

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛАДАСТЕНА

М. А. Яркова, М. В. Воронин, С. Б. Середенин¹

Изучено влияние ладастена [N-(2-адамантил)-N-(парабромфенил)амин] на поведение крыс с генетически детерминированной реакцией на стресс в тесте “открытое поле”. Установлено, что ладастен (30 мг/кг внутривнутрибрюшинно) вызывает анксиолитический эффект у крыс MR, не влияя на поведение MNRA. Выявлены вызванные стрессом нарушения в регуляции связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецептора у крыс MR, но не у MNRA. Изменения рецепции предотвращались ладастеном в анксиолитической дозе.

Ключевые слова: ГАМК_A-бензодиазепиновый рецепторный комплекс, инбредные крысы, эмоциональный стресс

ВВЕДЕНИЕ

Астенические состояния — симптомокомплекс, имеющий причинно-следственную связь со многими распространенными заболеваниями, усугубляющий их течение и осложняющий восстановительный период [9]. Астенические проявления возникают и у лиц, не прерывающих трудовую деятельность, вследствие различного рода перегрузок, экстремальных воздействий, что сопровождается снижением физической и умственной работоспособности. Близким по существу патологического состояния является синдром хронической усталости, представленный в МКБ-10 [6].

Для фармакотерапии астенических расстройств применяют психостимуляторы, анксиолитики, ноотропы, препараты метаболического действия, витаминные комплексы и др., выбор которых требует индивидуального подхода [1, 17]. Часто для лечения астенических расстройств необходима комбинация препаратов [1]. Поэтому в качестве перспективного средства представляет интерес соединение N-(2-адамантил)-N-(парабромфенил)амин, получившее название ладастен [13].

Ладастен первоначально характеризовался как психостимулятор с выраженным иммунопозитивным действием [7, 8]. Дополнительное изучение его эффектов на животных с генетически детерминированной freezing-реакцией на эмоциональный стресс позволило выявить наличие анксиолитических свойств [11, 12].

Нейрохимическими исследованиями показано, что психостимулирующее действие ладастена обусловлено активацией дофаминергической передачи [5]. Механизм анксиолитического эффекта оставался неясным, однако его регистрация у инбредных животных с “пассивным” фенотипом эмоционально-стрессовой реакции, с одной стороны, а, с другой — наличие у

препарата мембраностабилизирующих свойств [4], позволили предположить вовлеченность системы ГАМК_A-рецептора, исходя из фармакогенетических данных о ее нарушениях при стрессе [10].

Целью настоящей работы явилось выяснение влияния ладастена на связывающую способность бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецепторного комплекса в головном мозге крыс линий MR и MNRA при эмоционально-стрессовом воздействии в тесте “открытое поле” (ОП).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполняли на крысах-самцах линий MR и MNRA массой 200 – 250 г, племядро которых получено из питомника Winston Salem (США), разведение продолжено в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария по 6 особей в клетке при 12-часовом световом режиме в течение двух недель до эксперимента. Исследования проводили в осенне-зимний период с постановкой опытов в первой половине дня.

Ладастен синтезирован в опытно-технологическом отделе НИИ фармакологии под руководством Б. М. Пятинина и Н. И. Авдюниной. Препарат вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг за 90 мин до эксперимента в ОП.

Для радиолигандного анализа использовали N-метил-³H-диазепам (Радиевый институт им. В. Г. Хлопина, удельная активность 67,4 Ки/ммоль), γ-аминомасляную кислоту (“Сигма”), диазепам (Одесский физико-химический институт им. А. В. Богатского АН Украины).

Метод “открытое поле”. Эмоционально-стрессовое воздействие моделировали в тесте “открытое поле” в модификации [3]. Животных перед помещением в ОП выдерживали в темноте в течение 3 мин, па-

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

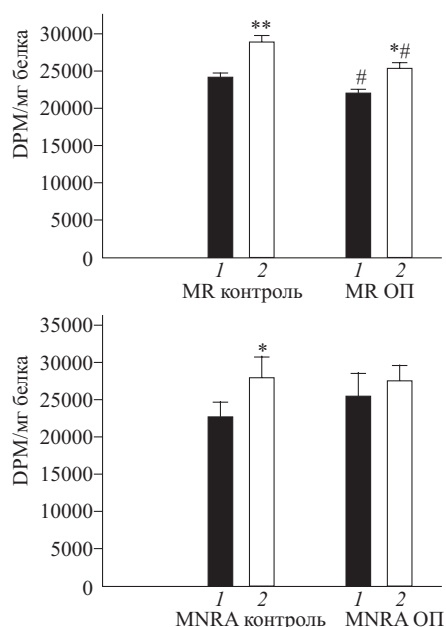


Рис. 1. Влияние эмоционально-стрессового воздействия в ОП на связывание [³H]- диазепама мембранными препаратами крыс MNRA и MR.

Данные представлены в виде М + S. Е. М. * — $p < 0,05$ (T-test); достоверное увеличение рецепции ³H-диазепама при добавлении ГАМК (ГАМК шифт); ** — $p < 0,001$ (T-test); достоверный ГАМК шифт; # — $p < 0,05$ (ANOVA); различия в сравнении с контролем. Здесь и на рис. 2: 1 — базальное связывание, 2 — ГАМК.

параметры поведения в ОП регистрировали в течение 5 мин.

Радиолигандный анализ. Сразу после эксперимента в ОП крыс декапитировали, извлекали головной мозг, отделяли ствол и мозжечок. Оставшуюся часть гомогенизировали в 16 мл ледяного (0–4 °С) 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,4) используя гомогенизатор Ultra-turraх T25 (IKA-labortechnik). Полученную суспензию центрифугировали при 42 000 g в течение 25 мин в ультрацентрифуге Optima L-70K (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 20 мл трис-НСl буфера и

использовали по 250 мкл в процедуре связывания [³H]-диазепама.

Мембранную фракцию головного мозга инкубировали с N-метил-³H-диазепамом в конечной концентрации 1 нМ в течение 30 мин при температуре таящего льда (0–4 °С). Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого диазепама (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим. Влияние ГАМК на связывание [³H]-диазепама изучали при ее добавлении в инкубационную среду в конечной концентрации 200 мкМ. Объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Процесс связывания останавливали путем добавления ледяного буфера и быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры типа GF/B (Whatman) с последующей двукратной промывкой ледяным буфером общим объемом 8 мл.

Фильтры высушивали в течение 12 ч при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объемом 5 мл. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счетчике Wallac 1411. Эффективность счета составляла 45 %. Неспецифическое связывание составляло не более 10 % от общего.

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури.

Оценку достоверности полученных результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA; post-hoc: Fisher LSD test) и Т-теста для независимых переменных. Статистический анализ данных проводили с применением интегрированного пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры поведения крыс MNRA и MR в ОП приведены в таблице. Контрольные результаты по локомоциям соответствуют данным [14], что подтверждает характеризующие животных межлинейные различия. Ладастен в дозе 30 мг/кг повышал периферическую и общую двигательную активность крыс MR, в отличие от MNRA, у которых наблюдаемые сдвиги оказались недостоверными (см. таблицу). Эти результаты полностью соответствуют данным, полученным ранее на

Влияние ладастена на уровень двигательной активности в тесте ОП крыс MR и MNRA

Группа животных	Виды двигательной активности					Количество дефекаций
	периферическая	вертикальная	центральная	центр	общая	
MNRA						
Контроль $n = 6$	15,8 ± 3,3	1,8 ± 0,9	2,0 ± 1,3	0,2 ± 0,2	19,8 ± 5,1	2,7 ± 0,6
30 мг/кг $n = 6$	27,7 ± 4,4	3,5 ± 1,7	3,0 ± 1,1	0,3 ± 0,2	34,5 ± 5,7	1,8 ± 0,7
MR						
Контроль $n = 6$	6,2 ± 1,4*	0,2 ± 0,2	—	—	6,3 ± 1,6*	1,8 ± 1,0
30 мг/кг $n = 6$	11,0 ± 1,2#**	2,8 ± 1,9	1,3 ± 0,9	0,3 ± 0,2	15,5 ± 3,6#*	2,7 ± 0,8

Примечание. Межлинейные различия по параметру поведения — в группе: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$; при введении ладастена: # — $p < 0,05$.

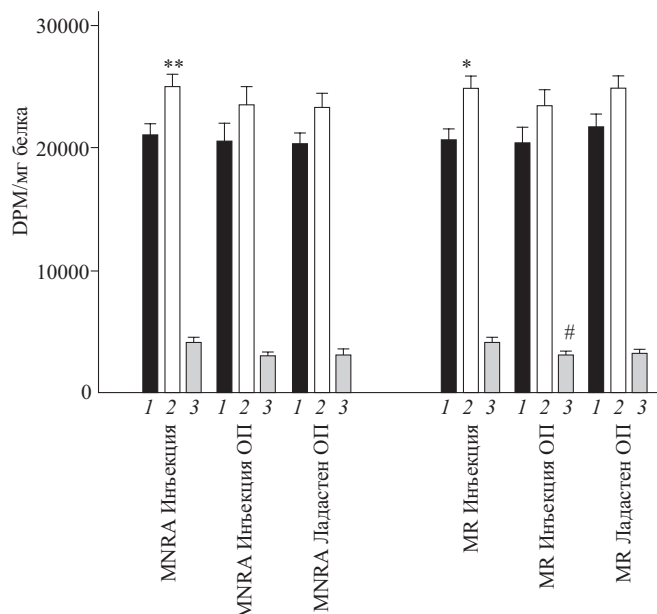


Рис. 2. Влияние ладастена на связывание [^3H]-дiazепама мембранными препаратами крыс MNRA и MR после эмоционально-стрессового воздействия в ОП.

Данные представлены в виде $M + S. E. M.$ * — $p < 0,05$ (T-test); достоверный ГАМК шифт; ** — $p < 0,01$ (T-test); достоверный ГАМК шифт; 3 — разница между ГАМК-стимулированным и базальным связыванием. # — $p < 0,05$ (ANOVA); достоверные различия по параметру 3 в сравнении с контролем (MR инъекция). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

мышьх C57BL/6 и BALB/c, продемонстрировавшим анксиолитическое действие препарата у животных с freezing-реакцией [11, 12]. Таким образом, на вновь использованной экспериментальной модели подтверждена направленность анксиолитического действия ладастена на пассивный фенотип эмоционально-стрессового ответа.

В следующей серии опытов изучали межлинейные различия в связывании ^3H diaзепам мембранной фракцией головного мозга крыс MNRA и MR. У интактных животных различий в рецепции [^3H]-diazепама не обнаружено (рис. 1). Помещение интактных крыс в ОП приводило к падению бензодиазепинового связывания у крыс MR, чего не наблюдали у MNRA (рис. 1). Таким образом, вновь, на другом виде животных, установлено, что эмоционально- стрессовое воздействие в ОП индуцирует снижение связывающей способности в бензодиазепиновом участке у особей с выраженной реакцией страха, но не у активных. Эти данные полностью соответствуют полученным на мышьях C57BL/6 и BALB/c [2, 16].

На фоне контрольной инъекции физиологического раствора достоверных межлинейных различий в абсолютных значениях связывания радиолиганда после эксперимента в ОП установить не удалось (рис. 2).

Однако, как и в случае с мышьями C57BL/6 и BALB/c [16], показано, что мембраны стрессированных MR крыс в меньшей, по сравнению с MNRA, сте-

пени отвечают на стимулирующее связывание [^3H]-diazепама действие ГАМК (рис. 2). Последнее рассматривается в качестве фактора эндогенной регуляции ГАМК_A-рецепторного комплекса [15]. Таким образом, и в данной постановке эксперимента отмечены вызванные эмоциональным стрессом изменения в системе ГАМК_A-рецептора, способные обусловить ангиогенез по ранее описанному механизму [10]. Ладастен в анксиолитической дозе восстанавливал способность мембран крыс MR реагировать на добавление ГАМК увеличением рецепции [^3H]- diaзепам, что можно интерпретировать как предотвращение вызванных эмоциональным стрессом нарушений в регуляции ГАМК-передачи. Сходные данные были получены на мышьях BALB/c [16].

Таким образом, установленные результаты позволяют объяснить анксиолитическое действие ладастена нормализацией ГАМК-передачи за счет восстановления функциональной активности бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецептора.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждены исходные межлинейные различия по двигательной активности в тесте “открытое поле” крыс MNRA и MR, разведенных в России.
2. Эмоционально-стрессовое воздействие в тесте “открытое поле” вызывает нарушения в регуляции связывающей способности бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецептора у крыс MR, но не у MNRA.
3. Ладастен в дозе (30 мг/кг внутривенно) оказывает анксиолитическое действие у крыс MR в тесте “открытое поле”, не влияя на поведение животных MNRA.
4. Ладастен в дозе, вызывающей анксиолитический эффект, предотвращает индуцированные эмоциональным стрессом нарушения регуляции лигандного связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецепторного комплекса у крыс MR.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Александровский, *Пограничные психические расстройства*, Медицина, Москва (1993).
2. Ю. А. Бледнов, М. Л. Гордей, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. фармакол.*, № 1, 61 – 63 (1987).
3. П. М. Бородин, Л. Шюллер, Д. К. Беляев, *Генетика*, **12**(12): 62 – 71 (1976).
4. Н. Н. Золотов, С. А. Сергеева, А. С. Лосев, *IV конференция “Биоантиоксидант”*, 20 – 21(1993).
5. В. С. Кудрин, С. А. Сергеева, Л. М. Красных и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 8 – 11(1995).
6. МКБ10^{*} ASD10 Психические расстройства и расстройства поведения (F00-F99); МКБ10 адаптированная для использования в РФ), Москва (1998).
7. И. С. Морозов, Н. Г. Арцимович, Т. А. Фадеева и др., *Патент СССР № 1826906, Бюл. изобретений*, № 25 (1993).
8. И. С. Морозов, Н. В. Климова, Т. Д. Карпова, С. С. Шестопалов, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 2, 3 – 6 (1999).
9. А. Б. Смулевич, *Руководство по психиатрии*, А. С. Тиганова (ред.), Медицина, Москва (1999), сс. 527 – 606.

10. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
11. С. Б. Середенин, А. Г. Мирямедова, *Бюл. exper. биол.*, **11**, 529 – 31 (1999).
12. С. Б. Середенин, А. Г. Мирямедова, М. М. Козловская, *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(3), 3 – 6 (1999).
13. С. Б. Середенин, М. А. Яркова, Б. А. Бадьштов, Патент Российской Федерации № 2175229, *Бюл. изобретений*, № 30 (2001).
14. P. L. Broadhurst, *Behav. Genet.*, **5**(4), 299 – 319 (1975).
15. T. L. Martin and J. M. Candy, *Neuropharmacol.*, **17**, 993 – 998(1978).
16. S. B. Seredenin and Yu. A. Blednov, *A pharmacogenetic approach to the design of new selective, anxiolytic drugs*, in: Seredenin S. B., Longo V., Gaviraghi G. (Eds) *Biological Basis of individual Sensitivity to psychotropic drugs*, Graffham Press Ltd. Edinburg, 25 – 38(1994)
17. S. B. Seredenin, *Psychopharmacology & Biological Narcology*, 1 – 2: 494 – 509 (2003).

Поступила 26.09.04

STUDYING THE MECHANISMS OF LADASTEN ACTION

M. A. Yarkova, M. V. Voronin and S. B. Seredenin

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

The effect of N-(2-adamantyl)-N-(*p*-bromophenyl)amine (ladasten) on the behavior of MR and MNRA inbred rats with different emotional-stress reaction (ESR) phenotypes was studied in the conventional open-field test. Ladasten (30 mg/kg, i.p.) produced anxiolytic effect in MR rates, while not influencing MNRA animals. At the same time, a model stress induced disorder in the regulation of 3 H-diazepam binding to the benzodiazepine site of GABA_A receptor in MR (but not in MNRA) rats. Ladasten administered in the anxiolytic dose prevented stress-induced changes in reception at this site.