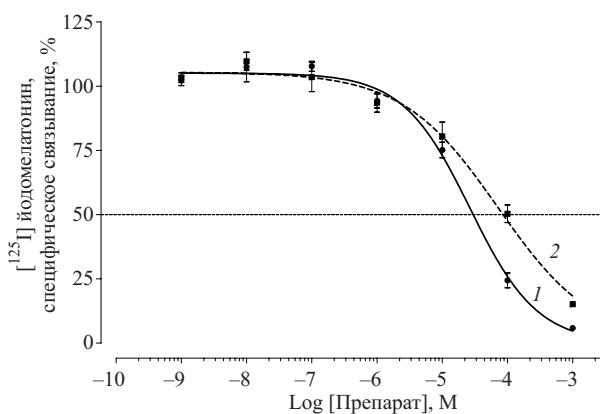
В радиолигандных исследованиях было обнаружено связывание с  $\sigma_1$ -рецепторами, поэтому исходя из литературных данных о транслокации  $\sigma_1$ -рецепторов при взаимодействии с лигандами из мембран эндоплазматического ретикулума в область наружной мембранны клетки, проведено исследование эффектов афобазола методом конфокальной микроскопии с иммунофлюоресцентным окрашиванием [46].

**Иммунофлюоресцентное окрашивание.** Способность афобазола вызывать транслокацию  $\sigma_1$ -рецептора в направлении внешней мембранны нейронов изучена с применением иммунофлюоресценции на модели иммортализированных клеток гиппокампа HT-22. Афобазол вносили в среду культивирования в конечной концентрации  $10^{-8}$  М, обладавшей нейропротекторным действием на моделях окислительного стресса и глутаматной токсичности [2]. Клетки фиксировали через 30 мин и через 1 ч после внесения афобазола 4 % параформальдегидом в течение 10 мин. Далее клетки отмывали раствором PBS 4 раза по 10 мин. После этого клетки обрабатывали согласно протоколу M. R. Morin-Surun и соавт. 250 мМ раствором сахарозы в течение 36 ч при температуре 4 °С и затем 1 мг/мл BSA в течение 2 ч при комнатной температуре [46]. Для

Таблица 2. Влияние преинкубации митохондрий с афобазолом на активность MAO-A митохондрий печени крысы

Условия эксперимента	Афобазол (1 мМ)	Афобазол (0,1 мМ)
Активность MAO-A без преинкубации, % от исходной активности	$58 \pm 4$	$41 \pm 6$
Активность MAO-A с преинкубацией (30 мин), % от исходной активности	$46 \pm 4$	$36 \pm 10$
Уровень значимости ( $p$ )	$> 0,05$	$> 0,05$

**Примечание.** Указана активность MAO-A, полученная в результате 4 – 7 независимых экспериментов и выраженная в процентах по отношению к контролю. Данные представлены в виде  $M \pm S$ . Е. М. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия для зависимых выборок.



**Рис. 4.** Взаимодействие афобазола с MT<sub>1</sub> рецептором. Для афобазола IC<sub>50</sub> = 2,7 · 10<sup>-5</sup> M, Ki = 1,6 · 10<sup>-5</sup> M, nH = 0,8. Для M-11 IC<sub>50</sub> = 7,2 · 10<sup>-5</sup> M, Ki = 4,4 · 10<sup>-5</sup> M, nH = 0,6. Связывание афобазола с MT<sub>1</sub> рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

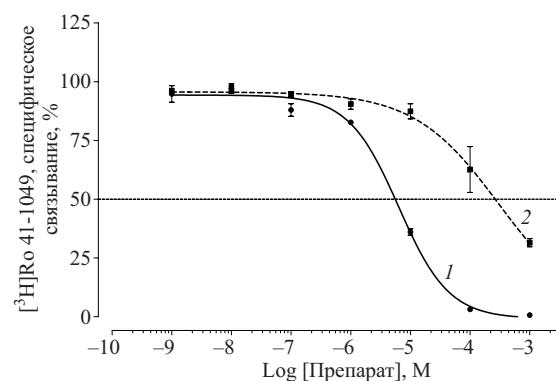
двойного иммунофлуоресцентного окрашивания использовали антитела к σ<sub>1</sub>-рецепторам фирмы “Santa Cruz Biotechnology” и антитела к кальнексину (белок, ассоциированный с мембраной эндоплазматического ретикулума) фирмы “Abcam” в растворе PBS с BSA (1 мг/мл). Инкубацию с первыми антителами проводили в течение 12 ч при 0°C, со вторыми — в течение 1 ч при комнатной температуре.

**Изучение активности MAO-A.** Влияние афобазола на активность MAO-A исследовали на митохондриях мозга и печени крыс. Митохондрии мозга и печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования как описано ранее [44]. Активность MAO-A определяли радиометрическим методом, используя 0,1 мМ [<sup>14</sup>C]серотонин креатининсульфат в качестве субстрата. Обратимость действия афобазола изучали согласно методике, опубликованной ранее [3]. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия для зависимых выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате радиолигандного анализа обнаружена группа рецепторов-мишеней афобазола. К их числу относятся: σ<sub>1</sub> рецептор, рецепторы мелатонина MT<sub>1</sub> и MT<sub>3</sub> (ML<sub>2</sub>) и регуляторный участок MAO-A. Основной метаболит афобазола M-11 проявил значимое средство только к MT<sub>3</sub> и MT<sub>1</sub> рецепторам.

При вытеснении из мест связывания агониста σ<sub>1</sub>-рецепторов [<sup>3</sup>H](+)-пентазоцина в концентрации 8 нМ величины IC<sub>50</sub>, Ki и nH для афобазола составили 7,1 · 10<sup>-6</sup> M, 5,9 · 10<sup>-6</sup> M и 0,9 соответственно (рис. 2). Величины IC<sub>50</sub> и Ki для M-11 находятся в области высоких миллимолярных концентраций, что не позволяет сделать заключение о специфическом взаимодействии M-11 с данным типом рецептора.



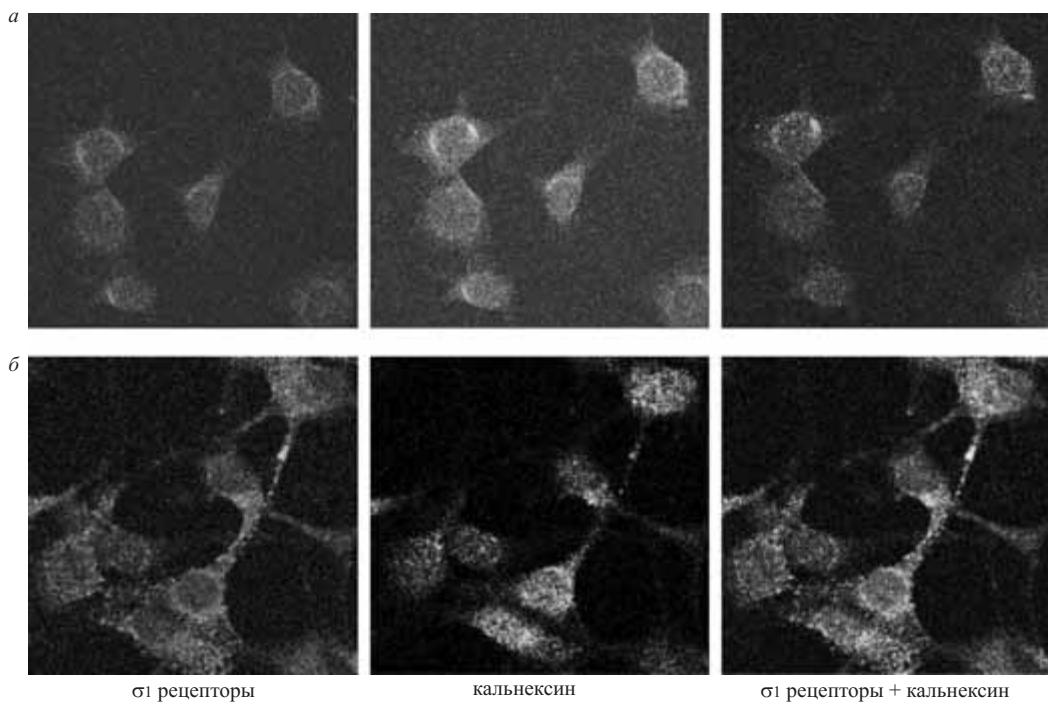
**Рис. 5.** Взаимодействие афобазола с MAO-A рецептором. Для афобазола IC<sub>50</sub> = 6,2 · 10<sup>-6</sup> M, Ki = 3,6 · 10<sup>-6</sup> M, nH = 1,1. Связывание афобазола с MAO-A рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

Наибольшее средство афобазола установлено для MT<sub>3</sub> (ML<sub>2</sub>) рецептора: IC<sub>50</sub> = 9,9 · 10<sup>-7</sup> M, Ki = 9,7 · 10<sup>-7</sup> M, nH = 0,8. MT<sub>3</sub> рецептор также оказался единственной обнаруженной мишенью основного метаболита афобазола — M-11: IC<sub>50</sub> = 4 · 10<sup>-7</sup> M, Ki = 3,9 · 10<sup>-7</sup> M, nH = 0,7 (рис. 3). Полученные данные позволяют отнести афобазол и M-11 к группе высокоафинных лигандов MT<sub>3</sub> рецептора.

Афобазол и M-11 в микромолярном диапазоне концентраций взаимодействуют с мелатониновым рецептором 1-го типа (MT<sub>1</sub>). Для афобазола IC<sub>50</sub> = 2,7 · 10<sup>-5</sup> M, Ki = 1,6 · 10<sup>-5</sup> M, nH = 0,8. Для M-11 IC<sub>50</sub> = 7,2 · 10<sup>-5</sup> M, Ki = 4,4 · 10<sup>-5</sup> M, nH = 0,6 (рис. 4). Однако афобазол обладает более высоким средством в данном типе рецептора.

При изучении взаимодействия афобазола с регуляторным участком MAO-A установлены следующие параметры рецепторного взаимодействия: IC<sub>50</sub> = 6,2 · 10<sup>-6</sup> M, Ki = 3,6 · 10<sup>-6</sup> M, nH = 1,1 (рис. 5). Значения параметров IC<sub>50</sub> и Ki для MT-11 находятся в области высоких концентраций (IC<sub>50</sub> = 3,1 · 10<sup>-4</sup> M, Ki = 1,8 · 10<sup>-4</sup> M, nH = 0,6), что свидетельствует об отсутствии специфического взаимодействия.

В результате иммунофлуоресцентного окрашивания клеток гиппокампа мыши линии HT-22 антителами к σ<sub>1</sub> и кальнексину установлено, что введение афобазола в среду культивирования вызывает внутриклеточное перераспределение σ<sub>1</sub> рецепторов. На рис. 6 видно, что в контроле σ<sub>1</sub> рецепторы отсутствуют в аксонах и локализованы в теле нейронов, а их расположение соответствует локализации маркера эндоплазматического ретикулума — кальнексина. Через 30 мин после внесения афобазола в среду культивирования окрашивание, специфичное для σ<sub>1</sub> рецепторов, наблюдается не только в теле нейронов, но и в аксонах. Через 1 ч после внесения афобазола видно, что данные рецепторы в значительной мере локализованы близ плазматической мембранны клеток, в том числе, аксонов, в то



**Рис. 6.** Иммунофлуоресцентное окрашивание  $\sigma_1$ -рецепторов и кальнексина в иммортализированных клетках гиппокампа мыши линии HT-22.

*a* — Контрольное окрашивание. *б* — Окрашивание через 1 ч после внесения афобазола в инкубационную среду в концентрации 10<sup>-8</sup> М.

время как кальнексин по-прежнему остается ассоциированным с мембраной эндоплазматического ретикулума в теле нейронов.

В результате исследований, проведенных под руководством А. Е. Медведева, установлено, что афобазол снижает активность MAO-A митохондрий головного мозга и печени крыс (рис. 7). При этом преинкубация препарата с митохондриями печени в течение 30 мин не усиливала эффект препарата в опытах на митохондриях печени (табл. 2). Отсутствие зависимого от времени увеличения ингибиции MAO-A свидетельствует об обратимом взаимодействии афобазола с ферментом. Действительно, при преинкубации афобазола с митохондриями печени длительностью 30 мин с последующей трехкратной отмыvkой митохондрий активность MAO-A восстанавливалась полностью (табл. 3).

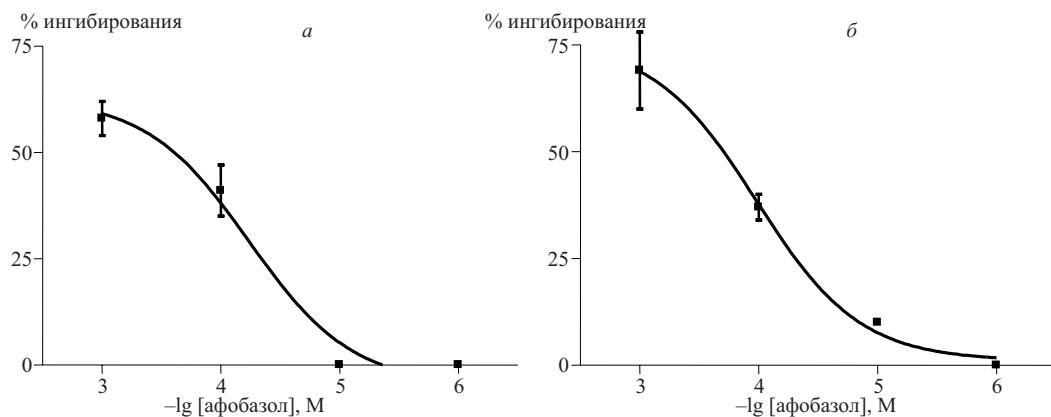
Величины IC<sub>50</sub> ингибиции MAO-A головного мозга [(3,6 ± 1,5) · 10<sup>-4</sup> М] и печени [(4,3 ± 1,1) · 10<sup>-4</sup> М] афобазолом, полученные в серии экспериментов, свидетельствует о том, что препарат проявляет свойства слабого легко обратимого ингибитора фермента.

Проведенное исследование определило в качестве первичных «мишеней» для афобазола  $\sigma_1$ , MT<sub>1</sub>, MT<sub>3</sub> рецепторы и MAO-A. В доступной литературе мы не обнаружили сообщений о фармакологических препаратах либо химических соединениях с подобным спектром рецепторных взаимодействий.

Физиологическая роль выявленных молекулярных образований подробно охарактеризована в ряде обзоров и оригинальных статей [17, 23, 27, 38]. Наиболее важно, что эти данные согласуются с установленными ранее анксиолитическими и нейропротекторными эффектами афобазола [1, 2, 5, 52]. В обсуждении представляется целесообразным более подробно рассмотреть ряд следствий из зарегистрированных фактов связывания афобазола с  $\sigma_1$  и MT<sub>3</sub> рецепторами, поскольку свойства MT<sub>1</sub> рецептора и обратимых ингибиторов MAO-A хорошо изучены.

**$\sigma_1$ -Рецепторы.**  $\sigma_1$ -Рецепторы открыты в 1976 г. [40]. Выявление селективных лигандов, клонирование и определение аминокислотной последовательности рецептора позволили исключить его из ряда опиоидных рецепторов, к которым он первоначально был отнесен [22, 29, 54, 59].

Предполагается, что  $\sigma_1$  рецептор локализуется преимущественно на эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и имеет два трансмембранных домена [8, 46]. Удивительным и вероятно весьма важным свойством  $\sigma_1$ -рецептора является способность к миграции в область поверхностной мембраны клетки в составе липидных микродоменов (*lipid rafts*) [24]. Липидное окружение  $\sigma_1$ -рецептора представлено сфинголипидами и холестерином, служащими каркасом для локализованных в наружной мембране белков рецепторов, ионных каналов ферментов [25]. Таким образом, логично полагать, что инициированный афобазолом



**Рис. 7.** Влияние афобазола на активность MAO-A печени (*а*) и головного мозга (*б*) крысы. Влияние афобазола на активность фермента исследовали без предварительной преинкубации митохондрий с препаратом. Данные шести независимых экспериментов – *а* и трех независимых экспериментов – *б* представлены в виде  $M \pm S. E. M.$

транспорт  $\sigma_1$  рецептора в область наружной мембранны может способствовать восстановлению фосфолипидного состава клеточных мембран, который, как известно, нарушается при патологических процессах в результате усиления перекисных реакций [21]. В свою очередь это должно нивелировать зависящие от ПОЛ нарушения конформации функционально важных белков и нормализовать их активность, что и было установлено для ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в опытах с афобазолом *ex vivo* [5].

Далее,  $\sigma_1$ -рецептор способен к белок-белковым взаимодействиям и рассматривается в ряде случаев в качестве шаперона [23, 26]. Установлено взаимодействие  $\sigma_1$ -рецепторов с белком цитоскелета анкирином, связанным с рецептором инозитол 1,4,5-трифосфата (IP3R), благодаря чему регулируется IP3 зависимое высвобождение  $Ca^{2+}$  из ЭПР [45].  $\sigma_1$ -Рецептор обнаружен также в мембранах ЭПР, ассоциированных с митохондриями, где взаимодействует с белком BiP, продленивая выход  $Ca^{2+}$  из ЭПР в митохондрии, увеличивая таким образом биоэнергетический потенциал нейронов [26]. Активация  $\sigma_1$ -рецепторов опосредует регуляцию потенциалзависимых ионных каналов наружной мембранны [8] и транспорт  $Ca^{2+}$  через

NMDA-рецепторы [41, 67].  $\sigma_1$ -Рецептор способен ингибировать пресинаптическое высвобождение глутамата и глутаматиндуцируемую NO синтазу [34, 37, 61]. За счет белок-белковых взаимодействий  $\sigma_1$ -рецептора происходит активация фосфолипазы С, каскада IP3 и диацилглицерола, что в конечном итоге определяет состояние  $Ca^{2+}$ -зависимых процессов [46]. Известны данные об опосредованном через  $\sigma_1$ -рецепторы влиянии на дофамин-, серотонин-, холинергические системы [9, 31, 42], продукцию и функционирование факторов роста нервов [57, 58, 66], а также экспрессию генов, в том числе регулирующих апоптоз [60, 68].

С  $\sigma_1$ -рецептором способны связываться нейростеины [56], физиологически активные нейропептиды [51], нейролептики (галоперидол) [55], антидепрессанты (имипримин) [50, 57], бензоморфаны [(+)-пентазоцин] [53], другие соединения [15].

В экспериментальных исследованиях лиганды  $\sigma_1$  рецепторов проявили ряд фармакологических свойств, среди которых отмечены анксиолитический и нейропротекторные эффекты, сходные с афобазолом [7, 30, 43].

Поскольку  $\sigma_1$ -рецепторы являются высококонсервативными белками, количество и локализация которых практически не изменяются в онтогенезе, вовлечены в разнообразные механизмы, поддерживающие гомеостаз клетки и ее жизнеспособность, отвечают на многие эндогенные соединения, изменения концентрации которых имеют приспособительный характер, можно полагать, что эти белки представляют эволюционно выработанные образования, осуществляющие функции защиты клетки при негативных воздействиях, и служат своеобразным “ремонтным комплектом” клетки. Если данная гипотеза верна, то область применения афобазола в клинической практике может быть значительно расширена. Экспериментальные подтверждения гипотезы представлены в статьях настоящего выпуска и предыдущих публикациях [5, 52].

**Таблица 3. Влияние трехкратной отмычки митохондрий от афобазола на активность MAO-A митохондрий печени**

Условия эксперимента	Активность MAO-A, % от исходной активности
Преинкубация с афобазолом (1 mM, 30 мин)	46 ± 4
Преинкубация с афобазолом (1 mM, 30 мин) + отмычка	105 ± 6
Уровень значимости ( <i>p</i> )	< 0,01

**Примечание.** Указана активность MAO-A, полученная в результате 3–4 независимых экспериментов и выраженная в процентах по отношению к контролю. Данные представлены в виде  $M \pm S. E. M.$ . Статистический анализ проводили с использованием t-критерия для зависимых выборок.

*MT<sub>3</sub>-рецепторы.* Среди рецепторов мелатонина MT<sub>3</sub> тип наименее изучен и имеет ряд свойств, позволяющих выделить его в отдельный класс. MT<sub>3</sub> рецептор представляет регуляторный участок фермента хинонредуктазы 2 (QR2, NQR2 E. C. 1.10.99.2) и характеризуется быстрой кинетикой процессов ассоциации и диссоциации с лигандами [38]. Аминокислотный состав MT<sub>3</sub> рецептора из ткани почки сирийского хомяка на 95 % совпадает с QR2 человека. Трансфекция гена QR2 человека в клеточную культуру приводила не только к развитию хинонредуктазной активности, но и к возникновению способности к связыванию MCA-NAT (2-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine) — наиболее специфического лиганда MT<sub>3</sub> рецептора, что позволило говорить об идентичности молекул фермента и рецептора [47]. В более поздних экспериментах это предположение было подтверждено на модели нокаутных мышей по гену NQR2 (NQR2-/-), ткани которых оказались неспособны к специфическому связыванию MCA-NAT [39].

Хинонредуктаза 2 и родственный фермент хинонредуктаза 1 (QR1) катализируют процессы детоксикации высокореактивных экзогенных хинонов, предохраняя клетки от окислительного стресса [13]. Тем не менее основная биологическая роль QR2 на сегодняшний день до конца не определена. Экспрессия гена QR2 имеет значительные межвидовые различия, однако наибольшее содержание фермента обнаруживается в печени и почках и в меньших количествах — в головном мозге [48]. Промотор гена QR2 включает копию ARE (*antioxidant response element*) последовательности, отвечающую за индукцию экспрессии в ответ на ряд ксенобиотиков и антиоксидантов [28]. Наличие данной последовательности характерно для многих генов ферментов детоксикации. Каталитические участки QR1 и QR2 имеют высокую степень гомологии и обеспечивают восстановление хинонных субстратов с переносом 1, 2 или 4 электронов [10, 33, 35]. Несмотря на схожесть QR1 и QR2 ферменты используют разные ко-субстраты и субстраты, а также реагируют на различные ингибиторы [10, 65]. В восстановительных реакциях QR1 участвуют NADH и NADPH, тогда как QR2 использует N-ribosyldihydronicotinamide (NRH) и N-methyldihydronicotinamide (NMH) [36, 65, 70]. Известно немного субстратов QR2. К их числу относят мениадион (витамин K3), допахиноны и коэнзим Q<sub>0</sub> (убихинон) — единственный известный на сегодняшний день эндогенный субстрат фермента. J. A. Boutin и соавт. [10] не исключают возможность взаимодействия QR2 с убихинонами с изопрениловыми боковыми цепями различной длины (Q1 – Q10). Учитывая способность убихинонов встраиваться в биологические мембранны, в том числе мембранны митохондрий, где они включаются в дыхательную цепь переноса электро-

нов, QR2 может модулировать гомеостаз и энергетический баланс клетки [10]. В этой связи интересно отметить общие клеточные структуры, участвующие в реализации эффектов афобазола как лиганда σ<sub>1</sub> и MT<sub>3</sub> рецепторов. Установлено также, что QR2 играет определенную роль в метаболической активации противоопухолевых препаратов из класса хинонов [11]. Несмотря на невысокое содержание фермента в головном мозге, в последнее время особое внимание уделяется его регуляторным функциям в ЦНС. Например, обсуждается влияние полиморфизма промоторной области гена QR2 в регуляции экспрессии и, как следствие, предрасположенности к болезни Паркинсона [62], а фермент рассматривается в качестве оксидазы токсичных катехоловых хинонов, продуктов окисления дофамина [19]. Фармакологическое значение связывания афобазола с MT<sub>3</sub> типом рецептора должно явиться предметом дальнейших исследований.

MT<sub>1</sub> рецептор на сегодняшний день изучен достаточно хорошо. Известно, что данный тип рецептора мелатонина связан с G-белками. Через MT<sub>1</sub> рецептор мелатонин участвует в регуляции циркадных ритмов. Установлено также, что мелатонин играет важную роль в формировании поведенческих реакций, а лиганды MT<sub>1</sub> рецептора обладают антидепрессивным и анксиолитическим свойствами [17, 32, 63]. Не исключено, что анксиолитическое действие афобазола опосредуется и через данный тип рецептора. Мягкий антидепрессивный эффект афобазола может проявляться также посредством ингибирования активности MAO-A — классической “мишени” для антидепрессантов [18, 69].

Таким образом, рецепторограммы, полученные в результате исследования взаимодействия афобазола с нейрорецепторами, и результаты иммунофлюоресцентного исследования *in vitro* внутриклеточной локализации σ<sub>1</sub>-рецептора в ответ на введение афобазола полностью соответствуют установленным фармакологическим эффектам афобазола, раскрывают первичные механизмы его действия как анксиолитика и нейропротектора и определяют дальнейшие перспективы фармакологического изучения и применения в фармакотерапии.

## ВЫВОДЫ

- Установлено взаимодействие афобазола с σ<sub>1</sub> (Ki = 5,9 · 10<sup>-6</sup> М), MT<sub>1</sub> (Ki = 1,6 · 10<sup>-5</sup> М), MT<sub>3</sub> (Ki = 9,7 · 10<sup>-7</sup> М) рецепторами и регуляторным участком MAO-A (Ki = 3,6<sup>-6</sup> М).

- Афобазол в концентрации 10<sup>-8</sup> М при 30 и 60 мин инкубации с иммортализированными клетками гиппокампа НТ-22 вызывает транслокацию σ<sub>1</sub>-рецептора из эндоплазматического ретикулума в область наружной мембранны клетки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Галаева, Т. Л. Гарифова, Т. А. Воронина и др., *Бiol. экспер. биол.*, **140**(5), 535 – 537 (2005).
2. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян и др., *Бiol. Экспер. биол.*, **140**(8), 194 – 196 (2005).
3. В. Ф. Позднев, Л. Н. Аксенова, А. Е. Медведев, *Биохимия*, **65**, 1288 – 1294 (2000).
4. С. Б. Середенин, А. О. Виглинская, Т. Я. Можаева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(2), 50 – 52 (2008).
5. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
6. М. А. Яркова, *Автотреф. дис. канд. мед. наук*, Москва (1996).
7. C. T. Ajmo, Jr., D. O. Vernon, L. Collier, et al., *Current neurovascular research*, **3**(2), 89 – 98 (2006).
8. E. Aydar, C. P. Palmer, V. A. Klyachko, and M. B. Jackson, *Neuron*, **34**(3), 399 – 410 (2002).
9. J. E. Bermack and G. Debonnel, *Journal of pharmacological sciences*, **97**(3), 317 – 336 (2005).
10. J. A. Boutin, F. Chatelain-Egger, F. Vella, et al., *Chemico-biological interactions*, **151**(3), 213 – 228 (2005).
11. C. M. Celli, N. Tran, R. Knox, and A. K. Jaiswal, *Biochem Pharmacol.*, **72**(3), 366 – 376 (2006).
12. A. M. Cesura, M. Bos, M. D. Galva, et al., *Molecular pharmacology*, **37**(3), 358 – 366 (1990).
13. S. Chen, K. Wu, and R. Knox, *Free radical biology & medicine*, **29**(3 – 4), 276 – 284 (2000).
14. Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochemical pharmacology*, **22**(23), 3099 – 3108 (1973).
15. T. L. Collier, R. N. Waterhouse, and M. Kassiou, *Current pharmaceutical design*, **13**(1), 51 – 72 (2007).
16. M. Da Prada, R. Kettler, H. H. Keller, et al., *Journal of neural transmission*, **29**, 279 – 292 (1990).
17. M. L. Dubocovich, M. A. Rivera-Bermudez, M. J. Gerdin, and M. I. Masana, *Front Biosci*, **8**, d1093 – 1108 (2003).
18. A. Feldstein, H. Hoagland, M. Rivera Oktem, and H. Freeman, *Int J Neuropsychiatry*, **1**(4), 384 – 387 (1965).
19. Y. Fu, L. Buryanovskyy, and Z. Zhang, *J. Biol. Chem.*, **283**(35), 23829 – 23835 (2008).
20. M. E. Ganapathy, P. D. Prasad, W. Huang, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **289**(1), 251 – 260 (1999).
21. B. Halliwell, *Journal of neurochemistry*, **97**(6), 1634 – 1658 (2006).
22. M. Hanner, F. F. Moebius, A. Flandorfer, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(15), 8072 – 8077 (1996).
23. T. Hayashi and T. Su, *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **11**(Suppliment 1), 116 – 117 (2008).
24. T. Hayashi and T. P. Su, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(41), 14949 – 14954 (2004).
25. T. Hayashi and T. P. Su, *Life sciences*, **77**(14), 1612 – 1624 (2005).
26. T. Hayashi and T. P. Su, *Cell*, **131**(3), 596 – 610 (2007).
27. J. Licinio, M. L. Wong (eds.), *Biology of Depression. From Novel Insights to Therapeutic Strategies*, WILEY-VCH, Weinheim, (2005).
28. A. K. Jaiswal, *Free radical biology & medicine*, **29**(3 – 4), 254 – 262 (2000).
29. O. Jbilo, H. Vidal, R. Paul, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**(43), 27107 – 27115 (1997).
30. C. Katnik, W. R. Guerrero, K. R. Pennypacker, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **319**(3), 1355 – 1365 (2006).
31. T. Kobayashi, K. Matsuno, M. Murai, and S. Mita, *Neurochemical research*, **22**(9), 1105 – 1109 (1997).
32. C. Kopp, E. Vogel, M. Rettori, et al., *Neuropharmacology*, **39**(10), 1865 – 1871 (2000).
33. J. J. Kwiek, T. A. Haystead, and J. Rudolph, *Biochemistry*, **43**(15), 4538 – 4547 (2004).
34. A. S. Lesage, K. L. De Loore, L. Peeters, and J. E. Leysen, *Synapse* (New York, N. Y.), **20**(2), 156 – 164 (1995).
35. R. Li, M. A. Bianchet, P. Talalay, and L. M. Amzel, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **92**(19), 8846 – 8850 (1995).
36. S. Liao, J. T. Dulaney, and H. G. Williams-Ashman, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2981 – 2987 (1962).
37. B. P. Lockhart, P. Soulard, C. Benicourt, et al., *Brain Res*, **675**(1 – 2), 110 – 120 (1995).
38. F. Maillet, G. Ferry, F. Vella, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **71**(1 – 2), 74 – 88 (2005).
39. F. Maillet, G. Ferry, F. Vella, et al., *FEBS Lett*, **578**(1 – 2), 116 – 120 (2004).
40. W. R. Martin, C. G. Eades, J. A. Thompson, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **197**(3), 517 – 532 (1976).
41. M. Martina, M. E. Turcotte, S. Halman, and R. Bergeron, *The Journal of physiology*, **578**(Pt 1), 143 – 157 (2007).
42. K. Matsuno, K. Matsunaga, T. Senda, and S. Mita, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **265**(2), 851 – 859 (1993).
43. T. Maurice, V. L. Phan, A. Urani, et al., *Japanese journal of pharmacology*, **81**(2), 125 – 155 (1999).
44. A. E. Medvedev, A. A. Kirkel, N. S. Kamyshekskaya, et al., *Biochemical pharmacology*, **47**(2), 303 – 308 (1994).
45. P. J. Mohler, J. Q. Davis, L. H. Davis, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**(13), 12980 – 12987 (2004).
46. M. P. Morin-Surun, T. Collin, M. Denavit-Saubie, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(14), 8196 – 8199 (1999).
47. O. Nosjean, M. Ferro, F. Coge, et al., *J. Biol. Chem.*, **275**(40), 31311 – 31317 (2000).
48. O. Nosjean, J. P. Nicolas, F. Klupsch, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **61**(11), 1369 – 1379 (2001).
49. D. S. Pickering and L. P. Niles, *Eur. J. Pharmacol.*, **175**(1), 71 – 77 (1990).
50. C. Rogers and S. Lemaire, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **70**(11), 1508 – 1514 (1992).
51. F. J. Roman, B. Martin, and J. L. Junien, *European journal of pharmacology*, **242**(3), 305 – 307 (1993).
52. S. B. Seredenin, *Psychopharmacology & Biological Narcology*, **1** – **2**, 494 – 509 (2003).
53. G. F. Steinfels, G. P. Alberici, S. W. Tam, and L. Cook, *Neuropsychopharmacology*, **1**(4), 321 – 327 (1988).
54. T. P. Su, *European journal of pharmacology*, **75**(1), 81 – 82 (1981).
55. T. P. Su, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **223**(2), 284 – 290 (1982).
56. T. P. Su, E. D. London, and J. H. Jaffe, *Science* (New York, N. Y.), **240**(4849), 219 – 221 (1988).
57. M. Takebayashi, T. Hayashi, and T. P. Su, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **303**(3), 1227 – 1237 (2002).
58. M. Takebayashi, T. Hayashi, and T. P. Su, *Synapse* (New York, N. Y.), **53**(2), 90 – 103 (2004).
59. S. W. Tam, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**(21), 6703 – 6707 (1983).
60. K. T. Tchedre and T. Yorio, *Investigative ophthalmology & visual science*, **49**(6), 2577 – 2588 (2008).

61. K. Vagnerova, P. D. Hurn, A. Bhardwaj, and J. R. Kirsch, *Anesthesia and analgesia*, **103**(2), 430 – 434 (2006).
62. W. Wang, W. D. Le, T. Pan, et al., *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **63**(2), 127 – 134 (2008).
63. Z. M. Weil, A. K. Hotchkiss, M. L. Gatien, et al., *Brain Res Bull.*, **68**(6), 425 – 429 (2006).
64. P. A. Witt-Enderby and M. L. Dubocovich, *Molecular pharmacology*, **50**(1), 166 – 174 (1996).
65. K. Wu, R. Knox, X. Z. Sun, et al., *Archives of biochemistry and biophysics*, **347**(2), 221 – 228 (1997).
66. Y. Yagasaki, T. Numakawa, E. Kumamaru, et al., *J. Biol. Chem.*, **281**(18), 12941 – 12949 (2006).
67. H. Yamamoto, T. Yamamoto, N. Sagi, et al., *J. Neurosci.*, **15**(1 Pt 2), 731 – 736 (1995).
68. S. Yang, A. Bhardwaj, J. Cheng, et al., *Anesthesia and analgesia*, **104**(5), 1179 – 1184, tables of contents (2007).
69. M. B. Youdim and J. P. Finberg, *Mod Probl Pharmacopsychiatry*, **19**, 63 – 74 (1983).
70. Q. Zhao, X. L. Yang, W. D. Holtzclaw, and P. Talalay, *Proc. Natl Acad Sci USA*, **94**(5), 1669 – 1674 (1997).

Поступила 25.09.08

## NEURORECEPTOR MECHANISMS INVOLVED IN THE ACTION OF AFOBAZOLE

S. B. Seredenin and M. V. Voronin

Laboratory of Pharmacogenetics, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The interaction of afobazole (5-ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio]benzimidazole dihydrochloride) and its main metabolite M-11 (2-[2-(3-oxomorpholine-4-yl)-ethylthio]-5-ethoxy benzimidazole hydrochloride) with neuroreceptors was studied using the method of radioligand analysis. The binding of afobazole with s1 ( $K_i = 5.9 \cdot 10^{-6}$  M), MT1 ( $K_i = 1.6 \cdot 10^{-5}$  M), and MT3 ( $K_i = 9.7 \cdot 10^{-7}$  M) receptors, as well as with a regulatory site of MAO-A ( $K_i = 3.6 \cdot 10^{-6}$  M) was revealed. The binding of M-11 with MT3 receptors ( $K_i = 3.9 \cdot 10^{-7}$  M) was demonstrated. The translocation of s1 receptor from endoplasmatic reticulum to the external membrane was revealed by the confocal microscopy technique on the immortalized hippocampal HT-22 cells under the condition of 30- and 60-min-long afobazole ( $10^{-8}$  M) application. Afobazole was shown to inhibit MAO-A reversibly. These properties of afobazole are consistent with our previous findings of the anxiolytic and neuroprotective effects of this drug.

**Key words:** Afobazole, sigma 1 receptors, melatonin receptors, MAO-A, radioligand binding, immunofluorescence

## СЕЛЕКТИВНЫЙ АНКСИОЛИТИК АФОБАЗОЛ УВЕЛИЧИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ BDNF И NGF В КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ЛИНИИ HT-22

Т. А. Антипова, Д. С. Сапожникова, Л. Ю. Бахтина, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

В опытах на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши было показано, что инкубация с афобазолом в конечной концентрации  $10^{-8}$  М приводит к увеличению содержания NGF, а в конечных концентрациях  $10^{-8}$  М –  $10^{-5}$  М к увеличению содержания BDNF.

**Ключевые слова:** афобазол, фактор роста нерва NGF, мозговой нейротрофический фактор BPNF, нейроны гиппокампа

### ВВЕДЕНИЕ

Из литературы известно, что лиганды  $\sigma_1$ -рецепторов опосредованно влияют на содержание мозгового нейротрофического фактора BDNF и фактора роста нервов NGF [8, 9]. На культуре клеток PC12 установлено, что гиперэкспрессия  $\sigma_1$ -рецепторов усиливает NGF-индуцированный рост нейритов, а снижение концентрации NGF ведет к увеличению количества  $\sigma_1$ -рецепторов [8]. Активация фосфолипазы C — гамма и последующего инозитолтрифосфат-зависимого сигнального каскада, вызванных BDNF, сопровождается повышением экспрессии  $\sigma_1$ -рецепторов, что свидетельствует об их участии в процессах нейропротекции [9].

Ранее установлено, что афобазол является лигандом  $\sigma_1$ -рецептора (IC50=7.1E-06M) [7]. На культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 зарегистрированы его нейропротекторные свойства при моделировании оксидативного стресса и глутаматной токсичности [2]. Исходя из совокупности приведенных данных, целью настоящей работы являлось изучение влияния афобазола на содержание мозгового нейротрофического фактора BDNF и фактора роста нервов NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали клетки линии HT-22 (иммортализованные клетки гиппокампа мыши). Клетки рассевали по 350 тыс./лунку на 6-луночные планшеты (Corning and Costar), предварительно обработанные раствором поли-D-лизина (0,1 мг/мл). Эксперименты проводили на 3-й день после пассажа (при образовании монослоя). Клетки отмывали от культуральной среды раствором PBS. Для определения содержания NGF клетки соединяли с лизирующим буфером (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100), pH 7,5 при температуре 4 °C, лизировали в течение 5 мин, затем соскребали, помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугирова-

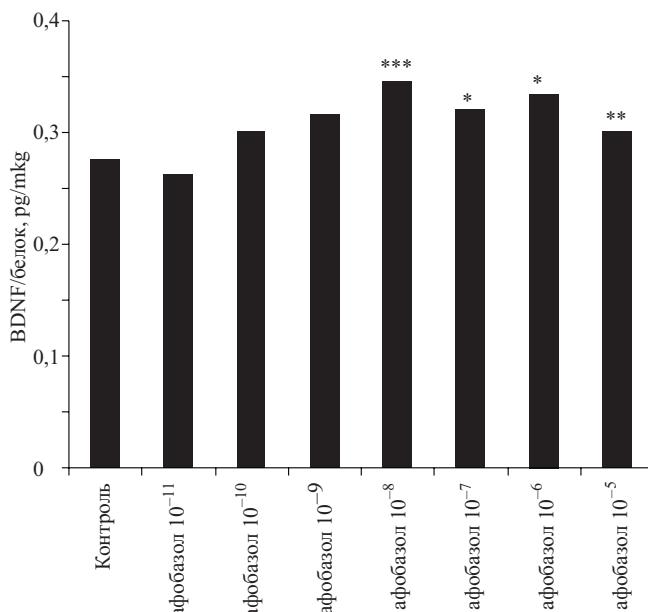
ли 10 мин при 13000 грт и 4 °C. Супернатант, содержащий белки цитозоля, анализировали с использованием электрофореза и иммуноблоттинга. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембранию PVDF осуществляли электроэлюзией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST (с добавлением 1% Tween-20) с 5% (вес/объем) обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем Вестерн-блоты инкубировали в присутствии первых поликлональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против NGF в разведении 1:1000 в течение 1 ч. Затем после отмычки блоты инкубировали в присутствии вторых антител (Santa Cruz Biotechnology и Bio-Rad), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000) в течение 1 ч. Детектирование NGF осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop.

Количественное содержание BDNF определяли методом иммуноферментного анализа (BDNF  $E_{max}$  Immunoassay System) в модификации ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) по протоколу фирмы "Promega" (США).

Для определения содержания BDNF афобазол добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях от  $10^{-11}$  М до  $10^{-5}$  М. После инкубации с препаратом в течение 1 ч среду заменяли на экстракционный буфер. При определении содержания NGF афобазол вносили в конечной концентрации  $10^{-8}$  М. Через 6 ч клетки лизировали.

На иммунологические планшеты наносили анти-BDNF моноклональные антитела (Anti-BDNF mAB) в карбонатном буфере (pH 9,7), которые связывают BDNF из экстрактов, и инкубировали при 4 °C в течение суток. После отмычки (буфером TBST) наносили другие специфичные к BDNF поликлональные AT (pAB) и инкубировали 2 ч. После отмычки количество специфически связавшихся поликлональных AT определяли с помощью видоспецифичных анти-IgY AT, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), и инкубировали 1 ч. Несвязавшиеся конъюгаты удаляли с помощью отмычки, за которой следовала инкубация

<sup>1</sup> ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций афобазола на уровень BDNF в культуре клеток HT-22 (\* —  $p \leq 0,001$ ; \*\* —  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* —  $p \leq 0,05$ ).

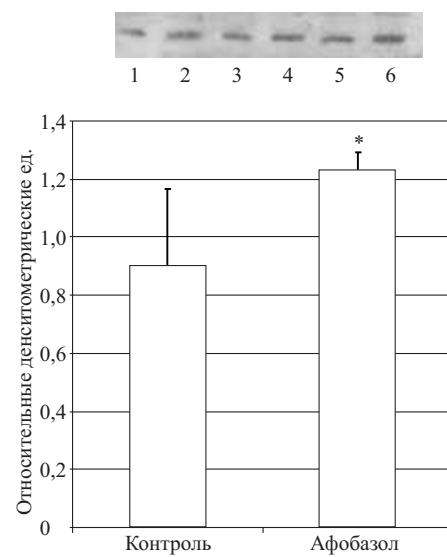
с хромогенным субстратом (TMB One Solution). Через 10 мин реакцию останавливали раствором 1Н HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм на спектрофотометре Elisa reader.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы Microsoft Excel и программы Jandel Scientific SigmaPlot и Statistica 6.0 для Windows. Достоверность различий между контролем и опытом проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в контроле содержание NGF составляет  $0,9 \pm 0,26$  отн. д. ед., а через 6 ч после внесения афобазола  $1,23 \pm 0,058$  отн. д. ед. (рис. 1). Таким образом, афобазол статистически достоверно на 36 % ( $p \leq 0,05$ ) увеличивает содержание данного нейротрофина в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22. Через 24 ч после внесения афобазола содержание NGF не отличалось от контрольного уровня.

Данные иммуноферментного анализа по изучению содержания BDNF показали, что афобазол статистически достоверно увеличивает уровень нейротрофина в конечных концентрациях  $10^{-8} M - 10^{-5} M$ , причем наибольшие увеличение (на 25 %,  $p \leq 0,05$ ) отмечено при внесении препарата в конечной концентрации  $10^{-8} M$  (рис. 2). Эти результаты согласуются с данными, полученными при изучении нейропротекторного действия афобазола на моделях оксидативного стресса и глутаматной токсичности в культуре клеток HT-22. Известно, что BDNF защищает нейроны от глутамат-



**Рис. 2.** Изменение содержания фактора роста нервов NGF через 6 ч после внесения афобазола в культуру клеток HT-22 (результаты Вестерн — блот анализа и денситометрии).

Дорожки: 1, 2, 3 — контроль, 4, 5, 6 — афобазол ( $10^{-8} M$ ).

ной токсичности, редуцируя повреждающее действие NO [4]. Установлено, что BDNF снижает активность каспазы-3 в нейронах коры и стриатума [3]. NGF играет важную роль в процессах созревания и поддержания жизнедеятельности холинергических нейронов нижних отделов переднего мозга и нейронов симпатической нервной системы [5]. Последние исследования функции NGF показали его участие в высвобождении ацетилхолина и глутамата из синаптических везикул нейронов коры большого мозга крысы. Нейропротекторное действие NGF проявляется в активации ядерного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, который является антиапоптотическим сигналом. Под контролем этого фактора транскрипции находится синтез белковых регуляторов, которые блокируют TNF- или Apo3L- (индукторы апоптоза) индуцированную активацию каспазы-8, относящейся к семейству апоптотических протеаз [6]. Кроме того, на модели травматического повреждения мозга крысы введение экзогенного NGF после повреждения повышало активность ферментов антиоксидантной защиты клеток, а именно, супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [10].

Таким образом, обнаруженную в настоящей работе способность афобазола увеличивать уровень BDNF и NGF следует рассматривать как важный элемент механизма его нейропротекторного действия. Полученные данные согласуются с предыдущими результатами, продемонстрировавшими способность афобазола предотвращать снижение содержания BDNF в различных структурах мозга животных при стрессовых воздействиях [1], и подтверждают гипотезу о сочетании в фармакологическом спектре афобазола анксиолитических и нейропротекторных свойств.

## ВЫВОДЫ

1. Афобазол в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 увеличивает содержание нейротрофинов BDNF и NGF.

2. Максимальный эффект афобазола проявляется при использовании конечной концентрации  $10^{-8}$  М.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Вальдман, Д. С. Мелкумян и др., *Психофармакол. биол. Наркол.*, **5**(3), 549 – 551 (2005).
2. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, С. Б. Середенин, *Бiol. экспер. биол.*, **8**, 161 – 163 (2005).
3. S. T. Kim, J. H. Choi, et al., *J. Neurochem.*, **95**(1), 89 – 98 (2005).

4. T. Kume, H. Kouchiyama, et al., *Brain Res.*, **756**(1 – 2), 200 – 204 (1997).
5. R. Levi-Montalcini, *Science*, **237**, 1154 – 1162 (1987).
6. H. Liu, R. Nowak, et al., *J. of Neurochem.*, **86**, 1553 – 1563 (2003).
7. S. Seredenin, G. Neznamov, et al., *The international J. of Neuropsychopharmacology*, **11**(1), 275 (2008).
8. M. Takebayashi, T. Hayashi, T-P Su, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**(3), 1227 – 1237 (2002).
9. Y. Yagasaki, T. Numakawa, et al., *J. Biol. Chem.*, **281**(18), 12941 – 12049 (2006).
10. Z. Zhou, H. Chen, et al., *J. Basic Clin Physiol Pharmacol.*, **14**, 217 – 224 (2003).

Поступила 25.09.08

## SELECTIVE ANXIOLYTIC AFOBAZOLE INCREASES THE CONTENT OF BDNF AND NGF IN THE CULTURE OF HIPPOCAMPAL HT-22 LINE NEURONS

**T. A. Antipova, D. S. Sapozhnikova, L. Yu. Bakhtina, and S. B. Seredenin**

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments on immortalized hippocampal cell culture of mice showed that afobazole increases the NGF level in a final concentration of  $10^{-8}$  М and the BDNF level in final concentrations from  $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  М.

**Key words:** Afobazole, BDNF, hippocampal neurons, NGF

## АФОБАЗОЛ СНИЖАЕТ ДВИГАТЕЛЬНЫЕ РАССТРОЙСТВА, ВЫЗВАННЫЕ ГАЛОПЕРИДОЛОМ

**С. Б. Середенин, Т. А. Гарикова, А. Л. Кузнецова, М. В. Воронин,  
М. А. Яркова, Т. А. Воронина<sup>1</sup>**

В опытах на мышах установлено, что афобазол (10 мг/кг) при однократном введении внутрибрюшинно усиливает действие галоперидола в дозе 0,05 мг/кг в тесте апоморфиновой вертикализации и не влияет на вызванную нейролептиком каталепсию. При 5-дневном предварительном введении в суточной дозе 10 мг/кг афобазол снижал экстрапирамидные эффекты галоперидола у мышей и крыс без существенного изменения показателей теста апоморфиновой вертикализации. Способность афобазола ослаблять экстрапирамидные нарушения, вызванные галоперидолом, может быть связана с агонистическим влиянием анксиолитика на  $\sigma_1$ -рецепторы.

**Ключевые слова:** афобазол,  $\sigma_1$ -рецептор, галоперидол, каталепсия, апоморфиновая вертикализация

### ВВЕДЕНИЕ

Большинство используемых в медицинской практике антипсихотических средств (нейролептиков) помимо основного антипсихотического действия характеризуются рядом побочных эффектов. Так, существенным ограничением для клинического применения одного из наиболее эффективных нейролептиков галоперидола являются вызываемые им экстрапирамидные расстройства и нейроэндокринные нарушения. Механизм антипсихотического действия галоперидола определяется антагонизмом с D2-рецепторами [13, 20]. Вместе с тем установлено, что галоперидол является антагонистом  $\sigma_1$ -рецепторов [10, 17]. Показано, что взаимодействие с  $\sigma_1$ -рецепторами коррелирует с выраженнойостью двигательных нарушений у пациентов, применяющих галоперидол и другие нейролептики [10]. В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН создан препарат афобазол, обладающий селективной анксиолитической активностью и нейропротекторным действием [3 – 6]. Анализ рецепторных взаимодействий афобазола, выполненный в сотрудничестве с компанией “Сереп” (Франция), показал, что препарат является лигандом  $\sigma_1$ -рецептора ( $IC_{50}$  7,1 · 10<sup>-6</sup> М) [14]. Полученные данные явились основанием для исследования влияния афобазола на выраженность основного и побочных эффектов галоперидола в экспериментах, выявляющих нейролептическую активность и двигательные расстройства [11, 18].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на самцах белых беспородных мышей массой 20 – 24 г и крыс массой 210 – 240 г, по-

лученных из питомника Столбовая РАМН. Животных содержали в условиях вивария НИИ фармакологии на стандартной диете, при 12-часовом режиме смены дня и ночи по 10 особей в клетке в течение двух недель до начала эксперимента. Исследования проводили с 10 ч до 14 ч в осенний период.

Для оценки нейролептической активности препаратов использовали тест апоморфиновой вертикализации [18]. Апоморфин (“Sigma”) вводили мышам в дозе 3 мг/кг подкожно за 10 мин до тестирования. Интенсивность вертикальной активности оценивали по 4-балльной системе. Для исследования каталепсии применяли тест удерживания позы на параллельных стенках [1, 2, 11] в опытах на мышах и крысах. Каталепсию вызывали внутрибрюшинным введением галоперидола (“Sigma”) в дозе 0,05 мг/кг, эффект регистрировали каждые 30 мин в течение трех часов. Критерием наличия каталептогенного действия считалось удерживание животного на параллельных стенках в течение 2 мин. Афобазол вводили животным внутрибрюшинно за 20 мин до тестирования.

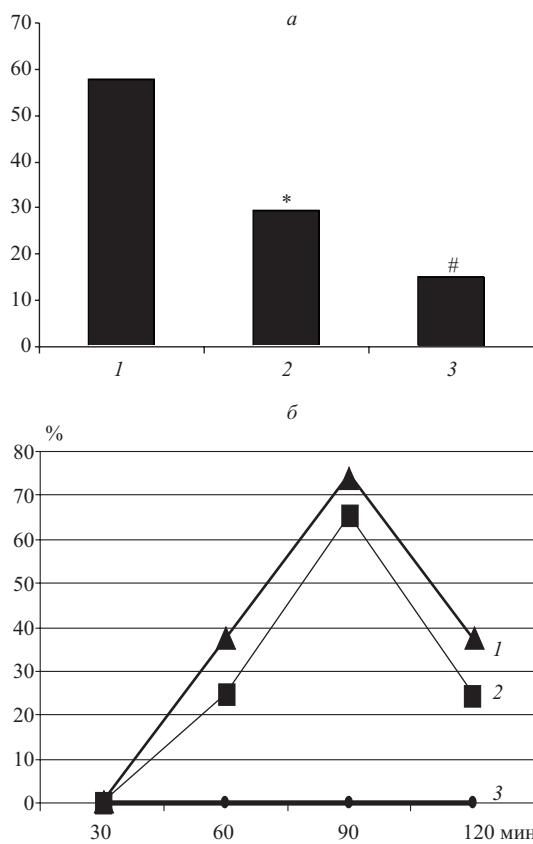
Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критерия  $\chi^2$  и определения площади под кривой (AUC) с помощью пакета программ Pharm/pcs, версия 4 [16].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных экспериментах установлено, что галоперидол в дозе 0,05 мг/кг снижает апоморфиновую вертикализацию у мышей в 2 раза (таблица). В той же дозе нейролептик вызывал каталепсию у 40 – 50 % исследованных мышей (рис. 1, б). Полученные результаты позволили выбрать дозу галоперидола 0,05 мг/кг для анализа его взаимодействия с афобазолом.

Афобазол в дозах 2 – 20 мг/кг не влиял на уровень апоморфиновой вертикализации у мышей (таблица). При совместном однократном введении галоперидола

<sup>1</sup> Лаборатория фармакогенетики (зав. — акад. РАМН С. Б. Середенин), лаборатория психофармакологии (руководитель — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



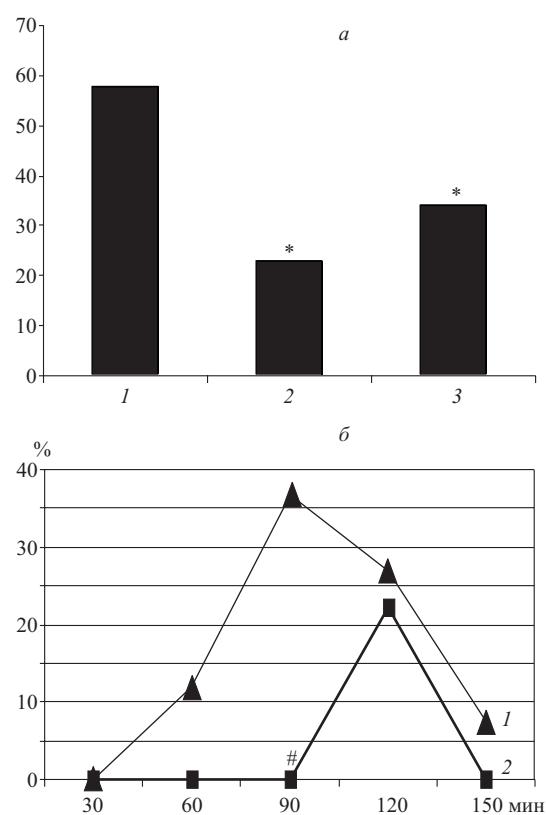
**Рис. 1.** Влияние афобазола, галоперидола и их сочетанного применения на вертикализацию, вызванную апоморфином (*a*) и каталепсию, вызванную галоперидолом (*б*) в опытах на мышах.

Здесь и на рис. 2 *a*: по оси ординат — вертикализация в абсолютных показателях. 1 — апоморфин 3 мг/кг; 2 — апоморфин 3 мг/кг + галоперидол 0,05 мг/кг; 3 — апоморфин 3 мг/кг + галоперидол 0,05 мг/кг + афобазол 10 мг/кг. Отличия от контроля достоверны при \* —  $p < 0,001$  (*t*-критерий Стьюдента), отличия от галоперидола достоверны при # —  $p < 0,05$  (*t*-критерий Стьюдента).

*б*: по оси абсцисс — время; по оси ординат — количество животных с каталепсией, %. 1 — галоперидол 0,05 мг/кг; 2 — галоперидол 0,05 мг/кг + афобазол 10 мг/кг; 3 — афобазол 10 мг/кг.

(0,05 мг/кг) и афобазола (10 мг/кг) эффект нейролептика в тесте апоморфиновой вертикализации усиливался (рис. 1, *a*), в то время как каталептогенное действие нейролептика не изменялось (рис. 1, *б*).

В следующей серии опытов афобазол вводили дважды в день в дозе 5 мг/кг в течение 5 сут. В день эксперимента первую дозу афобазола вводили совместно с галоперидолом, вторую — через 90 мин. В отличие от однократного применения комбинации препаратов, при использовании веществ по вышеуказанной схеме эффект галоперидола в апоморфиновом тесте не изменился (рис. 2, *a*). Вместе с тем двигательные расстройства, вызванные галоперидолом, на фоне предварительного введения афобазола снижались. Статистически достоверный результат у мышей зарегистрирован через 90 мин после введения препаратов (рис. 2, *б*). Существенные различия в каталептогенном действии галоперидола и его комбинации с афобазолом подтверждены определением площади под кри-



**Рис. 2.** Влияние афобазола при повторном введении (10 мг/кг/5 дней) на поведение мышей в тестах апоморфиновой вертикализации (*a*) и каталепсии, вызванной галоперидолом (*б*) в опытах на мышах.

Обозначения те же, что на рис. 1.

вой, отражающей развитие двигательных расстройств в течение 150 мин [16]. При сочетанном применении препаратов этот параметр уменьшился в 2,4 раза (рис. 2, *б*).

Описанные выше схемы пятидневного применения афобазола совместно с галоперидолом использовали в опытах на крысах. Как показано на рис. 3, уровень двигательных расстройств при введении комбинации препаратов значительно ниже, чем при использовании одного галоперидола в течение всего периода регистрации каталептогенного эффекта от 30 до 180 мин. Значение площади под кривой для сочетания оказалось в 4,2 раза ниже, чем для одного нейролептика. Таким образом, предварительное 5-дневное введение афобазола уменьшает каталептогенное действие галоперидола.

Полученные данные позволили установить взаимодействие афобазола с галоперидолом. При однократном введении препаратов зарегистрировано усиление эффекта нейролептика по антагонизму с апоморфином, а при 5-дневном предварительном введении афобазола — снижение индуцируемых галоперидолом двигательных расстройств, более выраженное у крыс. Для афобазола не выявлено сродство к дофаминовым receptorам, опосредующим антипсихотическое дей-

## Влияние галоперидола и афобазола на поведение мышей в teste апоморфиновой вертикализации

Вещество	Доза, мг/кг, внутрибрюшно	Интенсивность вертикальной активности		
		Контроль (физ. р-р + апоморфин)	Опыт (препарат + апоморфин)	Относительный показатель, %
Галоперидол	0,05	67,71 ± 6,41	30,14 ± 3,99*	44,51
Галоперидол	0,1	50,89 ± 5,23	5,11 ± 1,2*	10,04
Афобазол	2	53,22 ± 9,278	48,67 ± 7,299	91,45
	5	54,56 ± 6,263	48,22 ± 3,558	88,37
	10	56,89 ± 6,39	52,11 ± 4,721	91,59
	20	53,44 ± 3,4	46,33 ± 5,72	86,70

Примечание. Отличия от контроля достоверны: \* —  $p < 0,001$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

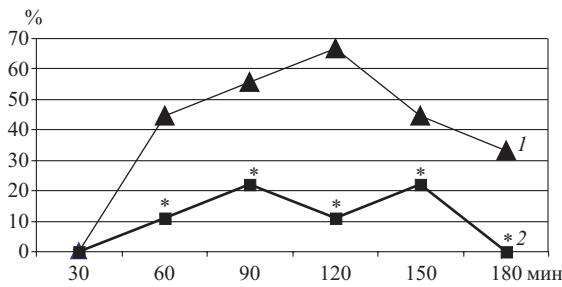


Рис. 3. Влияние афобазола (10 мг/кг/5 дней) на каталепсию, вызванную галоперидолом в опытах на крысях.

По оси абсцисс — время, по оси ординат — количество животных с каталепсией, %. 1 — галоперидол 0,05 мг/кг; 2 — галоперидол 0,05 мг/кг + афобазол 10 мг/кг. \* — достоверность отличий от галоперидола при  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ ).

ствие галоперидола [14], поэтому логично полагать, что формирование фармакологических эффектов совместно введенных препаратов определяется их сродством к  $\sigma_1$ -рецепторам. Вместе с тем известно, что агонисты  $\sigma_1$ -рецепторов способны модулировать дофаминергические нейромедиаторные процессы [8, 9, 12, 15], что могло обеспечить потенцирование антипсихотического эффекта галоперидола при совместном однократном введении с афобазолом.

Литература последних лет свидетельствует о том, что агонисты  $\sigma_1$ -рецепторов обладают нейропротекторными свойствами [19]. В тоже время галоперидол описан как антагонист  $\sigma_1$  рецепторов [10, 15]. Поэтому логичной была гипотеза о зависимости экстрапирамидных эффектов нейролептика от его влияния на  $\sigma_1$  рецепторы, что получило подтверждение в ряде исследований, выявивших корреляцию между сродством нейролептиков к  $\sigma_1$  рецепторам и выраженностю индуцированных ими двигательных расстройств [10].

В экспериментах, проведенных в настоящей работе, предварительное введение афобазола ослабляло каталептогенное действие галоперидола. Эти результаты и ранее полученные данные о нейропротекторных свойствах афобазола [6] дают основания для предположения, что анксиолитик, снижая эффект антагониста  $\sigma_1$ -рецепторов галоперидола, является их агонистом.

Отсутствие влияния афобазола на каталептогенный эффект галоперидола при однократном введении можно объяснить, во-первых, значительно большим сродством галоперидола к  $\sigma_1$ -рецепторам, по сравнению с афобазолом, во-вторых, достаточно быстрым метаболизмом афобазола [7].

По-видимому, для антагонизма препаратов по каталептогенному эффекту необходимо достаточное содержание анксиолитика в организме, поиск оптимальных схем их применения должен явиться предметом дальнейших исследований.

Результаты настоящей работы позволяют заключить: афобазол способен усилить антипсихотическое действие галоперидола и, что наиболее важно, уменьшить вызываемые нейролептиком двигательные расстройства.

## ВЫВОДЫ

1. Афобазол в дозах 2, 5, 10, 20 мг/кг при однократном введении не влияет на вызванную апоморфином вертикализацию у мышей.
2. Афобазол (10 мг/кг однократно) усиливает эффект галоперидола (0,05 мг/кг) в teste апоморфиновой вертикализации у мышей и не влияет на индуцированную нейролептиком каталепсию в teste удерживания позы на параллельных стенках.
3. Афобазол при введении в дозе 5 мг/кг дважды в день в течение 5 суток ослабляет вызванную галоперидолом каталепсию у мышей и крыс в teste удерживания позы на параллельных стенках и не влияет на антагонизм нейролептика с апоморфином.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина и др., *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 295 – 308.
2. К. С. Раевский и др., *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 230 – 244.
3. С. Б. Середенин, *Лекции по фармакогенетике*, Медицина, Москва (2004).
4. С. Б. Середенин, Ю. А. Бледнов, В. Л. Савельев и др., Патент РФ № 2061686, *Бюл. изобр.*, 16 (1996).

5. С. Б. Середенин, Г. Г. Незнамов, Ю. А. Бледнов и др., *Вестн. РАМН*, № 11, 3 – 9 (1998).
6. С. Б. Середенин, В. П. Акопян, Р. И. Авдюнина и др., Патент РФ, № 2288714, *Бюл. изобр.* № 34 (2006).
7. С. Б. Середенин, А. О. Виглинская, Г. Б. Колыванов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(2), 69 – 74 (2007).
8. T. L. Collier, R. N. Waterhouse, and M. Kassion, *Corrent Pharmacol. Design*, **13**, 51 – 72 (2007).
9. J. Karasawa, S. Takahashi, K. Takagi, and K. Norikomi, *Pharmacol Biochem Behav.*, **73**(3), 505 – 10 (2002).
10. R. R. Matsumoto and B. Pouw, *Europ. J. Pharmacol.*, **401**, 155 – 160 (2000).
11. C. Morpurgo, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **137**(1 – 2), 92 – 96 (1962).
12. S. Okuyama, Y. Imagawa, S. Ogawa, et al., *Life Sci.*, **53**(18), 285 – 290 (1993).
13. L. T. Schwartz and A. W. Brotman, *Drugs*, **44**, 981 – 992 (1992).
14. S. B. Seredenin, G. G. Neznamov, M. A. Yarkova, et al., *The Int. J. Neuropharmacol.*, **11**, supp. 1, 275 (2008).
15. S. Takahashi, K. Sonehara, K. Takagi, et al., *Psychopharmacology (Berl)*, **145**(3), 295 – 302 (1999).
16. R. J. Tallarida and R. B. Murray, *Manuel of Pharmacological calculation*, N. Y. Springer-Verlag, 1986, version 4.
17. S. W. Tam and L. Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 5618 – 5621 (1984).
18. M. Vasse, P. Protails, J. Costentin, and J.-C. Schwartz, *Arch. Pharmacol.*, **329**, 108 – 116 (1985).
19. L. L. Werling, E. C. Lauterbach, and U. Calef, *Neurologist*, № 13, 272 – 293 (2007).
20. J. M. Walker, W. D. Bowen, F. O. Walker, et al., *Pharmacol. Rev.*, **42**, 355 – 402 (1990).

Поступила 25.09.08

## AFOBAZOLE DECREASES MOTOR SIDE EFFECTS INDUCED BY HALOPERIDOL

**S. B. Seredenin, T. A. Garibova, A. L. Kuznetsova, M. V. Voronin, M. A. Yarkova, and T. A. Voronina**

Laboratory of Pharmacogenetics, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

Experiments on mice showed that a single intraperitoneal administration of anxiolytic afobazole (10 mg/kg) increases the effect of haloperidol in the apomorphine-induced climbing test and does not influence the catalepsy caused by the neuroleptic agent. The daily dose of afobazole 10 mg/kg during a five-day preliminary test reduced the extrapyramidal effects of haloperidole on rats and mice without significant change of the apomorphine-induced climbing test results. The ability of afobazole to reduce extrapyramidal disturbances caused by haloperidol can be related to the agonist effect of afobazole with respect to sigma 1 receptors.

**Key words:** Afobazole, sigma 1 receptors, haloperidol, catalepsy, apomorphine-induced climbing

## АНТИДЕПРЕССИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ АФОБАЗОЛА В ТЕСТАХ PORSOLT И NOMURA

С. Б. Середенин, Г. М. Молодавкин, М. В. Воронин, Т. А. Воронина<sup>1</sup>

В опытах на беспородных белых крысах показано, что анксиолитик афобазол в дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно в тестах вынужденного плавания по Porsolt и Nomura вызывает эффекты, сходные с антидепрессантами амитриптилином в дозе 10 мг/кг.

**Ключевые слова:** афобазол, антидепрессивная активность

### ВВЕДЕНИЕ

Оригинальный селективный анксиолитик афобазол внедрен в медицинскую практику в 2005 г. Радиолигандные исследования позволили установить связывание афобазола с  $\sigma_1$ ,  $MT_1$ ,  $MT_3$  рецепторами и моноаминоксидазой-А (MAO-А) в микромолярном диапазоне концентраций [10]. Взаимодействие с  $\sigma_1$ ,  $MT_1$  рецепторами и MAO-А позволяет предположить наличие у афобазола антидепрессивных свойств [6, 9, 14]. В связи с этим целью работы явилась экспериментальная проверка данной гипотезы.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 218 белых беспородных крысах-самцах массой 200 – 250 г возраста 70 – 90 дней (питомник РАМН Столбовая). Содержание животных в виварии соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. “Об утверждении правил лабораторной практики”.

Для оценки антидепрессивного действия афобазола использовали метод вынужденного плавания в сосуде с водой по Porsolt [1, 8] и метод плавания в сосуде со свободновращающимися колесами по Nomura [1, 7] в нашей модификации [4]. Опыты проводили с 12 до 16 ч.

В teste вынужденного плавания по Porsolt животных помещали в сосуд (диаметр 40 см, глубина 60 см) с водой (25 °C). Состояние иммобилизации оценивали визуально с определением ее длительности и числа эпизодов в течение 10 мин. Ввод и регистрация основных параметров экспериментальной методики проводились с использованием компьютерной программы [3].

Установка методики вынужденного плавания по Nomura [7] представляет сосуд размерами 64 × 30 × 42 см, разделенный на 4 равных отсека, в которых находятся колеса шириной 11 см. Сосуд запол-

нян водой (25 °C) до середины колес. Крысу помещают на колесо и затем производят регистрацию числа оборотов колес в течение 10 мин с помощью электромеханических счетчиков. Кроме того, вычисляется коэффициент корреляции между числом оборотов за первые и вторые 5 мин наблюдения [3].

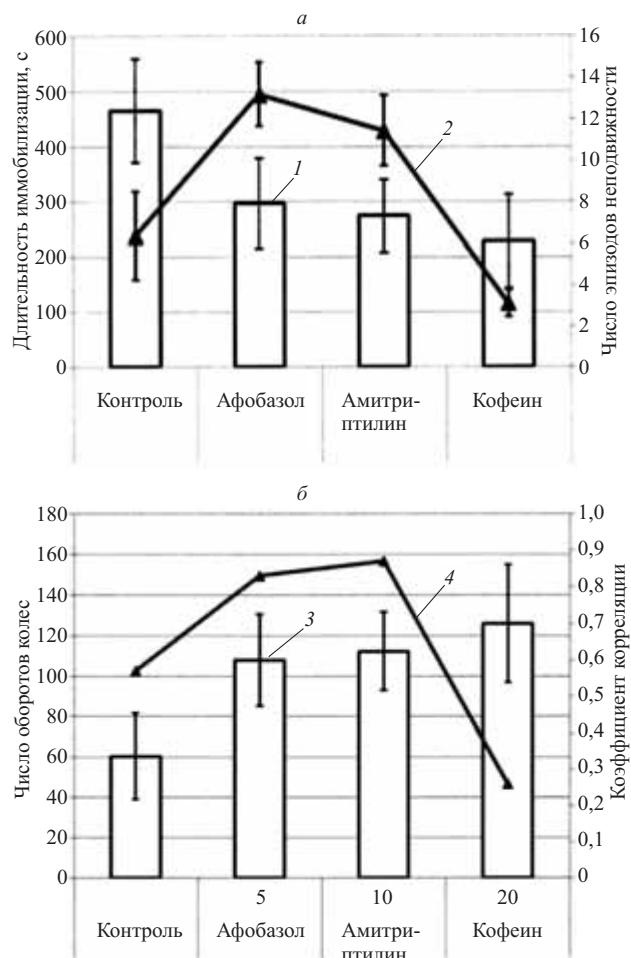
Афобазол использовали в дозе 5 мг/кг. В качестве препаратов сравнения использовали антидепрессант амитриптилин (10 мг/кг) и кофеин (20 мг/кг). Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду. Вещества вводили внутрибрюшинно за 40 мин до эксперимента.

Достоверность различий между группами определяли методом дисперсионного анализа [2].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Исследование в teste вынужденного плавания по методу Porsolt.* При регистрации общей длительности периодов неподвижности (иммобилизации) было установлено, что в контрольной группе этот показатель составляет  $465,35 \pm 93,59$  с, а число эпизодов иммобилизации —  $6,38 \pm 2,12$  (рисунок, а). Афобазол в дозе 5 мг/кг статистически достоверно уменьшает общую длительность неподвижности до  $297,73 \pm 81,65$  с ( $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой) и увеличивает число ее эпизодов до  $13,19 \pm 1,54$  ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Сходный эффект ранее был выявлен не только у соединений, взаимодействующих с  $MT_1$  рецепторами и ингибиторами MAO-А [5, 14], но и у агонистов  $\sigma_1$ -рецепторов стероидной природы, который снимался антагонистами рецептора [9, 11 – 13]. Аналогичное афобазолу действие оказывает антидепрессант амитриптилин (10 мг/кг), уменьшая длительность иммобилизации до  $274,61 \pm 66,24$  с ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем) и увеличивая число ее эпизодов до  $11,45 \pm 1,68$  ( $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой). Психостимулятор кофеин (20 мг/кг) также снижает длительность иммобилизации в этом teste до  $229,47 \pm 84,52$  с (различие с контролем достоверно при  $p < 0,05$ ), однако в противоположность афобазолу и амитриптилину он, подобно другим стимуля-

<sup>1</sup> Лаборатория фармакогенетики (руководитель — акад. РАМН С. Б. Середенин) и лаборатория психофармакологии (руководитель — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



Влияние афобазола (5 мг/кг, внутривенно), амитриптилина (10 мг/кг, внутривенно) и кофеина (20 мг/кг, внутривенно) на длительность (1) и число эпизодов (2) неподвижности у беспородных белых крыс в teste вынужденного плавания по Porsolt (*a*) и на число оборотов колес (3) и коэффициент корреляции между числом оборотов за первые и вторые 5 минут опыта (4) у беспородных белых крыс в teste вынужденного плавания по Nomura (*b*).

а: По осям ординат: слева — длительность иммобилизации, с; справа — число эпизодов иммобилизации.

б: По осям ординат: слева — число оборотов колес; справа — коэффициент корреляции.

торам, уменьшает число эпизодов иммобилизации до  $3,12 \pm 0,64$ . Сходство эффектов амитриптилина и афобазола и их отличие от кофеина свидетельствуют о наличии у афобазола антидепрессивного эффекта.

*Исследование в teste вынужденного плавания с врачающимися колесами по Nomura.* Установлено, что у крыс контрольной группы число оборотов колес достигает  $60,5 \pm 21,3$ . При этом коэффициент корреляции между числом оборотов за первые и вторые 5 мин наблюдения имеет среднюю величину — 0,57 (рисунок, *b*). Афобазол в дозе 5 мг/кг статистически достоверно увеличивает число оборотов колес до  $107,9 \pm 22,6$ , а

коэффициент корреляции до 0,83. Амитриптилин (10 мг/кг) действует аналогично, увеличивая число оборотов колес до  $112,2 \pm 19,4$  и коэффициент корреляции до 0,87. Кофеин (20 мг/кг) также достоверно увеличивает основной показатель активности по этому тесту, повышая число оборотов колес до  $125,7 \pm 28,9$ . Вместе с тем кофеин, в противоположность афобазолу и амитриптилину, уменьшает коэффициент корреляции (до 0,26). Таким образом, как и при использовании теста Porsolt, в teste Nomura афобазол и амитриптилин действуют однотипно, тогда как кофеин отличается от них по совокупности своих эффектов. Полное совпадение показателей, полученных для амитриптилина и афобазола в тестах Porsolt и Nomura, позволяет предположить, что афобазол, наряду с анксиолитическим, оказывает также антидепрессивное действие, которое согласуется со спектром нейрорецепторных взаимодействий [10]. Антидепрессивный эффект в teste Porsolt выявлен у соединений, взаимодействующих с МТ<sub>1</sub>-рецепторами, и ингибиторов МАО-А [5, 14], а также у агонистов σ<sub>1</sub>-рецепторов, который устраняется антагонистами рецепторов данного типа [9, 11–13].

Таким образом, с использованием двух стандартных тестов выявления антидепрессивной активности установлено наличие у афобазола антидепрессивного эффекта, что определяет перспективу его применения для лечения тревожных расстройств, осложненных депрессивной симптоматикой.

## ВЫВОДЫ

1. Афобазол в экспериментах на крысах в тестах Porsolt и Nomura оказывает антидепрессивный эффект.
2. По характеристикам антидепрессивного действия афобазол имеет сходство с амитриптилином.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005).
2. В. П. Боровиков, *Statistica: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов*, СПб (2001).
3. Г. М. Молодавкин, Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(6), 55–58 (2005).
4. Г. М. Молодавкин, Т. А. Воронина, А. Л. Мдзинаришвили, *Экспер. клин. фармакол.*, **58**(1), 3–5 (1995).
5. A. Ghanbargpour, F. Hadizadeh, F. Piri, and P. Rashidi-Ranjbar, *Pharm Acta Helv.*, **72**(2), 119–122 (1997).
6. L. L. Iversen, *The Monoamine Hypothesis of Depression Licitio*, M. L. Wong (eds.), *Biology of Depression. From Novel Insights to Therapeutic Strategies*. pp. 71–86 (WILEY-VCH, Weinheim, 2005).
7. S. Nomura, J. Shimizu, M. Kinjo, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **83**(3–4), 171–175 (1982).
8. R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, and M. Jalfre, *Eur. J. Pharmacol.*, **47**(4), 379–391 (1978).

9. D. S. Reddy, G. Kaur, and S. K. Kulkarni, *Neuroreport*, **9**(13), 3069 – 3073 (1998).
10. S. Seredenin, G. Neznamov, M. Yarkova, et al., *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **11**(Supplement 1), 275 (2008).
11. M. Ukai, H. Maeda, Y. Nanya, et al., *Pharmacology biochemistry, and behavior*, **61**(3), 247 – 252 (1998).
12. A. Urani, F. J. Roman, V. L. Phan, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **298**(3), 1269 – 1279 (2001).
13. A. Urani, P. Romieu, F. J. Roman, et al., *European journal of pharmacology*, **486**(2), 151 – 161 (2004).
14. Z. M. Weil, A. K. Hotchkiss, M. L. Gatien, et al., *Brain Res Bull*, **68**(6), 425 – 429 (2006).

Поступила 25.09.08

## ANTIDEPRESSANT PROPERTIES OF AFOBAZOLE IN THE PORSOLT AND NOMURA SWIM TESTS ON RATS

S. B. Seredenin, G. M. Molodavkin, M. V. Voronin, and T. A. Voronina

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Anxiolytic afobazole was shown in the experiments on outbred rats to decrease the immobility in the Porsolt and Nomura swim tests. The degree of afobazole effect in a dose of 5 mg/kg (i.p.) is similar to that of the standard antidepressant amitriptyline administered in doses of 10 mg/kg. Data obtained are testifying to the antidepressant activity of afobazole.

**Key words:** Afobazole, amitriptyline, antidepressant activity

## ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЕ СВОЙСТВА МОРФИНА

Л. Г. Колик, В. Н. Жуков, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

На беспородных мышах изучено влияние афобазола в дозах 1 и 10 мг/кг на антиноцицептивные эффекты морфина в дозе 3 мг/кг в тестах “hot plate” и “tail flick”. Установлено, что афобазол ослабляет анальгетическое действие морфина. Выявленный эффект предотвращается антагонистом  $\sigma_1$ -рецепторов галоперидолом в дозе 2 мг/кг.

**Ключевые слова:** афобазол, ноцицепция, морфин,  $\sigma_1$ -рецепторы, мыши

### ВВЕДЕНИЕ

Афобазол {2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этокси-бензимидазола дигидрохлорид}, селективный анксиолитик, разработанный в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, зарегистрирован в качестве лекарственного средства в 2005 г. [1]. Исследование рецепторного взаимодействия афобазола выявило его специфическое связывание с  $\sigma_1$ -рецепторами [10]. Известно, что “прототипный” лиганд  $\sigma_1$ -рецепторов (+)пентазоцин ослабляет анальгетическое действие морфина, а антагонист  $\sigma_1$ -рецепторов галоперидол предотвращает данный эффект [3]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния афобазола на индуцированную морфином анальгезию в тестах термической ноцицепции у мышей.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных мышах-самцах массой 18 – 22 г. Животных в течение 10 суток до начала эксперимента содержали в стандартных условиях вивария ГУ НИИ фармакологии РАМН по 10 особей в клетке. Эксперименты проводили в период 9:00 – 13:00 в осенне-зимний период.

Афобазол (1 и 10 мг/кг) и морфина гидрохлорид (3 мг/кг) растворяли в дистиллированной воде; галоперидол (2 мг/кг) растворяли в дистиллированной воде с 1 – 2 каплями твин-80. Вещества вводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл/10 г массы животного.

Для изучения ноцицептивных реакций животных предварительно отбирали по результатам фонового тестирования. В опыт брали мышей, латентный период реакции которых в teste “tail flick” не превышал 4 с, в teste “hot plate” — 15 с. Вещества вводили через 1 ч после фонового тестирования.

Тестирование ноцицептивной реакции выполняли при введении морфина, афобазола, их комбинации и на фоне блокады  $\sigma_1$ -рецепторов галоперидолом по схеме: галоперидол → 15 мин → морфин (или морфин + афобазол) → 30 мин → тестирование латентного периода реакции.

В teste “hot plate” животных помещали на нагретую до  $55 \pm 0,5$  °С медную пластину, являющуюся дном цилиндра из оргстекла диаметром 15 см. Фиксировали

время появления ноцицептивной реакции (лизание лапы или прыжок). Латентный период реакции в 30 с расценивали как 100 % анальгезию.

В teste “tail-flick” с помощью анальгезиметра analgesia test, tail flick type 812 фирмы “Hugo Sachs Electronic” (Германия) регистрировали время отдергивания хвоста от момента нанесения на расстоянии 1 см от его корня локального теплового воздействия. Латентный период реакции в 20 с оценивали как 100 % анальгезию.

Полученные данные рассчитывали в процентах от максимально возможного эффекта (МВЭ) [7].

Для статистической обработки данных использовали непараметрический критерий U Манна-Уитни.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

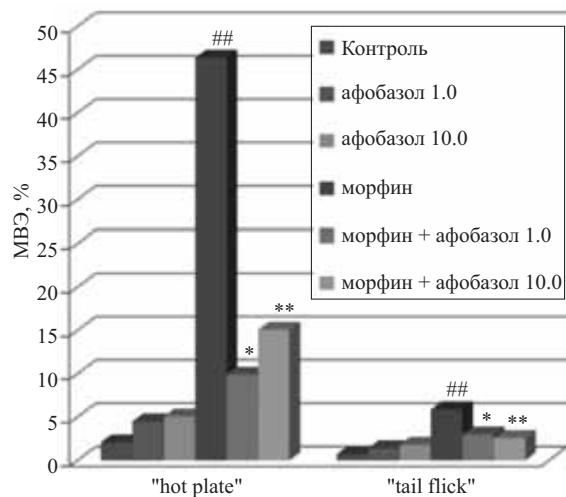
Установлено, что афобазол в дозах 1 и 10 мг/кг самостоятельным анальгетическим эффектом в тестах “hot plate” и “tail flick” не обладает. При сочетанном его введении с морфином наблюдали статистически значимое уменьшение латентного периода ноцицептивных реакций (рис. 1).

Не проявляя анальгетического эффекта *per se*, галоперидол усиливает антиноцицептивные эффекты морфина в указанных тестах. Предварительная блокада  $\sigma_1$ -рецепторов галоперидолом предотвращает снижение анальгетического действия морфина, которое наблюдается при совместном его использовании с афобазолом (рис. 2).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности афобазола модулировать антиноцицептивные эффекты морфина на супраспинальном (“hot plate”) и спинальном (“tail flick”) уровнях.

Функциональное состояние эндогенной опиоидной системы в определенной степени связано с активностью других нейрохимических систем ЦНС [11]. В последние годы в регуляции опиоидной анальгезии большое внимание уделяется роли  $\sigma_1$ -рецепторной системы [8, 9]. Она рассматривается как “антиопиоидная” в зависимости от уровня “тонической активности”  $\sigma_1$ -рецепторов [3, 4, 6]. Антагонист  $\sigma_1$ -рецепторов галоперидол потенцирует опиоидную анальгезию [5], тогда как агонист  $\sigma_1$ -рецепторов (+)пентазоцин значительно ее понижает [2]. Принимая во внимание эти данные, полученные в настоящей работе результаты о влиянии афобазола на индуцированную морфином анальгезию, позволяют полагать, что афобазол, так же как (+)пентазоцин, является агонистом

<sup>1</sup> Отдел фармакогенетики (руководитель — акад. РАМН С. Б. Середенин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



**Рис. 1.** Влияние афобазола и морфина на ноцицептивные реакции у мышей в тестах “hot plate” и “tail flick”.

Статистически значимые отличия по сравнению: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  с группой морфина; с контролем ## —  $p < 0,01$ . Непараметрический критерий Манна-Уитни. В группе 5 – 10 животных.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — термические модели ноцицепции, по оси ординат — латентный период реакции животных, выраженный в % от максимально возможного эффекта (МВЭ):

% от МВЭ = (латентный период реакции после введения соединения минус фоновый латентный период реакции)/(максимальное время экспозиции минус фоновый латентный период реакции) · 100 % [7].

$\sigma_1$ -рецепторов. Следует отметить, что в условиях сочетанного использования афобазола в качестве анксиолитика в медицинской практике необходимо иметь в виду возможное ослабление болеутоляющего действия опиоидов.

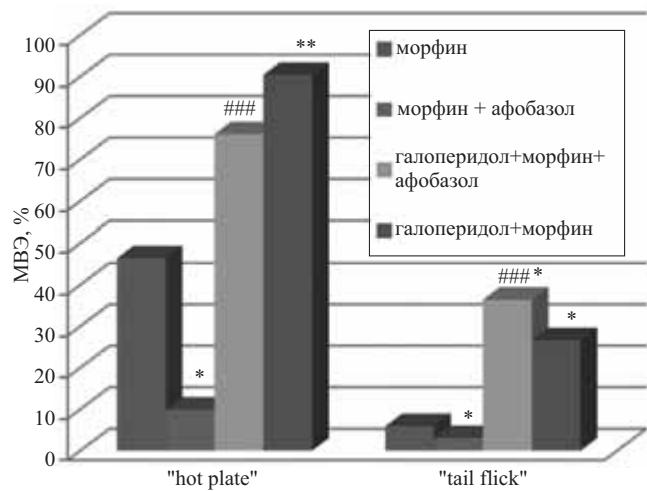
## ВЫВОДЫ

1. Афобазол в дозах 1 и 10 мг/кг ослабляет анальгетическое действие морфина в тестах “hot plate” и “tail flick”.

2. Галоперидол в дозе 2 мг/кг препятствует проявлению действия афобазола на индуцированную морфином анальгезию.

## ЛИТЕРАТУРА

- Регистрационное удостоверение № ЛС-000861(2005).
- W. D. Bowen, B. R. De Costa, S. B. Hellewell, J. M. Walker, and K. C. Rice, *Mol. Neuropharmacol.*, **3**, 117 – 126 (1993).
- C.-C. Chien and G. W. Pasternak, *Eur. J. Pharmacol.*, **250**, R7 – R8 (1993).



**Рис. 2.** Влияние антагониста  $\sigma_1$ -рецепторов — галоперидола на эффекты афобазола и морфина в условиях ноцицептивной стимуляции у мышей в тестах “hot plate” и “tail flick”.

Статистически значимые отличия: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с группой морфина; ### —  $p < 0,001$  по сравнению с группой морфин + афобазол. Критерий Манна-Уитни. В группе 10 – 17 животных. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

- C.-C. Chien and G. W. Pasternak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1583 – 1590 (1994).
- C.-C. Chien and G. W. Pasternak, *Neurosci. Lett.*, **190**, 137 – 139 (1995).
- M. A. King, S. Bradshaw, A. H. Chang, J. E. Pintar, and G. W. Pasternak, *J. Neurosci.*, **21**, 7788 – 7792 (2001).
- D. Le Bars, M. Gozariu, S. W. Cadden, *Pharmacol. Rev.*, **53**(4), 597 – 652 (2001).
- J. Mei and G. Pasternak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**(4), 1070 – 1074 (2002).
- J. Mei and G. Pasternak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322**(3), 1278 – 1285 (2007).
- S. Seredenin, G. Neznamov, M. Yarkova, et al., *J. Neuropsychopharmacol.*, **11**(Suppl.1), 275 (2008).
- J. M. van Ree, M. A. F. M. Gerrits and L. J. M. J. Vanderschuren, *Pharmacol. Rev.*, **51**(2), 341 – 396 (1999).

Поступила 25.09.08

## AFOBAZOLE EFFECTS ON ANTINOCICEPTIVE PROPERTIES OF MORPHINE

L. G. Kolik, V. N. Zhukov, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The effects of afobazole (1.0 and 10.0 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive properties of morphine (3.0 mg/kg, i.p.) were studied in mice. It is shown that afobazole attenuates the analgesic action of morphine in the “hot plate” and “tail flick” tests. This effect was prevented by sigma 1 receptor antagonist haloperidol (2.0 mg/kg, i.p.). Data obtained suggested that a decrease in the morphine antinociceptive action by afobazole is related to its agonistic interaction with sigma 1 receptors at supraspinal and spinal levels.

Key words: Afobazole, sigma 1 receptors, morphine, nociception

# НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА АФОБАЗОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

С. Б. Середенин, В. А. Крайнева<sup>1</sup>

На модели интрацеребральной посттравматической гематомы установлено, что афобазол в дозах 1 и 0,1 мг/кг внутрибрюшинно при двухнедельном введении снижает гибель животных, уменьшает неврологические нарушения, улучшает процессы обучения и памяти крыс.

**Ключевые слова:** афобазол, интрацеребральная посттравматическая гематома, нейропротекция, неврологический дефицит, обучение, память

## ВВЕДЕНИЕ

В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН разработан и внедрен в медицинскую практику оригинальный препарат афобазол, обладающий анксиолитической активностью без проявлений седативного и миорелаксирующего действия, характерного дляベンзодиазепинов [6, 7].

В спектре рецепторных взаимодействий афобазола выявлено лигандное связывание с  $\sigma_1$ -рецепторами (IC50-7.1E-06M) [15]. Установлено также, что препарат способен снижать уровень NO при ишемии мозга [1, 12], восстанавливает уровень BDNF при стрессиндуцированном снижении содержания нейротрофина [8]. В опытах *in vitro* нейропротекторное действие афобазола продемонстрировано при моделировании глутаматной токсичности и оксидативного стресса [4].

На модели фокальной ишемии головного мозга афобазол значительно сокращал зону пенымбы при первом введении через 6 ч после операции [9]. Афобазол способствовал увеличению кровоснабжения ишемизированного мозга [11].

Совокупность полученных данных в свете современных представлений о механизмах нейродегенеративных изменений при инсультах [14] определила целесообразность исследования нейропротекторного потенциала афобазола на экспериментальной модели геморрагического инсульта.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 220 – 250 г, полученных из питомника Столбовая РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище при 12-часовом световом режиме в течение двух недель до начала опыта.

Локальное кровоизлияние в головном мозге моделировали по методике интрацеребральной посттравматической гематомы [5].

У крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг в мышцу), проводили трепанацию черепа. Затем при помощи специального устройства (мандрен — нож) и стереотаксиса, осуществляли деструкцию мозговой ткани в области внутренней капсулы с введением через 2 – 3 мин в место повреждения крови, взятой из-под языка животного (0,02 – 0,03 мл). Таким способом достигается локальный аутогеморрагический инсульт в области внутренней капсулы (диаметр — 2 мм, глубина — 3 мм) без существенных повреждений выше расположенных образований мозга.

Через 24 ч после операции у крыс регистрировали неврологический дефицит, координацию движений, мышечный тонус, ориентировочно-исследовательское поведение и гибель животных.

Животные были разделены на группы: 1 — ложнооперированные (ЛО) крысы, которым под наркозом проводили только трепанацию черепа (I группа); 2 — животные с геморрагическим инсультом — ГИ (II группа); 3 — животные с ГИ, которым вводили афобазол в дозе 1 мг/кг (III группа); 4 — животные с ГИ, которым вводили афобазол в дозе 0,1 мг/кг (IV группа). Афобазол вводили внутримышечно через 6 ч после операции, затем ежедневно дважды в день в течение четырнадцати дней. Контрольным животным (I и II группы) вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Динамику развития нарушений, вызванных интрацеребральный посттравматической гематомой, и эффекты афобазола оценивали в течение 14 суток с регистрацией поведения и состояния животных на первые, третьи, седьмые и четырнадцатые сутки после операции, используя методологию, описанную ранее [3]. В течение 14 суток после операции регистрировали выживаемость крыс.

Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента (*t*-test) и точному критерию Фишера с использованием компьютерной программы Biostat.

<sup>1</sup> ГУ НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Таблица 1. Влияние афобазола на выживаемость животных после геморрагического инсульта (ГИ)

Группа животных	Общая гибель животных		Количество погибших животных в течение 14-ти суток после геморрагического инсульта (динамика), сутки							
	а. е.	%	1-е		3-и		7-е		14-е	
			а. е.	%	а. е.	%	а. е.	%	а. е.	%
ЛО	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0
ГИ	6/12*	50	2/12	16,7	1/10	10	1/9	11,1	2/8*	25
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	0/12 <sup>#</sup>	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	1/12 <sup>#</sup>	8,3	0/12	0	1/12	8,3	0/11	0	0/11	0

\* — достоверность отличий от ложнооперированных крыс при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

# — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение двух недель после операции в группе ЛО крыс гибели животных не наблюдали.

В группе крыс с ГИ в течение первых суток погибло около 17 % животных, а к 14-му дню — 50 %. Афобазол, вводимый по описанной схеме, в дозе 1 мг/кг, полностью предупреждал гибель крыс с ГИ, а в дозе 0,1 мг/кг уменьшал показатель гибели до 8 % (табл. 1).

Нарушения координации движений у крыс с ГИ в первые — третьи сутки отмечены у 90 — 55 %, а на седьмые — четырнадцатые у 37 — 17 % выживших животных.

Афобазол в дозе 1 мг/кг достоверно ослаблял нарушения координации движений у крыс на первые сутки, а к третьим суткам полностью их устранил. В дозе 0,1 мг/кг афобазол ослаблял нарушение координации движений к четырнадцатым суткам после инсульта (табл. 2).

Ослабление мышечного тонуса на первые-трети сутки отмечалось у 50 — 67 % соответственно, на четырнадцатые у 50 % животных с ГИ, в то время как при введении афобазола в дозе 0,1 и 1 мг/кг в первые сутки ослабление мышечного тонуса наблюдалось у

33 — 42 % животных, а к четырнадцатым суткам этот показатель снижался до 8 % (табл. 3).

Установлено, что у ложнооперированных животных норковый рефлекс не нарушается. У крыс с ГИ также не нарушается норковый рефлекс, но статистически достоверно увеличивается (в 4 раза) латентное время его выполнения. Афобазол как в дозе 1 мг/кг, так и в дозе 0,1 мг/кг достоверно снижает латентное время выполнения норкового рефлекса по сравнению с группой “инсультных” животных, т.е. улучшает выработку этого навыка (табл. 4).

При изучении влияния ГИ на память животных установлено, что в группе ЛО животных через сутки после обучения 42 % помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда, а в группе с ГИ 100 % животных зашли в темную камеру. При воспроизведении УРПИ на 14-й день после операции у крыс с ГИ не сохранялся памятный след, в то время как у ЛО животных этот показатель составлял 33 %.

Афобазол в дозе 0,1 мг/кг не оказывал влияния на воспроизведение УРПИ через сутки. При повышении дозы афобазола до 1 мг/кг отмечалось статистически достоверное увеличение латентного времени рефлекса по сравнению с “инсультными” животными (табл. 5).

Таблица 2. Влияние афобазола на координацию движений животных в teste врачающегося стержня после геморрагического инсульта (ГИ)

Группа животных	Количество животных, не удержавшихся на врачающемся стержне (3 об/мин), в течение 2-х минут							
	1-е сутки		3-и сутки		7-е сутки		14-е сутки	
	а. е.	%	а. е.	%	а. е.	%	а. е.	%
ЛО	3/12	25	1/12	8	2/12	17	0/12	0
ГИ	9/10*	90	5/9*	55	3/8	37,5	1/6	17
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	3/12 <sup>##</sup>	25	0/12 <sup>##</sup>	0	0/12	0	0/12	0
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	4/12 <sup>#</sup>	33	3/11	27	1/11	9	0/11	0

\* — достоверность отличий от ложнооперированных крыс при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

# — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

## — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,01$  (точный критерий Фишера).

Таблица 3. Влияние афобазола на мышечный тонус животных в teste горизонтальной перекладины после геморрагического инсульта (ГИ)

Группа животных	Количество животных, не подтянувшихся на горизонтальной перекладине							
	1-е сутки		3-и сутки		7-е сутки		14-е сутки	
	а. е.	%	а. е.	%	а. е.	%	а. е.	%
ЛО	2/12	17	2/12	17	2/12	17	0/12	0
ГИ	5/10	50	6/9*	67	5/8	62,5	3/6*	50
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	4/12	33	3/12	25	2/12	17	1/12 <sup>#</sup>	8
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	5/12	42	2/11	18	2/11	18	0/11 <sup>#</sup>	0

\* — достоверность отличий от ложнооперированных крыс при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

# — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фишера).

В первые сутки после операции при оценке неврологических отклонений по шкале Mc Grow показано, что почти у всех (90 – 100 %) животных с ГИ наблюдались вялость, замедленность движений, слабость конечностей, тогда как у ЛО крыс эти нарушения были отмечены лишь у 30 – 40 %. Сильных неврологических нарушений, проявляющихся в виде манежных движений по кругу, парезов и параличей конечностей, в группе ЛО не наблюдалось, а у животных с ГИ они были отмечены у 30 – 40 %.

Афобазол в дозах 1 и 0,1 мг/кг ослаблял проявления неврологических нарушений (рис. 1).

Изучение ориентированно-исследовательского поведения в условиях методики “открытого поля” показало, что в первые сутки после операции у крыс ГИ отмечалось значительное, почти в 3 раза, снижение суммарных показателей двигательной активности и исследовательского поведения. Сходные показатели поведения крыс наблюдались и на 14-й день после ГИ.

Афобазол в дозах 1 и 0,1 мг/кг при регистрации эффекта на первые-трети сутки после ГИ увеличивал суммарные показатели поведения до уровня животных в группе ЛО. На седьмые-четырнадцатые сутки только в дозе 0,1 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение суммарных показателей (рис. 2).

Таблица 4. Влияние афобазола на обучение

Группа животных	Латентное время (с) захода в темную камеру при обучении (норковый рефлекс), 1 сутки после операции	Латентное время (с) захода в темную камеру при обучении (норковый рефлекс), 1 сутки после операции		
		ЛО	ГИ	ГИ + афобазол (1 мг/кг)
ЛО	12,0 ± 2,5			
ГИ	47,7 ± 7,3**			
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	29,1 ± 5,0 <sup>#</sup>			
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	20,0 ± 4,6 <sup>##</sup>			

\*\* — достоверность отличий от ложнооперированных крыс при  $p \leq 0,01$  (*t*-тест Стьюдента).

# — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,05$  (*t*-тест Стьюдента).

## — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,01$  (*t*-тест Стьюдента).

При изучении поведения животных после ГИ в teste приподнятого крестообразного лабиринта в первые сутки отмечено значительное снижение количества

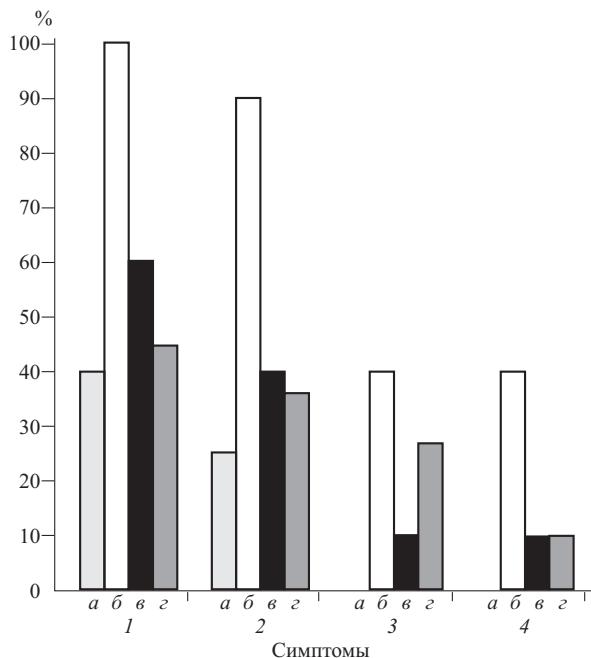
Таблица 5. Влияние афобазола на воспроизведение УРПИ у крыс после обучения с интрацеребральной посттравматической гематомой

Группа животных	Латентное время захода в темную камеру, с	Количество крыс, вошедших в темную камеру, %	
		24 часа	3-е суток
ЛО	95,0 ± 21,9	58	67
ГИ	30,0 ± 7,9*	100	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	145,8 ± 18,6 <sup>##</sup>	25	50
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	96,8 ± 23,7 <sup>#</sup>	64	73
7 суток		7 суток	
ЛО	61,6 ± 21,2	75	75
ГИ	13,8 ± 4,0	100	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	127,9 ± 20,0 <sup>##</sup>	42	91
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	38,9 ± 17,1		
14 суток		14 суток	
ЛО	76,4 ± 22,7	67	67
ГИ	13,2 ± 2,8	100	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	109,6 ± 21,4 <sup>##</sup>	50	
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	24,6 ± 15,7	91	

\* — достоверность отличий от ложнооперированных крыс при  $p \leq 0,05$  (*t*-тест Стьюдента).

# — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,05$  (*t*-тест Стьюдента).

## — достоверность отличий от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,01$  (*t*-тест Стьюдента).



**Рис. 1.** Влияние афобазола на неврологический дефицит (шкала Mc Grow).

По оси абсцисс — симптомы: 1 — вялость, замедленность движений, 2 — слабость конечностей, 3 — манежные движения, 4 — парез и паралич 1–4 конечностей.

Здесь и на рис. 3: а — ЛО, б — ГИ, в — ГИ + афобазол 1 мг/кг, г — ГИ + афобазол 0,1 мг/кг.

переходов в рукава. Сходные показатели зарегистрированы и на 14-е сутки после ГИ.

Афобазол в первые сутки после ГИ увеличивал количество переходов в рукава до уровня животных в группе ЛО. На 14-й день афобазол в дозах 0,1 и 1 мг/кг увеличивает время, проведенное в открытых рукавах лабиринта, а также количество выходов в открытые рукава (рис. 3).

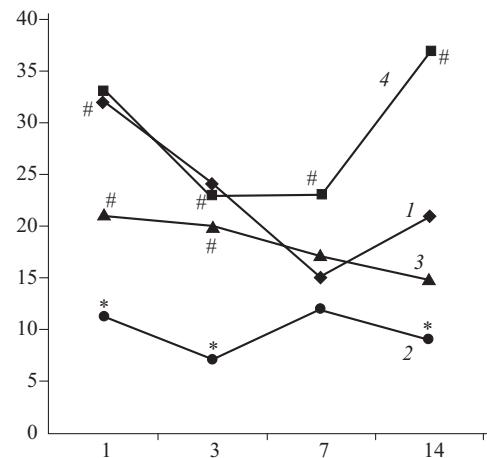
Таким образом, в результате выполненных экспериментов показано, что в сравнении с ложнооперированными животными у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой увеличивается количество погибших животных, наблюдаются выраженный неврологический дефицит, нарушение координации движений, ослабление процессов обучения и памяти.

Афобазол в дозах 1 и 0,1 мг/кг, внутрибрюшно через 6 ч после операции, а затем ежедневно два раза в день в течение 14 дней значительно снижает выраженность постинсультных нарушений.

Афобазол улучшает показатели неврологического статуса по шкале Mc Grow уже через сутки после инсульта, а при курсовом применении повышает мышечный тонус и улучшает координацию движений.

Афобазол улучшает нарушенную память и воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания.

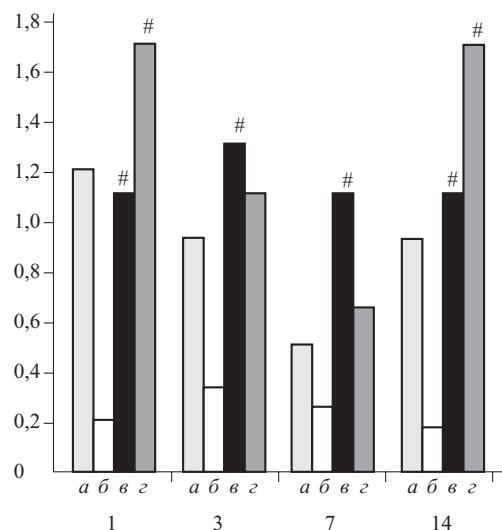
В дозе 1 мг/кг афобазол полностью предупреждает гибель животных с геморрагическим инсультом.



**Рис. 2.** Суммарная двигательная активность под влиянием афобазола в teste “открытого поля” (регистрация динамики в течение 14 сут после операции).

По оси абсцисс — время, сут, по оси ординат — суммарная двигательная активность. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с ложнооперированными животными (*t*-критерий Стьюдента); # —  $p < 0,05$  с группой ГИ (*t*-критерий Стьюдента). 1 — ЛО, 2 — ГИ, 3 — ГИ + афобазол (1 мг/кг), 4 — ГИ + афобазол (0,1 мг/кг).

Полученные в настоящей работе данные подтверждают ранее выявленные нейропротекторные свойства афобазола. Так, препарат оказывал защитное действие, уменьшая очаг поражения головного мозга крыс, вызванный окклюзией левой средней мозговой артерии. Протекторный эффект зарегистрирован как при одновременном с окклюзией введении препарата, так и при его использовании через 3, 6 и 24 ч после операции [9]. Афобазол, введенный внутрибрюшно в дозе 5 мг/кг, повышал выживаемость крыс в условиях ишемии.



**Рис. 3.** Влияние афобазола на поведение животных в условиях методики ПКЛ после геморрагического инсульта.

По оси абсцисс — время, сут, по оси ординат — количество переходов в “открытые рукава”.

\* — достоверность отличий от ложнооперированных крыс при  $p \leq 0,05$  (*t*-тест Стьюдента), # — от “инсультных” крыс при  $p \leq 0,05$  (*t*-тест Стьюдента). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

мии, вызванной перевязкой общих сонных артерий [10]. Полученные данные показали, что на модели геморрагического инсульта использованная схема применения афобазола оказалась более эффективной по критерию выживаемости животных, чем в предыдущем исследовании [2].

Вышеприведенные сведения по исследованию нейропротекторных свойств афобазола *in vitro* также соответствуют полученным в настоящей работе результатам. Можно полагать, что нейропротекторный эффект афобазола связан с его первичным взаимодействием с  $\sigma_1$ -рецепторами, поскольку ранее изученные лиганды этого образования также проявили нейропротекторные свойства и вызывали нейрохимические изменения, сходные с афобазолом [13].

## ВЫВОД

Селективный анксиолитик афобазол обладает выраженной нейропротекторной активностью, участвуя в механизмах первичной и вторичной нейропротекции. Эффект афобазола сохраняется в пределах терапевтического окна.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласанян, *Мед. наука Армении*, **42**(3), 25 – 30 (2002).
2. И. Л. Галаева, Т. Л. Гарипова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Бiol. экспер. биол.*, **140**(11), 545 – 549 (2005).

3. Т. Л. Гарипова, И. Л. Галаева, Т. А. Воронина, В. А. Крайнева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(3), 13 – 16 (2003).
4. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, *Бiol. экспер. биол.*, **40**(8), 161 – 163 (2005).
5. А. Н. Макаренко, Н. С. Косячин, Н. В. Пасикова и др., *Ж. высш. нервн. деят.*, **52**(6), 760 – 763 (2002).
6. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 15 – 19 (2001).
7. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
8. С. Б. Середенин, Д. С. Мелкумян, Е. А. Вальдман и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 3 – 6 (2006).
9. С. Б. Середенин, О. В. Поварова, О. С. Медведев, Е. А. Вальдман, Т. С. Середенина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 3 – 5 (2006).
10. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(5), 9 – 12 (2004).
11. И. В. Силкина, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(1), 20 – 24 (2005).
12. M. G. Balasanyan, A. S. Kanayan, and A. V. Thopchayan, *Acta Physiol. Hung.*, **89**(1 – 3), 198 (2002).
13. C. Katnik, W. R. Guerrero, K. R. Pennypacker, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **319**, 1355 – 65 (2006).
14. A. I. Qureshi, Z. Ali, et al., *Crit Care Med.*, **31**, 1482 – 1489 (2003).
15. S. Seredenin, G. Neznamov, M. Yarkova, et al., *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **11**(1), 275 (2008).

Поступила 22.09.08

## NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF AFOBAZOLE ON A HEMORRAGIC STROKE MODEL

S. B. Seredenin and V. A. Kraineva

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

The model of posttraumatic hematoma was used to imitate the condition of hemorrhagic stroke in rats. Afobazole (5-ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio] benzimidazole dihydrochloride) administered in doses of 0.1 and 1.0 mg/kg intraperitoneally for 14 days was shown to be able to decrease the pathological manifestations of this model. Afobazole administration decreased mortality and the neurological deficits, including motor coordination, and improve the learning and memory.

**Key words:** Afobazole, intracerebral posttraumatic hematoma, neuroprotection, neurologic deficiency, learning, memory

## ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ СТРЕСС-БЕЛКА HSP70 В ТКАНИ МОЗГА КРЫС ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ПРЕХОДЯЩЕЙ ИШЕМИИ

Т. А. Антипова, И. О. Логвинов, И. Н. Курдюмов, Н. Р. Мирзоян, Т. С. Ганьшина,  
А. И. Турилова, Р. С. Мирзоян, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

В опытах на наркотизированных крысах показано, что глобальная преходящая ишемия мозга вызывает значительное снижение мозгового кровотока в коре большого мозга крыс и снижает уровень стресс-белка HSP70 в стриатуме. Афобазол восстанавливает нарушенное в условиях ишемии кровоснабжение мозга, а также увеличивает синтез стресс-белка HSP70.

**Ключевые слова:** афобазол, глобальная преходящая ишемия головного мозга, стресс-белок HSP70, Вестерн-блот анализ

### ВВЕДЕНИЕ

В литературе широко обсуждается защитное действие стресс-белка HSP70 при ишемических поражениях мозга и сердца. Белки HSP (heat shock proteins) впервые были выявлены в клетках, подвергнутых остому тепловому воздействию. В дальнейших исследованиях было показано, что при различных видах стресса резко возрастает синтез индуцибелльной формы HSP, которая в условиях нормы практически не обнаруживается. Повышенная экспрессия и нейропротекторное действие HSP70 обнаружены в условиях глутаматной нейротоксичности, при депривации кислорода и глюкозы и на различных моделях ишемии головного мозга [3, 10 – 13]. С другой стороны, при пониженном содержании HSP70 увеличиваются клеточные повреждения, вызванные локальной ишемией мозга как у нокаутных, так и у интактных мышей [12].

Выявлена способность HSP70 защищать синаптическую функцию ГАМК, глутамата и глицина в условиях термического стресса, а также увеличивать продолжительность медленного сна, которая опосредуется через стимуляцию ГАМК-ergicической тормозной системы. Кроме того, предполагается, что взаимодействие HSP70 с липидной частью мембранны может играть существенную роль в фолдинге полипептидов мембранны и в процессах их транслокации через мембрану [9].

Ранее нами была установлена способность афобазола оказывать выраженное нейропротекторное действие в условиях локальной перманентной [1, 5, 6] и глобальной преходящей ишемии мозга, увеличивать кровоснабжение мозга, опосредуемое через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы сосудов [7], а также повышать в условиях ишемии устойчивость мембранных структур нейронов коры и стриатума к свободнорадикальным процессам [8]. Кроме того, на культуре нейронов линии НТ-22 на модели глутаматной токсичности и оксидативного

стресса обнаружен нейропротекторный эффект афобазола [2].

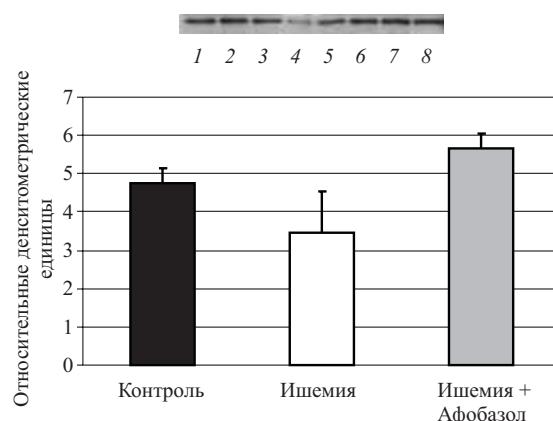
Целью исследования явилось изучение влияния афобазола на содержание стресс-белка HSP70 в коре и стриатуме крыс в условиях глобальной преходящей ишемии головного мозга.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовано 50 наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутрибрюшинно) и 10 бодрствующих беспородных крыс-самцов массой 260 – 300 г при естественном дыхании. Регистрацию локального кровотока проводили в теменной области головного мозга крыс с помощью лазерного допплеровского флюметра ALF-21 (“Transonic System Inc.”, США). Для этой цели игольчатый датчик флюметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры большого мозга с помощью микроманипулятора и коромысла. Для регистрации артериального давления и введения препарата в бедренные артерию и вену вставляли силиконовые катетеры. Регистрацию уровня артериального давления осуществляли электроманометром BPR-01 (Электрометрия, Венгрия).

Содержание HSP70 в цитоплазматической фракции стриатума и коры мозга крыс определяли с помощью методики Вестерн-блот анализа. Ткань гомогенизировали (тефлон/стекло) в буфере (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100), pH 7,5 при температуре 4 °C в соотношении 1:6 ткань/буфер. Затем гомогенаты помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 13000 грм и 4 °C. Супернатант, содержащий белки цитозоля, анализировали с использованием электрофореза и иммуноблоттинга. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF осуществляли электроэлюзией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST (с добавлением 1 % Tween-20) с 5 % (вес/объем) обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем Вестерн-блоты инкубировали в присутствии первых моноклональных антител (Santa Cruz

<sup>1</sup> ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



Изменение содержания стресс-белка HSP70 после ишемического повреждения мозга и введения афобазола в стриатуме крыс (результаты Вестерн-блот анализа и денситометрии). Дорожки: 1, 2 — контроль, 3, 4, 5 — ишемия, 6, 7, 8 — ишемия + афобазол.

Biotechnology) против HSP70 в разведении 1:1000 в течение 1 ч. Затем после отмычки блоты инкубировали в присутствии вторых антител (Santa Cruz Biotechnology и Bio-Rad), конъюгированных с пероксидазой хрина (разведение 1: 2000) в течение 1 ч. Детектирование HSP70 осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы Microsoft Excel. Достоверность различий между контролем

и опытом проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глобальную преходящую ишемию вызывали у крыс окклюзией обеих общих сонных артерий с одновременным снижением артериального давления до 40 мм рт. ст. методом кровопускания. Через 15 мин зажимы с обеих сонных артерий удаляли и кровь реинфузировали. Исходный локальный мозговой кровоток в среднем составлял  $32,3 \pm 3,2$  усл. ед., среднее артериальное давление при этом составляло 90 мм рт. ст. На фоне окклюзии общих сонных артерий и геморрагии (3 – 5 мл крови) кровоток снижался до  $6,2 \pm 1,05$  усл. ед. После снятия зажимов и реинфузии крови в первые 5 – 10 мин кровоток повышался до  $33,5 \pm 2,7$  усл. ед. В 7 опытах из 20 увеличение мозгового кровотока в среднем составило  $49,7 \pm 6,5$  усл. ед по сравнению с доишемическим периодом ( $p < 0,004$ ). Следовательно, после окончания ишемии наблюдается постишемическая гиперперфузия, которая не сопровождается повышением артериального давления выше исходного уровня. Спустя 30 – 40 мин после нарушения мозгового кровообращения кровоток понижался в среднем на  $19,6 \pm 3,2$  усл. ед. (в среднем на 41 % от исходного уровня, табл. 1). Однонаправленных выраженных изменений уровня артериального давления в постишемическом периоде не наблюдалось, поэтому можно за-

Таблица 1. Изменения локального мозгового кровотока – ЛМК (в усл. ед. и в %) к контролю в коре большого мозга крыс в условиях глобальной преходящей ишемии

№ опыта	ЛМК, контроль	1 мин после ишемии	10 мин после ишемии	30 – 60 мин после ишемии	% изменений
1	26	6	25	10	– 60
2	73	16	73	60	– 18
3	22	10	14	10	– 55
4	30	15	20	14	– 53
5	20	11	16	16	– 20
6	34	2	16	16	– 53
7	33	9	32	22	– 33
8	28	14	36	27	– 4
9	22	7	27	21	– 5
10	28	2	26	9	– 68
11	60	6	76	56	– 7
12	38	4	66	14	– 63
13	27	3	26	14	– 48
14	17	2	12	9	– 47
15	25	2	14	14	– 44
16	25	2	44	10	– 60
17	22	3	6	6	– 73
18	25	3	43	19	– 24
19	49	4	56	30	– 31
20	43	3	43	15	– 65
$m \pm M$	$32,3 \pm 3,2$	$6,2 \pm 1,05^*$	$33,5 \pm 2,7$	$19,6 \pm 3,2^*$	$– 41 \pm 5,01$

\*  $p < 0,001$  — по отношению к контролю.

ключить, что изменения мозгового кровотока связаны с непосредственным изменением тонуса сосудов мозга.

Далее было изучено влияние афобазола на кровоснабжение мозга крыс в условиях глобальной преходящей ишемии мозга. Оказалось, что препарат в дозе 5 мг/кг при внутривенном введении крысам, перенесшим глобальную ишемию, увеличивал локальный мозговой кровоток в среднем на  $40 \pm 9,3\%$  ( $n = 7$ , табл. 2), т.е. до исходного уровня. Цереброваскулярный эффект препарата наблюдался в одних опытах через 10 мин после введения, в других — через 20 мин, иногда через 40 и 60 мин. Длительность эффекта — 60 и более мин.

Препарат оказывал неоднозначное влияние на уровень артериального давления: в одних опытах оно снижалось (3 опыта), в других — не изменялось (3 опыта), в одном — повышалось. Следовательно, эффект афобазола на сосуды мозга не опосредуется через влияние на артериальное давление; препарат действует непосредственно на тонус сосудов мозга, нарушенный вследствие ишемического воздействия.

Далее представляло интерес изучить изменения синтеза HSP70 в условиях глобальной преходящей ишемии и влияние афобазола на эти изменения.

При изучении изменений синтеза стресс-белка HSP70 в коре и стриатуме мозга крыс было проведено 3 серии опытов: 1 — контрольная группа, 2 — животные после глобальной преходящей ишемии и 3 — животные, получавшие афобазол в дозе 10 мг/кг внутрьбрюшинно через 30 мин после реинфузии.

Проведенные исследования показали, что у контрольных животных исходный уровень содержания HSP70 составлял  $4,75 \pm 0,39$  отн. д. ед. (относительные денситометрические единицы). Через 24 ч после ишемического повреждения мозга уровень белка в стриатуме был статистически достоверно снижен на 26,9 % по сравнению с контролем и составил  $3,47 \pm 1,06$  отн. д. ед. ( $p < 0,05$ ). В серии опытов с использованием афобазола через 24 ч синтез белка достоверно увеличивался в среднем на 46 % по сравнению с ишемией и составил  $5,66 \pm 0,38$  отн. д. ед. ( $p < 0,05$ ), см. рисунок.

Ранее нами было показано, что нейроны стриатума более чувствительны к ишемическому повреждению, чем нейроны коры [8]. Настоящее исследование подтвердило эти данные, так как наблюдались изменения в основном в нейронах стриатума, а в коре изменений синтеза белка HSP70 не обнаружено.

Таким образом, исследование показало, что нейропротекторное действие афобазола связано, с одной стороны, с улучшением кровоснабжения мозга в условиях глобальной преходящей ишемии, с другой — со способностью препарата повышать в условиях ишемии устойчивость мембранных структур нейронов коры и стриатума к свободнорадикальным процессам,

а также увеличивать синтез стресс-белка HSP70 в стриатуме мозга крыс.

Известно, что одним из наиболее важных звеньев в развитии ишемического поражения ткани мозга является окислительный стресс. Вместе с тем головной мозг высоко чувствителен к свободнорадикальному окислению вследствие того, что его мембранные структуры богаты полиненасыщенными жирными кислотами. Они являются мишенью для свободнорадикального повреждения. В то же время в мозге в сравнении с другими органами и тканями активность антиоксидантной системы ниже. В норме антиоксидантная система уравновешивает действие прооксидантной, тогда как в условиях ишемического повреждения равновесие смещается в сторону увеличения функции последней. Происходит накопление окисленных липидов (гидропероксиды жирных кислот, малоновый диальдегид и др.) и белков, содержащих S — S-связи, карбонили и др. модифицированные группы, а также фрагментов окисленных нуклеотидов, что в конечном итоге приводит к гибели клетки. HSP70, в свою очередь, предотвращает агрегацию белков, участвует в раскладывании и реорганизации поврежденных при окислительном стрессе белков [14], а также в протеолитической деградации нестабильных белков. Поэтому после ишемического повреждения мозга уровень белка в наших экспериментах в стриатуме был снижен по сравнению с контролем. В последнее время растет интерес к использованию в медицине антистрессовых свойств шаперонов, к которым относятся и HSP70 [4]. Однако есть трудности в применении экзогенных белков теплового шока [4]. В связи с этим ведется поиск лекарственных средств, влияющих на синтез эндогенных HSP70. Поэтому тот факт, что афобазол при ишемии мозга увеличивает синтез эндогенных HSP70 представляет интерес для клинического применения афобазола при ишемических поражениях мозга.

Таблица 2. Влияние афобазола на локальный мозговой кровоток (ЛМК) в условиях глобальной преходящей ишемии мозга крыс

№ опыта	ЛМК, усл. ед., после ишемии	ЛМК, усл. ед., после введения афобазола	% изменений
1	18	31	+ 72
2	11	13	+ 18
3	8	11	+ 38
4	6	10	+ 67
5	11	13	+ 18
6	16	25	+ 56
7	28	32	+ 14
	$14 \pm 2,8$	$19,3 \pm 3,07^*$	$+ 40 \pm 9,3$

\*  $p < 0,01$

## ВЫВОДЫ

1. Глобальная преходящая ишемия вызывает значительное снижение кровоснабжения мозга у крыс и снижает содержание стресс-белка HSP70 в стриатуме.
2. Афобазол восстанавливает нарушенное вследствие ишемии кровоснабжение мозга и увеличивает синтез HSP70 в стриатуме.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласанян, *Автореф. дис. докт. фарм. наук*, Ереван, (2003).
2. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, С. Б. Середенин, *Бiol. экспер. бiol.*, **8**, 161–163 (2005).
3. И. Ю. Малышев, Е. В. Малышева, *Бiol. экспер. бiol.*, **126**(12), 604–611 (1998).
4. Ю. Ф. Пастухов, И. В. Екимова, *Нейронауки*, **2**(2), 3–25, (2005).
5. С. Б. Середенин, В. П. Акопян, М. Г. Баласанян, А. В. Топчян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(2), 3–5 (2006).

6. С. Б. Середенин, О. В. Поварова, О. С. Медведев и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 3–5 (2006).
7. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(5), 9–13, (2004).
8. И. В. Силкина, Т. А. Зенина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 47–50 (2006).
9. N. Arispe, M. Doh, and A. De Maio, *Cell Stress Chaperons*, **7**, 330–338 (2002).
10. R. G. Giffard, L. Xu, H. Zhao, et al., *J. of Experimental Biology*, **207**, 3213–3220 (2004).
11. T.-H. Lee, K. Hiroyuki, S.-T. Chen, et al., *Stroke*, **29**, 1678–1697 (1998).
12. S.-H. Lee, M. Kim, B.-W. Yoon, et al., *Stroke*, **32**, 2905–2912 (2001).
13. S.-H. Lee, H.-M. Know, Y.-Ju Kim, et al., *Stroke*, **35**, 2195–2199 (2004).
14. D. A. Parsell and S. Lindquist, *Annu Rev. Genet.*, **27**, 437–496 (1993).

Поступила 22.09.08

## EFFECTS OF AFOBAZOLE ON STRESS PROTEIN HSP70 CONTENT IN BRAIN TISSUE OF RATS WITH GLOBAL TRANSIENT ISCHEMIA

**T. A. Antipova, I. O. Logvinov, I. N. Kurdyumov, N. R. Mirzoyan, T. S. Gan'shina, A. I Turilova, R. S. Mirzoyan, and S. B. Seredenin**

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments in anesthetized rats showed that global transient brain ischemia caused a significant decrease in cerebral blood flow in rat cerebral cortex and reduced the stress protein HSP70 level in striatum. Afobazole administration restored the cerebral blood supply disturbed by ischemia and increased the stress protein HSP70 synthesis in striatum.

**Key words:** Afobazole, global transient brain ischemia, stress protein HSP70, western-blot analysis

## ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ РИТМА СЕРДЦА У КРЫС, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПОВЕДЕНИЮ В ТЕСТЕ “ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ”

Н. В. Каверина, Е. П. Попова, М. А. Яркова, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

Изучали изменение вариабельности сердечного ритма при формировании эмоционально-стрессового ответа и на фоне анксиолитика афобазола у крыс с различным типом поведения в teste “открытое поле”. Установлено, что в группе стресс-устойчивых крыс преобладает тонус симпатического нервной системы, а в группе стресс-неустойчивых — парасимпатической. При стрессе в группе стресс-неустойчивых животных наблюдается уменьшение вариабельности сердечного ритма за счет доли очень низких частот, в отличие от стресс-устойчивых, у которых доля очень низких частот возрастает. Афобазол вызывает увеличение вариабельности сердечного ритма во всех группах животных. У стресс-неустойчивых животных афобазол повышает тонус блуждающего нерва.

**Ключевые слова:** афобазол, вариабельность сердечного ритма, эмоционально-стрессовая реакция

### ВВЕДЕНИЕ

Зависимость течения сердечно-сосудистых заболеваний от состояния вегетативной нервной системы хорошо известна [6, 20, 24, 26]. Одним из количественных показателей активности вегетативной нервной системы является оценка вариабельности сердечного ритма (ВСР) [1, 13]. С появлением устройств, обеспечивающих автоматизированное измерение ВСР, данный метод становится все более популярным [21]. Впервые зависимость между снижением ВСР и повышением смертности больных, перенесших инфаркт миокарда, была установлена М. М. Wolf и соавт. [32]. Показано также, что снижение ВСР возникает во время приступов ишемии миокарда и при морфофункциональных изменениях миокарда у пациентов, страдающих гипертонической болезнью [3, 8, 11, 17].

Исследование ВСР позволяет детально оценить хронотропную функцию сердца, выяснить с какими спектральными характеристиками ВСР связаны ее изменения [13]. Анализ спектральных характеристик ВСР дает возможность выявить отдел вегетативной нервной системы, симпатический или парасимпатический, ответственный за изменение данных показателей. Простота метода регистрации частоты сердечных сокращений позволяет использовать данный метод при развитии эмоционально-стрессовой реакции [7].

Ответ на эмоционально-стрессовое воздействие зависит как от фактора, его обуславливающего, так и от состояния адаптационных систем организма, при недостаточности которых развиваются патологические процессы [15]. Поэтому изучение фенотипа систем адаптации имеет важное значение для разработки индивидуальных подходов к фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний.

<sup>1</sup> ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Доказана генетическая предрасположенность к различным типам эмоционально-стрессовых реакций (ЭСР) [19, 22, 23]. В экспериментальных работах выделены разные варианты поведения животных в teste “открытое поле”: активное, сочетающееся с низкой эмоциональностью, с реакцией “замирания”, характеризующееся высокой эмоциональностью. Распространенными моделями таких типов поведения являются пары инбредных мышей C57BL/6 и BALB/c и крыс MR (Maudsley Reactive) и MNRA (Maudsley NonReactive) [18, 19]. Сходные ответы описаны у человека [16, 29, 30]. В зависимости от фенотипа реакции на эмоциональный стресс, как у животных, так и у человека, возникают различные эффекты психофармакологических средств коррекции ЭСР [4, 5, 29, 31].

В настоящей работе был изучен характер изменений ВСР у беспородных крыс, разделенных по типу поведения в teste “открытое поле” [27]. В задачи исследования входило изучение отличий параметров ВСР при формировании эмоционально-стрессового ответа и при введении небензодиазепинового анксиолитика афобазола у высокоактивных (ВА) — стресс-устойчивых и низкоактивных (НА) — стресс-неустойчивых животных.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 170 – 200 г, полученных из питомника Столбовая РАМН. Животных содержали в виварии НИИ фармакологии им. В. В. Закусова по 10 особей в клетке, с необращенным 12-часовым режимом, при температуре 22 – 24 °C и влажности 60 %, на стандартной диете. После 10 дней адаптации крыс тестировали в “открытом поле”. Эксперименты проводили с 10 до 14 ч в осенне — зимний период. Установка “открытое поле”

и регистрируемые параметры поведения крыс описаны ранее [28].

В качестве стресс-устойчивых (СУ) отбирали крыс с общей двигательной активностью более 80 единиц, а стресс-неустойчивых (СН) — с общей двигательной активностью менее 35 единиц [27, 28]. Афобазол вводили на следующий за тестированием день в дозе 5 мг/кг в объеме 0,2 мл внутрибрюшинно за 30 мин перед экспериментом в “открытом поле”. Десяти контрольным ВА и 10 НА крысам вводили физиологический раствор в объеме 0,2 мл внутрибрюшинно. У животных, находящихся в “открытом поле”, одновременно регистрировали ЭКГ с помощью электродов, закрепленных на грудной клетке специальной манжетой. Для регистрации ЭКГ использовали компьютерный комплекс Поли-Спектр-Ритм (Россия). ЭКГ регистрировали в течение 5 мин. Была проведена специальная серия опытов, когда у животных регистрировали ЭКГ во время нахождения в клетке, т.е. в покое. Для этой серии были использованы предварительно тестированные в “открытом поле” 10 высокоактивных и 10 низкоактивных крыс. После регистрации ЭКГ проводили статистический анализ ВСР. Рассчитывали следующие показатели: R-Rmin, мс — минимальная продолжительность интервала R-R; R-Rmax, мс — максимальная продолжительность интервала R-R; RRNN, мс — средняя длительность интервалов R-R; SDNN, мс — стандартное отклонение интервалов R-R; RMSSD, мс — квадратный корень из среднеарифметического значения квадрата разности длительностей последовательных интервалов R-R; CV, % — коэффициент вариации интервалов R-R.

Статистические показатели характеризуют динамичный ряд интервалов RR как случайный процесс, но не отображают его внутреннюю структуру и не позволяют судить о механизмах, обеспечивающих наблюдаемый конечный эффект регуляторных воздействий [1]. С помощью спектрального анализа можно получить более полное представление о взаимодействии двух отделов вегетативной нервной системы [14]. Анализ спектральной мощности дает информацию о распределении мощности в зависимости от частоты колебаний. Для вычисления спектральной плотности использовали непараметрический метод — быстрое преобразование Фурье. Спектральный анализ ритма сердца заключается в идентификации его волновой структуры. В используемой в исследовании программе реализована основная система спектрального анализа, соответствующая рекомендациям стандарта “Вариабельность ритма сердца. Стандарт измерения, физиологической интерпретации и клинического использования” [2].

Согласно основной системе спектрального анализа вариабельности ритма сердца, выделяются и анализируются следующие показатели: TP, мс<sup>2</sup> — полная мощность спектра колебаний интервалов R-R; VLF, мс<sup>2</sup> — мощность спектра интервалов R-R в области

очень низких частот (0,003 – 0,04 Гц); LF, мс<sup>2</sup> — мощность спектра интервалов R-R в области низких частот (0,04 – 0,15 Гц); HF, мс<sup>2</sup> — мощность спектра интервалов R-R в области высоких частот (0,15 – 0,4 Гц); LFnorm, у. е. — мощность спектра интервалов R-R в области низких частот, измеренная в нормализованных единицах; нормализованные единицы отражают относительный вклад каждого из компонентов (низких или высоких частот) в пропорции к общей мощности за вычетом компонента очень низких частот, то есть это отношение мощности низких частот к сумме компонент низких и высоких частот (LFnorm = LF/(LF + HF)); HFnorm, у. е. — мощность спектра интервалов R-R в области высоких частот, измеренная в нормализованных единицах (HFnorm = HF/(LF + HF)); LF/HF — соотношение мощностей спектра интервалов R-R в области низких и высоких частот; % VLF — процент колебаний очень низкой частоты в общей мощности спектра; % LF — процент колебаний низкой частоты в общей мощности спектра; % HF — процент колебаний высокой частоты в общей мощности спектра.

Результаты сравнивали как внутри СУ и СН групп, так и между группами. Изучали характеристики ВСР у крыс в покое (серия покоя), в условиях стресса, возникающего у крыс в “открытом поле” (серия стресса) и на фоне введения афобазола в условиях “открытого поля”. Результаты обрабатывали статистическим методом однофакторного дисперсионного анализа. Для оценки межгрупповых различий использовали критерий Ньюмена-Кейлса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### I. Изучение показателей ВСР у крыс в покое

#### 1. Изучение статистических показателей ВСР у крыс в покое

В группе СН крыс R-Rmax был больше, чем у СУ крыс, его значение составило  $177 \pm 28,3$  мс по сравнению с  $156,8 \pm 9,3$  мс ( $p = 0,046$ ), табл. 1. Стандартное отклонение интервалов R-R в группе СН крыс было выше по сравнению с СУ. В группе СН крыс SDNN составило  $9,5 \pm 4,2$  мс, а в группе СУ крыс  $5,75 \pm 2,6$  мс ( $p = 0,027$ ). Статистически значимых изменений остальных показателей не наблюдалось. Следует отметить тенденцию к увеличению среднего R-R, интервала RRNN и квадратного корня из среднеарифметического значения квадрата разности R-R интервалов в группе СН крыс по сравнению со СУ.

#### 2. Изучение спектральных показателей ВСР у крыс в покое

Для выяснения вопроса об изменении активности отделов автономной нервной системы и соответственно их влияния на частоту сердечных сокращений использовали спектральный анализ.

В группе СН животных наблюдали достоверно большее значение общей мощности спектра TP по срав-

нению с группой СУ (табл. 2). ТР в группе СН крыс была равна  $577,3 \pm 64,4$  мс<sup>2</sup>, а в группе СУ крыс  $277 \pm 15,5$  мс<sup>2</sup>, ( $p = 0,0001$ ). В группе СН животных наблюдались большие значения мощностей спектра, соответствующие очень низким, низким и высоким частотам (рисунок). В области очень низких и высоких частот увеличение было более чем в 2 раза, т.е. увеличение общей мощности происходило в основном за счет этих областей.

Измерение мощности может быть выражено в нормализованных единицах, которые отражают относительный вклад каждого из компонентов в пропорции к общей мощности за вычетом очень низкочастотного компонента. Представление низкочастотного и высокочастотного компонентов в нормализованных единицах подчеркивает контролируемое и сбалансированное поведение двух звеньев автономной нервной системы и минимизирует влияние изменений общей мощности на уровень низко- и высокочастотных колебаний. Таким образом, при анализе изменений структуры спектра расчет нормализованных единиц позволяет оценить изменение низкочастотного компонента относительно высокочастотного. При анализе значений, выраженных в нормализованных единицах, установлено, что в группе СУ животных больше была доля низких частот, а в группе СН животных этот показатель имел меньшее значение, что свидетельствует о повышенном то-

нусе симпатической нервной системы у СУ животных. Как следствие этого наблюдается укорочение интервалов R-R и снижение вариабельности ритма сердца. В группе СН животных мощность высоких частот было значительно выше, чем в группе СУ  $32,1 \pm 5,59$  мс<sup>2</sup> и  $12,5 \pm 4,25$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ) соответственно. Это свидетельствует о повышении роли блуждающего нерва в регуляции сердечного ритма у СН животных. В группе СН крыс доля колебаний, соответствующих низким частотам, составила  $17,2 \pm 5,7$  %, что ниже, чем в группе СУ крыс  $26,4 \pm 4,1$  ( $p = 0,0001$ ), а доля колебаний, соответствующих высоким частотам, была достоверно выше —  $8,2 \pm 3,9$  % у СН крыс и  $5,12 \pm 1,27$  % ( $p = 0,028$ ) у СУ крыс. Доля колебаний, соответствующих очень низким частотам, в группе СН крыс также была больше по сравнению с группой СУ крыс, хотя статистически достоверных изменений не выявлено. В группе СН крыс доля колебаний, соответствующих очень низким частотам, составила  $74,5 \pm 8,65$  %, а в группе СУ крыс  $68,1 \pm 5,1$  % ( $p = 0,059$ ).

Таким образом, в покое в группе СУ животных установлен повышенный тонус симпатической нервной системы. Частота сердечных сокращений у животных данной группы выше по сравнению с группой СН, и как следствие этого вариабельность в группе СУ животных снижена. Известно, что при воздействии стрессовых факторов активация симпатической нер-

Таблица 1. Изменение статистических параметров вариабельности сердечного ритма у крыс в покое, в условиях стресса в teste “открытое поле” и на фоне афобазола

Показатель	Серия покоя		Серия стресса		Афобазол, 5 мг/кг внутрибрюшинно	
	Группа СУ	Группа СН	Группа СУ	Группа СН	Группа СУ	Группа СН
R-Rmin, мс	$118,3 \pm 1,75$	$120,2 \pm 3,8$	$119,5 \pm 15,9$	$119,6 \pm 12,9$	$117,1 \pm 20,8$	$132,7 \pm 8,92$
$p_1$					$> 0,05$	0,005
$p_2$		$> 0,05$				0,029
R-Rmax, мс	$156,8 \pm 9,3$	$177 \pm 28,3$	$170,5 \pm 16,7$	$175,5 \pm 22,1$	$212,5 \pm 16,7$	$195,5 \pm 24,1$
$p_1$					$0,0001$	0,026
$p_2$		0,046				0,074
RRNN, мс	$133,8 \pm 5,8$	$143,8 \pm 14,5$	$139,3 \pm 19,3$	$142,8 \pm 14,7$	$158,3 \pm 15,0$	$160,8 \pm 10,34$
$p_1$					$0,032$	0,001
$p_2$		0,058				$> 0,05$
SDNN, мс	$5,75 \pm 2,6$	$9,5 \pm 4,2$	$7,63 \pm 3,16$	$7,83 \pm 2,87$	$12,9 \pm 3,54$	$9,58 \pm 3,96$
$p_1$					$0,004$	0,161
$p_2$		0,027				0,054
RMSSD, мс	$2,75 \pm 1,25$	$4,2 \pm 1,8$	$3,75 \pm 1,28$	$4,39 \pm 2,28$	$7,3 \pm 3,47$	$5,25 \pm 3,36$
$p_1$					$0,007$	0,393
$p_2$		0,051				0,190
CV, %	$4,3 \pm 1,8$	$6,22 \pm 2,3$	$5,5 \pm 1,87$	$5,42 \pm 1,85$	$8,2 \pm 1,85$	$5,93 \pm 2,09$
$p_1$					$0,009$	$> 0,05$
$p_2$		0,052				0,015

**Примечание.** R-Rmin, мс — минимальная продолжительность интервала R-R; R-Rmax, мс — максимальная продолжительность интервала R-R; RRNN, мс — средняя длительность интервалов R-R; SDNN, мс — стандартное отклонение интервалов R-R; RMSSD, мс — квадратный корень из среднеарифметического значения квадрата разности длительностей последовательных интервалов R-R; CV, % — коэффициент вариации ряда интервалов R-R. Здесь и в табл. 2: СУ — стресс-устойчивые животные, СН — стресс-неустойчивые. Отличия достоверны:  $p_1$  — серии покоя от серии стресса,  $p_2$  — группы СУ от группы СН.

вной системы является одним из механизмов, обеспечивающих развитие адаптации организма к стрессу. Таким образом, исходно повышенный уровень симпатической нервной системы позволяет животным легко адаптироваться в условиях стресса, что подтверждается данными.

В группе СН животных наблюдалось повышение доли очень низких и высоких частот, что свидетельствует о повышении тонуса вагуса (рисунок *a, б*). Роль очень низких частот (VLF) не совсем ясна. Предполагают, что уровень VLF ассоциирован с функцией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы почек, секрецией нейропептидов и с метаболическими процессами в тканях [9, 10, 25]. У больных, страдающих гипертонической болезнью с различными значениями VLF, наблюдается различная чувствительность к антигипертоническим препаратам. Высказывается предположение, что исходное значение VLF можно использовать как маркер при подборе антигипертензивной терапии. Например, установлено, что пациентам с высоким значением VLF не показаны  $\beta$ -адреноблокаторы, наиболее эффективными у них оказались блокаторы кальциевых каналов [12]. Установленные различия мощности колебаний очень низких частот у СН и СУ животных в покое могут быть полезны при анализе результатов серии стресса и эффектов афобазола.

Соотношение мощностей спектра интервалов R-R в области низких и высоких частот LF/HF, характеризующее симпато-вагусный баланс, составляет у СУ крыс  $4,96 \pm 0,7$ , у СН крыс  $3,2 \pm 1,27$  ( $p = 0,001$ ).

## II. Изучение показателей ВСР у крыс в условиях стресса в teste “открытое поле”

### 1. Изучение статистических показателей ВСР у крыс в условиях стресса в teste “открытое поле”

При стрессе в “открытом поле” статистические показатели вариабельности ритма сердца у СУ и СН крыс достоверно не различались (табл. 1).

При сравнении группы СУ крыс при стрессе и в покое наблюдалось достоверно большее значение максимального R-R интервала. R-R<sub>max</sub> составило  $170,5 \pm 16,7$  при стрессе по сравнению с  $156,8 \pm 9,3$  ( $p = 0,036$ ) в покое. Следует отметить тенденцию к увеличению стандартного отклонения R-R интервалов SDNN, что свидетельствует о возрастании вариабельности ритма сердца.

У СН животных не наблюдается достоверных различий статистических показателей в условиях стресса и в покое. Можно отметить тенденцию к снижению стандартного отклонения R-R интервалов SDNN, что свидетельствует об уменьшении вариабельности ритма сердца при стрессе у СН животных. При анализе ритмограммы установлено, что выраженная тахикардия в группе СН животных после помещения их в “открытое поле” наблюдается в течение 2 мин. Далее частота сердечных сокращений возвращается к исходным значениям. Так как анализировался 5-минутный ин-

тервал, то, возможно, те изменения, которые наблюдались в течение первых 2 мин не были выявлены.

### 2. Изучение спектральных показателей ВСР у крыс в условиях стресса в teste “открытое поле”

В состоянии стресса у СУ крыс спектральные характеристики по сравнению с покойем изменяются следующим образом (табл. 2): полная мощность спектра колебаний ТР возрастает и становится равной  $412,1 \pm 22,3$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$  по отношению к серии покоя); мощность спектра в области очень низких частот VLF также возрастает (рисунок, *a*). Этот показатель становится равным  $347,5 \pm 37,7$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ). При анализе структуры спектра в условиях стресса по сравнению с покойем установлено повышение доли колебаний очень низких частот до  $81,98 \pm 6,33$  ( $p = 0,001$ ). Доля остальных компонентов (низких и высоких частот) снижается, что является следствием увеличения доли очень низких частот.

Данное изменение спектральных характеристик у СУ животных свидетельствует об увеличении вариабельности ритма сердца. Общая мощность спектра возрастает за счет очень низких частот, что, возможно, отражает активацию компенсаторных механизмов в ответ на стресс. Доля низких частот, отражающих симпатический тонус, имеет тенденцию к уменьшению, хотя остается достаточно высокой (рисунок, *b*). Это может быть связано с повышенной двигательной активностью у животных.

У СН крыс в состоянии стресса спектральные характеристики изменяются следующим образом: полная мощность спектра колебаний ТР снижается и становится равной  $387,8 \pm 47,45$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$  по отношению к серии покоя); мощность спектра в области очень низких частот VLF также уменьшается до  $297,5 \pm 40,76$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ), рисунок, *a*. Наблюдается снижение мощности низких частот до  $19,15 \pm 13,54$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,012$ ), рисунок, *b*. Соотношение мощностей спектра интервалов R-R в области низких и высоких частот LF/HF имеет тенденцию к увеличению, что свидетельствует о возможном повышении тонуса симпатической нервной системы. Таким образом, у СН крыс в условиях стресса наблюдается уменьшение общей мощности спектра, т.е. значительное снижение вариабельности ритма сердца. Уменьшение происходит за счет компоненты очень низких и высоких частот (рисунок, *a, б*), что свидетельствует о понижении роли вагуса в контроле деятельности сердца, а также сниженной активности компенсаторных механизмов, связанных с ренин — ангиотензин — альдостероновой системой и нейропептидами у СН-животных.

При сравнении групп СУ и СН животных в “открытом поле” установлено, что мощность VLF у СН животных достоверно ниже, чем у СУ —  $297,5 \pm 40,8$  мс<sup>2</sup> по сравнению с  $347,5 \pm 37,7$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,007$ ), рисунок, *a*, т.е. в данной группе животных снижена вариабель-

нность сердечного ритма. Мощность колебаний низких частот выше в группе СН животных —  $70,7 \pm 20,7$  мс<sup>2</sup> по сравнению с  $57,5 \pm 8,2$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,005$ ) у СУ крыс (рисунок, б). Наблюдается тенденция к увеличению мощности высоких частот в группе СН животных (рисунок, в). При анализе структуры спектра показано, что доля очень низких частот в группе СН крыс снижена по сравнению с группой СУ крыс —  $73,4 \pm 8,27$  мс<sup>2</sup> и  $81,98 \pm 6,3$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,016$ ), соответственно. Доля низких частот в группе СН животных была выше по сравнению со СУ животными, а доля высоких частот была ниже. Таким образом, у СН животных по сравнению со СУ наблюдается низкая вариабельность ритма сердца за счет снижения мощности очень низких колебаний, что свидетельствует о снижении процессов адаптации к стрессу. Наблюдается повышенный уровень низких частот, что связано с повышением тонуса симпатической нервной системы в условиях стресса у СН крыс. Доля высоких частот у СН крыс по сравнению с СУ ниже, что свидетельствует об уменьшении роли вагуса в регуляции сердечного ритма.

Полученные данные позволяют сделать следующее заключение. В условиях стресса у СУ крыс повышается полная мощность спектра колебаний ритма (TP), что свидетельствует об увеличении вариабельности

ритма сердца. При анализе структуры спектра установлено, что доля очень низких частот в этой группе животных высока. Возможно, это является особенностью СУ животных, что обеспечивает их хорошую адаптацию в условиях стресса. Доля низких частот остается достаточно высокой, т.е. отмечается повышенный симпатический тонус, что, возможно, объясняется высокой двигательной активностью. В группе СН крыс наблюдается понижение, как общей мощности спектра, так и мощности очень низких частот. Последнее, возможно, является особенностью данной группы и отражает низкий уровень реакции адаптации на стресс. Наблюдается возрастание мощности низких частот, что, наряду с увеличением их доли в структуре спектра, свидетельствует об усиления симпатического тонуса у СН животных в условиях стресса.

### III. Изучение изменений показателей вариабельности сердечного ритма на фоне афобазола у крыс в teste “открытое поле”

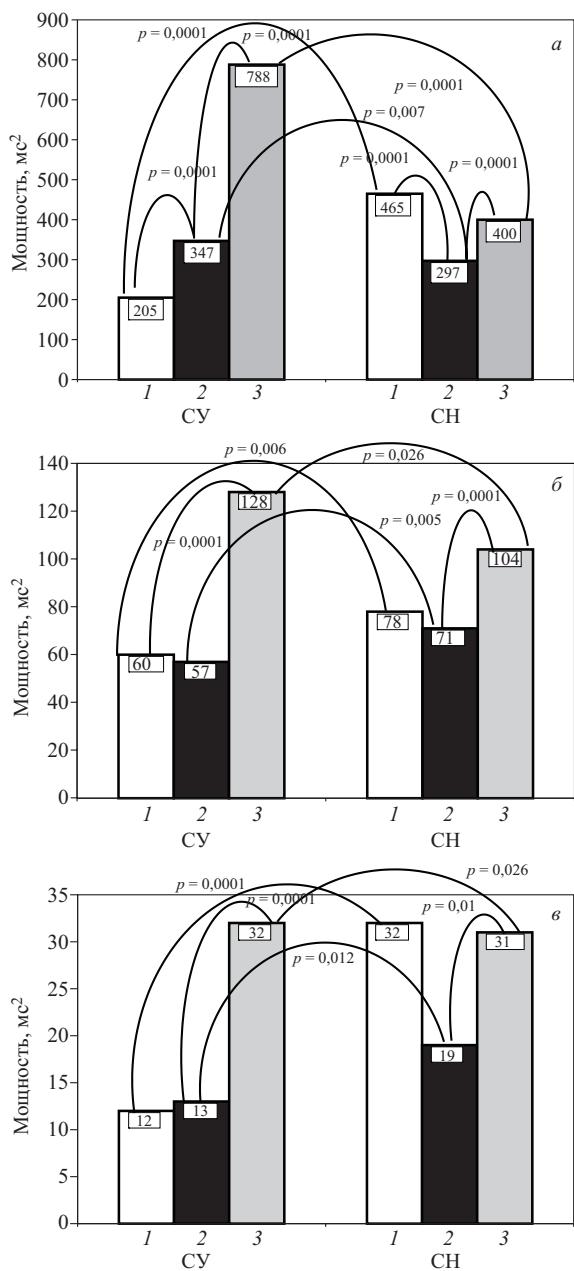
#### 1. Изучение статистических показателей BCP у крыс на фоне афобазола в teste “открытое поле”

У СУ-крыс на фоне афобазола возрастает средняя длительность интервалов RRNN до  $158,3 \pm 15$  мс ( $p = 0,032$  по отношению к СУ-крысам серии стресса) и максимальная продолжительность интервала R-Rmax до  $212,4 \pm 16,7$  мс ( $p = 0,0001$ ), табл. 1.

Таблица 2. Изменение спектральных характеристик вариабельности сердечного ритма у крыс в покое, при стрессе в teste “открытое поле” и на фоне афобазола

Показатель	Серия покоя		Серия стресса		Афобазол, 5 мг/кг	
	СУ	СН	СУ	СН	СУ	СН
TP, мс <sup>2</sup>	$277 \pm 15,5$	$577,3 \pm 64,4$	$412,1 \pm 22,3$	$387,8 \pm 47,5$	$948,1 \pm 69$	$536,8 \pm 67,3$
$p_1$					$0,0001$	$0,0001$
$p_2$		$0,0001$				$0,0001$
LF norm, у.е.	$82,8 \pm 1,8$	$72,2 \pm 9,6$	$79,98 \pm 6,82$	$79,48 \pm 6,67$	$79,4 \pm 7,8$	$75,8 \pm 10,5$
$p_1$					$> 0,05$	$0,247$
$p_2$		$0,003$				$0,381$
HF norm, у.е.	$17,2 \pm 1,8$	$27,8 \pm 9,6$	$20,02 \pm 6,82$	$20,52 \pm 6,67$	$20,6 \pm 7,8$	$24,2 \pm 10,5$
$p_1$					$> 0,05$	$0,247$
$p_1$		$0,003$				$0,381$
LF/HF	$4,96 \pm 0,7$	$3,2 \pm 1,27$	$4,54 \pm 1,99$	$4,49 \pm 2,18$	$4,9 \pm 3,5$	$3,8 \pm 1,8$
$p_1$					$> 0,05$	$0,353$
$p_2$		$0,001$				$0,353$
% VLF	$68,1 \pm 5,1$	$74,5 \pm 8,65$	$81,98 \pm 6,33$	$73,43 \pm 8,27$	$82,0 \pm 7,7$	$66,8 \pm 8,5$
$p_1$					$> 0,05$	$0,044$
$p_2$		$0,059$				$0,0001$
% LF	$26,4 \pm 4,1$	$17,2 \pm 5,7$	$14,5 \pm 5,54$	$21,2 \pm 7,04$	$14,4 \pm 6,7$	$24,0 \pm 6,5$
$p_1$					$> 0,05$	$0,279$
$p_2$		$0,0001$				$0,003$
% HF	$5,12 \pm 1,27$	$8,2 \pm 3,9$	$3,55 \pm 1,28$	$5,36 \pm 2,28$	$3,6 \pm 1,9$	$9,9 \pm 4,4$
$p_1$					$> 0,05$	$0,001$
$p_2$		$0,028$				$0,0001$

Примечание. TP, мс<sup>2</sup> — полная мощность спектра колебаний ЧСС; LFnorm, у. е. — мощность спектра ЧСС в области низких частот в нормализованных единицах; HFnorm, у. е. — мощность спектра ЧСС в области высоких частот в нормализованных единицах; LF/HF — соотношение мощностей спектра ЧСС в области низких и высоких частот; % VLF — процент колебаний очень низкой частоты в общей мощности спектра; % LF, % HF — процент колебаний низкой или высокой частоты в общей мощности спектра.



Изменение мощности очень медленных частот (VLF, *a*), медленных частот (LF, *b*) и быстрых частот (HF, *c*) в группах стресс-устойчивых (СУ) и стресс-неустойчивых (СН) животных в покое, при стрессе в тесте “открытое поле” и на фоне афобазола.

1 — покой, 2 — стресс, 3 — афобазол.

Под влиянием афобазола возрастает стандартное отклонение интервалов SDNN  $12,9 \pm 3,54$  мс ( $p = 0,004$ ) и квадратный корень из среднеарифметического значения квадрата разности длительностей последовательных интервалов RMSSD  $7,3 \pm 3,47$  мс ( $p = 0,007$ ), что свидетельствует об увеличении вариабельности ритма сердца на фоне афобазола. Коэффициент вариации ряда интервалов CV возрастает под влиянием афобазола и составляет  $8,2 \pm 1,85\%$  ( $p = 0,009$ ).

В группе СН животных на фоне афобазола возрастает средняя длительность интервалов RRNN до  $160,8 \pm 10,3$  мс ( $p = 0,001$ ) и максимальная продолжительность интервала R-Rmax до  $195,5 \pm 24,1$  мс ( $p = 0,026$ ). R-Rmin также возрастает до  $132,7 \pm 8,9$  мс ( $p = 0,001$ ) в отличие от СУ-крыс.

Под влиянием афобазола в группе СН крыс наблюдалась тенденция к увеличению стандартного отклонения интервалов SDNN и квадратного корня из среднеарифметического значения квадрата разности длительностей последовательных интервалов RMSSD, что свидетельствует об увеличении вариабельности ритма сердца на фоне афобазола у СН животных.

При сравнении статистических показателей вариабельности ритма сердца у СУ и СН животных на фоне афобазола не наблюдалось достоверных отличий. Можно отметить тенденцию к снижению стандартного отклонения R-R интервалов SDNN. В группе СН крыс этот показатель составил  $9,58 \pm 3,96$  мс, а в группе СУ  $12,9 \pm 3,5$  мс ( $p = 0,054$ ). Наблюдалось также достоверное уменьшение коэффициента вариации R-R интервалов CV. В группе СН животных его значение равно  $5,9 \pm 2,1\%$ , а в группе СУ  $8,2 \pm 1,85\%$  ( $p = 0,015$ ), что свидетельствует о снижении вариабельности ритма сердца.

#### 2. Изучение спектральных показателей ВСР у крыс на фоне афобазола в teste “открытое поле”.

В группе СУ-крыс на фоне афобазола (табл. 2) значительно возрастает полная мощность спектра ТР  $948,2 \pm 69$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ), при этом возрастание наблюдается в большей степени за счет компонент очень низких частот VLF  $788 \pm 93,3$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ), рисунок, *a*, а также медленных частот LF  $127,2 \pm 31,3$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ), рисунок, *b* и высоких частот  $32,5 \pm 6,4$  мс<sup>2</sup> ( $p = 0,0001$ ), рисунок, *c*. Полученные данные свидетельствуют о том, что возрастает вариабельность ритма сердца. Для выявления роли каждого компонента в увеличении вариабельности анализировали структуру спектра и значения мощности в нормализованных единицах.

Анализ структуры спектра показал, что доля мощности очень низких частот составляет  $82,05 \pm 7,67\%$ , что аналогично группе СУ-крыс при введении физиологического раствора. Доли мощностей низких и высоких частот остаются неизменными по сравнению с контрольной группой, несмотря на возрастание абсолютного значения этих показателей. Таким образом, в группе СУ-животных введение афобазола приводило к значительному возрастанию вариабельности сердечного ритма, однако, не происходило изменения соотношения различных компонент. Значительная роль в спектре компоненты очень низких частот сохраняется. Не наблюдается изменений в мощности низких и высоких частот, выраженных в нормализованных единицах, т.е. соотношение этих компонент также на фоне афобазола не изменяется.

В группе СН-крыс на фоне афобазола (табл. 2) также возрастает полная мощность спектра ТР  $536,8 \pm 67,3 \text{ мс}^2$  ( $p = 0,0001$ ), хотя в меньшей степени по сравнению с группой СУ-крыс. При этом возрастание происходит в большей степени за счет компоненты высоких частот HF (рисунок *в*), которая возрастает до  $30,9 \pm 7,1 \text{ мс}^2$  ( $p = 0,01$ ). Мощность очень низких частот и низких частот возрастает до  $400,2 \pm 54,2 \text{ мс}^2$  ( $p = 0,0001$ ) и  $104,3 \pm 12,3 \text{ мс}^2$  ( $p = 0,0001$ ) соответственно (рисунок, *а, б*). Анализ структуры спектра показал, что доля мощности очень низких частот составляет  $66,8 \pm 8,5 \%$  ( $p = 0,044$ ), что ниже по сравнению с группой СН-крыс при введении физиологического раствора, несмотря на возрастание абсолютного значения этого показателя. Доля мощности низких частот не изменяется, а доля высоких частот возрастает почти в два раза и составляет  $9,9 \pm 4,4 \%$  ( $p = 0,001$ ). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о повышении тонуса вагуса на фоне афобазола в группе СН-животных. Повышение мощности низких частот можно объяснить тем, что по данным некоторых исследователей вагус оказывает влияние не только на формирование высоких частот, но и обуславливает 50 % низких частот. Установлено, что мощность низкочастотных колебаний значительно уменьшается при введении атропина [14]. Кроме того, в опытах на собаках обнаружено, что гангионарные парасимпатические нейроны, которые находятся в мелких вегетативных узлах, окружающих правое предсердие, передают сигнал к синусовому узлу и замедляют сердцебиение [19]. Удаление этого сплетения полностью устраниет высокочастотные колебания и снижает мощность низкочастотных колебаний на 50 %. Это означает, что низкочастотные колебания наполовину обусловлены сигналами парасимпатической нервной системы.

При расчете мощности низких LF<sub>norm</sub> и высоких HF<sub>norm</sub> частот в нормализованных единицах установлено, что соотношение мощностей низких и высоких частот на фоне афобазола в группе СН-крыс изменяется в сторону повышения мощности высоких частот в сравнении с низкими. Симпато-вагусный баланс, характеризующийся соотношением LF/HF достоверно не изменяется, хотя имеется тенденция к уменьшению по сравнению с контролем, что свидетельствует о повышении парасимпатического тонуса.

Из полученных результатов можно сделать следующее заключение. СУ животные имеют повышенный тонус симпатической нервной системы. Компонент, соответствующий очень низким частотам не выражен, но при стрессе наблюдается его значительное увеличение, что свидетельствует о высоких адаптационных возможностях этой группы. СН животные имеют более высокий тонус парасимпатической нервной системы, доля очень низких частот значительна, но в условиях стресса наблюдается ее снижение, что, возможно,

связано с низкой активностью реакций адаптации на стресс у этой группы животных.

В условиях стресса у СУ крыс наблюдается повышение полной мощности спектра, т.е. увеличение вариабельности сердечного ритма. Также наблюдается повышение доли очень низких частот, что является особенностью данной группы. Для данной группы характерно повышение симпатического тонуса, что связано с высокой двигательной активностью животных.

У СН-крыс наблюдается значительное снижение вариабельности ритма сердца, снижение мощностей очень низких и высоких частот, что свидетельствует о снижении роли парасимпатической нервной системы в регуляции ритма сердца у данной группы животных.

Афобазол вызывает увеличение полной мощности спектра в обеих группах, что свидетельствует о повышении вариабельности ритма сердца. В группе СУ-крыс сохраняется роль очень низких частот, при одновременном повышении мощностей всех компонент спектра. В группе СН-крыс наблюдается возрастание вагусных влияний на сердце, что свидетельствует о том, что афобазол стимулирует вагусный контроль в отношении сердца.

## ВЫВОДЫ

1. В группе интактных стресс-устойчивых животных установлен повышенный тонус симпатической нервной системы, а у стресс-неустойчивых — парасимпатической нервной системы.

2. При эмоционально-стрессовом воздействии в teste “открытое поле” у стресс-устойчивых крыс происходит повышение вариабельности сердечного ритма, что сопровождается увеличением доли очень низких частот в отличие от стресс-неустойчивых животных, у которых снижаются вариабельность сердечного ритма и доля очень низких частот.

3. Афобазол вызывает увеличение общей мощности спектра интервалов R-R, что свидетельствует о возрастании вариабельности ритма сердца в обеих исследованных группах.

4. В группе стресс-устойчивых животных на фоне афобазола сохраняется повышенное содержание очень низких частот. В группе стресс-неустойчивых животных афобазол вызывает повышение тонуса вагуса и, таким образом, способствует лучшей адаптации сердечно-сосудистой системы животных к стрессу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Р. М. Баевский, Г. А. Никулина, *Вестн. аритмол.*, **16**, 6 – 16 (2000).
2. *Вариабельность сердечного ритма. Стандарты измерения, физиологической интерпретации и клинического использования. Рабочая группа Европейского Кардиологического Общества и Северо-Американского общества стимуляции и электрофизиологии*, Вестн. Аритмол., **11**, 53 – 78, (1999).
3. И. В. Корнелюк, Я. Г. Никитин, Т. М. Коптиух, *Вестн. аритмол.*, **36**, 18 – 22 (2004).

4. В. А. Машин, М. Н. Машина, *Рос. физиол. ж.*, **90**(12), 1508 – 1521 (2004).
5. В. С. Мякотных, Т. А. Боровкова, А. А. Баталов, *Рос. биомед. ж.*, **4**(74), 101 – 102 (2003).
6. М. В. Носкова, А. Ш. Ревишвили, *Вестн. аритмол.*, **35**, 22 – 25 (2004).
7. А. Н. Рагозин, *Вестн. аритмол.*, **22**, 37 (2001).
8. И. Рутгай-Недецки, *Вестн. аритмол.*, **22**, 56 – 60 (2001).
9. Г. В. Рябкина, А. В. Соболев, *Кардиология*, **10**, 87 – 97 (1996).
10. О. Б. Степура, О. Д. Остроумова, И. Г. Курильченко и др., *Клин. мед.*, **4**, 57 – 58 (1997).
11. А. Н. Сумин, Т. Н. Енина, Н. Н. Верхушапова и др., *Вестн. аритмол.*, **37**, 32 – 39 (2005).
12. А. Н. Флейшман, С. Н. Филимонов, Н. В. Климина, *Тер. архив*, **12**, 33 – 39 (2001).
13. Н. Б. Хаспекова, *Вестн. аритмол.*, **32**, 15 – 23 (2003).
14. В. М. Хаютин, Е. В. Лукошкова, *Вестн. аритмол.*, **26**, 10 – 21 (2002).
15. Е. И. Чазов, *Кардиол. вестн.*, **1**(XIII), 5 – 9 (2006).
16. Y. A. Aleksandrovsky, I. O. Chrulenko-Varnicky, and L. G. Uvarova, *J. Neuropath. Psychiat.*, **9**, 1367 – 1376 (1984).
17. J. T. Bigger, J. L. Fleiss, R. C. Steinman, et al., *Circulation*, **85**, 164 – 71 (1992).
18. D. A. Blizzard, *Behav. Genet.*, **11**, 469 – 489 (1981).
19. P. L. Broadhurst, *Behav. Genet.*, **5**, 299 – 319 (1975).
20. P. B. Corr, K. A. Yamada, F. X. Witkowski, *The Heart and Cardiovascular System*, Fozzard H. A., Haber E., Jennings R. B., Katz A. N., Morgan H. E. (eds.), New York: Raven Press (1986), 1343 – 1403.
21. L. S. Dreifus, P. J. Agarwal, E. H. Botvinik, et al., (American College of Cardiology Cardiovascular Technology Assessment Committee), *J. Am. Coil. Cardiol.*, **22**, 948 – 50 (1993).
22. J. L. Fuller and W. R. Thompson, *Behaviour genetics*, New York, Wiley (1960), 230 – 269.
23. C. S. Hall, *The genetics of behavior*; Steven SS. (ed.), *Handbook of experimental psychology*, New York, Wiley (1951), 304 – 329.
24. M. N. Levy, P. J. Schwartz (eds.), *Vagal control of the heart: Experimental basis and clinical implications*, Armonk: Future. (1994).
25. M. Malik, A. J. Camm (eds.), *Heart rate variability*. Armonk, New York: Futura Publishing Company, (1995).
26. P. J. Schwartz, S. G. Priori, *Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside*, W. B. Saunders, D. P. Zipe, Jalife J. (eds.), Philadelphia (1990), 330 – 43.
27. S. B. Seredenin, Yu. A. Blednov, B. A. Badistov, *Drug dependence and emotional behaviour*, Valdman A. V. (Ed.) London, Plenum Press, (1986) 49 – 77.
28. S. B. Seredenin, I. V. Viglinskaya, P. O. Kashevskaya. *Biological Basis of Individual Sensitivity to Psychotropic Drugs* (Ed.), Seredenin S. B., Longo V., Gaviragli G., Graffham Press Ltd, Moscow, Russia, (1994) 47 – 56.
29. A. V. Valdman, Yu. A. Alexandrovsky, S. B. Seredenin, *Biological basis of individual pharmacotherapy. In Theoretical basis of psychiatric illness*, VII All-Union meeting of Neuropharmacologists and Psychiatrists. Moscow, (1981).
30. A. V. Valdman, M. M. Kozlovskaia, and O. S. Medvedev, *Pharmacological regulation of emotional stress*, Moscow, Meditsina, (1979).
31. A. V. Valdman, A. V. Martinichin, *Investigation of psychotropic drugs effects on psychophysiological characteristics of operator abilities in emotional stress conditions. In Pharmacological correction of weariness*. Bobkob YuG. Moscow (1982) 83 – 879.
32. M. M. Wolf, G. A. Varigos, D. Hunt (Eds.), *Med. J. Australia*, **2**, 52 – 53 (1978).

Поступила 24.04.08

## AFOBAZOLE EFFECT ON HEART RATE VARIABILITY IN RATS WITH DIFFERENT BEHAVIORS IN “Open Field” TEST

N. V. Kaverina, E. P. Popova, M. A. Yarkova, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The course of cardiovascular diseases is known to depend upon vegetative nervous system condition. The heart rate variability is the quantitative indicator of vegetative nervous system activity. The emotional stress reaction in rats tested in the “open field” was assessed by measuring the heart rate variability, which allowed the chronotropic cardiac function to be studied in detail and showed which part of the vegetative system (either sympathetic or parasympathetic) prevails in animals with different phenotypes of the emotional stress reaction. In rats demonstrating different behaviors in the “open field” test, changes in the heart rate variability were examined under conditions of the emotional stress response development and the treatment with non-benzodiazepine anxiolytic afobazole. It was established that the sympathetic nervous system tone prevails in stress-resistant rats, whereas in non-resistant animals, the parasympathetic system is predominating. In non-resistant rats exposed to stress, the heart rate variability decreased due to reduced power of very low frequencies, in contrast to stress-resistant animals, which showed increased power of very low frequencies. Afobazole was found to increase the heart rate variability in both animal groups. In non-resistant rats, afobazole also raised the vagus tone.

**Key words:** Afobazole, heart rate variability, emotional stress reaction

## ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНОГО АНКСИОЛИТИКА АФОБАЗОЛА НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

И. Б. Цорин, И. П. Палка, Г. Г. Чичканов<sup>1</sup>

В опытах на наркотизированных крысах показано, что афобазол вызывает небольшую брадикардию и практически не влияет на показатели гемодинамики и деятельности сердца: артериальное давление, систолический и сердечный выброс, среднее ускорение кровотока в аорте. Препарат уменьшает частоту возникновения фибрилляций желудочков во время 7-минутной окклюзии и последующей 3-минутной реперфузии левой коронарной артерии. Афобазол при введении в течение 21 дня в условиях экспериментального инфаркта миокарда у крыс не влияет на насосную и сократительную функции сердца. Препарат нормализует подавленную при инфаркте миокарда реакцию среднего ускорения кровотока в аорте на нагрузку объемом, т.е. повышает адаптационные способности сердечной мышцы.

**Ключевые слова:** афобазол, фибрилляции желудочков, инфаркт миокарда

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы психотропные средства (анксиолитики, антидепрессанты) нашли широкое применение в кардиологической практике. В наших предыдущих исследованиях было изучено влияние анксиолитиковベンゾдиазепинового ряда (диазепам, хлордиазепоксид), а также трициклического антидепрессанта имипрамина на системное артериальное давление, сократительную функцию миокарда, коронарное кровообращение и перераспределение кровотока в ишемизированной сердечной мышце. Полученные данные позволили дать рекомендации по оптимизации применения подобного рода средств при патологии сердечно-сосудистой системы и уменьшить проявления их побочных действий [7, 8]. В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН был создан селективный анксиолитик афобазол, который нашел широкое применение в медицинской практике [5]. Как показали экспериментальные исследования, этот препарат защищает мозг от ишемического повреждения [6]. В настоящей работе представлялось интересным провести систематическое изучение влияния афобазола на сердечно-сосудистую систему: гемодинамику, сократительную функцию сердца, частоту сердечных сокращений. Не менее важным было исследовать антиаритмическое и противофибрилляторное действие препарата, а также его влияние на течение экспериментального инфаркта миокарда.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для суждения о влиянии афобазола на гемодинамику и деятельность сердца использовали электромагнитный метод регистрации кровотока в восходящей части дуги аорты. Эксперименты проводили на 13 бе-

льых беспородных крысах-самцах массой 200 – 250 г, наркотизированных этаминал-натрием (60 мг/кг внутривенно) в условиях вскрытой грудной клетки и искусственной вентиляции легких. В опытах использовали электромагнитный измеритель потока крови MFV-1200 (“Nihon Kohden”, Япония). Проводя фазовый анализ кровотока в аорте, рассчитывали следующие показатели гемодинамики и деятельности сердца: частоту сердечных сокращений, систолический и сердечный выброс, среднее ускорение кровотока в аорте. Системное артериальное давление измеряли электроманометром в сонной артерии. Графическую регистрацию деятельности сердца осуществляли на приборе Мингограф-81. Афобазол вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг. Полученные данные обрабатывали статистически. Значимость изменений определяли с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений и метода множественных сравнений Даннетта [3].

Антифибрилляторное действие соединений изучали в опытах на наркотизированных этаминал-натрием (60 мг/кг внутривенно) крысах самцах массой 180 – 240 г в условиях открытой грудной клетки и искусственной вентиляции легких. У животных с помощью специального приспособления вызывали окклюзию левой коронарной артерии в 1 – 2 мм от ее начала. Через 7 мин проводили реперфузию. Именно в этот период возникает наибольшее количество (70 – 100 %) фибрилляций желудочков [11]. ЭКГ во II стандартном отведении регистрировали с помощью прибора Мингограф-81. Подсчитывали количество случаев фибрилляций желудочков во время окклюзии и реперфузии, опасных для жизни аритмий (фибрилляции + параксизмальные желудочковые тахикардии), общее количество аритмий. Афобазол вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг. В контрольной серии опытов вводили эквивалентный объем физиологического раствора (1 мл/кг). Всего было проведено 2 серии экспериментов на 52 крысах. Результаты подвергали статистиче-

<sup>1</sup> Лаборатория фармакологии цереброваскулярных расстройств (зав. — проф. Р. С. Мирзоян) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Таблица 1. Влияние афобазола (5 мг/кг внутривенно) на гемодинамику и деятельность сердца наркотизированных крыс (этаминал-натрий, 60 мг/кг, внутрибрюшинно)

Показатель	Исходный уровень	Изменения показателей в % к исходному уровню после введения препарата ( $M \pm m$ , $n = 13$ )				
		2 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин
Среднее АД, мм. рт. ст.	$83,8 \pm 5,2$	$+1,2 \pm 1,8$	$+2,2 \pm 1,5$	$0,0 \pm 1,7$	$+18,1 \pm 8,9$	$+7,8 \pm 2,7^*$
Частота сердечных сокращений, уд. в минуту	$276,6 \pm 9,5$	$-2,9 \pm 1,1$	$-2,7 \pm 1,1$	$-4,1 \pm 1,6$	$-5,4 \pm 2,6^*$	$-6,2 \pm 2,9^*$
Систолический выброс, мл	$0,15 \pm 0,02$	$+8,4 \pm 4,9$	$+4,5 \pm 4,2$	$+0,2 \pm 2,9$	$+3,0 \pm 2,5$	$+6,2 \pm 2,8$
Сердечный выброс, мл/мин	$40,6 \pm 3,6$	$+5,2 \pm 5,0$	$+1,6 \pm 4,5$	$-3,8 \pm 3,5$	$+1,5 \pm 5,1$	$-0,2 \pm 4,4$
Среднее ускорение кровотока в аорте, см/сек <sup>2</sup>	$4131 \pm 296$	$+8,2 \pm 4,3$	$8,4 \pm 2,9$	$+3,8 \pm 3,8$	$+2,8 \pm 2,5$	$+2,7 \pm 2,3$

\* —  $p \leq 0,05$  по отношению к исходному уровню.

ской обработке. Проводили балльное шкалирование выборок: отсутствие аритмий — 0; экстрасистолия — 1; параксизмальная желудочковая тахикардия — 2; фибрилляция желудочков, возникшая во время реперфузии — 3; фибрилляция, возникшая во время окклюзии венечного сосуда — 4. Значимость изменений определяли с помощью метода точной вероятности Фишера и метода Манна — Уитни [3].

Влияние афобазола на течение экспериментального инфаркта миокарда изучали в экспериментах на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Инфаркт миокарда моделировали по [12]. Ложнооперированым животным не производили перевязку коронарной артерии. Препарат вводили внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 21 дня в дозе 5 мг/кг. Первую инъекцию осуществляли сразу после операции. В контрольных сериях экспериментов вводили эквивалентные объемы физиологического раствора.

Через 21 день у крыс, наркотизированных внутрибрюшинно уретаном (1300 мг/кг), регистрировали ЭКГ в трех стандартных отведениях с помощью компьютерного ветеринарного электрокардиографа Поли-Спектр-8/В фирмы “Нейрософт” (Россия), соединенного с персональным компьютером Pentium IV. Обработку электрокардиограмм проводили при помощи специальной программы, предназначенный для электрокардиографического обследования различных видов животных, в том числе крыс. Измеряли интервалы RR<sub>max</sub>, RR<sub>min</sub>, RR<sub>mean</sub>, QT, продолжительность комплекса QRS; QT<sub>c</sub> (QT<sub>c</sub> = QT/√RR), частоту сердечных

сокращений (ЧСС). Рассчитывали коэффициент вариации сердечного ритма (CV %), вариационный размах (ВР) RR, индекс напряжения регуляторных систем (ИН) по Р. М. Баевскому [1]. Затем в условиях искусственной вентиляции легких и открытой грудной клетки проводили запись кривой фазового кровотока в восходящей части дуги аорты и системного артериального давления как описано выше. Кривую кровотока в аорте и артериальное давление с помощью аналого-цифрового преобразователя записывали в электронном виде на персональном компьютере Pentium IV. Проводя фазовый анализ кровотока в аорте, по специальной программе рассчитывали показатели, указанные выше.

Для изучения компенсаторной возможности миокарда в условиях повышенной нагрузки животным в бедренную вену вводили одномоментно 1 мл физиологического раствора. Запись показателей производили сразу и через 1 мин после введения.

Было проведено 3 серии экспериментов (28 крыс): 1 — ложнооперированные животные (7 крыс) — контроль; 2 — животные с инфарктом миокарда (12 крыс) — контроль; 3 — животные с инфарктом миокарда (9 крыс), получавшие афобазол.

Полученные данные обрабатывали статистически. Статистическую значимость изменений показателей гемодинамики и деятельности сердца определяли с помощью одномерного дисперсионного анализа и критерия множественных сравнений Дункана, а также дисперсионного анализа для повторных измерений и

Таблица 2. Влияние афобазола на частоту возникновения фибрилляций желудочков, опасных для жизни аритмий и тяжесть аритмического процесса в условиях 7-минутной окклюзии и последующей реперфузии коронарной артерии у наркотизированных (этаминал-натрий, 60 мг/кг, внутрибрюшинно) крыс

Вещество	Количество животных в серии	Количество фибрилляций желудочков	Количество опасных для жизни аритмий	Общее количество аритмий	Тяжесть аритмического процесса в баллах (медиана, 25 и 75 % процентили)
Контроль	33	21	30	30	3 (2 ÷ 4)
Афобазол, 5 мг/кг	19	5*	14	17	2* (1 ÷ 3)

\* —  $p \leq 0,01$  — по отношению к контролю.

критерия множественных сравнений по Даннету. Для обработки показателей ЭКГ использовали метод Крускала — Уоллиса и критерий множественных сравнений по Данну, а также методы Манна — Уитни и точной вероятности Фишера, с помощью которого статистически обрабатывали данные о количестве животных, имевших комплексы QS на ЭКГ [2, 3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты на наркотизированных этаминал-натрием крысах показали, что афобазол в дозе 5 мг/кг оказывает незначительное влияние на гемодинамику и деятельность интактного сердца. Практически не изменяются системное АД, сердечный выброс и сократительная функция сердца. Лишь через 20–30 мин после введения препарата отмечается небольшая, статистически значимая брадикардия (табл. 1).

Представлялось интересным изучить влияние афобазола в условиях патологии сердечно-сосудистой системы, в частности, при нарушениях ритма сердца. Для исследования была выбрана модель фибрилляции желудочков у наркотизированных этаминал-натрием крыс, у которых нарушения ритма сердца вызывали 7-минутной окклюзией и последующей 3-минутной реперфузии коронарной артерии. Опыты показали, что афобазол обладает заметным антиаритмическим и противофibrillаторным действием. Так, если у животных контрольной группы фибрилляции желудочков возникали в 21 случае из 33, то под влиянием препарата, который вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг сразу после начала окклюзии, значительно уменьшалась частота возникновения фибрилляций (5 из 19, табл. 2). Уменьшалась также тяжесть аритмического процесса, оцениваемая с помощью балльного шкалирования.

Интересные данные были получены при изучении влияния афобазола на течение экспериментального инфаркта миокарда у крыс. Животным вводили препарат длительно в течение трех недель. Опыты показали, что через 21 день после операции у контрольных крыс

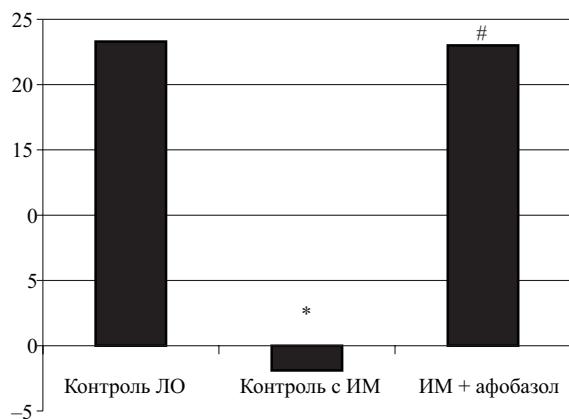
с инфарктом миокарда, в отличие от ложнооперированных животных, на ЭКГ в 10 случаях из 12 регистрировался комплекс QS. Такие изменения на ЭКГ свидетельствуют о трансмуральном инфаркте миокарда, т.е. о некротизации всех слоев сердечной мышцы в очаге ишемии. По остальным показателям ЭКГ и вариабельности ритма сердца контрольные крысы с инфарктом миокарда не отличались от контрольных ложнооперированных крыс (табл. 3). Отсутствие изменений интервалов RR, PQ, QT<sub>c</sub> и комплекса QRS указывает на то, что через 21 день после возникновения инфаркта миокарда у крыс не выявляются заметные нарушения автоматии сердца (RR), проведения возбуждения по предсердиям (PQ) и желудочкам (QRS) и длительности реполяризации миокарда желудочков (QT<sub>c</sub>). Следует также отметить, что в условиях трехнедельного инфаркта миокарда, по-видимому, отсутствуют изменения соотношения тонуса симпатической и парасимпатической нервных систем, о чем свидетельствуют неизмененные показатели вариабельности ритма сердца [1].

У крыс с инфарктом миокарда, получавших афобазол в дозе 5 мг/кг/дн в течение 21 дня, количество животных с комплексом QS на ЭКГ было значительно меньше (3 из 9, против 10 из 12,  $p = 0,0318$ ). У крыс, получавших афобазол, отмечалось также значительное увеличение интервала RR по сравнению с ложнооперированными животными. Остальные показатели ЭКГ и вариабельности сердечного ритма не отличались от таковых у контрольных крыс с инфарктом миокарда (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что изучаемый препарат, по-видимому, уменьшает интенсивность некротического поражения миокарда, снижает ЧСС и не вызывает через сутки после последнего введения стойких изменений проводимости по предсердиям и желудочкам, длительности реполяризации миокарда желудочков, соотношения тонуса симпатической и парасимпатической нервных систем [1].

Таблица 3. Влияние афобазола (5 мг/кг в день, внутрибрюшинно) при введении в течение 21 дня на показатели ЭКГ и вариабельность сердечного ритма крыс в условиях инфаркта миокарда. Представлены медианы, 25 % и 75 % процентили

Группа	N	Интервал R-R, с	Интервал PQ, с	Комплекс QRS, с	Интервал QT, с	Интервал QT <sub>c</sub> , с <sup>1/2</sup>	Коэффициент вариации R-R, %	Размах выборки R-R, с	Индекс напряженности
Контроль — ложнооперированные крысы	7	0,140 0,129 ÷ 0,146	0,048 0,045 ÷ 0,053	0,032 0,030 ÷ 0,036	0,066 0,066 ÷ 0,077	0,180 0,180 ÷ 0,215	0,59 0,56 ÷ 0,73	0,004 0,003 ÷ 0,005	$8,3 \cdot 10^4$ $7,1 \cdot 10^4 \div 19,4 \cdot 10^4$
Контроль — крысы с инфарктом миокарда	12	0,146 0,139 ÷ 0,177	0,052 0,048 ÷ 0,057	0,029 0,022 ÷ 0,034	0,080 0,076 ÷ 0,098	0,213 0,203 ÷ 0,231	0,83 0,55 ÷ 2,28	0,006 0,004 ÷ 0,019	$6,4 \cdot 10^4$ $1,7 \cdot 10^4 \div 8,0 \cdot 10^4$
Крысы с инфарктом миокарда, получавшие афобазол	9	0,167* 0,156 ÷ 0,171	0,052 0,048 ÷ 0,058	0,034 0,029 ÷ 0,036	0,078 0,075 ÷ 0,084	0,191 0,178 ÷ 0,203	0,84 0,79 ÷ 0,91	0,006 0,005 ÷ 0,008	$5,1 \cdot 10^4$ $3,5 \cdot 10^4 \div 7,8 \cdot 10^4$

\* —  $p \leq 0,05$  по отношению к ложнооперированному контролю.



Изменение реакции среднего ускорения кровотока в аорте на нагрузку под влиянием афобазола (5 мг/кг в день, внутрибрюшинно) при введении в течение 21 дня в условиях экспериментального инфаркта миокарда у крыс.

По оси ординат — величина реакции среднего ускорения кровотока в аорте в % к исходному уровню. ЛО — ложнооперированные крысы, ИМ — инфаркт миокарда. \* —  $p \leq 0,01$  по отношению к ЛО контролю; # —  $p \leq 0,01$  по отношению к контролю с ИМ.

Следует отметить, что у контрольных крыс с трехнедельным инфарктом миокарда, по сравнению с ложнооперированными животными, было значительно уменьшено ускорение кровотока в восходящей части дуги аорты, что свидетельствует об угнетении сократительной функции сердца. При этом частота сердечных сокращений, артериальное давление, систолический и сердечный выброс у контрольных крыс с инфарктом миокарда значимо не отличались от показателей у ложнооперированных животных (табл. 4). По сравнению с контрольными животными с инфарктом миокарда афобазол в дозе 5 мг/кг/дн при длительном (21 день) введении не приводил к существенным изменениям среднего АД, ЧСС, систолического и сердечного выброса, сократительной функции сердца (табл. 4).

Таким образом, трехнедельный инфаркт миокарда у крыс сопровождается значительным угнетением сократительной функции сердечной мышцы. При этом систолический и сердечный выброс практически не

меняются, что свидетельствует об определенной компенсации постинфарктной сердечной недостаточности. Поддержание в условиях инфаркта миокарда насосной функции на достаточно высоком уровне, по всей вероятности, связано с компенсаторными процессами в условно-интактных зонах миокарда. В этом отношении наши данные согласуются с наблюдениями других исследователей [9, 10].

Нам представлялось интересным изучить влияние афобазола на способность сердечной мышцы к адаптации в условиях ее повышенной работы. Известно, что скрытая сердечная недостаточность, как правило, проявляется при дополнительной нагрузке на миокард [4]. Действительно, наши опыты показали, что, если у ложнооперированных животных нагрузка объемом (1 мл физиологического раствора в вену) вызывала значительное увеличение среднего ускорения кровотока в аорте, систолического и сердечного выброса, то у контрольных животных с инфарктом миокарда в ответ на нагрузку сократительная функция, оцениваемая по величине среднего ускорения кровотока в аорте, практически не изменялась. В то же время реакция насосной функции оставалась такой же как у ложнооперированных животных (рисунок). Афобазол при длительном введении не оказывал существенного влияния на насосную и сократительную функции сердца, однако, что важно, нормализовал реакцию среднего ускорения кровотока в аорте на нагрузку объемом, т.е. увеличивал способность сердечной мышцы к адаптации в условиях заживающего инфаркта миокарда (рисунок). Можно предположить, что это связано с активацией компенсаторных процессов в условно-интактных зонах миокарда.

## ВЫВОДЫ

1. Афобазол в дозе 5 мг/кг внутривенно практически не изменяет системное АД, сердечный выброс и сократительную функцию интактного сердца. Препарат вызывает небольшую брадикардию.

2. В условиях окклюзии и реперфузии коронарной артерии у крыс афобазол оказывает антиаритмическое и противофибрилляторное действие.

Таблица 4. Влияние афобазола (5 мг/кг в день, внутрибрюшинно) при длительном введении (21 день) на показатели гемодинамики и деятельности сердца. Представлены средние арифметические значения показателей и их стандартные ошибки ( $M \pm SEM$ )

Группа	N	Показатели гемодинамики сердца и деятельности сердца				
		ЧСС, уд/мин	АД, мм рт. ст.	Систолический выброс, мл	Сердечный выброс, мл/мин	Ускорение кровотока в аорте, см/сек <sup>2</sup>
Контроль — ложнооперированные крысы	7	$314 \pm 14$	$81,1 \pm 6,4$	$0,195 \pm 0,012$	$61,5 \pm 5,0$	$6843 \pm 752$
Контроль — крысы с инфарктом миокарда	12	$293 \pm 14$	$72,7 \pm 5,8$	$0,188 \pm 0,013$	$55,3 \pm 4,5$	$4827 \pm 321^*$
Крысы с инфарктом миокарда, получавшие афобазол	7	$328 \pm 13$	$58,6 \pm 3,5$	$0,166 \pm 0,011$	$54,4 \pm 4,3$	$4097 \pm 522^*$

\* —  $p \leq 0,01$  по отношению к ложнооперированному контролю.

3. Афобазол при длительном введении в условиях экспериментального инфаркта миокарда у крыс не влияет на показатели гемодинамики и деятельности сердца, а также вариабельность сердечного ритма.

4. При длительном введении в условиях экспериментального инфаркта миокарда афобазол восстанавливает нарушенную реакцию среднего ускорения кровотока в аорте в ответ на нагрузку объемом, т.е. повышает адаптационную способность сердечной мышцы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Р. М. Баевский, О. И. Кирилов, С. З. Клецкин, *Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе*, Наука, Москва (1984).
2. И. Гайдышев, *Анализ и обработка данных: специальный справочник*, СПб: Питер (2001).
3. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1998).
4. Л. И. Ольбинская, П. Ф. Литвицкий, *Коронарная и миокардиальная недостаточность*, Медицина, Москва (1986).

5. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов, *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9, (1998).
6. С. Б. Середенин, О. В. Поварова, О. С. Медведев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 3 – 5, (2006).
7. Г. Г. Чичканов, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Москва (1982).
8. Г. Г. Чичканов, И. Б. Цорин, *Материалы IV Международной конференции “Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам”*, Москва (2006), сс. 79 – 80.
9. A. De Felice, R. Frerling, and P. Horan, *Amer. J. Physiol.*, **257**, H289 – H296, (1989).
10. H. Kobayashi, C. E. Smith, F. M. Fouad-Tarazi, et al., *Cardiov. Res.*, **23**, 842 – 851, (1989).
11. T. Krzeminski, J. Grzyb, A. Kurcok, and R. Brus, *Pol. J. Pharmacol. and Pharm.*, **44**, Suppl., 169 – 170 (1992).
12. A. I. Selye, E. Bajuz, and S. Crasse, *Angiology*, **11**, 398 – 407, (1960).

Поступила 20.11.08

## SPECIFIC FEATURES OF THE EFFECT OF SELECTIVE ANXIOLYTIC AFOBAZOLE ON CARDIOVASCULAR SYSTEM

I. B. Tsurin, I. P. Palka, and G. G. Chichkanov

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments in narcotized rats showed the new selective anxiolytic afobazole, a derivative of 2-mercaptopbenzimidazole, to cause a small bradycardia with almost no effect on the important parameters of heart hemodynamics and cardiac performance such as the arterial pressure, cardiac output, and mean aorta blood flow acceleration. Afobazole decreased the rate of ventricular fibrillations during 7-min occlusion followed by 3-min reperfusion of the left coronary artery in narcotized rats. Afobazole administered in rats for 21 days under conditions of experimental myocardial infarction had no effect on the pump and contractile cardiac functions. The drug normalized the reaction of mean aorta blood flow acceleration to the volume load suppressed by myocardial infarction, which was indicative of an increase in the adaptive capacity of myocardium.

**Key words:** Afobazole, ventricular fibrillation, myocardial infarction

## АНТИМУТАГЕННЫЕ И АНТИТЕРАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА АФОБАЗОЛА

**А. Д. Дурнев, А. К. Жанатаев, О. В. Шредер, С. Б. Середенин<sup>1</sup>**

В опытах на мышах и крысах установлена способность афобазола (1, 10 и 100 мг/кг внутрь) при однократном и 5-дневном совместном, а также 5-дневном предварительном введении предупреждать или значимо снижать кластогенные эффекты прооксиданта диоксидина (100 и 300 мг/кг внутрибрюшинно), кластогенные и тератогенные эффекты алкилирующего агента циклофосфамида (20 мг/кг внутрибрюшинно).

**Ключевые слова:** афобазол, тератогенез, хромосомные aberrации, мыши, крысы

### ВВЕДЕНИЕ

Афобазол — оригинальный анксиолитик, разработанный в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, имеет структурное сходство с ранее исследованными производными 2-меркаптобензимидазола, которые проявили выраженные antimутагенные свойства в экспериментах на млекопитающих по отношению к различным индукторам мутагенеза [1]. Отдельные препараты этой группы были успешно применены в клинике для коррекции мутагенных эффектов незаменимых лекарств и защиты генетических структур у больных системной красной волчанкой [1, 8].

Данные наблюдения, а также сообщения о взаимодействии афобазола с MT<sub>3</sub> рецепторами [15], об антиоксидантных [6], цитопротекторных [7] свойствах препарата определили задачу настоящей работы по выяснению его влияния на мутагенные и тератогенные эффекты ксенобиотиков у мышей и крыс.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование antimутагенных свойств афобазола выполняли на самцах и самках мышей линий C57BL/6 и BALB/c в возрасте 8–12 недель, содержащихся в условиях вивария НИИ фармакологии при 12-часовом световом режиме, при свободном доступе к воде и пище.

Подходы к оценке antimутагенности химических соединений описаны ранее [2].

В качестве индукторов мутагенеза использовали диоксидин (ДН) и циклофосфамид (ЦФ). Антибактериальный препарат широкого спектра действия диоксидин [1,4-ди-N-окись 2,3-бис-(оксиметил)хиноксалина], мутаген прооксидантного типа действия [1], вводили внутрибрюшинно в дозах 100 и 300 мг/кг. Цитостатический противоопухолевый препарат циклофосфамид [N'-бис-(β-хлорэтил)-N'-O-триметильтиольный эфир диамида фосфорной кислоты], непрямой алкилирующий мутаген [1], вводили внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг.

Афобазол в виде водного раствора в дозах 0,5, 1, 10 и 100 мг/кг вводили внутрь.

Эксперимент проводили в трех вариантах. В первом — мутаген и афобазол вводили одновременно на срок 24 ч. Во втором — животных обрабатывали афобазолом в течение пяти дней, последнее введение сочеталось с инъекцией мутагена на срок 24 часа. В третьем — афобазол вводили совместно с мутагеном в течение 5 дней с забоем животных через 6 ч после последней инъекции.

Цитогенетические препараты костного мозга бедренных костей готовили стандартным суховоздушным методом [14]. При цитогенетическом анализе учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами хромосом и обменами различного типа. Статистическую обработку (φ-критерий) проводили путем сравнения долей аномальных клеток в контрольной и экспериментальной группах. В каждом варианте эксперимента использовали 4–5 животных, от каждого животного анализировали по 100 метафазных пластинок.

Исследования по оценке влияния афобазола на индуцированный тератогенез выполнены на беспородных белых крысах питомника Столбовая РАМН массой 200–250 г. День обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках принимали за 1-й день беременности. Животных содержали при свободном доступе к брикетированному корму, овощам и воде, при естественном освещении.

Беременным крысам первой группы на 14-е сутки беременности внутрибрюшинно вводили ЦФ в дозе 20 мг/кг. Выбор дозы ЦФ и срока введения основывался на ранее опубликованных сведениях [9]. Крысам второй, третьей и четвертой опытных групп на 14-е сутки беременности вводили афобазол внутрь в дозах 1, 10 или 100 мг/кг и через 15 мин ЦФ. На 20-е сутки беременности крыс забивали дислокацией шейных позвонков.

Выделенные плоды осматривали, регистрировали наружные аномалии, взвешивали, определяли крацио-каудальный размер. У части эмбрионов после фиксации в жидкости Буэна проводили микроанатомическое исследование состояния внутренних органов по методу Вильсона — Дыбана. Другую часть эмбрионов после фиксации в 96° спирте и окрашивания ализарином исследовали по модифицированному методу

<sup>1</sup> ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Доусона [3]. Регистрировали аномалии костного скелета, среднее количество точек окостенения на один зародыш в области пястны, плюсны, позвоночника и грудины, а также аномалии черепа. Достоверность различий количества повреждений у эмбрионов экспериментальных групп оценивали методом параметрического дисперсионного анализа с использованием критерия Ньюман-Кеулса при условии нормального распределения и *t*-критерия Стьюдента при парных сравнениях эмбриотоксических показателей. В анализ включали всех полученных эмбрионов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены обобщенные данные, характеризующие влияние афобазола на цитогенетические эффекты ДН и ЦФ при различных режимах введения

анксиолитика в разных дозах самцам и самкам мышей линии C57BL/6.

Во всех вариантах экспериментов отдельно взятые мутагены статистически значимо увеличивали уровни клеток метафаз с хромосомными повреждениями в клетках костного мозга мышей. Основную долю хромосомных повреждений составляли одиночные фрагменты.

### Однократное введение

После совместного однократного введения ДН (100 мг/кг) с афобазолом в дозах 0,5, 1, 10 и 100 мг/кг самцам и дозах 1, 10 и 100 мг/кг самкам мышей было установлено значимое снижение цитогенетического эффекта мутагена до уровня контрольных значений.

При использовании ДН в дозе 300 мг/кг афобазол в дозе 0,5 мг/кг не влиял на цитогенетический эффект

Таблица 1. Влияние афобазола при различных режимах введения на кластогенные эффекты диоксидина и циклофосфамида у самцов и самок мышей линии C57BL/6

Условия эксперимента	Однократное совместное введение						Предварительное 5-дневное введение						Совместное 5-дневное введение					
	Исследованых клеток		Поврежденных метафаз ( $M \pm m\%$ )		Ослабление эффекта мутагена		Исследованых клеток		Поврежденных метафаз ( $M \pm m\%$ )		Ослабление эффекта мутагена		Исследованых клеток		Поврежденных метафаз ( $M \pm m\%$ )		Ослабление эффекта мутагена	
	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$	$\sigma$	$\varphi$
Контроль*	500	500	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5			500	500	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5			500	500	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5		
Диоксидин, 100 мг/кг	700	500	5,7 ± 0,9	3,8 ± 0,9			500	500	5,0 ± 1,0	4,0 ± 0,9			500	400	10,6 ± 1,4	10,8 ± 1,5		
+ Афобазол, 0,5 мг/кг	500	—	2,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 мг/кг	700	500	2,3 ± 0,6 <sup>d</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>c</sup>	+	+	500	500	1,4 ± 0,5 <sup>d</sup>	1,8 ± 0,6 <sup>c</sup>	+	+	500	500	9,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	9,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	0	0
10 мг/кг	500	500	2,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>d</sup>	+	+	500	500	1,4 ± 0,5 <sup>d</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>c</sup>	+	+	500	400	8,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,9 <sup>d</sup>	0	65%
100 мг/кг	500	400	2,0 ± 0,6 <sup>d</sup>	1,3 ± 0,5 <sup>d</sup>	+	+	500	500	1,8 ± 0,6 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	+	+	500	400	4,8 ± 0,9 <sup>d</sup>	1,5 ± 0,6 <sup>d</sup>	55 %	+
Диоксидин, 300 мг/кг	500	500	22,8 ± 1,8	10,6 ± 1,4			500	500	17,6 ± 1,7	10,2 ± 1,4			—	—	—	—		
+ Афобазол 0,5 мг/кг	500	—	18,2 ± 1,7	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 мг/кг	400	500	12,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	6,2 ± 1,1 <sup>c</sup>	44 %	43 %	500	500	10,6 ± 1,4 <sup>c</sup>	4,8 ± 1,1 <sup>c</sup>	40 %	53 %	—	—	—	—	—	—
10 мг/кг	500	500	5,6 ± 1,7 <sup>d</sup>	2,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	75 %	+	500	400	5,2 ± 1,0 <sup>d</sup>	4,0 ± 0,9 <sup>d</sup>	71 %	61 %	—	—	—	—	—	—
100 мг/кг	500	500	10,4 ± 1,4 <sup>d</sup>	2,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	54 %	+	400	400	5,0 ± 1,0 <sup>d</sup>	6,2 ± 1,1 <sup>b</sup>	72 %	39 %	—	—	—	—	—	—
Циклофосфамид 20 мг/кг	400	500	15,3 ± 1,7	7,8 ± 1,2			400	500	19,3 ± 2,0	7,6 ± 1,1			500	400	22,2 ± 1,8	7,8 ± 1,3		
+ Афобазол, 1 мг/кг	500	500	10,2 ± 1,6 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	33 %	56 %	500	500	15,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	0	50 %	500	500	16,2 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,8 <sup>d</sup>	0	54 %
10 мг/кг	500	500	4,6 ± 0,9 <sup>d</sup>	1,6 ± 0,6 <sup>d</sup>	69 %	+	500	500	12,2 ± 1,5 <sup>c</sup>	1,8 ± 0,6 <sup>d</sup>	37 %	+	500	500	16,2 ± 1,6 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,7 <sup>d</sup>	0	+
100 мг/кг	400	500	5,5 ± 1,1 <sup>d</sup>	4,4 ± 0,9 <sup>b</sup>	64 %	44 %	500	500	10,6 ± 1,4 <sup>d</sup>	2,2 ± 0,7 <sup>d</sup>	45 %	+	500	500	12,4 ± 1,5 <sup>d</sup>	4,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	44 %	41 %

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: «+» — снижение до спонтанного уровня мутирования; «0» — защитный эффект не зарегистрирован, «-» — нет данных, «\*» — во всех случаях имеются статистически значимые различия между контрольными значениями и результатами, зарегистрированными после воздействия мутагенов, <sup>a</sup> —  $p > 0,05$ ; <sup>b</sup> —  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> —  $p < 0,01$ ; <sup>d</sup> —  $p < 0,001$  уровень значимости при сравнении с эффектом мутагена.

мутагена у самцов, но при применении в дозах 1, 10 и 100 мг/кг значимо уменьшал выход поврежденных метафаз на 44, 75 и 54 % соответственно. В большей степени эффект мутагена снижался у самок. Результаты, зарегистрированные после применения афобазола в дозах 10 и 100 мг/кг, не отличались от контрольных данных, а после использования анксиолитика в дозе 1 мг/кг эффект мутагена был уменьшен на 43 %.

В экспериментах с ЦФ афобазол в дозах 1, 10 и 100 мг/кг редуцировал эффект мутагена у самцов на 33, 69 и 64 % соответственно, в дозах 1 и 100 мг/кг у самок на 56 и 44 % соответственно, в дозе 10 мг/кг — до уровня контрольных значений.

Таким образом, афобазол продемонстрировал выраженные антимутагенные свойства при однократном совместном введении с мутагенами различного действия.

#### *Предварительное 5-дневное введение*

Афобазол, вводимый самцам и самкам мышам в течение 5 дней в дозах 1, 10 и 100 мг/кг, полностью устранил цитогенетический эффект ДН в дозе 100 мг/кг.

**Таблица 2. Влияние афобазола при различных режимах введения на кластогенные эффекты диоксидина и циклофосфамида у самцов и самок мышей линии BALB/c**

Условия эксперимента	Однократное совместное введение				Предварительное 5-дневное введение				Совместное 5-дневное введение									
	Исследованых клеток		Поврежденных метафаз ( $M \pm m \%$ )		Ослабление эффекта мутагена		Исследованых клеток		Поврежденных метафаз ( $M \pm m \%$ )		Ослабление эффекта мутагена		Исследованых клеток		Поврежденных метафаз ( $M \pm m \%$ )		Ослабление эффекта мутагена	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Контроль*	500	500	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,5			500	500	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,5			500	500	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,6		
Диоксидин, 100 мг/кг	500	500	3,2 ± 0,8	4,8 ± 0,9			500	500	3,6 ± 1,0	5,0 ± 1,0			400	500	8,3 ± 1,9	10,2 ± 1,4		
1 мг/кг	500	500	1,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,7 <sup>b</sup>	+	+	500	500	1,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,6 <sup>c</sup>	+	+	400	500	2,0 ± 0,7 <sup>d</sup>	9,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	+	0
10 мг/кг	500	500	0,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,6 <sup>c</sup>	+	+	500	500	1,0 ± 0,4 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,6 <sup>c</sup>	+	+	400	500	1,8 ± 0,7 <sup>d</sup>	8,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	+	0
100 мг/кг	500	500	1,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>c</sup>	+	+	500	500	0,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>c</sup>	+	+	400	500	1,5 ± 0,6 <sup>d</sup>	3,6 ± 0,8 <sup>d</sup>	+	65 %
Диоксидин, 300 мг/кг	500	500	22,4 ± 1,7	19,8 ± 1,8			400	500	17,3 ± 1,9	20,2 ± 1,8			—	—	—	—		
1 мг/кг	400	500	16,0 ± 1,8 <sup>b</sup>	13,0 ± 1,5 <sup>c</sup>	29 %	34 %	500	500	7,2 ± 1,2 <sup>d</sup>	12,9 ± 1,5 <sup>c</sup>	58 %	36 %	—	—	—	—	—	—
10 мг/кг	400	500	9,3 ± 1,5 <sup>d</sup>	10,8 ± 1,4 <sup>d</sup>	58 %	46 %	500	500	1,8 ± 0,6 <sup>d</sup>	10,1 ± 1,3 <sup>d</sup>	+	50 %	—	—	—	—	—	—
100 мг/кг	500	500	14,8 ± 1,6 <sup>c</sup>	6,8 ± 1,1 <sup>d</sup>	34 %	66 %	500	500	1,6 ± 0,6 <sup>d</sup>	5,8 ± 1,0 <sup>d</sup>	+	70 %	—	—	—	—	—	—
Циклофосфамид, 20 мг/кг	500	500	20,8 ± 1,8	14,2 ± 1,6			500	500	18,4 ± 1,7	15,2 ± 1,6			500	500	19,2 ± 1,8	21,4 ± 1,8		
+ Афобазол, 1 мг/кг	700	500	14,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	8,4 ± 1,2 <sup>c</sup>	32 %	41 %	500	500	10,4 ± 1,4 <sup>d</sup>	14,2 ± 1,6 <sup>a</sup>	44 %	0	500	500	10,4 ± 1,4 <sup>d</sup>	18,4 ± 1,7 <sup>a</sup>	46 %	0
10 мг/кг	700	400	9,0 ± 1,1 <sup>d</sup>	6,3 ± 1,2 <sup>d</sup>	57 %	56 %	400	500	5,3 ± 1,0 <sup>d</sup>	7,6 ± 1,1 <sup>d</sup>	71 %	50 %	500	500	8,4 ± 1,2 <sup>d</sup>	17,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	56 %	0
100 мг/кг	500	400	9,6 ± 1,3 <sup>d</sup>	4,8 ± 1,1 <sup>d</sup>	54 %	66 %	500	500	6,4 ± 1,1 <sup>d</sup>	5,3 ± 1,0 <sup>d</sup>	65 %	65 %	400	500	5,8 ± 1,0 <sup>d</sup>	12,4 ± 1,4 <sup>d</sup>	70 %	40 %

В параллельном эксперименте афобазол в тех же дозах значимо редуцировал цитогенетический эффект ДН, применяемого из расчета 300 мг/кг, на 40, 71 и 72 % у самцов и на 53, 61 и 39 % у самок соответственно.

При сочетании с ЦФ афобазол в дозе 1 мг/кг не влиял на цитогенетический эффект мутагена у самцов, а в дозах 10 и 100 мг/кг редуцировал выход поврежденных метафаз на 37 и 45 % соответственно. У самок защитный эффект афобазола был выражен сильнее. Препарат в дозе 1 мг/кг снижал цитогенетический эффект на 50 %, а в дозах 10 и 100 мг/кг предупреждал его развитие.

Таким образом, наличие у афобазола антимутагенной активности подтверждилось при использовании препарата в режиме предварительного введения.

#### *Совместное 5-дневное введение*

Афобазол в дозах 1 и 10 мг/кг не оказывал значимого влияния на цитогенетический эффект ДН в дозе 100 мг/кг у самцов мышей. Только при использовании анксиолитика в дозе 100 мг/кг было выявлено 55 % снижение цитогенетического эффекта мутагена. У са-

мок защитный эффект афобазола был более выражен, препарат в дозе 10 мг/кг снижал цитогенетические действие на 65 %, а в дозе 100 мг/кг предупреждал его развитие.

В экспериментах с использованием ЦФ защитное действие афобазола у самцов выявилось только при его использовании в дозе 100 мг/кг, эффект мутагена был редуцирован на 44 %. У самок редукция эффекта мутагена наблюдалась при использовании афобазола во всех дозах. Афобазол в дозе 10 мг/кг препятствовал проявлению цитогенетического эффекта мутагена, а в дозах 1 и 100 мг/кг редуцировал его на 54 и 41 % соответственно.

В целом, результаты, полученные после совместного 5-дневного введения с мутагенами, подтвердили наличие у афобазола антимуутагенной активности. Следует отметить, что данная схема рассматривается в исследованиях по антимуутагенезу как наиболее "жесткая" [2].

Описанные результаты согласуются с данными, полученными при использовании афобазола в разных дозах, при разных режимах введения в аналогичных по исполнению экспериментах на самцах и самках мышей линии BALB/c и представленными в табл. 2.

Во всех вариантах цитогенетических экспериментов наблюдаемое снижение выхода aberrантных метафаз происходило за счет пропорционального снижения всех категорий хромосомных aberrаций, которые, в основном, были представлены одиночными фрагментами хромосом.

На основании обобщения полученных результатов можно сделать заключение о способности афобазола уменьшать кластогенные эффекты мутагенов, существенно различающихся по механизмам действия: проксиданта ДН и алкилирующего агента ЦФ. При этом наблюдается отчетливая специфичность действия афо-

базола по отношению к этим мутагенам. Защитные эффекты афобазола по отношению к мутагенной активности ДН более значительны, чем в случае с ЦФ. Это наблюдение указывает на взаимосвязь между антимуутагенными и антиоксидантными свойствами афобазола и логично объясняется различиями в механизмах повреждающего действия мутагенов. Мутагенное действие ДН опосредовано его способностью индуцировать образование свободных радикалов кислорода, а в механизме мутагенного действия ЦФ преобладает алкилирующее действие, хотя свободно-радикальный компонент также присутствует [1].

Примечательно, что афобазол, применяемый в широком диапазоне доз, не вызывал комутагенного эффекта, что выгодно отличает его от многих антимуутагенов/антиоксидантов, демонстрирующих дозозависимую смену защитного, антимуутагенного эффекта на нежелательное, комутагенное действие [1, 2].

По эффективности антимуутагенного действия афобазол не уступает уже изученным производным 2-МБИ. При однократном введении афобазол превосходит по антимуутагенной активности наиболее эффективный антимуутаген этого ряда — бемитил [1], а в условиях многократного применения проявляет защитный эффект в значительно меньших дозах.

Выявление антимуутагенных свойств афобазола в совокупности с известными сведениями о генотоксических и прооксидантных механизмах тератогенеза [10, 12, 13] определило целесообразность исследования влияния анксиолита на тератогенные эффекты ЦФ.

В табл. 3 представлены данные, характеризующие влияние афобазола на тератогенные эффекты ЦФ в дозе 20 мг/кг. В этой специально подобранный дозе тератоген не вызывал эмбриотоксического эффекта, однако, индуцировал уродства у 100 % эмбрионов.

Таблица 3. Влияние афобазола (Аф) на тератогенные эффекты циклофосфамида (ЦФ)

Показатель	ЦФ, 20 мг/кг	ЦФ + Аф, 1 мг/кг	ЦФ + Аф, 10 мг/кг	ЦФ + Аф, 100 мг/кг
Количество исследованных плодов	51	111	158	144
<b>Аномалии развития:</b>				
Кровоизлияние в мозг	75 % (38)	59 % (66) •	22 % (35) •	10 % (14) •
Менингоэнцефалоцеле	100 % (51)	27 % (30) •	40 % (63) •	18 % (26) •
Краниошизис	100 % (51)	56 % (62)	64 % (101)	48 % (69)
Микроцефалия	57 % (29)	0 •	28 % (44) •	0 •
Эзофтальм	71 % (36)	5 % (6) •	26 % (41) •	10 % (15) •
Микрогнатия	25 % (13)	6 % (7) •	16 % (25)	1 % (1) •
Гипогнатия	41 % (21)	5 % (6) •	15 % (24) •	6 % (9) •
Протрузия языка	29 % (15)	4 % (4) •	10 % (16) •	13 % (19) •
Микромелия	80 % (41)	0 •	9 % (15) •	0 •
Эвентерация	27 % (14)	5 % (5) •	16 % (25)	0 •
Тератома	88 % (45)	21 % (23) •	34 % (54) •	21 % (30) •
Повреждения передних конечностей	31 % (16)	13 % (14) •	3 % (5) •	0 •
Повреждения задних конечностей	86 % (44)	71 % (79) •	49 % (78) •	24 % (34) •

**Примечание.** Здесь и в табл. 4 • — значимые различия ( $p < 0,05$ ) при сравнении с эффектами отдельно взятого ЦФ.

Таблица 4. Влияние афобазола (Аф) на аномальное формирование костной системы, индуцированное циклофосфамидом (ЦФ)

Показатель	ЦФ, 20 мг/кг	ЦФ + Аф, 1 мг/кг	ЦФ + Аф, 10 мг/кг	ЦФ + Аф, 100 мг/кг
Количество плодов	28	46	69	74
Акрания, %	100	13 •	26 •	1,4 •
Дисморфия челюсти, %	92,7	15 •	26 •	1,4 •
Отсутствие затылочных костей, %	100	15 •	16 •	26 •
Сколиоз, %	71,4	19,8 •	16 •	0 •
Незаращение позвонков, %	78,6	28 •	11,6 •	0 •
Раздвоение точек около грудины, %	42,7	32,6	5,8 •	1,4 •

При макроскопическом исследовании эмбрионов были выявлены множественные аномалии, такие как краиниозис, менингоэнцефалоцеле, экзофтальм, протрузия языка, эвентерация, тератомы, грубые повреждения передних и задних конечностей (ахейния, аподия, олигодактилия). Выявленный спектр аномалий, возникающих под действием ЦФ, соответствует описанному в ранее проведенных исследованиях [9].

Под действием афобазола в дозах 1 и 100 мг/кг число отдельных аномалий эмбрионов снижалось до нулевого уровня, например, микроцефалия, микромелия, ахеция, аподия, эвентерация, олигодактилия передних конечностей.

Достоверное снижение количества грубых аномалий в 2, 4 и более раз наблюдалось в опытных группах животных, обработанных афобазолом во всех использованных дозах.

Изучение состояния внутренних органов плодов крыс, получавших ЦФ, выявило различные аномалии головного мозга, небных отростков, почек, сердца. Во всех группах животных получавших афобазол, снижалось количество эмбрионов с патологией развития внутренних органов. Наиболее эффективное действие афобазол оказывал в дозах 1 и 100 мг/кг.

При исследовании костной системы также отмечено дозозависимое снижение количества грубых аномалий (табл. 4). Из данных, приведенных в таблице, видно, что под влиянием афобазола в дозе 1 и 10 мг/кг, количество плодов с такими грубыми дефектами, как акрания, дисморфия челюсти, сколиоз, незаращение позвонков, снижалось в 4 – 8 раз по сравнению с тератогенной группой. При введении афобазола в дозе 100 мг/кг количество эмбрионов с акранией и дисморфией челюсти уменьшилось до 1,4 %. Такие показатели как сколиоз и незаращение позвонков в этой группе не были зарегистрированы.

Таким образом, афобазол в диапазоне доз 1 – 100 мг/кг приводит к дозозависимому статистически достоверному уменьшению эмбриотоксических поражений, значимо снижает тератогенное действие ЦФ и сужает спектр индуцируемых уродств, т.е. обладает антиретагенным действием.

Одним из механизмов тератогенеза является окислительный стресс и сопряженные с ним цитотоксические, мутационные и генотоксические воздействия

[10, 12, 13]. В этой связи выявление у афобазола антитератогенного действия согласуется с его цитопротекторными, антирадикальными [6, 7] и антимутагенными [4, 5] эффектами.

Показано [15], что одной из первичных мишней афобазола является МТ<sub>3</sub>-рецептор — регуляторный участок фермента хинонредуктазы 2 (QR2, NQR2 E. C. 1.10.99.2). Этот фермент катализирует процессы детоксикации высокореактивных экзогенных хинонов, предохраняя клетки от окислительного стресса [11]. Эти данные согласуются, с одной стороны, с результатами цитированных работ о роли окислительного стресса в формировании генотоксических, канцерогенных и тератогенных эффектов, с другой, с наблюдениями, описанными в настоящей работе, и, возможно, указывают на первичное звено формирования протекторных эффектов афобазола.

В дополнение к описанному выше необходимо указать, что недавно опубликованные результаты свидетельствуют о способности афобазола (50 мг/кг) снижать сверхэкспрессию онкогенов и генов-супрессоров, возникающую под действием канцерогена диметилбензо(а)антрацена, что привело авторов к выводу о возможных антиканцерогенных эффектах анксиолитика [16].

Таким образом, афобазол обладает уникальным спектром защитных свойств: цитопротекторной, антиоксидантной, антимутагенной, антиретагенной и, с высокой вероятностью, антиканцерогенной активностью. Это открывает очевидные перспективы дальнейших экспериментальных и клинических исследований афобазола в качестве профилактического средства.

## ВЫВОДЫ

1. Афобазол (1, 10 и 100 мг/кг внутрь) устраниет или значительно снижает цитогенетические эффекты диоксилина и циклофосфамида у мышей.

2. Афобазол (1, 10 и 100 мг/кг внутрь) снижает тератогенное действие циклофосфамида у крыс.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий*, Медицина (1998).
2. А. Д. Дурнев, *Бiol. экспер. бiol.*, № 9, 281 – 289 (2008).
3. А. П. Дыбан, В. С. Баранов, И. М. Акимов, *Арх. анат.*, № 10, 89 – 100 (1970).

4. А. К. Жанатаев, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(2), 57 – 59 (2000).
5. А. К. Жанатаев, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Бюл. экспер. биол.*, № 11, 539 – 542 (2000).
6. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, С. Б. Середенин, *Бюл. экспер. биол.*, № 8, 161 – 163 (2005).
7. Т. А. Зенина, И. В. Силкина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 47 – 45 (2006).
8. Т. А. Лисицына, А. Д. Дурнев, М. М. Иванова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(5), 38 – 41 (1999).
9. Н. А. Чеботарь, А. М. Котин, *Фармакол. и токсикол.*, № 3, 374 – 384 (1984).
10. J. B. Bishop, K. L. Witt, and R. A. Sloane, *Mutat. Res.*, **396**(1 – 2), 9 – 43 (1997).
11. S. Chen, K. Wu, and R. Knox, *Free Radic. Biol. Med.*, **29**(3 – 4), 76 – 84 (2000).
12. W. Foster, P. Myllynen, L. M. Winn, et al., *Placenta*, **29**, Suppl A, S. 105 – 107 (2008).
13. A. Ornoy, *Reprod Toxicol.*, **24**(1), p. 31 – 41 (2007).
14. R. J. Preston, B. J. Dean, S. Galloway, et al., *Mutat. Res.*, **189**(2), 157 – 165 (1987).
15. S. Seredenin, G. Neznamov, M. Yarkova, *Inter. J. Neuropsychopharmacology*, Suppl. 1, p. 275 (2008).
16. I. Szanyi, L. Lujber, I. Gerlinger, et al., *In Vivo*, **21**(6), p. 1059 – 1063 (2007).

Поступила 25.09.08

## ANTIMUTAGENIC AND ANTITERATOGENIC PROPERTIES OF AFOBAZOLE

**A. D. Durnev, A. K. Zhanataev, O. V. Shreder, and S. B. Seredenin**

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments of mice and rats showed the ability of afobazole (1, 10, and 100 mg/kg, p.o.) upon single, 5-day combined, and 5-day preliminary administration to prevent or significantly decrease the clastogenic effects of the prooxidant agent dioxidine (100 and 300 mg/kg, i.p.) and the clastogenic and teratogenic effects of the alkylating agent cyclophosphamide (20 mg/kg, i.p.).

**Key words:** Afobazole, teratogenesis, chromosomal aberrations

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## ВЛИЯНИЕ ДИМЕБОНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ НА ПОВЕДЕНИЕ И ПАМЯТЬ МЫШЕЙ SAMP 10

В. В. Григорьев<sup>1</sup>, Т. Л. Гарипова<sup>2</sup>, Т. А. Воронина<sup>2</sup>, С. А. Литвинова<sup>2</sup>,  
С. О. Бачурин<sup>1</sup>

У мышей линии SAMP10 (Senescence-accelerated mouse prone10) с генетически детерминированным ускоренным старением в 16-месячном возрасте в сравнении 3-месячными животными той же породы отмечались характерные для старых животных дефицит поведения и памяти, снижение ориентированно-исследовательского поведения, повышенный уровень тревожности. Димебон при длительном применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) оказывал позитивное влияние на поведение и память 16-месячных мышей SAMP10. Наблюдалась оптимизация ориентированно-исследовательского поведения в “открытом поле”, снижение уровня тревожности на модели приподнятого крестообразного лабиринта, улучшение воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания.

**Ключевые слова:** мыши линии SAMP 10 (Senescence-accelerated mouse prone 10), димебон, поведение, память

### ВВЕДЕНИЕ

Димебон (3,6-диметил-9-(2-метил-пиридинил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-гамма-карболина дигидрохлорид) первоначально, за счет блокирования гистаминов H<sub>1</sub>-рецепторов, использовали как антигистаминный препарат [5, 6, 10]. Позднее у димебона были выявлены нейропротекторные свойства. В частности, в экспериментальных исследованиях было показано, что препарат эффективен на моделях холинергического дефицита, вызванного нейротоксинами AF64A [5] и фрагментом β-амилоида Aβ<sub>25–35</sub>, [6]. Нейропротекторные свойства димебона подтверждены клиническими испытаниями на больных в начальной стадии болезни Альцгеймера [10]. Учитывая особенности спектра фармакологической активности димебона, представляло интерес исследовать возможности использования препарата в качестве геропротектора. Одной из современных моделей ускоренного старения рассматривают линии мышей SAMP (senescence-accelerated mouse prone, SAMP1,2,3,6,7,8,9,10,11) с генетически детерминированным ускоренным старением [16, 17]. Данные генотипирования с использованием микросателлитных маркеров позволили предположить, что у этих мышей четыре локуса, расположенные в хромосомах 4, 14, 16 и 17, содержат гены, ответственные за ускоренное старение [1, 12, 16, 17]. У животных SAMP отмечаются признаки преждевременного старения и более короткая продолжительность жизни. В частности,

у линии SAMP10, начиная с 4-го месяца жизни, в результате накопления повреждений ДНК [14], отложения в различных областях мозга Аβ-амилоида [18], повышенного уровня перекисного окисления липидов [9, 11], потери кортикальных синапсов и других патологических процессов развиваются неврологический дефицит, депрессия, эмоциональная дезориентация, повышенная тревожность, ухудшение памяти и способности к обучению и другие отклонения [3, 11–13, 15].

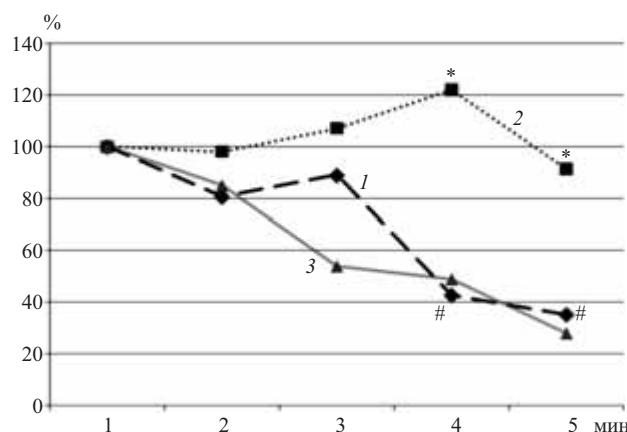
Целью настоящего исследования явилось изучения влияния димебона при длительном применении в питьевой воде на психофизиологический статус мышей линии SAMP 10.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на мышах-самцах линии SAMP 10 (с генетически детерминированным ускоренным старением) массой 25–35 г, содержащихся в стандартных клетках в условиях естественного светового режима при свободном доступе к питью и стандартному гранулированному корму. В 10 месяцев жизни мыши были случайным образом разделены на 2 группы по 13 животных в каждой: одна группа мышей получала только питьевую воду (“старый” контроль), вторая — димебон в дозе 1,5 мг/кг в виде питьевого раствора ежедневно на протяжении 5 месяцев. Для сравнительной оценки признаков ускоренного старения, характерных для данной породы [13], были использованы молодые животные (“молодой” контроль). На момент проведения экспериментов животным, получавшим димебон, и животным “старого” контроля

<sup>1</sup> Институт физиологически активных веществ РАН, Московская обл., 142432, пос. Черноголовка.

<sup>2</sup> ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва 125315, Балтийская, 8.

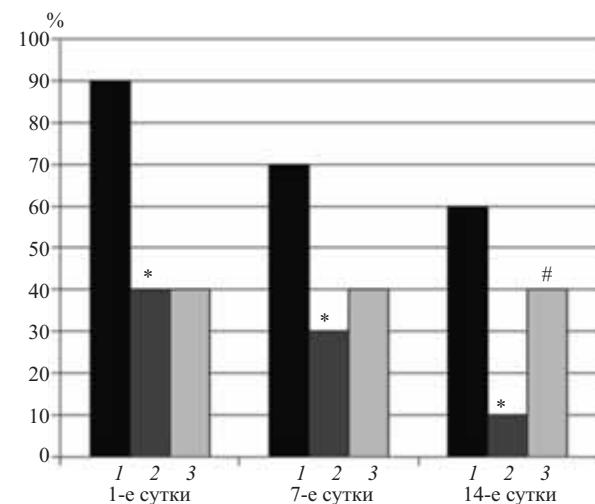


**Рис. 1.** Влияние димебона (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на двигательную активность мышей с ускоренным старением (SAMP10) в возрасте 16 месяцев в относительных показателях к первой минуте наблюдения в установке Оптоваримекс.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — количество движений в относительных показателях по отношению к первой минуте ( $n/1$ ), %. Отличия достоверны от контроля 3 мес, при \* —  $p \leq 0,05$  (критерий  $\chi^2$ ), от контроля 16 мес, при # —  $p \leq 0,05$  (критерий  $\chi^2$ ). 1 — димебон, 2 — контроль (16 мес), 3 — контроль (3 мес).

было 16 месяцев, мышам группы “молодого” контроля — 3 месяца.

Поведенческие эксперименты проводили в первой половине дня. Для оценки поведения и состояния мышей был использован комплекс методов, традиционно применяемых в нейропсихофармакологии [2]. Неврологический дефицит у животных определяли по шкале Stroke-index McGraw. Тяжесть состояния оценивали по сумме соответствующих баллов. Мышечный тонус определяли по подтягиванию задних конечностей на горизонтальной перекладине. Координацию движений изучали в тесте “врачающегося стержня”. Ориентировочно-исследовательское поведение мышей исследовали в условиях методики открытого поля. Показатели поведения (горизонтальные и вертикальные перемещения, обследование отверстий) регистрировали в течение трех минут. В установке Оптоваримекс (“Colombus Instrument”, США) в течение 5 мин регистрировали двигательную активность группы мышей (по 13 животных). Уровень тревожности животных определяли в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). Мыши помещали на центральную площадку хвостом к светлому рукаву. Регистриро-



**Рис. 2.** Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на воспроизведение УРПИ мышей SAMP10.

По оси ординат — количество животных, не зашедших в темную камеру при воспроизведении рефлекса, %. Отличия достоверны от контроля (3 мес), при \* —  $p \leq 0,01$ , от контроля (16 мес), при # —  $p \leq 0,01$  (критерий  $\chi^2$ ). 1 — контроль (3 мес), 2 — контроль (16 мес), 3 — димебон (16 мес).

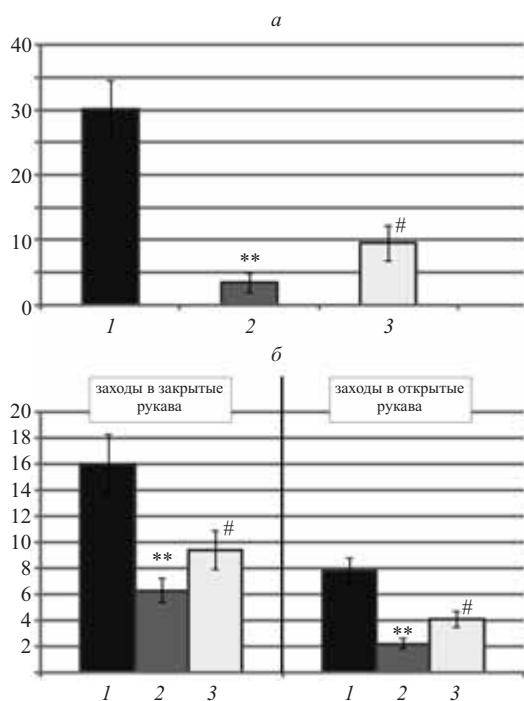
рировали время, проведенное животными в открытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава. Общее время наблюдения для каждого животного составляло 5 мин. Обучение условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) проводили в установке Passive avoidance (“Lafayette Instrument Co”, США) по методике [8] в модификации [2]. Животное помещали на светлую платформу хвостом к отверстию, ведущему в темную камеру с электродным полом, и регистрировали латентный период первого захода в затемненное отделение установки. Затем наносили неизбежаемое электроболевое раздражение через пол током силой 0,5 мА и длительностью 1 с. Обучение продолжалось до тех пор, пока животное не переставало заходить в опасный отсек. Воспроизводили УРПИ через 24 часа, 7 и 14 сут после обучения.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Биостат с использованием *t*-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни и критерия  $\chi^2$ .

**Таблица 1.** Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на поведение мышей линии SAMP10 в “открытом поле”

Вещество	Возраст, мес	Количество горизонтальных перемещений	Вертикальная двигательная активность	Обследование отверстий	Суммарные показатели двигательной активности
Контроль	3	$71,7 \pm 5,1$	$14,0 \pm 1,0$	$13,4 \pm 0,9$	$99,1 \pm 5,1$
Контроль	16	$42,0 \pm 18,5^*$	$3,9 \pm 1,6^*$	$5,3 \pm 1,2^*$	$51,2 \pm 7,1^*$
Димебон	16	$53,2 \pm 5,2$	$4,0 \pm 1,4$	$6,7 \pm 0,8$	$63,8 \pm 6,1$

\* — достоверность отличий от контроля (3 мес), при  $p \leq 0,01$  (*t*-критерий Стьюдента).



**Рис. 3.** Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на поведение мышей линии SAMP10 в условиях методики ПКЛ.

а: по оси ординат — время проведенное в открытых рукавах, с. б: по оси ординат — количество заходов в рукава. 1 — контроль (3 мес), 2 — контроль (16 мес), 3 — димебон 1,5 мг/кг в день в течение 5 мес. Отличия достоверны от контроля (3 мес), при \* —  $p \leq 0,01$  ( $t$ -критерий Стьюдента); от контроля (16 мес), при # —  $p \leq 0,05$  ( $U$  — критерий Манна-Уитни).

**Таблица 2. Влияние димебона при хроническом применении (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) на воспроизведение УРПИ мышей линии SAMP10**

Группа животных	Возраст, мес	Латентное время рефлекса, с	Время, проведенное на освещенной площадке
<i>Воспроизведение рефлекса через сутки</i>			
Контроль	3	164,0 ± 16,0	164,0 ± 16,0
Контроль	16	90,7 ± 24,5*	91,4 ± 24,4*
Димебон	16	103,0 ± 22,6	130,0 ± 18,6
<i>Воспроизведение рефлекса на 7-е сутки</i>			
Контроль	3	152,5 ± 16,5	163,0 ± 9,2
Контроль	16	74,5 ± 24,2*	79,5 ± 23,2**
Димебон	16	95,0 ± 23,37	118,5 ± 19,4
<i>Воспроизведение рефлекса на 14-е сутки</i>			
Контроль	3	132,5 ± 20,8	154 ± 12,0
Контроль	16	40,2 ± 16,1**	66,5 ± 18,47**
Димебон	16	89,7 ± 25,23#	112,2 ± 23,54#

**Примечание.** Отличия достоверны ( $t$ -критерий Стьюдента): от контроля (3 мес) при: \* —  $p \leq 0,05$ , \*\* —  $p \leq 0,01$ ; от контроля (16 мес) при # —  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование неврологического статуса мышей SAMP 10 по шкале McGraw показало, что как у 3-месячных так и у 16-месячных мышей не наблюдали тяжелых неврологических нарушений в виде манежных движений, парезов и параличей. Вместе с тем в отличие от молодых 3-месячных мышей у старых 16-месячных животных в 80 % случаев отмечали вялость и замедленность движений, птоз (40 %). В группе животных, получавших димебон, не отмечали грубых неврологических нарушений, а слабые были выражены в меньшей степени (30 %), чем в контроле у старых мышей. Изучение миорелаксации и координации движений у животных в тестах подтягивания на горизонтальной перекладине и врачающегося стержня не выявило каких либо заметных изменений во всех трех группах мышей. Животные в 90–95 % случаев подтягивали задние конечности на перекладине и удерживались на врачающемся стержне в течение двух минут.

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения SAMP10 в открытом поле показало, что у старых животных отмечалось значительное, статистически достоверное уменьшение всех показателей — количества вертикальных и горизонтальных перемещений, числа обследований отверстий (табл. 1). В группе мышей, получавших димебон, наблюдалась тенденция восстановления ориентировочно-исследовательского поведения, особенно по показателю горизонтальных перемещений. В целом, при сравнении суммарных показателей димебон в значительной степени восстановил ориентировочно-исследовательское поведение старых мышей в открытом поле на 25 % (табл. 1).

Исследование двигательной активности группы мышей в установке Оптоваримекс проводили с целью выявления влияния димебона на угашение ориентировочно-исследовательской активности, на так называемое негативное обучение или привыкание. В этом случае у животных ослабевает реакция на новизну и постепенно уменьшается двигательная активность [2, 7]. На рис. 1 видно, что у мышей линии SAMP10 в возрасте трех месяцев к 5-й минуте наблюдения регистрируется постепенное ослабление двигательной активности по отношению к первой минуте, т.е. развивается привыкание к обстановке или негативное обучение. И в этом они не отличаются от молодых беспородных животных. У старых мышей SAMP 10 подобное естественное поведение почти полностью отсутствует и групповая двигательная активность этих мышей на протяжении всего времени наблюдения сохраняется высокой, сходной с показателями в первую минуту. В группе животных, получавших димебон, поведение мышей не отличалось от показателей “молодого” контроля — отмечалось быстрое привыкание к новой обстановке и, соответственно, уменьшение количества перемещений (рис. 1). Таким образом, димебон кор-

ректировал нарушенную у 16-месячных мышей линии SAMP 10 способность к негативному обучению, привыканию к новой обстановке при регистрации групповой двигательной активности.

Исследование обучения мышей линии SAMP 10 УРПИ показало, что при воспроизведении рефлекса через сутки после обучения у 16-месячных мышей в сравнении с 3-месячными животными наблюдалось значительное статистически достоверное уменьшение латентного времени рефлекса и времени, проведенного на освещенной платформе при воспроизведении рефлекса на 1, 7 и 14-е сутки после обучения (табл. 2). Сходные закономерности отмечались и при регистрации количества животных, не зашедших в камеру. Так, если у 3-месячных животных при воспроизведении рефлекса через сутки помнили и не заходили в темную камеру 90 % мышей, через 7 суток — 70 %, через 14 – 60 %, то в группе 16-месячных животных эти показатели составляли 40, 30 и 10 % соответственно (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют о существенном нарушении у 16-месячных мышей процессов обучения и памяти. На фоне длительного применения димебона в питьевой воде у 16-месячных мышей наблюдалось улучшение обучения и воспроизведения УРПИ, особенно на 14-е сутки наблюдения: отмечалось статистически достоверное увеличение латентного времени рефлекса (табл. 2) и количества животных, не зашедших в темную камеру (рис. 2).

При регистрации уровня тревожности животных в условиях ПКЛ показано, что у мышей старшего возраста значительно, в 10 раз, уменьшалась величина основного показателя — времени, проведенного животными на открытых рукавах лабиринта (рис. 3, а). Значительно уменьшалось и количество заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта (рис. 3, б). Такое поведение животных свидетельствует о повышенном уровне тревожности у SAMP 10 в возрасте 16 месяцев. В группе животных, получавших димебон, отмечалось, хотя и незначительное, но статистически достоверное увеличение всех показателей поведения мышей в ПКЛ (рис. 3), т.е. под действием димебона наблюдалось улучшение тактики поведения мышей в ПКЛ.

Таким образом, показано, что у мышей линии SAMP10 в возрасте 16 месяцев в сравнении 3-месячными животными той же породы отмечалось снижение ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле, нарушение “негативного обучения” при регистрации групповой двигательной активности. Отмечалось повышение уровня тревожности в ПКЛ и ухудшение воспроизведения памятного следа на модели УРПИ, особенно при регистрации поведения через 7 и 14 дней после обучения. В комплексе эти изменения поведения 16-месячных мышей свидетельствуют об ослаблении у них функции высшей нервной деятельности, характерном для старых животных [1, 19].

Поведение мышей, длительно получавших раствор димебона, отличалось от поведения как 16-месячных, так и 3-месячных животных, потреблявших воду. У мышей после димебона в сравнении с 16-месячным контролем наблюдалось достоверное улучшение “негативного обучения” при регистрации двигательной активности группы мышей, снижение уровня тревожности на модели ПКЛ, улучшение воспроизведения УРПИ, особенно, через 7 и 14 сут после обучения.

Таким образом, димебон заметно замедлял у SAMP 10 развитие генетически детерминированного ускоренного старения. Подобное действие препарата определяется его нейропротекторным эффектом [5, 6, 10], который, по-видимому, определяется способностью димебона воздействовать на глутаматергическую систему через модуляцию АМРА- и NMDA-рецепторов [4].

## ВЫВОДЫ

1. У мышей линии SAMP10 (Senescence-accelerated mouse prone 10) с генетически детерминированным ускоренным старением в возрасте 16 месяцев в сравнении 3-месячными животными той же породы отмечается снижение ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле, повышение уровня тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте, нарушение воспроизведения памятного следа на модели условной реакции пассивного избегания.

2. Димебон при длительном применении в питьевой воде (1,5 мг/кг в день в течение 5 мес) в значительной степени ослабляет нарушения поведения и памяти у 16-месячных мышей с ускоренным типом старения линии SAMP10, корректируя ориентировочно-исследовательское поведение, улучшая воспроизведение условной реакции пассивного избегания, снижая тревожность в приподнятом крестообразном лабиринте.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Анисимов, *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, Санкт-Петербург (2003).
2. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 253 – 263.
3. Т. Л. Гарикова, Т. А. Воронина, С. А. Литвинова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 3 – 6 (2007).
4. В. В. Григорьев, О. А. Драный, С. О. Бачурин, *Бiol. экспер. бiol.*, **136**(11), 538 (2003).
5. Н. Н. Лермонтова, Н. В. Лукоянов, Т. П. Серкова, У. А. Лукоянова, С. О. Бачурин, *Бiol. экспер. бiol.*, **129**(6), 640 – 643 (2000).
6. Н. Н. Лермонтова, А. Е. Редкозубов, Е. Ф. Шевцова и др., *Бiol. экспер. бiol.*, **132**(11), 545 – 550 (2001).
7. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 5, 498 – 500 (1992).
8. R. Ader, W. Weijnen, and P. Moleman, *Psychon. Sci.*, **26**, 125 – 128 (1972).
9. A. Boldyrev, M. Yuneva, E. Sorokina, et al., *Biochemistry Moscow*, **66**, 1157 – 1163 (2001).

10. S. O. Bachurin, E. Bukatina, and N. Lermontova, *Ann. N. Y. Acad.*, **939**(2), 425 – 435 (2001).
11. Eun Young Lee and Min Kyu Lee, *Korean J. Anat.*, **34**(6), 645 – 651 (2001).
12. M. Hosokawa, T. Abe, K. Higuchi, et al., *Mech. Ageing Dev.*, **118**, 61 – 70 (2000).
13. M. Miyamoto, *Exp. Gerontol.*, **32**, 139 – 148, (1997).
14. A. Shimada, H. Keino, M. Satoh, et al., *J. Gerontol A Biol. Sci. MedSci.*, **57**, 415 – 21 (2002).
15. A. Shimada, H. Keino, M. Satoh, et al., *Synapse*, **48**, 198 – 204 (2003).
16. T. Takeda, M. Hosokawa, S. Takeshita, et al., *Mech Ageing Dev.*, **17**, 183 – 194 (1981).
17. T. Takeda, M. Hosokawa, and K. Higuchi., *J. Am. Geriatr Soc.*, **39**, 911 – 919 (1991).
18. Todd A. Carter, Jennifer A. Greenhall, Shigeo Yoshida, et al., *Genome Biology*, **6**, (2005).
19. T. A. Voronina, *Alzheimer disease: therapeutic strategies.*, Giacobini E., Becker (eds.), Birkhauser-Boston, 265 – 269, (1994).

Поступила 24.09.08

## **EFFECTS OF THE CHRONIC ADMINISTRATION OF DIMEBON ON THE BEHAVIOR AND MEMORY OF SAMP 10 MICE**

**V. V. Grigor'ev<sup>1</sup>, T. L. Garibova<sup>2</sup>, T. A. Voronina<sup>2</sup>, S. A. Litvinova<sup>2</sup>, and S. O. Bachurin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432, Russia

<sup>2</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

SAMP 10 mice with genetically determined senescence (senescence-accelerated mouse prone 10) aged 16 months demonstrated (in comparison to 3-months old animals of the same strain) the following traits typical of old animal: behavior and memory deficiency, exploratory behavior impairment, and elevated level of anxiety. Dimebon administered for a long period of time with drinking water (1.5 mg/kg over 5 months) produced a positive action upon behavior and memory of 16-months-old SAMP10 mice, optimized exploratory behavior in the open field test, diminished anxiety in elevated plus maze test, and improved retrieval of passive avoidance reaction.

**Key words:** SAMP10 strain mice (Senescence-accelerated mouse prone 10), genetically determined accelerated aging, dimebon, behavior, memory

## ВЛИЯНИЕ ФЕНИБУТА НА МЕЖПОЛУШАРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЗГА КРЫС

Л. Е. Бородкина<sup>1</sup>, Г. М. Молодавкин<sup>2</sup>, И. Н. Тюренков<sup>1</sup>

Изучено влияние ноотропного препарата фенибута на амплитуду транскаллозального потенциала сенсомоторной коры большого мозга крыс. Установлено, что фенибут в дозе 25 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении увеличивает амплитуду транскаллозального ответа и усиливает, таким образом, межполушарную передачу. Выявленная способность фенибута усиливать межполушарную передачу, которая является объективным показателем ноотропной активности, подтверждает наличие у него ноотропного действия и обосновывает его позитивное влияние на процессы обучения и памяти.

**Ключевые слова:** транскаллозальный вызванный потенциал, сенсомоторная кора мозга, ноотропы, память, производные ГАМК, фенибут, крысы

### ВВЕДЕНИЕ

Фенибут ( $\gamma$ -амино- $\beta$ -фенил-масляной кислоты гидрохлорид) является первым отечественным анксиолитиком, который оказывает одновременно успокаивающее, антифобическое, противоукачивающее и выраженное ноотропное действие.

По ряду фармакологических классификаций данный препарат относится к классу ноотропных средств с нейропротекторной активностью из группы производных гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Его ноотропные свойства подтверждены многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями, однако, такой объективный показатель ноотропной активности, как влияние на межполушарное взаимодействие, до сих пор оставался не описанным в научных публикациях, посвященных данному препарату.

Известно, что мозолистое тело (МТ) играет важную роль в интегративной деятельности полушарий головного мозга [1, 5], а межполушарная интеграция имеет большое значение для процессов обучения при обработке различной сенсорной информации, формировании и латерализации (“переносе”) различных условных рефлексов с одной стороны тела на другую. Электрофизиологическим коррелятом межполушарной передачи является транскаллозальный ответ (ТКО) — двухфазное отклонение потенциала коры большого мозга характерной формы, возникающее в одном полушарии при стимуляции симметричной точки другого полушария мозга [1, 5, 7]. Транскаллозальный ответ чувствителен к воздействию различных фармакологических агентов. Способность веществ уменьшать ам-

плитуду транскаллозального потенциала рассматривается как важное подтверждение ноотропного действия препарата [3, 4, 6, 8 – 10].

Целью данного исследования стало изучение влияния фенибута на амплитуду транскаллозального ответа.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 24 беспородных белых крысах-самцах массой 180 – 250 г, полученных из питомника РАМН Столбовая.

Вызванные потенциалы регистрировали от поверхности сенсомоторной коры. Эту зону коры выбрали для исследования потому, что сенсомоторная интеграция играет важную роль в организации практических всех форм поведения, в том числе и процессов памяти.

Оценку влияния фенибута на транскаллозальный ответ (ТКО) проводили в острых опытах по методике, описанной ранее [3, 4]. Исследование осуществляли в несколько этапов.

Животных оперировали под эфирным наркозом. Во время операции проводили трахеотомию (интубацию), в яремную вену и внутрибрюшинно вводили катетеры — первый для подачи миорелаксанта, второй — для введения исследуемого вещества.

Далее скальпировали череп, высверливали два симметричных отверстия над правой и левой областью сенсомоторной коры, через которые на поверхность коры устанавливали раздражающий и регистрирующий шариковые хлорсеребряные электроды. Индифферентный игольчатый электрод вкалывали в мышечную ткань в области носовых костей.

Животных переводили на искусственную вентиляцию легких и обездвиживали дитилином (3 – 5 мг/кг/час в вену).

Регистрацию ТКО проводили через 2 ч после операции. При таком перерыве между операцией и регистрацией ТКО регистрируемые показатели не зависят от операционных манипуляций и воздействия эфира.

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей (зав. — проф. И. Н. Тюренков) Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 400066, пл. Павших Борцов, 1.

<sup>2</sup> Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

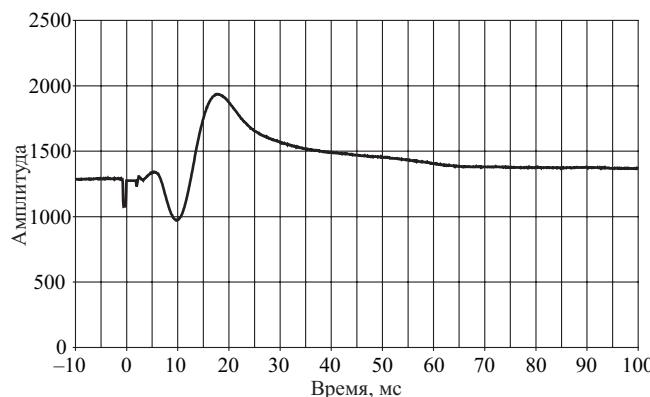


Рис. 1. Транскаллозальный ответ сенсомоторной коры крысы.

Для установления силы раздражения вначале определяли пороговую величину раздражения, вызывающую двухфазный ТКО, а затем в опыте использовали силу раздражения на 1 – 2 В больше пороговой. Транскаллозальный ответ получали путем подачи на раздражающий электрод импульсов (26 – 29 В, 0,1 мс) с выхода стимулятора MSE-3R (“Nihon Kohden”, Япония).

Для усиления регистрируемой электрической активности использовали усилители Берг-Фурье анализатора (OTE “Biomedica”, Италия), настроенные на полосу частот в пределах от 0,2 до 500 Гц.

Регистрацию и обработку ТКО осуществляли с помощью электрофизиологического комплекса на основе цифрового осциллографа PCS500 (фирма “Velleman Instruments”, Голландия), подключаемого к параллельному порту IBM-совместимого компьютера.

Влияние фенибута на транскаллозальный ответ оценивали по усредненным вызванным потенциалам. Усреднение производили с помощью шаблона, специально разработанного для программы Excel, по 20 реализациям с интервалом между стимулами 5 с. Усредненный вызванный потенциал регистрировали 2 – 3 раза до введения вещества (для проверки стабильности фона) и через каждые 15 мин в течение 2 ч после введения. Из-за небольшого размера черепа крысы и, соответственно, малого расстояния между стимулирующим и отводящим электродами (3 – 5 мм), при записи часто регистрируется большой артефакт раздражения, искажающий форму вызванного потенциала. Чтобы уменьшить этот эффект на усредненной записи, стимуляцию производили, меняя полярность раздражения через каждый стимул. Поскольку форма и амплитуда вызванного потенциала практически не зависит от полярности стимуляции, то он продолжал накапливаться и при этой процедуре, в то время как артефакт раздражения менял свою полярность вслед за изменением полярности стимуляции и при накоплении постепенно уменьшался. Благодаря этому приему искажение суммарного потенциала было минимальным. Подсчитывали средние значения амплитуд транскаллозальных ответов и их стандартные отклонения для каждой группы.

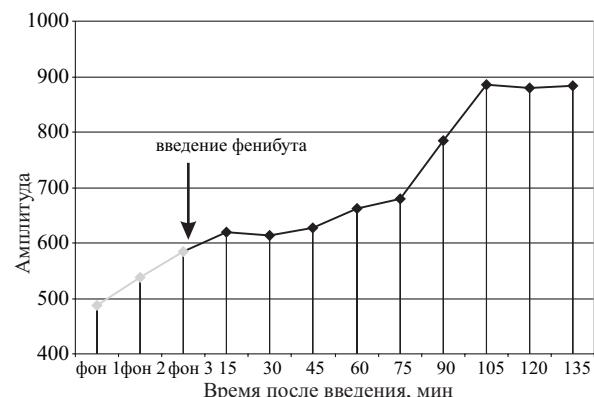


Рис. 2. Влияние фенибута на амплитуду транскаллозального ответа у белых крыс.

Фенибут вводили внутрибрюшинно однократно после 3 фоновых контрольных записей ТКО. Затем ТКО регистрировали через 15, 30, 45, 60, 75, и 90 мин после введения препарата.

Достоверность различий между опытом и контролем оценивали с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа [2].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении фоновых контрольных записей ТКО представлял двухфазный электрический потенциал (рис. 1) первую фазу которого — позитивный компонент (P1) сразу сменяется второй фазой — негативным компонентом (N1), что соответствует данным литературы [4, 6, 8, 9].

Анализ результатов проведенного эксперимента показал, что фенибут (25 мг/кг внутрибрюшинно) увеличивает амплитуду транскаллозального ответа (рис. 2). Эффект фенибути начинает проявляться через 60 – 75 мин после введения. В дальнейшем, вплоть до 105-й минуты наблюдения, амплитуда вызванного потенциала после введения фенибути продолжает непрерывно увеличиваться. Однако, начиная со 105-й минуты, нарастание амплитуды ответа прекращается и остается на этом уровне до 135-й минуты наблюдения, что на графическом отображении результатов эксперимента характеризуется образованием “плато”. Статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) увеличение ТКО под влиянием фенибути достигается через 90 мин после его введения и на протяжении всего времени наблюдения остается статистически достоверно ( $p \leq 0,05$ ) выше значений, полученных до введения препарата (рис. 2). Различия между фоновыми и опытными показателями ТКО носили статистически значимый характер при  $p \leq 0,05$  для интервала 90 – 135 минут.

Изменения транскаллозального потенциала, вызванные введением фенибути, сопровождались параллельной синхронизацией электроэнцефалограммы.

Таким образом, установлено, что фенибут (25 мг/кг внутрибрюшинно однократно) обладает выраженной

способностью увеличивать амплитуду транскаллозального ответа (ТКО). Под влиянием фенибута показатели ТКО статистически значимо более высокие, чем при проведении фоновых записей. Полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемый препарат усиливает межполушарную передачу. Это экспериментально подтверждает стимулирующее влияние фенибута на процессы обучения и памяти.

## ВЫВОДЫ

1. Фенибут существенно увеличивает амплитуду транскаллозального ответа, следовательно усиливает межполушарную передачу.
2. Полученные данные указывают на стимулирующее влияние фенибута на процессы обучения и памяти.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Л. Бианки, Е. В. Филиппова, *Физиология поведения: нейробиологические закономерности*, Наука, Ленинград (1987).
2. В. П. Боровиков, И. П. Боровиков, *Statistica — Статистический анализ и обработка данных в среде Windows*, Филин, Москва (1997).

3. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Издательство Медицина, Москва, 2005.
4. Г. М. Молодавкин, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Москва (1998).
5. I. Hasegawa, T. Fukushima, T. Ihara, et al., *Science*, № 281, 814 – 817 (1998).
6. C. Giurgea and F. Moyersoone, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **188**, 401 – 404 (1972).
7. B. Grafstein, *J. Neurophysiol.*, **22**, 504 – 515 (1954).
8. R. U. Ostrovskaya, T. A. Gudasheva, S. S. Trofimov, et al., *Biological Basis of Individual Sensitivity to Psychotropic drugs. Graffham Press Ltd. Edngurgh, UK. (Eds) S. B. Seredenin, V. Longo, G. Gaviragli*, 79 – 91 (1994).
9. S. Okuyama and H. Aihara, *Neuropharmacology*, **27**(1), 67 – 72 (1988).
10. U. Schindler, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.*, № 13, 99 – 115 (1989).

Поступила 25.09.08

## EFFECT OF PHENIBUT ON THE INTERHEMISPHERIC TRANSMISSION IN RAT BRAIN

L. E. Borodkina<sup>1</sup>, G. M. Molodavkin<sup>2</sup>, and I. N. Tyurenkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov, Volgograd, 400131, Russia

<sup>2</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Effects of the nootropic drug phenibut on the transcallosal potential amplitude in the sensomotor brain cortex have been studied in rats. It is established that a single administration of phenibut in a dose of 25 mg/kg (i.p.) increases the transcallosal response amplitude, thus improving the interhemispheric transmission. This effect, being an objective evidence of the nootropie activity, confirms the drug status and corroborates the positive action of phenibut on the learning and memory processes.

**Key words:** Phenibut, transcallosal evoked potential, sensomotor brain cortex, nootropes, GABA derivatives, memory

## ВЛИЯНИЕ ФЕНИБУТА НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ, А ТАКЖЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ АМИНОКИСЛОТ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

Л. Е. Бородкина<sup>1</sup>, В. С. Кудрин<sup>2</sup>, П. М. Клодт<sup>2</sup>, В. Б. Наркевич<sup>2</sup>, И. Н. Тюренков<sup>1</sup>

Изучено влияние ноотропного препарата фенибута, структурного аналога гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) на содержаниеmonoаминов и их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот в структурах головного мозга крыс Вистар. Установлено, что фенибут в дозе 25 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении вызывает статистически значимое увеличение содержания метаболита дофамина 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), а также тормозной аминокислоты таурина в стриатуме. Выявлено отсутствие статистически достоверного влияния фенибута на уровень ГАМК, серотонина и дофамина в различных структурах мозга и умеренное снижение под действием изучаемого препарата содержания норадреналина в гиппокампе.

**Ключевые слова:** monoамины, нейромедиаторные аминокислоты, головной мозг, ноотропы, память, производные ГАМК, фенибут, крысы

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое значение придается изучению механизмов действия и внедрению в клиническую практику при заболеваниях нервной системы ноотропных препаратов, облегчающих процессы обучения и памяти, оказывающих влияние на метаболизм нейронов, обладающих вазоактивным и антигипоксическим свойствами [1, 3]. К числу наиболее важных эффектов ноотропов следует отнести их нейропротекторное действие и способность облегчать reparативное восстановление тканей мозга при повреждениях различного генеза [4, 5, 8].

Среди препаратов ноотропного ряда, в частности, циклических производных гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), значительный интерес представляет производное ГАМК фенибут (гидрохлорид  $\gamma$ -амино- $\beta$ -фенил-масляной кислоты). Последний является оригинальным отечественным ноотропным препаратом с широким спектром сопутствующей фармакологической (в т.ч. анксиолитической) активности [1, 5]. Фенибут повышает умственную и физическую работоспособность, снижает эмоциональное напряжение, тревогу, улучшает сон; уменьшает проявления астении и вазовегетативных симптомов (головная боль, чувство тяжести в голове), раздражительность, эмоциональную лабильность [1, 5], проявляет нейропротекторные свойства в условиях ишемического повреждения головного мозга [8], стресса различного генеза [4] и др.

Несмотря на то что данный препарат находит широкое применение в клинике астенических и тревожно-невротических состояний, молекулярные механизмы его действия изучены слабо. В частности, изучение влияния фенибута на содержание monoаминов — медиаторов возбуждения в ЦНС [норадреналина (НА), дофамина (ДА) и серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ), а также их метаболитов], позволяющее раскрыть механизмы нейропсихотропного действия веществ [6, 7], до настоящего времени не проводилось.

Малоизученным оставался вопрос об эффектах данного соединения на параметры нейропередачи посредством аминокислот в различных структурах мозга, подробное исследование которого позволило бы выявить функциональное образование мозга, являющееся преимущественной мишенью фармакологического воздействия фенибута [2]. В настоящее время ключевая роль нейромедиаторных аминокислот мозга в патогенезе разнообразных нарушений центральной нервной системы — эпилептических припадков, ишемии, гипоксии, депрессивных и психотических расстройств, болезни Альцгеймера, паркинсонизма и ряда других доказана многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями [2, 3].

В настоящем исследовании с помощью метода высокоеффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) было исследовано влияние фенибута на содержание monoаминов и их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга крыс Вистар.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте было использовано 28 крыс-самцов линии Вистар массой 200 – 220 г (питомник РАМН Столбовая). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме.

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей (зав. — проф. И. Н. Тюренков) Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 400066, пл. Павших Борцов, 1.

<sup>2</sup> Лаборатория нейрохимической фармакологии (зав. — В. С. Кудрин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Эксперименты проводили в интервале с 10 до 14 часов дня. Животных выдерживали в индивидуальных боксах 30 мин до введения фенибута опытным и физиологического раствора контрольным животным.

Фенибут использовали в дозе 25 мг/кг. Фенибут и физиологический раствор вводили за 45 мин до декапитации животных. Структуры мозга [фронтальная кора (ФК), гиппокамп, стриатум], извлекали на льду и замораживали в жидком азоте. Затем выделенные структуры размельчали в гомогенизаторе “стекло-тэфлон” (0,2 мм) при 10 °С при скорости вращения пестика 3000 об/мин. В качестве среды выделения использовали 0,1 н. HClO<sub>4</sub> с добавлением 500 пикомоль/мл внутреннего стандарта диоксибензиламина (ДОБА). Структуры мозга гомогенизировали в 20 объемах среды выделения. Пробы центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин. Супернатант использовали в дальнейшем для определения monoаминов, их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот.

Содержание monoаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, “West Lafayette”, США) с инжектором Rheodyne 7125 с петлей на 20 мкл для нанесения образцов. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке (ReproSil-Pur, ODS-3, 4 × 100 мм, диаметр зерен 3 мкм, Dr. Majsch GMBH, ФРГ, “Элсико”, Москва). Маточные стандарты готовили ежемесячно в 0,1 н HClO<sub>4</sub> в концентрации 500 пикомоль/мл с добавлением 0,2 mM

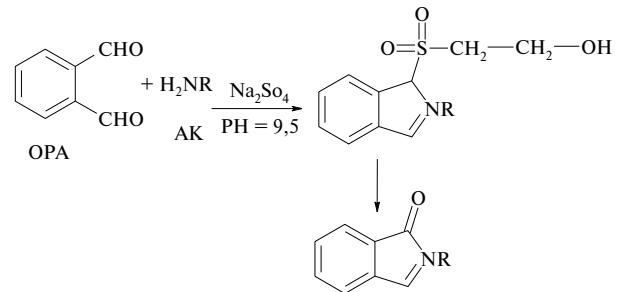


Схема дериватизации аминокислот.

OPA — ортофталевый альдегид (o-phthalaldehyde), AK — аминокислота.

метабисульфита натрия в качестве консерванта. Рабочие стандарты готовили из маточных растворов ежедневно разбавлением в 0,1 н HClO<sub>4</sub>, 1:1000. Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+ 0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: ОСЧ KН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> безводный (“Fluka”) — 0,069 M, лимонная кислота моногидрат (“Fluka”) — 0,27 M, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты — (ЭДТА Na<sub>2</sub>, “Sigma”) — 0,27 mM, октилсульфат Na<sub>2</sub> (ионпарный реагент “Диа-фарм”) — 1,9 mM, ацетонитрил (“Merck”) — 1,871 M, pH 3,0. Для калибровки хроматографа использовали смеси рабочих стандартов определяемых веществ в соотношении 500 пикомоль/мл. Величины концентрации катехоламинов (КА) в опытных образцах рассчитывали,

Таблица 1. Влияние фенибута на содержание monoаминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс Вистар, *M ± S.E.M.*, % по отношению к контролю (0,9 % NaCl)

Вещество	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	5-ОТ	5-ОИУК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОИУК/5-ОТ
<i>Фронтальная кора</i>									
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 10,3	100,0 ± 11,0	100,0 ± 13,4	100,0 ± 16,0	100,0 ± 9,4	100,0 ± 8,4	100,0 ± 9,4	100,0 ± 7,1	100,0 ± 5,8
Фенибут (25 мг/кг в/б)	74,7 ± 3,4*	86,7 ± 3,2	82,1 ± 5,9	51,4 ± 6,2*	85,8 ± 2,5	93,8 ± 3,5	94,4 ± 7,4	60,3 ± 6,6*	108,3 ± 5,4
<i>Стриатум</i>									
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 12,9	100,0 ± 6,6	100,0 ± 5,4	100,0 ± 5,5	100,0 ± 6,7	100,0 ± 5,5	100,0 ± 5,3	100,0 ± 2,0	100,0 ± 3,4
Фенибут (25 мг/кг в/б)	82,9 ± 9,2	108,2 ± 2,1	116,8 ± 5,7*	95,4 ± 5,6	101,5 ± 4,7	107,5 ± 4,9	106,1 ± 3,2	87,5 ± 4,2*	105,4 ± 4,6
<i>Гиппокамп</i>									
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 9,6	100,0 ± 54,4	100,0 ± 26,5	100,0 ± 13,0	100,0 ± 4,2	100,0 ± 4,1	100,0 ± 23,0	100,0 ± 23,4	100,0 ± 3,6
Фенибут (25 мг/кг в/б)	65,4 ± 3,9*	43,1 ± 5,4	37,5 ± 8,7	61,3 ± 7,4*	93,1 ± 4,4	101,9 ± 3,6	42,4 ± 11,0	67,6 ± 11,9	110,1 ± 5,2

Примечание. \* — Различия достоверны по сравнению с содержанием monoаминов в мозге крыс Вистар, получавших физ. р-р (0,9 % NaCl) при *p* < 0,05 (*t*-критерий Стьюдента). в/б — внутрибрюшинно.

исходя из отношений высот пиков в стандартной смеси и в образце, по следующей формуле:

$$C_{KAion} = \frac{H_{KAion} \times \Phi}{H_{DGBAon}} \text{ пг/мл},$$

$$\text{где } \Phi_i = \frac{C_{KAict}}{H_{KAict}/H_{DGBAict}},$$

$\Phi_i$  — фактор пересчета для концентрации Kai,  $H_{KAict}$  — высота пика KAi стандарта,  $H_{KAion}$  — высота пика KAi, определяемого в пробе,  $H_{DGBAon}$  — высота пика DГБА в стандартном растворе,  $H_{DGBAict}$  — высота пика DГБА, определяемого в пробе,  $C_{KAict}$  — концентрация KAi в стандарте,  $C_{KAion}$  — концентрация KAi, определяемого в пробе.

Определение содержания возбуждающих (аспартат, глутамат) и тормозных (ГАМК, глицин, таурин) нейромедиаторных аминокислот проводили методом ВЭЖХ/ЭД согласно стандартной методике (Pearson и соавт., 1991). Поскольку аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не поглощают УФ спектром) и не проявляют электрохимической активности, для их детекции необходимо предварительное проведение химического модифицирования — дериватизации. Для этого использовали ортофталевый альдегид (ОФА), способный флуоресцировать при связывании с аминокислотой.

ГАМК, аспартат, глутамат, таурин, глицин в концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н.  $HClO_4$  использовали в качестве стандартной смеси для калибровки. Через 15 мин после инкубации при комнатной температуре 20 мкл раствора наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкМ, 4,6 × 250. Регистрацию продуктов разделения проводили на флюоресцентном детекторе Agilent 1100 (США) при длине волн возбуждения 230 нм и волны эмиссии 392 нм. Мобильная фаза состояла из 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,6) с 0,025 мМ ЭДТА

и 5 % ацетонитрила. Скорость подвижной фазы составляла 1,5 мл/мин.

Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозный фильтр (диаметр пор — 0,2 мкм) и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом.

В качестве стандарта для определения количества аминокислот в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий аспартат, глутамат, глицин, таурин, ГАМК в концентрации 0,5 ммоль/л (см. схему).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартных методов параметрического статистического анализа t-критерия Стьюдента; однофакторного дисперсионного анализа, критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении эффектов фенибута на содержаниеmonoаминов и их метаболитов обнаружено, что указанное вещество статистически значимо снижает уровень НА в гиппокампе на 35 %. Фенибут не влиял на содержание ДА, однако вызывал статистически достоверное изменение содержания его метаболитов, увеличивая концентрацию ДОФУК в стриатуме и, напротив, снижая содержание ГВК в гиппокампе. Влияния фенибута на уровень 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК обнаружено не было. Не отмечалось также статистически значимого влияния данного соединения на комплексные показатели, характеризующие скорость кругооборота ДА и 5-ОТ, за исключением параметра ГВК/ДА, который незначительно уменьшался в стриатуме (табл. 1).

При изучении влияния фенибута на содержание возбуждающих (аспартат, глутамат) и тормозных (ГАМК, глицин, таурин) нейромедиаторных аминокислот наиболее значительные эффекты отмечались в стриатуме. При этом фенибут вызывал небольшое, но

Таблица 2. Влияние фенибута на содержание нейротрансмиттерных аминокислот во фронтальной коре головного мозга крыс Вистар ( $M \pm S.E.M.$ ) % по отношению к контролю (0,9 % NaCl)

Препарат	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
<i>Фронтальная кора</i>					
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 4,258	100,0 ± 4,085	100,0 ± 3,155	100,0 ± 5,695	100,0 ± 3,999
Фенибут (25 мг/кг в/б)	102,383 ± 4,066	102,517 ± 2,511	106,834 ± 5,422	103,552 ± 3,805	102,673 ± 2,102
<i>Стриатум</i>					
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 5,241	100,0 ± 4,891	100,0 ± 2,922	100,0 ± 4,455	100,0 ± 6,706
Фенибут (25 мг/кг в/б)	113,134 ± 4,493	113,413 ± 4,921	110,738 ± 4,734	114,102 ± 4,547*	103,092 ± 5,893
<i>Гиппокамп</i>					
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 2,397	100,0 ± 1,864	100,0 ± 2,401	100,0 ± 3,616	100,0 ± 1,688
Фенибут (25 мг/кг в/б)	98,475 ± 1,249	94,831 ± 1,477*	95,477 ± 1,968	102,871 ± 3,763	120,178 ± 23,187

Примечание. \* — Различия достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента). в/б — внутрибрюшинно.

статистически достоверное увеличение концентрации таурина (табл. 2).

В других структурах головного мозга крыс эффекты фенибута практически не проявлялись, лишь незначительно снижалась концентрация глутамата в гиппокампе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что фенибут вызывает достоверное увеличение содержания метаболита дофамина 3,4-диоксифенилуксусной кислоты, а также тормозной аминокислоты таурина. Влияния фенибута на уровень ГАМК нами не наблюдалось, несмотря на то, что изучаемое вещество является структурным аналогом последней. Не отмечалось и значимого влияния данного ноотропного препарата на серотонинергическую систему.

## ВЫВОДЫ

1. Фенибут вызывает выраженное увеличение содержания метаболита дофамина 3,4-диоксифенилуксусной кислоты и тормозной аминокислоты таурина в стриатуме.

2. Препарат не оказывает существенного влияния на ГАМК, серотонин и дофамин в различных структу-

рах головного мозга и умеренно снижает содержание норадреналина в гиппокампе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Б. Арушанян, *Стимуляторы психических процессов*, Ставрополь (2003).
2. Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(2), 10 – 14 (2003).
3. Т. А. Воронина, *Фармакол. и токсикол.*, **54**(2), 5 – 11 (1991).
4. С. В. Грачева, *Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов*, Г. В. Ковалева (ред.), Волгоград (1985), сс. 124 – 129.
5. Г. В. Ковалев, *Нootропные средства*, Нижне-Волжское книжное издательство, Волгоград (1990).
6. А. Н. Талалаенко, Д. В. Гордиенко, О. П. Маркова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(1), 14 – 18 (2000).
7. А. Н. Талалаенко, Д. В. Гордиенко, О. П. Маркова, Н. В. Гончаренко, Д. В. Панкратьев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 20 – 24 (2001).
8. И. Н. Тюренков, М. Н. Багметов, В. В. Епишина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 19 – 22 (2006).
9. W. R. Pearson, *Genomics*, **11**(3), 635 – 50 (1991).

Поступила 25.09.08

## EFFECT OF PHENIBUT ON THE CONTENT OF MONOAMINES, THEIR METABOLITES, AND NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS IN RAT BRAIN STRUCTURES

L. E. Borodkina<sup>1</sup>, V. S. Kudrin<sup>2</sup>, P. M. Klodt<sup>2</sup>, V. B. Narkevich<sup>2</sup>, and I. N. Tyurenkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov, Volgograd, 400131, Russia

<sup>2</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Effects of the nootropic drug phenibut, which is a structural analog of gamma-aminobutyric acid (GABA), on the content of monoamines, their metabolites, and neurotransmitter amino acids in brain structures have been studied on Wistar rats. It is established that a single administration of phenibut in a dose of 25 mg/kg (i.p.) produces a statistically significant increase in the content of dopamine metabolite (3,4-dioxypyrenylacetic acid) and the retarding amino acid taurine in striatum. At the same time, phenibut did not significantly influence the levels of GABA, serotonin, and dopamine in various brain structures and produce a moderate decrease in the level of norepinephrine in the hippocampus.

**Key words:** Phenibut, monoamines, neurotransmitter amino acids, brain, nootropes, GABA derivatives, memory

## ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОПАРКИНСОНЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ГИМАНТАНА НА СОДЕРЖАНИЕ И МЕТАБОЛИЗМ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ МОНОАМИНОВ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Д. А. Абаймов, И. А. Зимин, В. С. Кудрин, Г. И. Ковалев<sup>1</sup>

Гимантан (*N*-адамант-2-ил гексаметиленимина гидрохлорид) — новый противопаркинсонический препарат, обладающий широким спектром активности и по ряду тестов превосходящий препарат сравнения амантадин (мидантан). Изучали влияние гимантана на уровень содержанияmonoаминов и их метаболитов в стриатуме, фронтальной коре и гиппокампе мышей линии C57BL/6. Обнаружено, что при однократном системном введении гимантан (20 мг/кг внутрибрюшинно) вызывает уменьшение уровней ДОФА, серотонина и его метаболита 5-ГИУК в стриатуме мышей, оказывает умеренное ингибирующее действие на синтез дофамина в стриатуме, а также влияет на соотношение ГВК/ДА в гомогенатах фронтальной коры.

**Ключевые слова:** паркинсонизм, противопаркинсонические средства, производные адамантана, гимантан, monoамины, медиаторные аминокислоты, дофамин, серотонин, стриатум, фронтальная кора, гиппокамп

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона вызывается дефицитом дофаминергической передачи в стриатуме, который, в свою очередь, обусловливается дегенерацией нейронов компактной части черной субстанции [14]. Из-за большого числа патогенетических звеньев болезни Паркинсона наиболее перспективными являются препараты, сочетающие несколько механизмов действия. Такими препаратами являются производные адамантана (амантадин, мидантан) [2, 16], воздействующие сразу на несколько нейрохимических систем и обладающие выраженным нейропротекторными свойствами [10, 11]. В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН синтезирован и изучен новый противопаркинсонический препарат гимантан (*N*-адамант-2-ил гексаметиленимина гидрохлорид), превосходящий амантадин по противопаркинсонической эффективности.

Гимантан оказывает дозозависимое модулирующее влияние на активность дофамин- и серотонинергической нейромедиаторных систем в стриатуме [1], обладает свойствами низкоаффинного блокатора ионных каналов глутаматных NMDA-рецепторов, избирательно ингибирует МАО-В, имеет слабо выраженную антирадикальную активность и иммуномодулирующее действие [3]. В экспериментах определен спектр противопаркинсонической активности гимантана, доказаны его преимущества перед амантадином (мидантаном), показана перспективность применения гимантана для лечения ригидных и дрожательных форм паркинсонизма [4, 8]. В настоящее время препарат проходит стадию клинических испытаний. Тем не менее, изучение нейрохимических и молекулярно-биологи-

ческих механизмов действия гимантана не завершено. Влияние гимантана на содержание, синтез и катаболизм нейромедиаторов, вовлеченных в этиопатогенез болезни Паркинсона, остается не вполне выясненным. В представленном исследовании изучено влияние гимантана на содержание 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), норадреналина (НА), гомованилиновой кислоты (ГВК), 5-гидрокситриптофана (5-ГТП), серотонина (СТ) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) во фронтальной коре, стриатуме и гиппокампе мышей линии C57BL/6.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования по определению содержания monoаминов и их метаболитов в ткани мозга проводили на самцах мышей линии C57BL/6 массой 22–25 г, которых содержали в виварии НИИ фармакологии в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum*, по 10 особей в клетке в течение 7 суток до начала эксперимента, на стандартной диете при 12-часовом световом режиме.

Животные контрольной группы (I группа) получали физиологический раствор (0,9 % NaCl внутрибрюшинно). Животные II группы получали гимантан (20 мг/кг внутрибрюшинно). Препарат вводили за 30 мин до декапитации. Животным III группы вводили NSD1015, ингибитор декарбоксилазы-L-ароматических аминокислот, в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно за 2 ч до декапитации. Животные IV группы получали гимантан (20 мг/кг) на фоне введенного NSD1015 (50 мг/кг).

Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией с последующей декапитацией, головной мозг извлекали на льду и выделяли стриатум, гиппокамп и фронтальную кору [12], размельчали в гомогенизаторе “стекло

<sup>1</sup> Лаборатория радиоизотопных методов исследований (зав. — проф. Г. И. Ковалев), лаборатория нейрохимической фармакологии (зав. — В. С. Кудрин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

— тefлон” (0,2 мм) при 10 °C при скорости вращения пестика 3000 об/мин. В качестве среды выделения использовали 0,1 Н HClO<sub>4</sub> с добавлением внутреннего стандарта ДГБА (3,4-дигидроксибензиламин) в концентрации — 0,5 нмоль/мл. Структуры мозга гомогенизировали в 20 объемах среды выделения. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Супернатант использовали в дальнейшем для определения моноаминов и их метаболитов. Содержание моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоеффективной жидкостной хроматографии (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, “West Lafayette”, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4 × 100 мм, диаметр пор 3 мкм (Dr. Majsch GMBH, “Элсико”, Москва). Насос PM-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы 1 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 mM октансульфоновой кислоты, 0,1 mM ЭДТА и 9 % ацетонитрила (рН 3,0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS, США) на стеклоугольном электроде (+ 0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрацию образцов проводили с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1,5 (АМПЕРСЕНД). Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о.с.ч., х.ч. или analytical grade. Для калибровки хроматографа использовали смеси рабочих стандартов определяемых веществ в концентрации 500 пмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площади пиков в стандартной смеси и в образце [7].

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с применением программы Statistica 6.0, используя метод непараметрической статистики U-критерий Манна-Уитни. На рисунках звездочками обозначены достоверные различия ( $p < 0,05$ ). Результаты представлены в виде  $m \pm S.E.M$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гимантан был исследован в его предполагаемой активности относительно биосинтеза ДА и СТ, что оценивали по накоплению их предшественников L-ДОФА и 5-ГТП в условиях *in vivo* блокады декарбоксилазы L-ароматических аминокислот (ДААК) с помощью стандартного ингибитора 3-оксибензилгидразина (3-ОБГ или NSD1015). Необходимость использования NSD1015 для оценки биосинтеза обусловлена высокой интенсивностью процессов биосинтеза моноаминов, следствием чего является низкое содержание их предшественников в интактном мозге. Блокада ДААК посредством NSD1015 приводила к накоплению ДОФА (с  $0,74 \pm 0,15$  до  $4,45 \pm 0,34$ ) и 5-ГТП (с  $0 \pm 0$  до  $1,59 \pm 0,14$ ) в ткани стриатума, что говорит о действенности выбранной модели. Аналогичные изменения под влиянием NSD1015 происходили и в других исследуемых структурах головного мозга.

**Стриатум.** Гимантан в дозе 20 мг/кг вызывал снижение количества ДОФА на 18 % от контрольного значения (табл. 1).

Уровень СТ уменьшался на 13 %, а его метаболита 5-ГИУК — на 17 % (рисунок, а). Поскольку изменения в отношении 5-ГИУК/СТ обнаружено не было, можно допустить, что произошедшие изменения не имеют прямой связи с процессами синтеза серотонина. В пользу данного предположения свидетельствует также то, что введение гимантана на фоне NSD1015 не оказывало влияния на тканевое содержание 5-ГТП, СТ

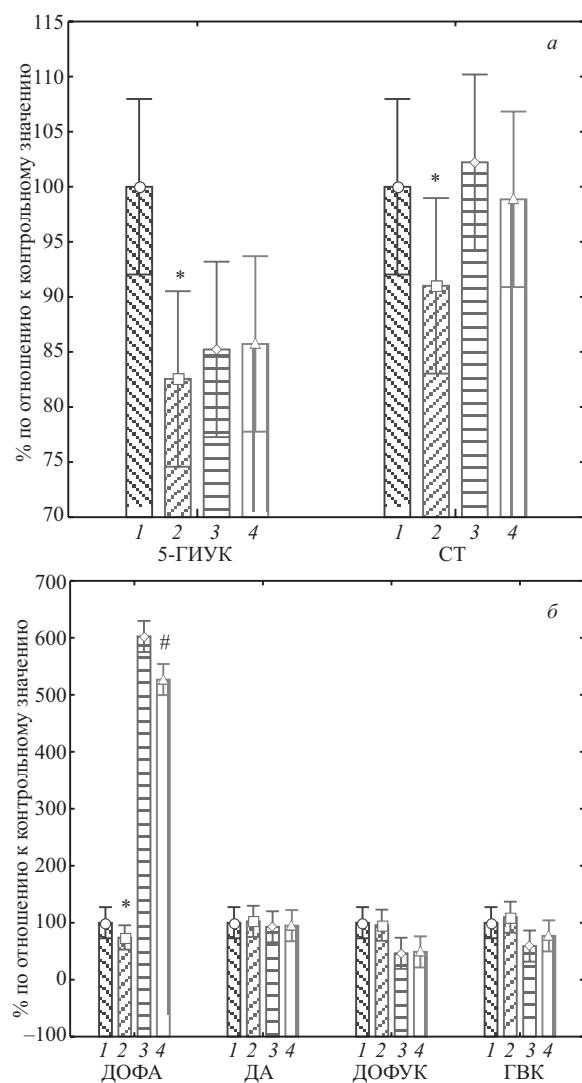
Таблица 1. Влияние гимантана на содержание биогенных аминов в стриатуме мышей C57BL/6 (нмоль/г ткани,  $m \pm S.E.M$ )

Показатель	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ГВК/ДА
Контроль, физ. р-р. в/б	$0,74 \pm 0,15^*$	$3,00 \pm 0,10$	$3,22 \pm 0,33$	$0,00 \pm 0,00$	$57,64 \pm 7,37$	$2,08 \pm 0,20^*$	$5,54 \pm 0,65$	$5,15 \pm 0,23^*$	$0,10 \pm 0,00$
Гимантан, 20 мг/кг в/б	$0,61 \pm 0,02^*$	$2,82 \pm 0,10$	$3,08 \pm 0,15$	$0,00 \pm 0,00$	$59,00 \pm 2,51$	$1,72 \pm 0,08^*$	$6,08 \pm 0,28$	$4,54 \pm 0,17^*$	$0,10 \pm 0,00$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 \*— статистически значимое отличие, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ . в/б — внутрибрюшинно.

Таблица 2. Влияние гимантана на содержание биогенных аминов в коре мышей C57BL/6 (нмоль/г ткани,  $m \pm S.E.M$ )

Показатель	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ГВК/ДА
Контроль, физ. р-р. в/б	$0,32 \pm 0,06$	$3,53 \pm 0,32$	$0,29 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,17$	$1,56 \pm 0,18$	$0,75 \pm 0,11$	$5,90 \pm 0,09$	$1,28 \pm 0,31^*$
Гимантан, 20 мг/кг в/б	$0,22 \pm 0,03$	$2,98 \pm 0,10$	$0,38 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,10$	$1,54 \pm 0,18$	$0,65 \pm 0,10$	$6,22 \pm 0,36$	$0,69 \pm 0,13^*$



Влияние гимантана на процессы синтеза и обмена серотонина (а) и дофамина (б) в норме и на фоне введения ингибитора ДААК NSD1015 в стриатуме мышей линии C57BL/6.

\* статистически значимое отличие, критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ , # — тенденция к снижению относительно значения на фоне NSD1015,  $p = 0,07$ .

1 — физиологический раствор; 2 — гимантан, 20 мг/кг; 3 — NSD1015, 50 мг/кг; 4 — гимантан + NSD 1015.

и 5-ГИУК (на рисунках не представлено). По-видимому, серотонинергические эффекты гимантана могут осуществляться опосредованно, например, через влияние на обратный пресинаптический захват СТ.

Введение NSD1015 приводило к накоплению ДОФА (с  $0,74 \pm 0,06$  до  $4,45 \pm 0,34$ ) и 5-ГТП (с  $0 \pm 0$  до  $1,59 \pm 0,14$ ), тогда как гимантан на фоне NSD1015 проявлял тенденцию к снижению ДОФА (U-критерий Манна-Уитни,  $p = 0,073$ ), (рисунок, б). Последнее согласуется с результатами, полученными при введении препарата интактным крысам (не получавшим NSD1015), согласно которым гимантан статистически значимо уменьшал концентрацию ДОФА в стриатуме (табл. 1). Полученные данные, свидетельствуют, по-видимому, о том, что гимантан оказывает умеренное ингибирующее действие на синтез ДА. Данное ингибирующее влияние, вероятно, связано с ранее обнаруженным нами эффектом препарата на пресинаптические дофаминовые ауторецепторы D3 [5], которые способны одновременно влиять на синтез ДА и его высвобождение [9, 13, 15].

**Фронтальная кора.** В данной ткани были обнаружены значимые изменения в соотношении ГВК/ДА, отражающем интенсивность катаболизма внеклеточного дофамина: во II группе животных величина ГВК/ДА уменьшилась на 54 % по отношению к I группе (табл. 2). Напротив, в IV группе (NSD1015 + гимантан) этот показатель возрос на 51 % по отношению к III группе, которой вводили только NSD1015 (табл. 3).

Увеличение соотношения ГВК/ДА в IV группе произошло преимущественно за счет повышения концентрации ГВК (есть тенденция увеличения ГВК в группе IV по отношению к группе III по U-критерию Манна-Уитни,  $p = 0,063$ ). Поскольку гимантан способен увеличивать экстраклеточную концентрацию ДА в стриатуме [1], возрастание концентрации ГВК, образующейся при участии экстраклеточного фермента КОМТ, может быть связано с ингибированием обратного захвата ДА гимантаном [5]. В группе I, напротив, обнаружено статистически достоверное уменьшение соотношения ГВК/ДА, обусловленное увеличением концентрации ДА. Увеличение содержания дофамина может быть связано с эффектами гимантана на процессы депонирования и катаболизма данного нейромедиатора и, видимо, не связано с изменениями скорости синтеза. Введение гимантана на фоне NSD1015 не обнаружило влияния на уровни ДОФА и 5-ГТП, что также указывает на отсутствие эффекта препарата на биосинтез ДА и СТ во фронтальной коре.

Таблица 3. Влияние гимантана на содержание биогенных аминов в коре мышей C57BL/6 на фоне эффекта NSD1015 (нмоль/г ткани,  $n \pm S.E.M$ )

Показатель	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ГВК/ДА
NSD1015, 50 мг/кг в/б	$0,72 \pm 0,06$	$3,46 \pm 0,34$	$0,24 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,09$	$0,34 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,16$	$7,15 \pm 0,21$	$2,41 \pm 0,41^*$
Гимантан + NSD 1015, в/б	$0,72 \pm 0,08$	$3,24 \pm 0,19$	$0,20 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,13$	$1,41 \pm 0,38$	$7,41 \pm 0,46$	$4,71 \pm 1,94^*$

**Гиппокамп.** Значимых изменений в уровне биогенных аминов после введения гимантана выявлено не было. По-видимому, препарат не вмешивается в процесс биосинтеза ДА и СТ в гиппокампе мышей.

Таким образом, выявленное влияние гимантана на серотонинергические системы стриатума свидетельствует о важности роли серотонинергического компонента в механизме противопаркинсонического действия гимантана. Известно, что серотонин усиливает активность ключевых нейрохимических и нейропатофизиологических механизмов расстройства движения при паркинсонизме: снижение серотонинергической передачи в системе базальных ганглиев оказывает выраженный противопаркинсонический эффект [6]. Следовательно, установленное влияние гимантана на серотонинергическую функцию может вносить определенный вклад в устранение проявлений паркинсонизма, включая дрожательную симптоматику.

Полученные данные об уменьшении содержания внеклеточного метаболита серотонина 5-ГИУК в гомогенатах стриатума согласуются с результатами, полученными для микродиализатов стриатума [1], и позволяют предположить, что гимантан оказывает влияние и на систему ферментативной деградации биогенных аминов. В пользу этого предположения свидетельствует также обнаруженный эффект препарата на соотношение ГВК/ДА в гомогенатах фронтальной коры.

## ВЫВОДЫ

1. Гимантан при однократном системном введении (20 мг/кг внутрибрюшинно) вызывает уменьшение содержания ДОФА, серотонина и его метаболита 5-ГИУК в стриатуме мышей.

2. Гимантан оказывает умеренное ингибирующее влияние на синтез дофамина в стриатуме, что, по-ви-

димому, связано с действием на пресинаптические дофаминовые D3-ауторецепторы.

3. Гимантан оказывает влияние на соотношение ГВК/ДА в гомогенатах фронтальной коры, что свидетельствует о действии препарата на катаболизм моноаминов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Э. А. Андяржанова, Е. А. Вальдман, В. С. Кудрин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(6), 13 – 16 (2001).
2. О. Б. Вайншток, Л. И. Олейник, *Дифференциальная диагностика и современные методы лекарственного лечения паркинсонизма*, Киев (1978).
3. Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, Л. Н. Аксенова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(5), 3 – 5 (2003).
4. Е. А. Вальдман, Л. Н. Неробкова, Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(1), 7 – 10 (2004).
5. Г. И. Ковалев, Д. А. Абаймов, М. В. Воронин, Ю. Ю. Фирстова, *Нейрохимия*, **24**(2), 150 – 156 (2007).
6. Г. Г. Крыжановский, С. В. Магаева, Н. А. Трекова, *Бiol. экспер. бiol.*, **5**, 466 – 469 (1993).
7. В. С. Кудрин, И. И. Мирошниченко, К. С. Раевский, *Нейрохимия*, **7**(1), 3 – 8, (1988).
8. Л. Н. Неробкова, Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, *Экспер. и клинич. фармакол.*, **63**(3), 3 – 6 (2000).
9. C. W. Aretha and A. Sinha, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**(2) 609 – 13 (1995).
10. W. Danysz and C. G. Parsons, *Neurosci Biobehav Rev.*, **21**(4), 455 – 468 (1997).
11. M. Ebadi, S. K. Srinivasan, and M. D. Baxi, *Prog. Neurobiol.*, **48**(1), 1 – 19 (1996).
12. J. Glowinski and L. L. Iversen., *J. Neurochem.*, **13**(8), 655 – 669 (1966).
13. A. Gobert, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**(2), 899 – 913 (1995).
14. C. Hamani and A. M. Lozano, *Ann. NY Acad. Sci.*, **991**, 15 – 21 (2003).
15. T. E. Koeltzow., *J. Neurosci.*, **18**(6), 2231 – 2238 (1998).
16. R. S. Schwab and D. C. Poskanzer, *Jama.*, **222**(7), 792 – 795 (1972).

Поступила 24.09.08

## EFFECTS OF ANTIPARKINSONIAN DRUG HEMANTANE ON THE LEVEL AND METABOLISM OF BIOGENIC MONOAMINES IN BRAIN STRUCTURES OF C57BL/6 MICE

D. A. Abaimov, I. A. Zimin, V. S. Kudrin, and G. I. Kovalev

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Hemantane (N-adamant-2-yl-hexamethyleneimine hydrochloride) is a new antiparkinsonian drug showing a broad activity spectrum, being superior to the reference drug amantadine in some tests. The effects of hemantane on the levels of biogenic amines and their metabolites in the striatum, frontal cortex, and hippocampus have been studied in C57BL/6 mice. It was found that a single administration of hemantane (20 mg/kg, i.p.) decreased the concentration of DOPA, serotonin, and its metabolite in mice striatum, gently inhibited the synthesis of dopamine in mice striatum, and influenced the HVA/DA balance in frontal cortex homogenates.

**Key words:** Hemantane, parkinsonism, antiparkinsonian drugs, adamantine derivatives, monoamines, neurotransmitter amino acids, dopamine, serotonin, striatum, frontal cortex, hippocampus

## ДЕЙСТВИЕ СЕМАКСА И МЕКСИДОЛА НА МОДЕЛЯХ ИШЕМИИ МОЗГА У КРЫС

Вик. В. Яснечов<sup>1</sup>, Т. А. Воронина<sup>2</sup>

В опытах на крысах установлено, что на модели ишемии мозга, вызванной перевязкой обеих общих сонных артерий, семакс и мексидол статистически достоверно уменьшают выраженность неврологического дефицита и снижают летальность животных. При этом для мексидола выявлено линейное усиление эффекта с увеличением дозы (от 30 до 120 мг/кг/сут), тогда как действие семакса, наоборот, ослабляется с увеличением дозы (от 0,3 до 1,2 мг/кг/сут). На модели ишемии головного мозга, вызванной гравитационной перегрузкой, семакс и мексидол при курсовом профилактическом применении существенно ослабляют выраженность неврологического дефицита и предупреждают развитие ретроградной амнезии рефлекса пассивного избегания.

**Ключевые слова:** ишемия головного мозга, семакс, мексидол, перевязка общих сонных артерий, гравитационная перегрузка, противоишемическое действие

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время оригинальные отечественные лекарственные препараты семакс (гептапептид метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин) и мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксиридин-сукинат) широко применяют в различных областях медицины. Оба препарата используют в неврологии при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения и связанных с ней заболеваниях, в том числе при мозговом инсульте и его последствиях [3, 4, 7, 10, 11, 13].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение в эксперименте на крысах противоишемического действия семакса и мексидола с анализом зависимости доза — эффект на традиционной модели ишемии головного мозга, вызванной окклюзией общих сонных артерий, и на модели ишемии мозга, вызванной гравитационной перегрузкой.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на белых нелинейных крысах-самцах массой 220–290 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Противоишемическую активность веществ оценивали на животных с экспериментальной ишемией головного мозга на двух моделях. Первую модель воспроизводили путем одномоментной перевязки (под общей анестезией эфиром для наркоза) обеих общих сонных артерий. Животные контрольной группы получали только изотонический раствор натрия хлорида (NaCl). В подопытных группах животным вводили внутрибрюшинно семакс (0,3, 0,6 и 1,2 мг/кг/сут) и мексидол (30, 60, 90 и 120 мг/кг/сут) 1 раз/сут в течение 7 сут; в первые

сутки — через 1, 3 и 6 ч после операции. Животных после операции наблюдали в течение 2 недель с регистрацией выживаемости крыс. Неврологический дефицит (НД) у животных определяли в баллах по шкале С. Р. McGraw и соавт. [15] в модификации И. В. Ганнушкиной и соавт. [6] каждый час в течение 24 ч, а затем 1 раз в сутки. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов.

Во второй модели ишемию головного мозга вызывали гравитационной радиальной перегрузкой в крацио-каудальном направлении, создаваемой с помощью специальной центрифуги диаметром 2 м [5]. Для этого крыс помещали в контейнеры центрифуги в строго крацио-каудальном направлении относительно вектора центростремительного ускорения, величина которого составляла 10 г в течение 6 мин. После центрифугирования у животных определяли НД, как описано выше. Кроме того, до воздействия гравитационной перегрузки крыс обучали условной реакции пассивного избегания (УРПИ) [14]. Сохранность УРПИ проверяли через 24 ч после окончания действия перегрузки. Препараты вводили (до воздействия) внутрибрюшинно 4 раза (1 раз/сут в течение 3 сут и за 45 мин до начала центрифугирования). Животные контрольной группы получали изотонический раствор NaCl.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета программ Biostat.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение действия семакса и мексидола на модели ишемии головного мозга, вызванной перевязкой обеих общих сонных артерий

Результаты действия веществ на модели с двусторонней перевязкой общих сонных артерий представлены в табл. 1. Показано, что у крыс контрольной группы НД был наиболее выражен ( $8,8 \pm 0,1$  балла) через 2 и 3 сут после двусторонней перевязки общих сонных артерий; при этом в контроле погибло 24 % (16 крыс из 67) животных.

<sup>1</sup> ОАО “Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ”, Московская область, пос. Старая Купавна, 142450, ул. Кирова, 23.

<sup>2</sup> Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Таблица 1. Изменение неврологического дефицита (в баллах) у крыс после двусторонней перевязки общих сонных артерий под влиянием семакса и мексидола,  $M \pm m$ 

Вещество (доза, мг/кг/сут)	Срок после операции						
	12 ч	24 ч	2 сут	3 сут	5 сут	7 сут	14 сут
0,9 % раствор NaCl (контроль $n = 67$ )	8,5 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,6 ± 0,1
Мексидол (30) ( $n = 28$ )	5,4 ± 0,1*	5,9 ± 0,1*	6,4 ± 0,1*	6,3 ± 0,1*	6,2 ± 0,1*	6,0 ± 0,1*	5,8 ± 0,1*
Мексидол (60) ( $n = 20$ )	5,2 ± 0,1*	5,8 ± 0,1*	6,1 ± 0,1*	6,1 ± 0,1*	6,0 ± 0,1*	5,8 ± 0,1*	5,5 ± 0,1*
Мексидол (90) ( $n = 20$ )	4,9 ± 0,1*	5,0 ± 0,1*	5,4 ± 0,1*	5,4 ± 0,1*	5,2 ± 0,1*	5,1 ± 0,1*	5,0 ± 0,1*
Мексидол (120) ( $n = 20$ )	4,7 ± 0,1*	4,9 ± 0,1*	5,0 ± 0,1*	5,0 ± 0,1*	4,8 ± 0,1*	4,7 ± 0,1*	4,6 ± 0,1*
Семакс (0,3) ( $n = 28$ )	4,8 ± 0,1*	4,9 ± 0,1*	5,5 ± 0,1*	5,5 ± 0,1*	5,2 ± 0,1*	5,1 ± 0,1*	4,9 ± 0,1*
Семакс (0,6) ( $n = 20$ )	5,3 ± 0,1*	5,7 ± 0,1*	5,9 ± 0,1*	5,9 ± 0,1*	5,8 ± 0,1*	5,5 ± 0,1*	5,4 ± 0,1*
Семакс (1,2) ( $n = 20$ )	6,2 ± 0,1*	6,9 ± 0,2*	7,3 ± 0,2*	7,3 ± 0,2*	7,2 ± 0,2*	7,0 ± 0,2*	6,8 ± 0,2*

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* —  $p < 0,05$  — значимость различий по сравнению с контролем (критерий Стьюдента).

Установлено, что семакс оказывал наиболее выраженное действие в дозе 0,3 мг/кг/сут, что выражалось в достоверном снижении летальности животных до 7 % ( $p < 0,05$ ) и уменьшении НД (табл. 1). В более высоких дозах (0,6 и 1,2 мг/кг/сут) эффект препарата был существенно слабее. Например, в дозе 0,6 мг/кг/сут летальность составляла 15 % ( $p > 0,05$ ), а в дозе 1,2 мг/кг/сут — 20 % ( $p > 0,05$ ). Следовательно, эффект семакса ослабляется с увеличением дозы (в дозах от 0,3 до 1,2 мг/кг/сут). Полученные данные объясняются наличием у семакса перевернутой колокообразной зависимости доза — эффект [2, 9].

В сравнение с семаксом мексидол имеет линейную зависимость доза — эффект и его противоишемическое действие усиливается с увеличением дозы (табл. 1). Так, например, препарат уменьшал летальность крыс в дозах 30 и 60 мг/кг/сут до 14 % и 10 % ( $p > 0,05$ ) соответственно, в дозе 90 мг/кг/сут — до 5 % ( $p < 0,05$ ), а в дозе 120 мг/кг/сут — до 0 % ( $p < 0,05$ ). Сходные изменения происходили под влиянием мексидола и при оценке НД. Выявленная для мексидола линейная зависимость противоишемического действия от дозы проявляется и в отношении других эффектов препарата, в частности, антиамнестического [9].

## 2. Изучение действия семакса и мексидола на модели ишемии головного мозга, вызванной гравитационной перегрузкой

Из 40 животных контрольной группы после 6-минутного центрифугирования (ускорение 10 g) погибла 1 крыса (2 %). В подопытных группах (животным вводили семакс или мексидол) гибели животных не наблюдалось.

После центрифугирования у контрольных крыс проявлялся НД в виде вялости, замедленности движений, трепора конечностей, полуптоза/птоза, пареза/паралича одной или нескольких конечностей; при этом НД в среднем составлял 8,5 ± 0,1 балла (табл. 2).

Мексидол в дозах 30 и 90 мг/кг/сут значимо ( $p < 0,05$ ) ослаблял выраженность НД в 1,5 и 1,7 раза соответственно, а семакс в дозах 0,3 и 0,6 мг/кг/сут — в 1,7 и 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл. 2). У животных всех групп, включая контрольную, через 6 ч после центрифугирования визуально уже не выявлялись признаки НД.

Воздействие гравитационной перегрузки вызывало у большинства крыс (75 %,  $p < 0,001$ ) ретроградную амнезию УРПИ (табл. 3). Семакс в дозе 0,3 мг/кг/сут практически полностью предотвращал развитие амнезии, однако при повышении дозы до 0,6 мг/кг/сут был неэффективен (табл. 3). Мексидол в дозе 30 мг/кг/сут не оказывал антиамнестического действия, но в дозе 90 мг/кг/сут значимо ( $p < 0,01$ ) уменьшал выраженность амнезии в 2,3 раза (табл. 3).

Таблица 2. Влияние семакса и мексидола на выраженность неврологического дефицита (НД), вызванного у крыс воздействием гравитационной перегрузки (ускорение 10 g)

Условия опытов и вещество (доза, мг/кг/сут)	Число крыс	НД, баллы
0,9 % раствор NaCl + перегрузка (контроль)	39	8,5 ± 0,1
Мексидол (30) + перегрузка	15	5,6 ± 0,1*
Мексидол (90) + перегрузка	20	5,1 ± 0,1*
Семакс (0,3) + перегрузка	22	5,0 ± 0,1*
Семакс (0,6) + перегрузка	16	6,3 ± 0,1*

Таблица 3. Влияние семакса и мексидола на амнестический эффект, вызванный у крыс воздействием гравитационной перегрузки (ускорение 10 g)

Условия опытов и введение (доза, мг/кг/сут)	Общее число крыс	Число крыс, обучившихся УРПИ, %	Число крыс с амнезией УРПИ через 24 ч после воздействия перегрузки, %
0,9 % раствор NaCl + псевдоперегрузка КЭВ (контроль 1)	29	26 (90)	6 (23)
0,9 % раствор NaCl + перегрузка (контроль 2)	39	36 (92)	27 (75) <sup>ooo</sup>
Мексидол (30) + перегрузка	15	14 (93)	7 (50)
Мексидол (90) + перегрузка	20	18 (90)	6 (33)**
Семакс (0,3) + перегрузка	22	21 (95)	6 (28)***
Семакс (0,6) + перегрузка	16	15 (94)	8 (53) <sup>o</sup>

**Примечание.** Различия статистически значимы по сравнению с контролем 1° и контролем 2\* соответственно (точный метод Фишера): ° —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , <sup>ooo</sup> и \*\*\* —  $p < 0,001$ . КЭВ — комплексное экстремальное воздействие.

Таким образом, на модели ишемии головного мозга, вызванной гравитационной перегрузкой, семакс и мексидол при курсовом профилактическом применении оказывают отчетливое защитное действие, предупреждая развитие НД и нарушения памяти. Сходное действие в условиях ишемии головного мозга, вызванной гравитационной перегрузкой, оказывают кавинтон, фенибут, каптоприл, эналаприл и лозартан [1, 5, 8, 12].

## ВЫВОДЫ

1. Семакс (0,3 мг/кг/сут) и мексидол (90 и 120 мг/кг/сут) при лечебном курсовом введении (7 суток) оказывают противоишемическое действие у крыс с двусторонней перевязкой общих сонных артерий, что выражается в достоверном уменьшении неврологического дефицита и гибели животных. Для мексидола показано линейное усиление эффекта с увеличением дозы, для семакса — ослабление эффекта с увеличением дозы.

2. Семакс (0,3 мг/кг/сут) и мексидол (90 мг/кг/сут) при курсовом профилактическом применении статистически достоверно ослабляют выраженность неврологического дефицита и предупреждают развитие ретроградной амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванных воздействием гравитационной перегрузки.

## ЛИТЕРАТУРА

- Л. М. Аджиенко, *Автореф. дис. докт. фарм. наук*, Купавна (2000).
- И. П. Ашмарин, В. Н. Незавиделько, Н. Ф. Мясоедов и др., *Ж. высш. нерв. деят.*, **47**(2), 420 – 430 (1997).
- И. П. Ашмарин, Л. Ю. Алфеева, Л. А. Андреева и др., Патент RU 2251429 С2. Опубликовано: 10.05.2005 Бюл., № 13 (2005).
- Т. А. Воронина, *Отечественный препарат нового поколения мексидол: основные эффекты, механизм действия, применение*, Москва (2004).
- М. Д. Гаевый, Л. М. Аджиенко, Л. М. Макарова, А. А. Абдулсалам, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(3), 63 – 64 (2000).
- И. В. Ганушкина, А. Л. Антелава, М. В. Баранчикова, *Пат. физiol.*, № 2, 3 – 8 (1998).
- Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Москва, Медицина (2001).
- Л. М. Макарова, *Бiol. экспер. бiol. Прил. I. "Мексидол в клинике и эксперименте"*, 48 – 57 (2006).
- Н. А. Проворнова, *Автореф. дис. канд. бiol. наук*, Купавна, (1999).
- В. И. Серегин, *Бiol. экспер. бiol. Прил. I. "Мексидол в клинике и эксперименте"*, 78 – 81 (2006).
- З. А. Суслина, И. Н. Смирнова, М. М. Танашян и др., *Клиническая эффективность мексидола и влияние его на реологические свойства крови и гемоперфузию головного мозга при хронических формах цереброваскулярных заболеваний*, Москва (2002).
- И. Н. Тюренков, М. Н. Багметов, В. В. Епишина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 19 – 22 (2006).
- А. И. Федин, С. А. Румянцева, О. П. Миронова, В. Н. Евсеев, *Применение антиоксиданта мексидола у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения*, Москва (2002).
- R. Cumin, E. F. Bandle, E. Gamzu, and W. E. Haefely, *Psychopharmacol.*, **78**, 104 – 111 (1982).
- C. P. McGraw, A. G. Pashayan, O. T. Wendel, *Stroke*, **7**(5), 485 – 488 (1976).

Поступила 24.09.08

## EFFECT OF SEMAX AND MEXIDOL ON BRAIN ISCHEMIA MODELS IN RATS

Vic. V. Yasnetsov<sup>1</sup> and T. A. Voronina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Center for Safety of Biologically Active Substances, ul. Kirova 23, Staraya Kupavna, Moscow oblast, 142450 Russia

<sup>2</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

It was established that semax and mexidol significantly reduced neurological deficiency and increased the survival in rats with model brain ischemia induced by the bilateral ligation of common carotid arteries. Mexidol exhibited a linear dose – effect relationship (in a range of doses from 30 to 120 mg/kg per day), while the effect of semax decreased with increasing dose (in a dose range from 0.3 to 1.2 mg/kg per day). Preventive course administration of semax and mexidol considerably reduced neurologic deficiency and amnesia in a step-down passive avoidance situation in rats with model brain ischemia caused by gravitation overload.

Key words: Semax, mexidol, brain ischemia, bilateral ligation of common carotid arteries, gravitation overload, antiischemic effect

## Юбилей

---

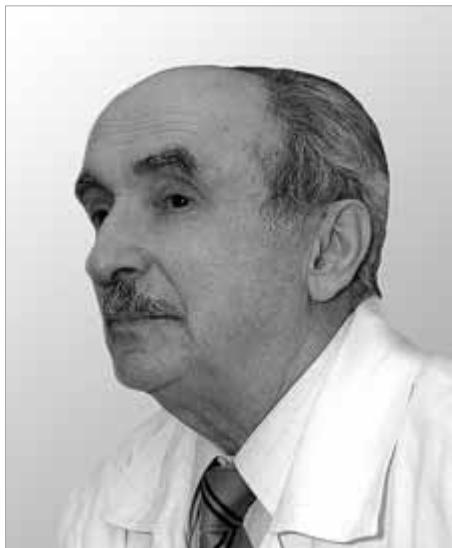
### ЭДУАРД БЕНИАМИНОВИЧ АРУШАНЯН (к 75-летию со дня рождения)

В январе 2009 года исполнилось 75 лет со дня рождения Эдуарда Бениаминовича Арушаняна – заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, почётного профессора, заведующего кафедрой фармакологии Ставропольской государственной медицинской академии.

Э. Б. Арушанян – один из ведущих психофармакологов страны. Свою научную деятельность начал в 1953 году в студенческом научном кружке при кафедре фармакологии I Ленинградского медицинского института им. И. П. Павлова под руководством академика АМН В. В. Закусова. С тех пор основным направлением его исследований является разработка проблем нейро- и психофармакологии. По окончании с отличием института, А. Б. Арушанян был направлен в Забайкалье, где в течение 26 лет работал на кафедре фармакологии Читинского медицинского института, пройдя путь от ассистента до заведующего кафедрой. С 1983 года по настоящее время возглавляет кафедру фармакологии Ставропольской медицинской академии.

Темой его докторской диссертации послужило изучение механизмов действия судорожных и противосудорожных веществ. Впервые методом внутриклеточного отведения потенциалов от одиночных нейронов спинного мозга Э. Б. Арушанян показал, что в основе специфического действия конвульсантов может лежать ослабление, а в антиконвульсивном эффекте, напротив, усиление работы центральных тормозных механизмов. Эти оригинальные исследования, не утратившие значения и по сей день, позволили по-новому трактовать механизм действия изученных веществ.

Начиная с 1970 г., после того, как он возглавил и по существу заново создал кафедру фармакологии в Читинском мединституте, был развернут комплекс исследований в виде единой научной программы “Физиология и фармакология базальных ганглиев головного мозга”. В результате всесторонней разработки проблемы удалось получить много новых сведений, которые существенно расширили знания о фармакодинамике антипсихотических и психостимулирующих средств, а



также в области физиологии и патофизиологии стриатных механизмов. Накопленные сведения определили содержание книг “Хвостатое ядро”, “Нигрострионигральная система”, опубликованных в издательстве “Наука” в 1976 и 1989 гг. и монографических руководств “Нейролептические средства” и “Психостимулирующие вещества”. Свидетельством международного признания значимости этих исследований явилось почётное и редкое для советских, тем более провинциальных фармакологов приглашение Э. Б. Арушаняна выступить с основной лекцией перед делегатами V Международного конгресса фармакологов (Париж, 1978), в которой излагалось оригинальное положение о месте стриатума в специфическом действии психотропных средств.

После перехода на работу в Ставропольский медицинский институт (позднее академия) Э. Б. Арушанян приступил к созданию нового для отечественной фармакологии направления – хронофармакологии. Отсутствие экспериментальной базы и квалифицированных кадров в очередной раз не явилось для него препятствием. В кратчайшие сроки была создана современная экспериментальная лаборатория. Э. Б. Арушанян смог зарядить своим энтузиазмом многих молодых исследователей, и вскоре на кафедре сформировался работоспособный коллектив, каждый из членов которого под руководством своего учителя вел самостоятельный поиск. Исследования посвящены выяснению роли фактора времени в эффекте преимущественно психотропных средств, что позволило с новых позиций подойти к расшифровке антидепрессивных и противовревматических свойств препаратов разных групп. Среди прочего, впервые был поставлен вопрос об участии хронотропной мозговой железы эпифиза и её основного гормона мелатонина в фармакологическом эффекте. Полученные результаты были систематизированы в нескольких монографиях (“Хронофармакология”, 2000 и “Хронофармакология на рубеже веков”, 2005; “Анксиолитические средства”, 2001; “Антидепрессанты”, 2002; “Стимуляторы психических процессов”, 2003; “Ноотроп-

ные средства”, 2004, “Факторы, влияющие на действие лекарственных веществ”, 2005; “Уникальный мелатонин”, 2007). Итоги многолетних исследований автора и возглавлявшихся им коллективов кафедр фармакологии Читинского и Ставропольского медицинских институтов обобщены в его капитальном двухтомном руководстве “Психофармакология” (2008).

Э. Б. Арушанян является автором свыше 700 опубликованных научных работ, в числе которых 22 монографии и 165 зарубежных публикаций. Он участник многих фармакологических форумов за рубежом (Сан-Франциско, 1972; Хельсинки, 1975; Париж, 1978 и 1997; Лондон, 1990; Монреаль, 1994; Мюнхен, 1998, Дели, 1999 и др.). За свою деятельность награжден орденами “Знак Почета” и “Дружбы”, медалью им. Н. П. Кравкова АМН СССР (1976), удостоен почетного звания “Заслуженный деятель науки РФ” (1993) и, почётного профессора Ставропольской медицинской академии (2008); лауреат премии И. П. Павлова (РАН) (1994). Его заслуги высоко оценены за рубежом: избран действительным членом Нью-Йоркской академии наук (1995), биографическая справка о нём регулярно

(с 1996 г.) публикуется в престижных международных изданиях “Who is who in the World”, “Who is who in Medicine” и др., он награждён большой серебряной медалью “2 тысячи выдающихся учёных XX века” (Англия, Кембридж, 2001).

Э. Б. Арушанян является членом Президиума Российского научного общества фармакологов, членом редакционного Совета журнала “Экспериментальная и клиническая фармакология”, членом ряда центральных проблемных комиссий. Активно занимается подготовкой квалифицированных научных кадров. Под его руководством выполнено и защищено 24 кандидатских и 9 докторских диссертаций. Он неизменно уделяет много внимания научной работе студентов, стремясь привить молодым исследователям интерес к научному поиску.

Искренне поздравляем Эдуарда Бениаминовича с 75-летием, желаем крепкого здоровья, счастья, дальнейшей плодотворной работы в науке и подготовке молодых специалистов, больших творческих успехов в его благородном труде.

*Президиум правления Российского научного общества фармакологов  
Редколлегия журнала “Экспериментальная и клиническая фармакология”  
Ставропольская государственная медицинская академия  
Коллеги, ученики, друзья*

# АФОБАЗОЛ®

## СОВРЕМЕННОЕ СРЕДСТВО ОТ ТРЕВОГИ И СТРЕССА

- Селективный анксиолитик небензодиазепинового ряда
- Не вызывает привыкания и сонливости
- Не снижает концентрацию внимания и память
- Отпускается без рецепта



РУ ЛС-000861 от 21.07.2008



ОАО «Фармстандарт»  
141700, Россия, Московская обл.,  
г. Долгопрудный, Лихачёвский проезд, д. 5Б  
Тел./факс : (495) 970 00 30 / (495) 970 00 32  
[www.pharmstd.ru](http://www.pharmstd.ru)

ОАО «Валента Фармацевтика»  
по заказу ОАО «Фармстандарт-Лексредства»