

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ BDNF В СТРУКТУРАХ МОЗГА ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ ФЕНОТИПОМ ЭМОЦИОНАЛЬНО-СТРЕССОВОЙ РЕАКЦИИ

С. Б. Середенин, Д. С. Мелкумян, Е. А. Вальдман, М. А. Яркова,  
Т. С. Середенина, М. В. Воронин, А. С. Лапицкая<sup>1</sup>

Установлены специфические для линий инбредных мышей BALB/c и C57BL/6 сдвиги в содержании BDNF в гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и коре большого мозга при эмоционально-стрессовом воздействии и введении селективного анксиолитика афобазола. Показано, что афобазол обладает протекторным действием по отношению к снижению уровня BDNF в структурах мозга мышей BALB/c, вызванному эмоциональным стрессом.

**Ключевые слова:** BDNF, эмоциональный стресс, инбредные мыши, афобазол

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время уже известны общие механизмы, опосредующие процессы ангиогенеза и нейродегенерации [10], что объясняет, например, этиопатогенетическую роль тревожных расстройств для болезней Паркинсона, Альцгеймера, сопряженность ишемических нарушений головного мозга с возникновением тревоги [8, 15]. Поэтому представляется обоснованным комплексное применение анксиолитиков и нейропротекторов, а в оптимальном случае средств, сочетающих эти свойства.

Фундаментальные исследования в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН привели к созданию оригинального селективного анксиолитика афобазола, зарегистрированного в России в 2005 г. [13]. Преимущества афобазола перед бензодиазепиновыми анксиолитиками подтверждены в клинических исследованиях [6]. В то же время на различных экспериментальных моделях нейрональных нарушений *in vitro* и ишемии мозга *in vivo* показано, что афобазол обладает нейропротекторными свойствами [1, 3, 4, 7].

Одним из важных эндогенных регуляторов роста, дифференцировки и защиты нейронов от повреждающих воздействий является мозговой нейротрофический фактор BDNF [12]. Его нейропротекторное влияние зарегистрировано на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний [18]. Внутримозговое введение нейротрофина вызывает антидепрессивный эффект [17].

Поскольку эмоционально-стрессовые реакции рассматриваются в качестве пускового звена нервно-психических заболеваний [2], изменения уровня BDNF

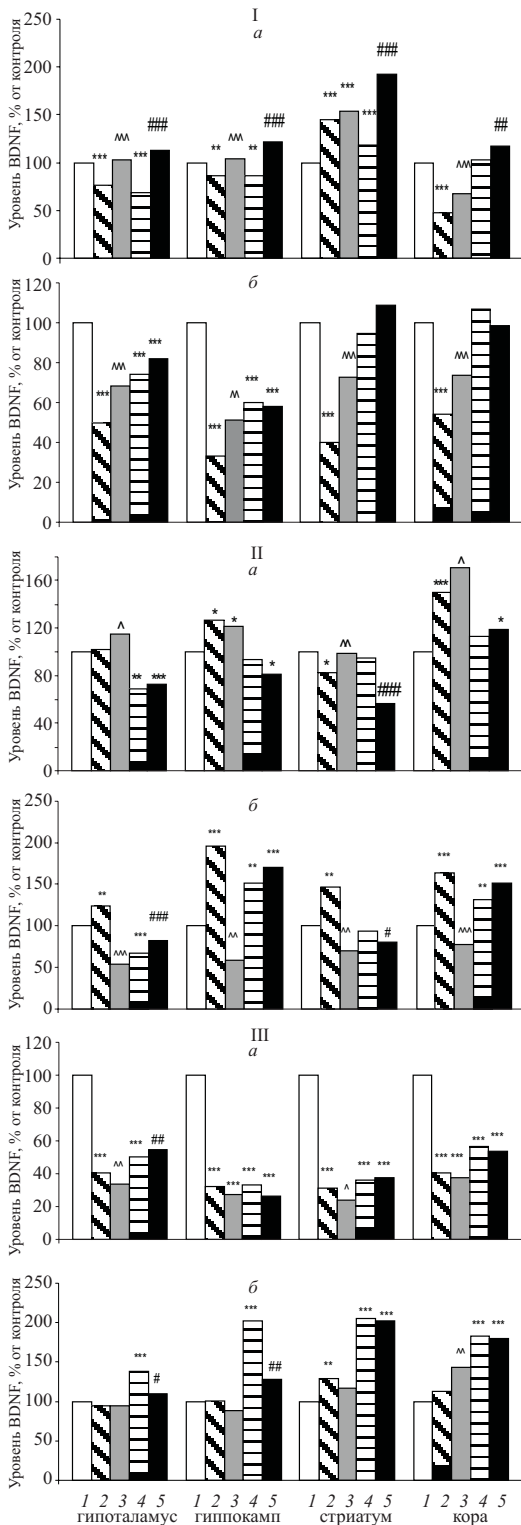
при формировании стрессового ответа, отмеченные в ряде исследований, представляют значительный интерес [14, 18]. Однако имеющиеся на сегодняшний день результаты трудно интерпретировать ввиду разнонаправленности установленных сдвигов, как в количественных, так и временных отношениях. Одной из вероятных причин неоднозначности данных может быть генетическая гетерогенность использованных в опытах животных по типу эмоционально-стрессовой реакции. Поэтому в целях поиска механизмов, обеспечивающих совокупность анксиолитических и нейропротекторных свойств афобазола, в настоящей работе изучено его влияние на содержание BDNF при стрессовых воздействиях у мышей C57BL/6 с активным фенотипом ответа на стресс и у мышей BALB/c, характеризующихся выраженной реакцией страха.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на мышках-самцах инбредных линий C57BL/6 и BALB/c массой 18–20 г, полученных из питомника Столбовая РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария НИИ фармакологии не менее двух недель до начала эксперимента по 10 особей в клетке на обычной диете при нормальном 12-часовом световом режиме. Эксперименты выполняли утром от 9 ч до 12 ч.

Уровень BDNF в структурах мозга определяли у животных, разделенных на следующие группы: 1-я — исходный контроль; мышей декапитировали моментально после взятия из клетки; 2-я — контроль на стрессирующее воздействие handling, включающий манипуляции с перемещением животных из клетки и введением физиологического раствора внутривентриально. Забой проводили через 1, 3 и 24 ч после инъекции; 3-я — введение афобазола внутривентриально в дозе 5 мг/кг, забой проводили через 1, 3 и 24 ч после инъекции препарата; 4-я — на фоне handling через 1 ч после инъекции физиологического раствора мышью помещали в тест открытое поле (ОП) в модификации П. М. Бородина [16], забой животных проводили через 1, 3 и 24 ч после эксперимента в ОП; 5-я — введение афобазола внутривентриально в дозе 5 мг/кг за 1 ч до эксперимента в ОП, забой животных проводили через 1, 3 и 24 ч после эксперимента в ОП.

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



Уровень BDNF в процентах от контроля (100 %) в гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и коре мышей линий BALB/c (а) и C57BL/6 (б) через 1 ч (I), через 3 ч (II) и через 24 ч (III) после стрессового воздействия.

I — контроль; 2 — инъекция физиологического раствора; 3 — инъекция афобазола (5 мг/кг); 4 — инъекция физраствора, через 1 ч помещение в ОП; 5 — инъекция афобазола (5 мг/кг), через 1 ч помещение в ОП. Различия достоверны по сравнению с 1-й группой: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; с 2-й группой: ^ —  $p < 0,05$ ; ^^ —  $p < 0,01$ ; ^^ —  $p < 0,001$ ; с 4-й группой: # —  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$ ; ### —  $p < 0,001$ .

В отдельной серии опытов BDNF исследовали у мышей, испытывавших в качестве стрессирующего воздействия handling, включающий перенос из клетки и введение физраствора внутрибрюшинно через каждые 6 ч в течение суток — контрольная группа. В опытной группе после взятия животных из клетки через каждые 6 ч в течение суток афобазол вводили внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Забой животных проводили через 6 ч после последней инъекции. В данной серии выполнены дополнительные контрольные эксперименты по определению уровня BDNF, аналогично описанным для 1-й группы.

Афобазол (2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этоксисбензимидазола дигидрохлорид) — синтезирован в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Препарат исследован в виде субстанции, растворенной в 0,9 % NaCl.

Определение содержания BDNF. Из головного мозга выделяли гипоталамус, гиппокамп, стриатум и кору, которые хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Полученные образцы гомогенизировали при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  политроном (Tissue Tearor™ Biospec products, Inc.) в экстракционном буфере, содержащем Tris, Triton и ингибиторы протеаз. Концентрацию BDNF определяли методом иммуноферментного анализа в модификации ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) по протоколу фирмы "Promega" (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Jandel Scientific SigmaPlot и STATISTICA 6.0. для Windows и *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей работе обосновано представление результатов определения уровня BDNF в структурах мозга в процентах от контрольных значений, определенных при моментальном забое животных [5].

Из рисунка I, а видно, что handling приводит к достоверному уменьшению BDNF в гипоталамусе, гиппокампе и коре у мышей BALB/c. Во всех случаях афобазол также статистически достоверно предотвращал наблюдаемое снижение (рисунок I, а). В стриатуме через 1 ч после handling уровень нейротрофина повышался, аналогичное действие оказывал афобазол (рисунок I, а). Помещение мышей BALB/c в ОП не приводило к дополнительному снижению содержания BDNF в гипоталамусе и гиппокампе, а в стриатуме и коре его уровень не отличался от исходного контроля. Однако во всех 4 исследованных структурах афобазол способствовал повышению содержания BDNF на фоне стрессирующих воздействий handling и ОП (рисунок I, а).

У мышей C57BL/6 handling также вызывал падение содержания нейротрофина (рисунок I, б). Следует отметить, что исходное содержание BDNF у мышей C57BL/6 было ниже, чем у BALB/c, во всех структурах, кроме стриатума [5]. Афобазол препятствовал уменьшению, вызываемому handling, однако уровень нейротрофина не достигал исходного (рисунок I, б). После эксперимента в ОП на фоне handling уровень BDNF оказался сходным с зарегистрированным в группе 1 в стриатуме и коре и оставался меньше исходного в гипоталамусе и гиппокампе. Афобазол у мышей C57BL/6 не влиял на эффекты эксперимента в ОП (рисунок I, б).

Анализ изменений BDNF через 3 ч после handling показал, что у мышей BALB/c уровень нейротрофина

достоверно увеличивается в гиппокампе и коре и уменьшается в стриатуме (рисунок II, а). Афобазол достоверно увеличивал уровень BDNF во всех структурах, кроме гиппокампа. Помещение мышей BALB/с в ОП приводило к снижению содержания BDNF в гипоталамусе, а в остальных структурах его уровень не отличался от исходного контроля. Эффекты афобазола через 3ч после стрессирующих воздействий не были выражены (рисунок II, а).

У мышей C57BL/6 в трехчасовом эксперименте уровень BDNF менялся разнонаправлено: handling вызывал увеличение, а афобазол — снижение содержания нейротрофина во всех исследованных структурах (рисунок II, б). Помещение мышей в ОП также приводило к увеличению уровня BDNF в гиппокампе и коре и к уменьшению в гипоталамусе. Афобазол достоверно увеличивал уровень нейротрофина во всех структурах, кроме стриатума (рисунок II, б).

В 24-часовом эксперименте у мышей BALB/с наблюдали достоверное падение уровня BDNF во всех структурах на фоне handling, которое в этот срок не модифицировалось при однократной инъекции афобазола. После эксперимента в ОП содержание нейротрофина также было снижено, только в гипоталамусе афобазол способствовал его небольшому повышению (рисунок II, б).

У мышей C57BL/6 через 24 ч после handling уровень BDNF не отличался от исходного, небольшое увеличение отмечено в стриатуме и коре. Афобазол на фоне handling не вызывал изменений, за исключением коры, где наблюдали небольшое увеличение BDNF (рисунок II, б). В то же время эксперимент в ОП приводил к увеличению содержания нейротрофина, которое не изменялось при введении афобазола в стриатуме и коре, но было меньше в гипоталамусе и гиппокампе (рисунок II, б).

Полученные данные соответствуют результатам предыдущих работ, демонстрирующих падение содержания BDNF в структурах мозга после эмоционально-стрессового воздействия, а также исследованиям, в которых были установлены разнонаправленные для отдельных структур сдвиги [14, 18]. Полученные данные указывают на выраженные различия в реакциях животных исследованных линий, оцененных по изменениям BDNF, на ОП. Если у BALB/с наблюдали про-

тивоположные эффекты эмоционально-стрессового воздействия и афобазола, то у C57BL/6 в большинстве случаев таких закономерностей не выявлено. Эти результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о высокой чувствительности мышей BALB/с к эмоционально-стрессовому воздействию в ОП и резистентности к таковому у C57BL/6 [9, 16]. Отмеченное соответствие дополняется данными, показывающими, что в экспериментах, включающих воздействие новой обстановки, афобазол оказывал анксиолитическое действие у мышей BALB/с, не влияя на C57BL/6 [16]. Изменения в уровне BDNF, зарегистрированные в суточном эксперименте, также подтверждают имеющиеся межлинейные различия в характере эмоционально-стрессовой реакции исследованных животных. Отсутствие через 24 часа выраженных эффектов афобазола может быть объяснено недостаточностью однократного введения препарата.

Для проверки этой гипотезы выполнена дополнительная серия опытов с 4-кратным введением физраствора в течение 24 ч, что рассматривалось как стрессирующее воздействие handling, и введением афобазола каждые 6 часов в течении суток. Данные о содержании BDNF, установленные через 6 ч после последней инъекции, приведены в таблице. Контрольные показатели исходного уровня BDNF, также определенные в данной серии, соответствовали ранее зарегистрированным [5]. Как видно из таблицы, стрессирующее воздействие handling приводило к достоверному снижению BDNF в гипоталамусе, стриатуме и коре мышей BALB/с. Афобазол при 4-кратном введении предотвращал наблюдаемое снижение. Противоположный эффект отмечен в гиппокампе (таблица).

У мышей C57BL/6 на фоне handling достоверное снижение BDNF выявлено в гипоталамусе и коре, а в гиппокампе и стриатуме его содержание увеличивалось. На фоне афобазола более высокий уровень BDNF по сравнению с handling отмечен лишь в гипоталамусе, в остальных структурах содержание нейротрофина было меньшим (таблица).

Таким образом, в дополнительной серии опытов показано, что стрессирующее воздействие вызывает выраженное падение уровня BDNF в исследованных структурах мозга мышей BALB/с, за исключением гиппокампа. Данные по гиппокампу у мышей BALB/с

#### Влияние афобазола на содержание BDNF в гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и коре большого мозга мышей BALB/с и C57BL/6 при повторных стрессовых воздействиях

Линия	Группа	Гипоталамус	Гиппокамп	Стриатум	Кора
BALB/с	1-я	0,28 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02
	2-я	0,23 ± 0,02***	0,25 ± 0,04	0,06 ± 0,01**	0,05 ± 0,01***
	3-я	0,26 ± 0,03^^	0,21 ± 0,03^^	0,07 ± 0,01^^	0,08 ± 0,01^^^
C57BL/6	1-я	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	2-я	0,18 ± 0,01***	0,25 ± 0,04***	0,05 ± 0,01**	0,05 ± 0,01*
	3-я	0,19 ± 0,02^	0,19 ± 0,03^^^	0,03 ± 0,01^^^	0,05 ± 0,01***

согласуются с результатами исследований [11]. Афобазол при повторных введениях препятствовал уменьшению содержания нейротрофина. Другая направленность влияния стрессирующих воздействий на уровень BDNF у мышей C57BL/6 подтверждает различия в механизмах формирования эмоционально-стрессовой реакции мышей BALB/c и C57BL/6 [16]. Объяснение этих фактов требует дополнительных исследований, однако очевидно, что линия мышей BALB/c, не устойчивых к примененному виду стресса, является более адекватной моделью для выполненного эксперимента.

Установленные на мышцах BALB/c противоположные влияния стрессирующего воздействия и афобазола на уровень BDNF дают основание для заключения о связи выявленных изменений с механизмами формирования эмоционально-стрессового ответа с выраженной реакцией страха и анксиолитического эффекта афобазола. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы о сочетании анксиолитических и нейропротекторных свойств афобазола.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены межлинейные различия в изменениях уровня BDNF у животных с различным фенотипом эмоционально-стрессовой реакции. Для мышей BALB/c характерно выраженное снижение BDNF через 1 и 24 ч после стрессовых воздействий. У мышей C57BL/6 стресс вызывает меньшее снижение уровня BDNF через 1 ч, а через 24 ч содержание нейротрофина восстанавливается.

2. Афобазол (5 мг/кг внутривентриально) при однократном введении препятствует снижению уровня BDNF через 1 ч после воздействия стрессирующих факторов. Эффект афобазола более выражен у мышей BALB/c. Через 24 ч после однократного введения влияние афобазола на содержание BDNF не выявлено.

3. Повторные стрессирующие воздействия handling приводят к значительному снижению содержания

BDNF в гипоталамусе, коре и стриатуме мозга мышей BALB/c. Афобазол при 4-кратном введении внутривентриально в дозе 5 мг/кг восстанавливал уровень BDNF до контрольных значений у мышей данной линии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласаян, *Автореф. дис. д-ра. фарм. наук*, Ереван (2003).
2. А. В. Вальдман, М. М. Козловская, О. С. Медведев, *Фармакологическая регуляция эмоционального стресса*, Медицина, Москва (1979).
3. И. П. Галаева, Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, **140**(11), 545 – 549 (2005).
4. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян и др., *Бюл. exper. биол.*, **140**(8), 161 – 163 (2005).
5. Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, М. А. Яркова и др., *Бюл. exper. биол.*, **140**(11), 549 – 552 (2005).
6. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков и др., *Exper. и клин. фармакол.*, **64**(2), 15 – 19 (2001).
7. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина и др., *Exper. и клин. фармакол.*, **67**(5), 9 – 12 (2004).
8. S. Bruce, *Science Press Ltd*, London, UK (2004), pp. 51 – 60.
9. C. S. Hall, *J. Comp. Physiol.*, **18**(2), 385 (1934).
10. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, et al., *Molecular cell biology*, Freeman&Company (2004).
11. F. Marmigere, F. Rage, L. Givalois, et al., *Hippocampus*, **13**, 646 – 655 (2003).
12. A. McAllister and L. Katz & Lo D Annu., *Rev. Neurosci.*, **22**, 295 – 318 (1999).
13. PCT / RU 95 / 00085
14. A. M. Rasmusson, L. Shi, and R. Duman, *Neuropsychopharmacology*, **27**(2), 133 – 142 (2002).
15. S. K. Schultz, C. S. Castillo, J. T. Kosier, and R. G. Robinson, *Am. J. Geriat. Psych.*, **5**, 229 – 237 (1997).
16. S. B. Seredenin, *Psychopharmacol. and Biological. Narcol.*, **1** – 2, 494 – 509 (2003).
17. Y. Shirayama, A. Chen, S. Nakagawa, et al., *Neuroscience*, **22**(8), 3251 – 3261 (2002).
18. L. Tapia-Arancibia, F. Rage, L. Givalois, and S. Arancibia, *Neuroendocrinol.*, **25**, 77 – 107 (2004).

Поступила 05.12.05

## EFFECTS OF AFOBAZOLE ON THE BDNF CONTENT IN BRAIN STRUCTURES OF INBRED MICE WITH DIFFERENT PHENOTYPES OF EMOTIONAL STRESS REACTION

A. B. Seredenin, D. S. Melkumyan, E. A. Val'dman, M. A. Yarkova, T. S. Seredenina, M. V. Voronin, and A. S. Lapitskaya

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

Changes in the BDNF content in brain structures — hippocampus, hypothalamus, striatum, and frontal cortex — were determined in mice of different emotional-stress reaction phenotypes, which were subjected to emotional stress and treated by the selective anxiolytic afobazole. The changes were different in BALB/c and C57BL/6 mice. Afobazole exhibited a significant protector action against a decrease in the brain BDNF level caused by emotional stress in BALB/c mice.