

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

АНАЛИЗ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВОГО УЧАСТКА ГАМК_A РЕЦЕПТОРА У МЫШЕЙ C57BL/6 И BALB/c ПРИ ВВЕДЕНИИ АНКСИОЛИТИКОВ

М. А. Яркова¹

Изучен уровень специфического связывания ³H-флуниотразапама синапсомембранными мембранами мозга мышей C57BL/6 и BALB/c после эксперимента в тестах “приподнятый крестообразный лабиринт” и “контакт с хищником” при введении анксиолитиков разной химической структуры и разных механизмов действия. Установлено падение бензодиазепиновой рецепции после эксперимента в “приподнятом крестообразном лабиринте” только у мышей BALB/c, а при “контакте с хищником” — у мышей обеих линий. Анксиолитическая активность афобазола, ладастена и ноопепта сопровождается нормализацией уровня бензодиазепиновой рецепции, нарушенной при стрессе различной модальности.

Ключевые слова: ГАМК_A-рецептор, афобазол, ладастен, ноопепт, эмоциональный стресс, инбредные мыши

ВВЕДЕНИЕ

Бензодиазепины имеют специфический участок связывания на ГАМК_A-рецепторе и являются его аллостерическими регуляторами [19]. Соединения данного класса, относящиеся к полным агонистам, усиливают рецепцию ГАМК, увеличивают транспорт ионов Cl⁻ в нейроны, что приводит к их гиперполяризации, и способны, в зависимости от структуры и дозы, вызывать анксиолитическое, седативное и снотворное действие [20]. Наоборот, вещества снижающие ГАМК-передачу (антагонисты, инверсные агонисты), опосредуют эффекты от анксиогенного до судорожного [21]. В ряде исследований выявлены эндогенные лиганды бензодиазепинового участка связывания, следовательно, лигандные взаимодействия в этом участке значимы для физиологических механизмов тревожности [8, 14]. В другой серии работ установлено, что состояния тревоги и страха, вызванные стрессовыми воздействиями, приводят к снижению бензодиазепиновой рецепции [2, 12, 15]. В нашей лаборатории установлено, что феномен стрессиндуцированного падения бензодиазепиновой рецепции зависит от наследственно контролируемого фенотипа стрессового ответа и от силы стрессорного фактора [13].

Целью настоящей работы явилось исследование изменений бензодиазепиновой рецепции при введении разных по структуре и механизмам действия анксиолитиков для выяснения вопроса, может ли данный па-

раметр служить показателем анксиолитического эффекта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Эксперименты выполнены на мышах-самцах инбредных линий C57BL/6 и BALB/c, массой 18–20 г, полученных из питомника “Пушино” — филиала Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова.

Выбор животных определен предыдущими исследованиями, демонстрирующими, что данные линии отличаются по эмоционально-стрессовой реакции, имитируя различия, характерные для класса млекопитающих [1].

Животных содержали в течение 10 суток до эксперимента по 20 особей в клетке типа 3Н в условиях вивария лаборатории фармакогенетики НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН со свободным доступом к воде и пище, при необращенном 12-часовом световом режиме.

В тесте “контакт с хищником” использовали 2-летнюю беспородную кошку.

Тест “приподнятый крестообразный лабиринт”. Эмоционально-стрессовое воздействие и оценку влияния анксиолитиков проводили в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” [25].

Тест “контакт с хищником”. Контрольных мышей помещали в прозрачную коробку из плексиглаза 40 × 40 × 20 см с прозрачной крышкой, снабженную отверстиями для вентиляции, по одной особи на 5 мин, после чего животных мгновенно декапитировали.

¹ Лаборатория фармакогенетики (руководитель — акад. РАМН С. Б. Середенин) НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

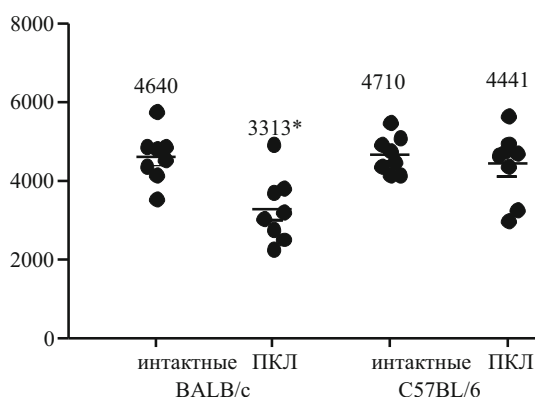


Рис. 1. Специфическое связывание ^3H -флунизтрапема мембранной фракцией ($P_1 + P_2$) головного мозга мышей линии BALB/c и C57BL/6 до и после эмоционально-стрессового воздействия в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ).

* — статистически значимое отличие по сравнению с группой интактные ($p < 0,05$).

Манипуляции с опытной группой проводили в другом, но идентичном помещении. Мышей помещали в коробку по процедуре, описанной для контрольной группы. На протяжении пяти минут к коробке с мышью допускалась кошка, проявлявшая в этот период характерные признаки поведения хищника. По окончании экспозиции мышей мгновенно декапитировали.

Подготовка материала и радиолигандные исследования. После декапитации немедленно извлекали мозг, отделяли ствольные структуры и мозжечок. Оставшуюся часть мозга гомогенизировали в 20 мл холодного TRIS-HCl буферного раствора ($t = 4^\circ$, 50 мМ, pH 7,4) и центрифугировали при 54000g в течение 25 мин на центрифуге Beckman. Супернатант сливали. Осадок ресуспендировали гомогенизацией в исходном объеме буфера и центрифугировали в тех же условиях. Процедуру очистки повторяли трижды. Для радиолигандных исследований осадок ресуспендировали в 20 мл холодного буферного раствора. Инкубацию проводили на льду в течение 30 мин в трех повторах для каждого

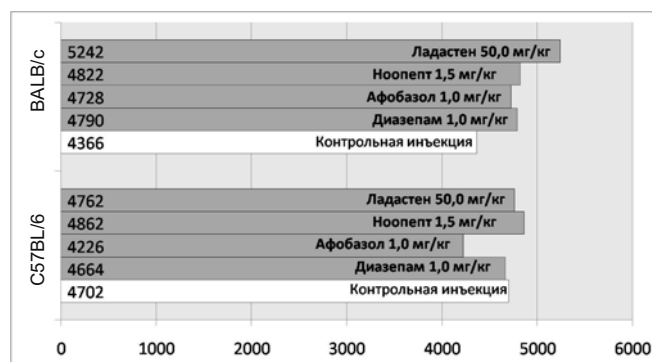


Рис. 2. Влияние препаратов на специфическое связывание ^3H -флунизтрапема мембранной фракцией ($P_1 + P_2$) головного мозга мышей линии BALB/c и C57BL/6.

По оси абсцисс — dpm/mg белка — счет за минуту на мг белка. * — статистически значимое отличие по сравнению с группой интактные ($p < 0,05$).

образца мозга мыши. В инкубационную среду вносили 250 мкл полученной мембранной фракции, 50 мкл 10 нМ раствора [N-метил- ^3H]-флунизтрапема (Amersham Bioscience 87,0 Ci/mmol). Для определения неспецифического связывания вносили 50 мкл раствора 400 μM диазепама (“Sigma”) в 5 % этиловом спирте. Холодный буферный раствор, 200 и 150 мкл соответственно, был добавлен для доведения реакционного объема до 500 мкл. Реакция бензодиазепинового связывания останавливалась путем вакуумной фильтрации на фильтрах из стеклянного микроволокна (Whatman, GF\B). Радиоактивность фильтра определяли на счетчике Beckman после добавления жидкого сцинтиллянта в объеме 3 мл. Концентрации белка в конечной суспензии определяли по методу Лоури [17], с использованием альбумина (Bovine albumin, “SIGMA Chemical Co”) в качестве стандарта. Данные приведены в DPM/мг белка.

Препараты и реактивы. В настоящем исследовании использованы препараты афобазол, ладастен и ноопепт, разработанные в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, имеющие в спектре фармаколо-

Влияние анксиолитиков на поведение мышей линий BALB/c и C57BL/6 в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” ($M \pm SEM$)

Препарат	Линия	% времени в открытых рукавах	% времени в центре	Двигательная активность
Контрольная инъекция	BALB/c	10,71 \pm 5,37	32,63 \pm 10,27	4,50 \pm 0,80
	C57BL/6	8,29 \pm 1,29	21,13 \pm 4,11	7,25 \pm 0,75
Афобазол	BALB/c	35,33 \pm 7,03*	20,25 \pm 3,63	6,75 \pm 0,70*
	C57BL/6	15,50 \pm 3,49	18,58 \pm 5,83	11,25 \pm 1,10*
Ноопепт	BALB/c	36,71 \pm 5,18*	36,13 \pm 6,02	8,5 \pm 1,69*
	C57BL/6	7,63 \pm 3,47	35,71 \pm 6,43	7,13 \pm 1,01
Ладастен	BALB/c	40,58 \pm 11,74*	47,83 \pm 10,56	6,13 \pm 1,60
	C57BL/6	6,71 \pm 3,22	13,75 \pm 3,96	6,88 \pm 0,83
Диазепам	BALB/c	55,38 \pm 12,75*	6,71 \pm 2,87*	9,63 \pm 2,17
	C57BL/6	9,63 \pm 4,83	19,17 \pm 11,70	2,63 \pm 0,71*

* — статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от группы “контрольная инъекция”.

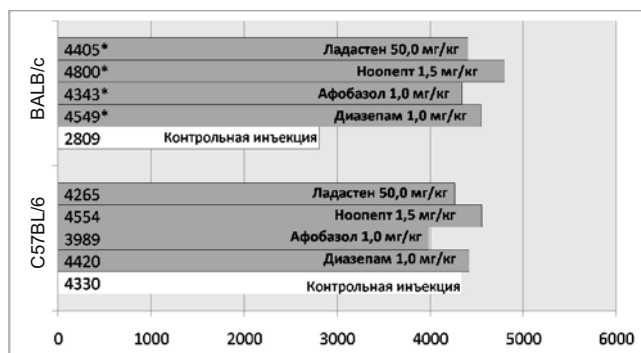


Рис. 3. Влияние предварительного введения препаратов на специфическое связывание ^3H -флунизтрапеама мембранной фракцией ($P_1 + P_2$) головного мозга мышей линии BALB/c и C57BL/6 после эмоционально-стрессового воздействия в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”.

По оси абсцисс — фгм/мг белка — счет за минуту на мг белка.

* — статистически значимое отличие по сравнению с группой контрольная инъекция ($p < 0,05$).

гической активности анксиолитический эффект [10, 11, 24]. В качестве препарата сравнения применяли диазепам. Все соединения использовали в виде субстанции. Афобазол и диазепам вводили мышам внутривенно в дозе 1 мг/кг за 30 мин до тестирования, ноопепт — 1,5 мг/кг внутривенно за 60 мин до тестирования, ладастен — 50 мг/кг в желудок за 90 мин до тестирования. Контрольные животные получали равный объем дистиллированной воды.

Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием U-критерия (тест Манна-Уитни) для независимых выборок [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных исследованиях установлено, что афобазол в дозе 1 мг/кг, ладастен в дозе 50 мг/кг, ноопепт в дозе 1,5 мг/кг и диазепам в дозе 1 мг/кг вызывали выраженный анксиолитический эффект у мышей линии BALB/c в тесте ПКЛ (таблица). Все препараты статистически значимо увеличивали по сравнению с контролем время нахождения в открытых рукавах лабиринта и двигательную активность.

Исследования на мышях C57BL/6 не выявили изменений в поведении животных после введения афобазола, ноопепта, и ладастена. Однако диазепам в дозе 1 мг/кг значимо угнетал двигательную активность мышей C57BL/6, что подтверждает известные данные о седативном влиянии анксиолитика на животных с активным фенотипом эмоционально-стрессовой реакции (ЭСР) [10] (таблица).

При исследовании после опыта в ПКЛ бензодиазепиновой рецепции установлено, что пятиминутная экспозиция в тесте мышей BALB/c статистически значимо снижала специфическое связывание [N-метил- ^3H]-флунизтрапеама, в то время как у C57BL/6 параметры рецепции не менялись (рис. 1). Аналогичные данные были получены ранее в экспериментах, с ис-

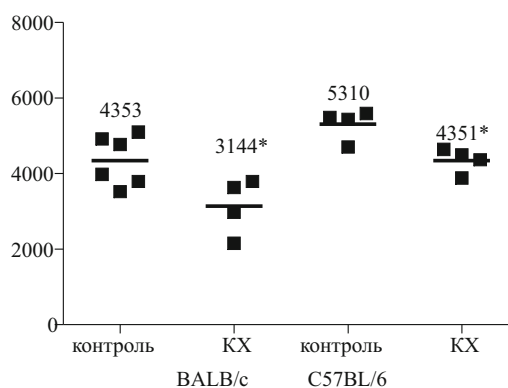


Рис. 4. Специфическое связывание ^3H -флунизтрапеама мембранной фракцией ($P_1 \pm P_2$) головного мозга мышей линии BALB/c и C57BL/6 до и после эмоционально-стрессового воздействия в тесте “контакт с хищником” (КХ). * — по сравнению с группой контроль ($p < 0,05$).

пользованием меченого по тритию диазепама [2] и флунизтрапеама [13] при стрессировании мышей тех же линий в тесте ОП. Учитывая, что тесты “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” имеют в качестве основного стрессирующего фактора новую обстановку, сходство полученных результатов с установленными в наших ранних работах можно считать закономерным.

В другой серии контрольных исследований анализ связывания [N-метил- ^3H]-флунизтрапеама с фракцией синапсом гомогената головного мозга мышей линий BALB/c и C57BL/6 показал, что изучаемые препараты, введенные вне стрессового воздействия в анксиолитических дозах, не изменяли параметры связывания меченого лиганда по сравнению с контрольной инъекцией воды (рис. 2).

Введение диазепама и афобазола в дозах 1 мг/кг, ноопепта в дозе 1,5 мг/кг и ладастена в дозе 50 мг/кг до эксперимента в ПКЛ препятствовало падению связывания радиолиганда у мышей линии BALB/c. У мышей C57BL/6 каких-либо изменений рецепции ^3H -флунизтрапеама не зарегистрировано (рис. 3).

В следующей серии экспериментов оценивали влияние анксиолитиков на уровень специфического связывания меченого флунизтрапеама мышей линий BALB/c и C57BL/6 в условиях анксиогенной обстановки, вызванной присутствием природного хищника — домашней кошки.

Контакт с хищником в течение 5 мин привел к значимому снижению связывания [N-метил- ^3H]-флунизтрапеама как у мышей BALB/c, так и C57BL/6 (рис. 4).

Предварительное введение всех исследуемых препаратов предотвращало индуцированное в тесте “контакт с хищником” падение бензодиазепиновой рецепции как у мышей линии BALB/c, так и C57BL/6 (рис. 5).

Таким образом, у всех изученных соединений противотревожная активность оказалась сопряженной с нормализацией уровня бензодиазепиновой рецепции, нарушенной у мышей линии BALB/c как эмоциональ-

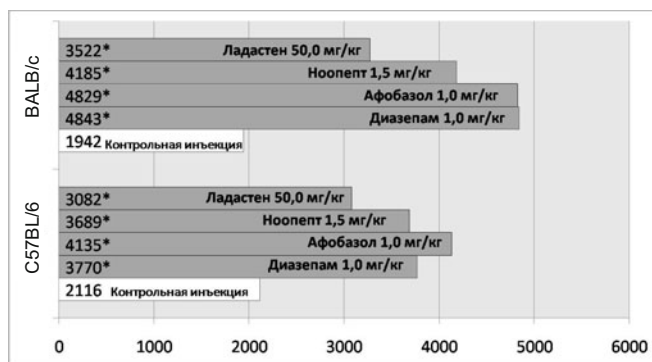


Рис. 5. Влияние предварительного введения препаратов на специфическое связывание ^3H -флунизтазема мембранной фракцией ($P_1 + P_2$) головного мозга мышей линии BALB/c и C57BL/6 после эмоционально-стрессового воздействия в тесте «контакт с хищником».

По оси абсцисс — fmol/mg белка — счет за минуту на мг белка.

* — статистически значимое отличие по сравнению с группой контрольной инъекции ($p < 0,05$).

но-стрессовым воздействием в тесте ПКЛ, так и КХ, а у мышей C57BL/6 с активным фенотипом ЭСР только в КХ.

В исследованиях последних лет установлена сложная структура ГАМК_A-рецептора, являющегося пентамерным Cl^- ионофором, в состав которого в разных соотношениях входят 18, экспрессирующихся в разных участках генома субъединиц [26]. Гетерогенная структура ГАМК_A-рецептора, неодинаковая в разных участках ЦНС, эффективный механизм сборки, внутриклеточного транспорта, локализации на поверхности клетки, а, с другой стороны, множественные места связывания для различных веществ и способность к аллостерической регуляции позволяют рассматривать ГАМК_A-рецептор в качестве важнейшей нейрохимической структуры, опосредующей реакции на возникающие эндо- и экзогенные стимулы. Скорость реакций определяется эффекторным звеном — транспортом ионов Cl^- , что реализуется в изменениях заряда и прохождения нервного импульса [26]. Поэтому объективные показатели состояния ГАМК_A-рецептора могут иметь маркерную значимость для характеристики тревоги. Сопряжение тревоги с падением рецепции в бензодиазепиновом участке установлено в ряде экспериментальных и клинических исследований [15, 22, 23], в фармакогенетических опытах нашей лаборатории [2, 12, 13]. В настоящей работе применены три анксиолитика, не взаимодействующие прямо с ГАМК_A-рецептором. Первичный механизм действия афобазола опосредуется σ_1 , MT_1 , MT_3 рецепторами и MAO_A [9]. Ладастен способен снижать экспрессию ГАМК-транспортера, что ведет к увеличению ГАМК в синаптической щели, модулировать экспрессию ряда других генов, продукты которых вовлечены в регуляцию нейропластичности [3, 4]. Механизм действия ноопепта включает холинопозитивные влияния, стимуляцию экспрессии нейротрофинов, антиоксидантное

действие [5 – 7]. Все эти изменения, характерные для изученных препаратов, могут опосредовать анксиолитический эффект. Поэтому наличие общего признака в фармакодинамике, предотвращение стрессиндуцированного падения бензодиазепиновой рецепции позволяет рассматривать данный феномен в качестве общего, возможно, результирующего звена в механизмах анксиолитического эффекта. По-видимому, и диазепам, усиливая рецепцию ГАМК, повышает связывающую способность бензодиазепинового участка по механизму обратной связи [16].

Таким образом, полученные результаты, демонстрирующие, что анксиолитическое влияние сопровождается восстановлением нарушенной при стрессе рецепции в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецептора, позволяют сделать заключение о целесообразности применения данного показателя для оценки состояния тревоги и эффектов анксиолитиков.

ВЫВОДЫ

1. Межлинейные различия в стрессиндуцированном падении бензодиазепиновой рецепции у мышей C57BL/6 и BALB/c зависят от силы стрессирующего фактора.
2. Анксиолитическая активность афобазола, ладастена и ноопепта сопряжена с нормализацией уровня бензодиазепиновой рецепции, нарушенной при стрессе различной модальности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. К. Беляев, *Вестн. АМН СССР*, № 7, 9 – 14 (1979).
2. Ю. А. Бледнов, М. Л. Гордей, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, № 1, 61 – 63 (1987).
3. Ю. В. Вахитова, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Москва (2007).
4. Ю. В. Вахитова, Р. С. Ямиданов, В. А. Вахитов, С. Б. Середенин, *Мол. биол.*, **39**(2), 276 – 285 (2005).
5. А. М. Менджерский, А. В. Лысенко, С. В. Демьяненко, *Нейрохимия*, **20** (4), 281 – 286 (2003).
6. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, А. П. Цаплина и др., *Бюл. exper. биол.*, **146**(9), 310 – 313 (2008).
7. Р. У. Островская, Т. Х. Мирзоев, Ф. А. Фирова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 11 – 14 (2001).
8. С. Б. Середенин, *Информ. бюлл. РФФИ*, **3**(4), 226 (1995).
9. С. Б. Середенин, М. В. Воронин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(1), 3 – 11 (2009).
10. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
11. С. Б. Середенин, М. А. Яркова, М. В. Воронин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(1), 63 – 5 (2001).
12. К. С. Чекина, М. А. Яркова, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, **148**(10), 408 – 410 (2009).
13. E. Costa, *Neuropharmacology*, **30**(12B), 1357 – 1364 (1991).
14. S. I. Deutsch, R. B. Rosse, J. Mastroiolo, *Clin. Neuropharmacol.*, **17**(3), 205 – 228 (1994).
15. W. E. Haefely, *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci.*, **238**(5 – 6), 294 – 301 (1989).
16. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. R. Farr, *J. Biol. Chem.*, **193**(3), 265 – 274 (1951).
17. H. B. Mann, D. R. Whitney, *Annals of Mathematical Statistics*, № 18, 50 – 60 (1947).

18. H. Mohler, T. Okada, *Science*, № 198, 849 – 851 (1977).
19. H. Mohler, J. M. Fritschy, K. Vogt, et al., *Handb Exp Pharmacol*, № 169, 225 – 247 (2005).
20. H. Mohler, *Cell Tissue Res.*, **326**(2), 505 – 516 (2006).
21. D. J. Nutt, A. L. Malizia, *Br. J. Psychiatry*, № 179, 390 – 396 (2001).
22. D. J. Nutt, *CNS Spectr.*, № 10, 49 – 56 (2005).
23. S. Pellow, P. Chopin, S. Pile, M. Briley, *J. Neurosci. Meth.*, № 14, 149 – 167 (1985).
24. C. van Rijnsoever, C. Sidler, J. M. Fritschy, *Eur. J. Neurosci.*, **21**(2), 327 – 338 (2005).

Поступила 24.05.11

ANALYSIS OF THE BINDING CAPACITY OF THE BENZODIAZEPINE SITE OF GABA_A RECEPTOR IN MICE C57BL/6 AND BALB/C PRETREATED WITH ANXIOLYTICS

M. A. Yarkova

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

The level of specific ³H-flunitrazepam binding in synaptosomal membranes of C57BL/6 and BALB/c mice brain underwent to the stress of different types has been studied. Mild stress (Elevated Plus Maze) was shown to induce the decrease of benzodiazepine binding in BALB/c mice only, while the strong one (Exposure to a predator) was revealed to cause this decrease in both strains. Behavioral effects of different non-benzodiazepine drugs possessing anxiolytic properties (Afobazol, Ladasten and Noopept) was accompanied with the normalization of the level of benzodiazepine reception, reduced by the stress of both modalities.

Key words: GABA_A receptor, Afobazol, Ladasten, Noopept, emotional stress, inbred mice