

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ АФОБАЗОЛА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

С. Б. Середенин¹, О. В. Поварова², О. С. Медведев², Е. А. Вальдман¹, Т. С. Середенина¹

Изучено нейропротекторное действие селективного анксиолитика афобазола при моделировании ишемического инсульта у крыс методом окклюзии левой средней мозговой артерии с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии. Установлено, что афобазол проявляет защитное действие в дозах от 0,1 до 5 мг/кг внутривнутрибрюшинно при отсроченной до 24 ч первой инъекции после операции с двукратным введением в последующие два дня.

Ключевые слова: афобазол, окклюзия средней мозговой артерии, нейропротекция

ВВЕДЕНИЕ

В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН выполнен цикл работ по созданию оригинального селективного анксиолитика афобазола, который включен в номенклатуру лекарственных средств, зарегистрированных в России в 2005 году. Механизм действия афобазола заключается в восстановлении связывающей способности бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецепторного комплекса [5], нарушения которой индуцируются эмоционально-стрессовыми воздействиями и регистрируются у больных с тревожными расстройствами [11, 12, 14, 18, 20]. Показано также, что афобазол обладает антиоксидантными свойствами [19], предотвращает усиление продукции NO и увеличивает активность сукцинатдегидрогеназы при моделировании ишемии мозга [1, 8], восстанавливает нормальный уровень BDNF в структурах мозга мышей, изменяющийся при стрессовом воздействии [6].

В опытах *in vitro* афобазол проявил нейропротекторные свойства при моделировании оксидативного стресса и глутаматной токсичности [3]. В прямом эксперименте на модели геморрагического инсульта препарат проявил защитные свойства при отсроченном введении [2].

Целью настоящей работы явилось исследование нейропротекторного действия афобазола на модели ишемического инсульта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 350–450 г (питомник РАМН “Столбовая”). Фокальную ишемию моделировали по методу [13].

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Кафедра фармакологии (зав. — проф. О. С. Медведев) МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 119192, пр. Ломоносовский, 31/5.

У животных после введения этаминал-натрия (40 мг/кг внутривнутрибрюшинно) в месте шва скуловой и лобной кости делали отверстие диаметром 2 мм, обнажая место пересечения средней мозговой артерии с нижней мозговой веной. Под микроскопом под левую среднюю мозговую артерию подводили металлический крючок. С помощью коагулятора осуществляли окклюзию средней мозговой артерии (ОСМА) проксимальнее места ее бифуркации на фронтальную и паритетальную ветви. При этом в поле зрения микроскопа наблюдалось прекращение тока крови по средней мозговой артерии выше места коагуляции. ОСМА сочетали с перевязкой ипсилатеральной сонной артерии.

Через 72 ч после ОСМА животных декапитировали, извлекали головной мозг и определяли объем инфаркта методом гистохимического окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ) [10]. Затем для каждого окрашенного среза проводили двустороннее фотографирование цветной видеокамерой CCD IRIS (“SONY”). С помощью программы МОСНА (Jandel Scientific, версия 1.2.0.0) проводили планиметрию, определяли площадь ипсилатерального полушария (ИП) и зоны поражения (ЗП). Объем ЗП и ИП вычисляли по общей формуле “трапеции”:

$$V = d [1/2[S_1 + S_n] + S_2 + \dots + S_i + \dots + S_{n-1}],$$

где d — толщина среза, S_1, S_n, S_{n-1} — площадь ЗП и ИП для каждого среза, с последующим определением процента объема ЗП относительно ИП.

Для анализа нейропротекторных свойств афобазола использовали следующие схемы его внутривнутрибрюшинного введения:

1 группа — афобазол (5 мг/кг) в момент окклюзии с двукратным введением в 10 ч и 20 ч в той же дозе в последующие два дня; 2 группа — афобазол (5 мг/кг) через 3 ч после окклюзии, далее аналогично группе 1; 3 группа — афобазол (5 мг/кг) через 6 ч после окклюзии, далее аналогично группе 1; 4 группа — афобазол

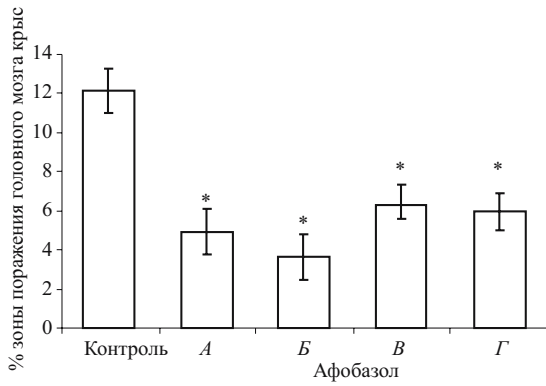


Рис. 1. Зона инфаркта головного мозга крыс через 72 ч после окклюзии левой средней мозговой артерии в контрольной группе и группах животных, получавших афобазол в дозе 5 мг/кг в момент операции (А) и через 3 ч после операции (Б), через 6 ч после операции (В) и через 24 ч после операции (Г).

По оси ординат — отношение объема зоны поражения к объему ипсилатерального полушария, %. По оси абсцисс: контроль — контрольные животные с окклюзией средней мозговой артерии + физраствор; А — животные с окклюзией средней мозговой артерии + афобазол 5 мг/кг внутривенно в момент операции; Б — животные с окклюзией средней мозговой артерии + афобазол 5 мг/кг внутривенно через 3 ч после операции; В — животные с окклюзией средней мозговой артерии + афобазол 5 мг/кг внутривенно через 6 ч после операции; Г — животные с окклюзией средней мозговой артерии + афобазол 5 мг/кг внутривенно через 24 ч после операции.

* — достоверность отличий от контрольных животных с окклюзией средней мозговой артерии, $p \leq 0,01$.

(5 мг/кг) через 24 ч после окклюзии; вторую инъекцию препарата осуществляли в 20 ч вторых суток, далее на 3-й день в 10 ч и 20 ч в той же дозе; 5 группа — афобазол (1 мг/кг) через 6 ч после окклюзии с двукратным введением в 10 ч и 20 ч в той же дозе в последующие два дня; 6 группа — афобазол (0,1 мг/кг) через 6 ч после окклюзии, далее аналогично группе 5; 7

Результаты контрольных серий опытов по моделированию окклюзии средней мозговой артерии

Животное	Контрольные группы животных с ОСМА (% зоны поражения от объема ипсилатерального полушария)		
	I серия	II серия	III серия
1	18,46	16,73	15,4
2	2,38	12,79	5,9
3	11,88	14,42	8,57
4	20,86	9,23	11,5
5	8,55	13,64	13,86
6	12,69	10,37	16,80
7	11,58	8,65	8,60
8	10,91	11,25	10,50
9	—	—	9,00
10	—	—	—
MEAN	12,16	12,14	11,1
SED	2,01	0,98	1,2
SEM	5,68	2,76	3,59

Примечание. Достоверные различия между группами отсутствуют.

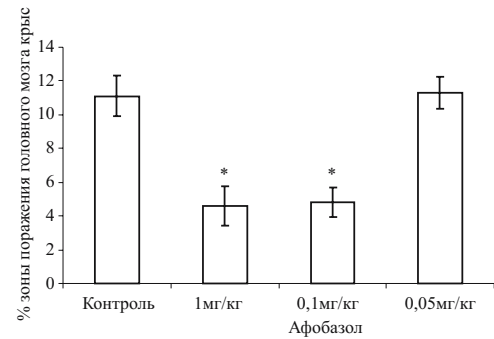


Рис. 2. Зона инфаркта головного мозга крыс через 72 ч после окклюзии левой средней мозговой артерии в контрольной группе и группах животных, получавших афобазол в дозах 1 мг/кг; 0,1 мг/кг через 6 ч после операции и в дозе 0,05 мг/кг через 24 ч после операции.

По оси ординат — отношение объема зоны поражения к объему ипсилатерального полушария, %. По оси абсцисс: контроль — контрольные животные с окклюзией средней мозговой артерии + физраствор. * — достоверность отличий от контрольных животных с окклюзией средней мозговой артерии, $p \leq 0,01$. Изменения в группе животных, получавших афобазол в дозе 0,05 мг/кг через 24 ч после операции, не являются достоверными ($p > 0,05$ относительно контрольной группы).

группа — афобазол (0,05 мг/кг) через 24 ч после окклюзии, далее в той же дозе аналогично группе 4.

Животные контрольных серий получали соответствующий объем физраствора.

Результаты представлены в виде средних величин и ошибки среднего. Для межгрупповых сравнений применяли критерий Крускала — Уоллиса. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 4.0 (Statistica Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологический анализ срезов головного мозга показал, что после ОСМА у крыс формируется зона инфаркта, которую при окрашивании ТТХ легко отличить от здоровой ткани. Следует отметить, что используемая в эксперименте модель фокальной ишемии головного мозга [9, 13, 15 – 17, 21] является наиболее воспроизводимой и легко переносится животными. При этом отмечается поражение лобнотемной области коры большого мозга животных [9, 13, 21], что приводит к формированию у них неврологического дефицита [9, 15 – 17], нарушению когнитивных функций [17, 21]. Сокращение зоны поражения в ЦНС сопряжено с нормализацией неврологического статуса животных [16, 17].

В трех контрольных группах, изученных в соответствии с протоколом эксперимента при разных поставках животных из питомника, зона поражения составила $12,16 \pm 2,01$ %; $12,14 \pm 0,98$ % и $11,1 \pm 1,2$ % от общего объема ипсилатерального полушария, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости модели (таблица).

При одновременном с окклюзией введении афобазола в дозе 5 мг/кг очаг поражения составил $4,91 \pm 1,13$ %; при отсрочке первого введения на 3 ч — $3,55 \pm 0,77$ %; на 6 ч — $6,26 \pm 1,24$ %; на 24 ч — $5,38 \pm 0,75$ %. Достоверные различия между группами животных, которым афобазол вводили после операции, отсутствуют (рис. 1).

В следующих сериях опытов снижали дозу афобазола. Установлено, что после первой инъекции препарата из расчета 1 и 0,1 мг/кг через 6 ч операции также как и в случае больших доз происходит уменьшение зоны поражения до $4,6 \pm 0,4$ % и $4,8 \pm 0,87$ % соответственно (рис. 2). Только при снижении дозы до 0,05 мг/кг и увеличении интервала между ОСМА и первой инъекцией препарата до 24 ч защитное влияние не регистрировалось (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что афобазол обладает выраженным нейропротекторным действием при моделировании ишемического инсульта. Результаты проведенных экспериментов соответствуют ранее установленным в опытах *in vitro* и *in vivo* [1–4, 6–8]. Защитный эффект афобазола проявляется при отсроченном до 24 ч первом введении после операции, что определяет перспективу использования препарата в качестве лекарственного средства в терапии ишемического инсульта. Важно, что защитное действие афобазола обнаружено в диапазоне доз от 0,1 до 5 мг/кг, соответствующем его анксиолитическим дозам, определенным на экспериментальных моделях при внутрибрюшинном введении.

Таким образом, результаты настоящей работы в совокупности с данными предыдущих исследований позволяют сделать заключение о целесообразности изучения афобазола в качестве нейропротекторного средства в клинических исследованиях.

ВЫВОД

Афобазол в дозах от 0,1 до 5 мг/кг оказывает защитное действие, уменьшая очаг поражения головного мозга крыс, вызванный окклюзией левой средней мозговой артерии. Протекторный эффект регистриру-

ется как при одновременном с окклюзией введении препарата, так и при его использовании через 3, 6 и 24 ч после операции с последующими инъекциями дважды в день в течение двух суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласанян, *Мед. наука Армении*, **42**(3), 25 – 30 (2002).
2. И. П. Галаева, Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, **140**(11), 545 – 549 (2005).
3. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян и др., *Бюл. exper. биол.*, **140**(8), 161 – 163 (2005).
4. Р. С. Мирзоян, А. В. Топчан, М. Г. Баласанян, *Exper. и клин. фармакол.*, **59**(5), 62 – 64 (1996).
5. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
6. С. Б. Середенин, Д. С. Мелкумян, Е. А. Вальдман и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 3 – 6 (2006).
7. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(5), 9 – 12 (2004).
8. M. G. Balasanyan, A. S. Kanayan, and A. V. Thopchyan, *Acta Physiol. Hung.*, **89**(1–3), 198(2002).
9. F. C. Barone, R. K. Clark, W. J. Price, et al., *Brain Res.*, **623**, 77 – 82(1993).
10. J. B. Bederson, L. H. Pitts, S. M. Germano, et al., *Stroke*, **17**, 1304 – 1308, (1986).
11. J. D. Bremner, R. B. Innis, T. White, et al., *Biol. Psychiatry*, **47**, 96 – 106(2000).
12. J. D. Bremner, R. B. Innis, S. M. Southwich, et al., *Am. J. Psychiatry*, **157**(7), 1120 – 1126(2000).
13. S. T. Chen, C. Y. Hsu, E. L. Hogan, et al., *Stroke*, **17**(4), 738 – 743 (1986).
14. S. I. Deutsch, R. B. Rosse, and J. Mastropaolo, *Clin. Neuropharmacol.*, **17**(3), 205 – 228(1994).
15. J. K. McGill, L. Gallagher, H. V. O. Carswell, et al., *Stroke*, **36**, 135 – 141(2005).
16. H. Kawai, H. Nakai, M. Suga, et al., *JPET*, **281**(2), 921 – 927 (1997).
17. Y. Numagami and S. T. Ohnishi, *J. Nutrition*, **131**(3), 1100S – 1105S (2001).
18. D. Nutt, *Internat. J. Neuropsychopharmacology.*, **7**(1), 17(2004).
19. S. B. Seredenin, *Psychopharm. and Biol. Narcology.*, 1 – 2, 494 – 509 (2003).
20. D. J. Stein, *CNS Spectrums.*, **10**(12), 930 – 934(2005).
21. R. P. Stroemer, T. A. Kent, and C. E. Hulsebosch, *Stroke*, **29**, 2381 – 2395 (1998).

Поступила 10.02.06

EVIDENCE FOR THE NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF AFOBAZOLE IN EXPERIMENTAL MODEL OF FOCAL BRAIN ISCHEMIA

S. B. Seredenin¹, O. V. Povarova², O. S. Medvedev², E. A. Val'dman¹, T. S. Seredenina¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia;

² Department of Pharmacology, Moscow State University, Lomonosovskii pr. 31/5, Moscow, 119192 Russia

The neuroprotective effect of the new selective anxiolytic afobazole was evaluated in rats with ischemic stroke produced by the occlusion of the left middle cerebral artery, with simultaneous ligation of the ipsilateral carotid artery. Afobazole exhibits a protective effect in a dose range from 0.1 to 5.0 mg/kg for the first injection delayed 24 h after operation and double daily injections over the following two days.