

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА АФОБАЗОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЕМОМРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

С. Б. Середенин, В. А. Крайнева¹

На модели интрацеребральной посттравматической гематомы установлено, что афобазол в дозах 1 и 0,1 мг/кг внутривентрикулярно 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 бенздиазепинов [6, 7].

В спектре рецепторных взаимодействий афобазола выявлено лигандное связывание с σ_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 пенумбры 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 — ложнопериорированные (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 интрацеребральной 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.

¹ 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 [#]	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/12	0
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	1/12 [#]	8,3	0/12	0	1/12	8,3	0/11	0	0/11	0

* — достоверность отличий от ложноперирированных 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 устранял. В дозе 0,1 мг/кг афобазол ослаблял нарушение координации движений к четырнадцатым суткам после инсульта (табл. 2).

Ослабление мышечного тонуса на первые-третьи 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 ложноперирированных 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 тесте вращающегося стержня после геморрагического инсульта (ГИ)

Группа животных	Количество животных, не удержавшихся на вращающемся 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 ^{##}	25	0/12 ^{##}	0	0/12	0	0/12	0
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	4/12 [#]	33	3/11	27	1/11	9	0/11	0

* — достоверность отличий от ложноперирированных 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 тесте 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 [#]	8
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	5/12	42	2/11	18	2/11	18	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).

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 ориентировочно-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-третьи 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
ЛО	12,0 ± 2,5
ГИ	47,7 ± 7,3**
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	29,1 ± 5,0 [#]
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	20,0 ± 4,6 ^{##}

** — 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 тесте 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, %
ЛО	95,0 ± 21,9	58
ГИ	30,0 ± 7,9*	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	145,8 ± 18,6 ^{##}	25
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	96,8 ± 23,7 [#]	64
		3-е суток
ЛО	68,8 ± 23,8	67
ГИ	25,7 ± 6,1	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	104,6 ± 22,9 ^{##}	50
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	70,0 ± 22,3	73
		7 суток
ЛО	61,6 ± 21,2	75
ГИ	13,8 ± 4,0	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	127,9 ± 20,0 ^{##}	42
ГИ + афобазол (0,1 мг/кг)	38,9 ± 17,1	91
		14 суток
ЛО	76,4 ± 22,7	67
ГИ	13,2 ± 2,8	100
ГИ + афобазол (1 мг/кг)	109,6 ± 21,4 ^{##}	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).

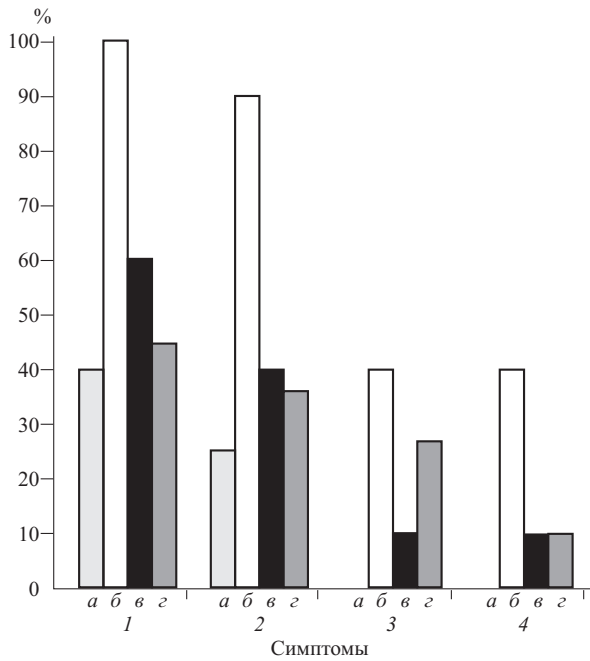


Рис. 1. Влияние афобазола на неврологический дефицит (шкала Mc Grow).

По оси абсцисс — симптомы: 1 — вялость, замедленность движений, 2 — слабость конечностей, 3 — маневренные 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, внутривентриально 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.

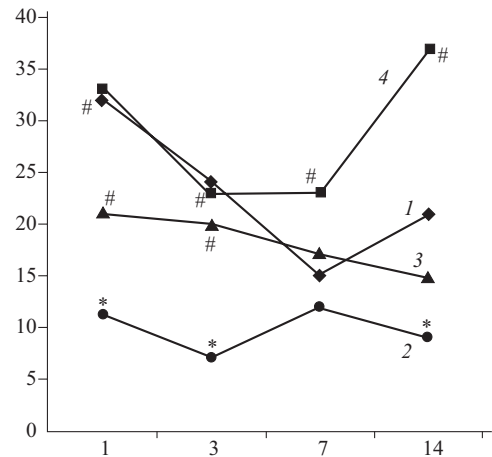


Рис. 2. Суммарная двигательная активность под влиянием афобазола в тесте “открытого поля” (регистрация динамики в течение 14 сут после операции).

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 внутривентриально в дозе 5 мг/кг, повышал выживаемость крыс в условиях ише-

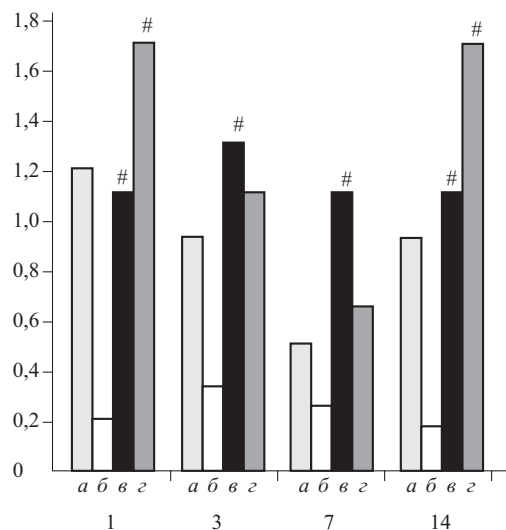


Рис. 3. Влияние афобазола на поведение животных в условиях методики ПКЛ после геморрагического инсульта.

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 σ_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. Гарибова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Бюл. эксперим. биол.*, **140**(11), 545 – 549 (2005).
3. Т. Л. Гарибова, 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, *Бюл. эксперим. биол.*, **40**(8), 161 – 163 (2005).
5. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицин, 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. М. Г. Balasanyan, A. S. Kanayan, and A. V. Thorchayan, *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 discoordination, and improve the learning and memory.

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