

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ МЕМАНТИНА НА МОДЕЛЯХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА И ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ГЕМАТОМЫ (ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА) В ОПЫТАХ НА КРЫСАХ

Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина, С. А. Литвинова, А. Л. Кузнецова,
А. Е. Кульчиков, А. В. Алесенко¹

Мемантин — низкоаффинный, неконкурентный антагонист глутаматергических NMDA-рецепторов, у крыс с холинергическим дефицитом, вызванным длительным введением скополамина (1 мг/кг/20дней), при использовании внутривнутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг в течение 10 дней предупреждал развитие нарушений обучения условным рефлексам активного и пассивного избегания и не оказывал существенного влияния на эмоциональный статус животных на модели приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). В опытах на крысах с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморрагическим инсультом) мемантин (2 мг/кг 3дня после операции) предотвращал гибель животных, ослаблял неврологический дефицит, улучшал воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания, ослаблял эмоциональную напряженность на модели ПКЛ.

Ключевые слова: мемантин, крысы, скополамин, холинергический дефицит, геморрагический инсульт, обучение

ВВЕДЕНИЕ

Известна роль глутаматергической системы в патогенезе нарушений функций ЦНС при различных заболеваниях. Впервые обозначенная Olney в 1969 г. [10] эксайтотоксичность — массивированный вход кальция в клетку через NMDA-регулируемые ионные каналы глутаматных рецепторов, приводящий к гибели нейрона, сопровождается патологические процессы в мозге при инсульте, черепно-мозговой травме, эпилепсии, болезнях Альцгеймера и Паркинсона [2, 6, 11]. Синтезированный в 1968 г. мемантин (3,5-диметил-1-адамантанамин) используется для лечения слабой и умеренной форм деменции, болезни Паркинсона, судорожных состояний, болезни Альцгеймера [11, 13, 14]. Мемантин, являясь низкоаффинным, неконкурентным антагонистом NMDA-рецепторов, обладает малой потенциал-зависимостью, селективно ингибирует патологическую активацию NMDA-рецептора [6 – 8]. В экспериментальных исследованиях показано, что мемантин обладает нейропротекторным действием на различных моделях болезни Альцгеймера [6, 7, 15], ишемического инсульта [6, 8].

Целью исследования явилось изучение эффекта мемантина на обучение и эмоциональный статус в условиях дефицита холинергической системы, вызванного длительным введением скополамина (модель болезни Альцгеймера) и на модели интрацеребральной посттравматической гематомы, геморрагического инсульта (ГИ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 220 – 250 г. Животных содержали в обычных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде.

Дефицит холинергической системы (модель болезни Альцгеймера) вызывали длительным введением крысам скополамина по специальной схеме [1, 2]. Животных случайным образом разделяли на 3 группы по 10 крыс. Крысам 1-й группы в течение 20 дней ежедневно вводили физиологический раствор (пассивный контроль), крысам 2-й и 3-й групп — м-холиноблокатор скополамин в дозе 1 мг/кг/день. С 21-го по 30-й день крысам 1-й группы (пассивный контроль) и 2-й группы (активный контроль) вводили физиологический раствор, а животные 3-й группы получали ежедневно мемантин в дозе 2 мг/кг. Все вещества вводили внутривнутрибрюшинно. Поведение, память, эмоциональное состояние крыс исследовали на следующий день после 10-дневного введения веществ с использованием комплекса методов, традиционно применяемых в нейрорепсихофармакологии [2]. Обучение условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) проводили в установке Passive avoidance фирмы “Lafayette Instrument Co” (США) [2, 5]. Крысу помещали на ярко освещенную платформу хвостом к отверстию, ведущему в темную камеру с электродным полом, и регистрировали латентный период первого захода в затемненное отделение установки. Затем отверстие закрывали и наносили животному неизбежное однократное электрошоковое раздражение через пол током силой 0,45 мА и

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

длительностью 10 с. Воспроизводили УРПИ через 24 ч после обучения. Обучение крыс условному рефлексу активного избегания (УРАИ) проводили в установке фирмы Ugo-Basile (Италия). Избавлением (безусловный рефлекс) считалась перебежка животного в соседний отсек в ответ на удар током, условным избеганием (условный рефлекс) — перебежка животного в соседний отсек после включения условного сигнала (свет) до подачи электрошокового раздражителя. Силу тока при электрошоковом раздражении крысы через электродный пол подбирали индивидуально. Обучение продолжалось в течение 6 дней, по 10 сочетаний в день. Критерием обученности считали 7 последовательных избеганий или избавлений из 10 предъявлений. Уровень тревожности крыс определяли в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). Крыс помещали на центральную площадку хвостом к светлому рукаву. Регистрировали время, проведенное животными в открытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава. Общее время наблюдения для каждого животного составляло 5 мин.

Для моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта, ГИ) у крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривентриально), проводили трепанацию черепа и осуществляли деструкцию мозговой ткани в области внутренней капсулы (координаты Н = 4 мм, L = 3,0 мм, А = 1,5 мм от брегмы) по атласу G. Paxinos с последующим введением в место повреждения крови, взятой из-под языка [2, 4]. Ложнооперированным животным (ЛОЖ) под наркозом проводили скальпирование и трепанацию черепа.

Животные были разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой: 1-я группа — ЛОЖ, 2-я животных с ГИ, 3-я группа — крысы с ГИ, получавшие мемантин (1 мг/кг, внутривентриально) ежедневно в течение первых трех дней после операции. Гибель животных, показатели поведения и состояние крыс регистрировали через 1, 3, 7 и 14 дней после ГИ. Неврологический дефицит у животных определяли по шкале Stroke-index McGrow в модификации [3]. Отмечали количество крыс с легкой симптоматикой (вялость движений, слабость конечностей, односторонний полуптоз, тремор, манежные движения) и с тяжелыми проявлениями неврологических нарушений (парезы и параличи 1–4

конечностей). Для оценки когнитивных функций использовали методику обучения УРПИ в установке Passive avoidance. Эмоциональный статус крыс определяли в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Биостат, с использованием параметрических и непараметрических критериев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Исследование эффекта мемантина на модели холинергического дефицита, вызванного скополамином.

Изучение эмоционального состояния крыс через 10 дней после длительного введения скополамина в ПКЛ показало, что у животных активного контроля (введение скополамина) в сравнении с пассивным контролем (введение физиологического раствора) наблюдалось уменьшение ($p \leq 0,05$) основного показателя — времени, проведенного крысами в открытых рукавах, и уменьшение двигательной активности, регистрируемой по числу переходов ($p \leq 0,05$). Наряду с этим в группе крыс активного контроля отмечалось увеличение латентного времени рефлекса и уменьшение заходов в открытые рукава лабиринта. Комплекс этих изменений свидетельствует о повышенной тревожности крыс с холинергическим дефицитом. Мемантин практически не оказывал влияния на поведение крыс с холинергическим дефицитом в условиях ПКЛ; наблюдалась лишь тенденция коррекции латентного времени рефлекса и увеличение заходов в открытые рукава (табл. 1).

Обучение крыс УРПИ показало, что при воспроизведении рефлекса через 14 суток после обучения в группе крыс пассивного контроля 90 % животных помнили об ударе током и не заходили в темную “опасную” камеру в течение всего времени наблюдения (рис. 2). Крысы, получившие до обучения скополамин (активный контроль), при воспроизведении рефлекса забывали ситуацию и заходили в темную камеру; при этом обучилось УРПИ только 50 % крыс. В группе животных, получавших после отмены скополамина мемантин, наблюдалось увеличение количества обучившихся крыс до 75 % (рис. 2).

Обучение УРАИ животных группы активного контроля, получавших скополамин, проходило значитель-

Таблица 1. Влияние мемантина (2 мг/кг 10 дней) на поведение крыс в условиях приподнятого крестообразного лабиринта на модели холинергического дефицита, вызванного длительным введением скополамина ($M \pm m$)

Группа животных, $n = 10$	Латентное время рефлекса	Количество заходов на открытые рукава	Количество заходов на закрытые рукава	Время нахождения на открытых рукавах	Общее число переходов
Пассивный контроль (физраствор)	4,90 ± 0,67	5,80 ± 1,69	1,00 ± 0,45	5,20 ± 2,64	6,80 ± 2,01
Активный контроль (скополамин)	9,25 ± 3,06	0,25 ± 0,23 ^{&}	1,00 ± 0,40	0,38 ± 0,35 ^{&}	1,50 ± 0,52 ^{&}
Мемантин (скополамин)	6,25 ± 1,22	0,13 ± 0,12	2,25 ± 0,68	0,25 ± 0,23	2,38 ± 0,75

[&] — достоверность отличий от пассивного контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Стьюдента).

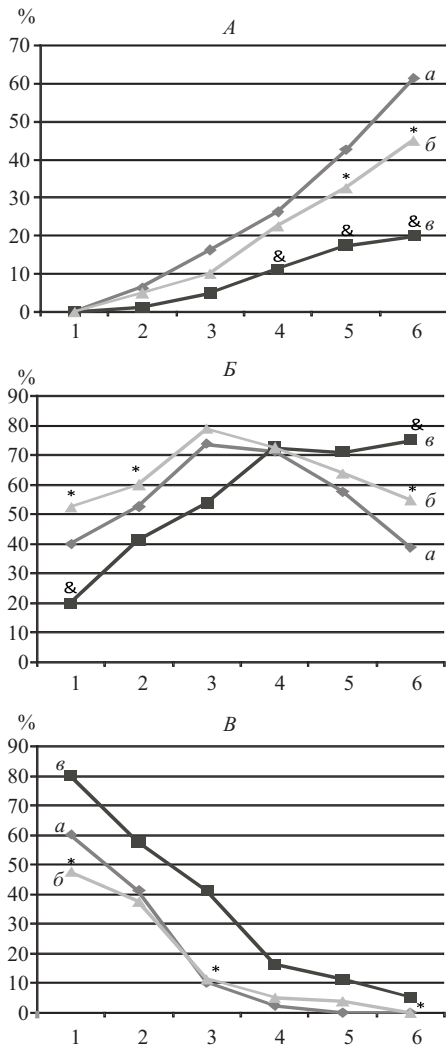


Рис. 1. Влияние мемантина на обучение крыс условной реакции активного избегания на модели холинергического дефицита, вызванного длительным введением скополамина (1 мг/кг/20дней).

А — реакции избегания (условный рефлекс), Б — реакции избавления (безусловный рефлекс), В — отказы от выполнения рефлексов; а — пассивный контроль (физиологический раствор), б — активный контроль (скополамин), в — мемантин (2 мг/кг/10дней).
Ось абсцисс: дни обучения.

Ось ординат: А — количество условных реакций от числа предъявлений, %; Б — количество безусловных реакций от числа предъявлений, %; В — количество отказов от числа предъявлений, %;

& — достоверность отличий от пассивного контроля при $p \leq 0,05$ (χ^2).

* — достоверность отличий от активного контроля при $p \leq 0,05$ (χ^2).

но медленнее, чем в группе пассивного контроля. Так, начиная с 3-го дня обучения и на протяжении всего времени эксперимента, динамика формирования рефлексов (условного и безусловного) у этих животных сильно отставала от показателей крыс пассивного контроля, и в результате к 6-му дню только 20 % животных достигли критерия обученности условному рефлексу (реакция избегания) (рис. 1). Мемантин (2 мг/кг) улучшал обучение условному рефлексу активного избегания в челночной камере. Начиная со

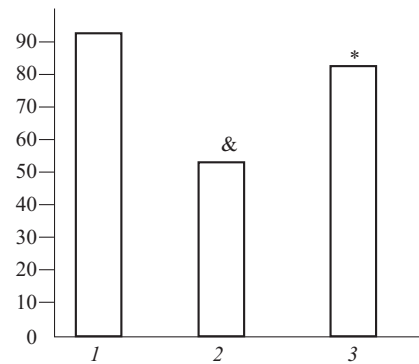


Рис. 2. Влияние мемантина на обучение крыс УРПИ на модели холинергического дефицита, вызванного длительным введением скополамина (1 мг/кг/20дней).

Ось абсцисс: 1 — пассивный контроль (физиологический раствор), 2 — активный контроль (скополамин), 3 — мемантин 2 мг/кг/3 дня (скополамин).

Ось ординат: количество животных, не зашедших в темную камеру, %
& — достоверность отличий от пассивного контроля при $p \leq 0,05$ (χ^2).

* — достоверность отличий от группы активного контроля при $p \leq 0,05$ (χ^2).

второго дня и по шестой, наблюдалось нарастание условных реакций (реакции избегания) в большей степени, чем это характерно для активного контроля (со скополамином), и к 5 дню уровень обучения достиг статистической достоверности по сравнению с активным контролем. Динамика формирования безусловного рефлекса (реакции избавления) у животных, получавших мемантин, практически не отличалась от показателей крыс пассивного контроля и достоверно превосходила показатели активного контроля. В результате к 6-му дню количество животных, достигших критерия обученности, в группе крыс с мемантином достигло 45 %. Статистически достоверно уменьшилось и количество отказов от выполнения рефлексов (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о способности мемантина улучшать процесс обучения УРАИ.

Таким образом, мемантин (2 мг/кг 10 дней) корректирует нарушенное длительным введением скополамина обучение и память крыс и оказывает умеренное позитивное влияние на эмоциональное состояние этих животных. При обучении условной реакции активного избегания под влиянием мемантина наблюдалось увеличение числа животных, достигших критерия обученности, и общего количества правильно выполняемых условных реакций за весь период наблюдения.

II. Исследование мемантина на модели интрацеребральной посттравматической гематомы, геморгического инсульта.

В группе ЛОЖ не наблюдалось гибели и каких-либо неврологических нарушений в течение всего времени наблюдения. При регистрации гибели животных после ГИ было установлено, что в контрольной группе крыс с ГИ на 7-е сутки после операции погибло 33 % животных, а к 14-м суткам этот показатель достиг

55 %. Мемантин предотвращал гибель животных в течение всего времени наблюдения, и к 14 дню погибло только одно животное (табл. 2). При изучении динамики неврологического дефицита у крыс с ГИ показано, что на 1-е сутки после операции у 70 – 77 % животных отмечались неврологические нарушения различной степени тяжести. К 3-м суткам этот показатель для контрольной группы ГИ снизился до 66 %. При этом количество животных с нарушениями тяжелой степени, проявляющимися в виде парезов и параличей конечностей, составило 33 %. К 14-м суткам все животные с тяжелыми проявлениями неврологического дефицита погибли, а у половины из оставшихся в живых крыс отмечалась легкая неврологическая симптоматика. В группе животных с ГИ и мемантином (1 мг/кг/3 дня, начиная с 3-го дня после операции) крыс с тяжелой неврологической симптоматикой выявлено не было, сократилось до 20 % количество крыс с легким неврологическим дефицитом (табл. 2)

Изучение поведения крыс с ГИ в ПКЛ показало, что у всех животных отмечались эмоциональные нарушения, регистрируемые по уменьшению числа переходов и времени, проведенному в открытых рукавах. В группе ЛОЖ к 7-м суткам поведение в ПКЛ нормализовалось. Животные с ГИ на протяжении всего времени наблюдения имели низкую двигательную активность и достоверно, по сравнению с ЛОЖ, низкий основной показатель — время, проведенное животными в открытых рукавах лабиринта. Мемантин оптимизировал поведение крыс в ПКЛ, увеличивая, хотя и недостоверно, основной показатель поведения — время пребывания в открытых рукавах, а также общее число и количество животных, исследующих открытые рукава установки (табл. 3). Обучение УРПИ крыс с ГИ пока-

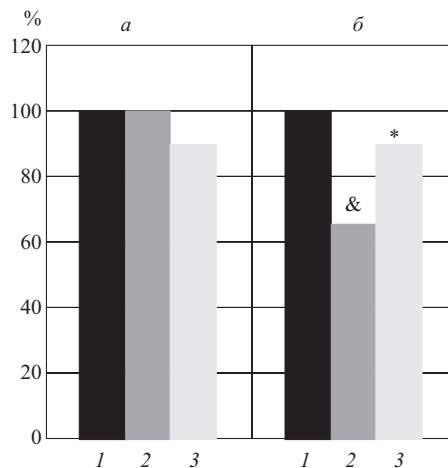


Рис. 3. Влияние мемантина на обучение УРПИ крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморрагическим инсультом, ГИ).

а — 1-е сутки после операции, б — 7-е сутки после операции.
 Ось абсцисс: 1 — ложнооперированные животные (ЛОЖ); 2 — ГИ; 3 — ГИ+мемантин (1 мг/кг/3 дня);
 Ось ординат: количество животных, не зашедших в темную камеру при воспроизведении рефлекса, %.
 & — достоверность отличий от группы ЛОЖ при $p \leq 0,05$ (χ^2).
 * — достоверность отличий от группы с ГИ при $p \leq 0,05$ (χ^2).

зало, что при воспроизведении рефлекса через 24 ч после обучения во всех группах отмечалось сохранение памятного следа, а через 7 суток только 60 % контрольных крыс с ГИ помнили о ситуации и не заходили в темную камеру. В группе крыс с ГИ и мемантином этот показатель составил 90 % (рис. 3).

Проведенные исследования показали, что мемантин обладает умеренным позитивным эффектом на экспериментальной модели болезни Альцгеймера, при дефиците холинергической системы, вызванном субхро-

Таблица. 2. Влияние мемантина (1 мг/кг 3дня) на динамику неврологических нарушений и гибель крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (ГИ)

Группа крыс	Время после операции, сутки							
	1-е		3-е		7-е		14-е	
	абс. пок.	отн. пок.	абс. пок.	отн. пок.	абс. пок.	отн. пок.	абс. пок.	отн. пок.
<i>Количество животных с легкими неврологическими нарушениями, %</i>								
ЛОЖ	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
ГИ	4/9	44,4 ^{&}	3/9	33,3 ^{&}	3/6	50 ^{&}	2/4	50 ^{&}
ГИ+мемантин	4/10	40 [*]	2/10	20 [*]	2/10	20	2/9	22,2 [*]
<i>Количество животных с тяжелыми неврологическими нарушениями, %</i>								
ЛОЖ	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
ГИ	3/9	33,3 ^{&}	3/9	33,3 ^{&}	1/6	16,6	0/4	0
ГИ+мемантин	3/10	30	0/10	0 [*]	0/10	0	0/9	0
<i>Гибель, %</i>								
ЛОЖ	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
ГИ	1/10	0	1/10	0	4/10	40 ^{&}	6/10	60 ^{&}
ГИ+мемантин	0/10	0	0/10	0	0/10	0	1/10	10 [*]

[&] — достоверность отличий от ложнооперированных животных (ЛОЖ) при $p \leq 0,05$ (χ^2);
^{*} — достоверность отличий от группы с ГИ при $p \leq 0,05$ (χ^2).

Таблица 3. Влияние мемантина (1 мг/кг 3 дня) на поведение крыс после интрацеребральной посттравматической гематомы (ГИ) в приподнятом крестообразном лабиринте ($M \pm m$)

Группа животных	Время нахождения в открытых рукавах	Кол-во крыс, зашедших в открытые рукава		Число заходов в открытые рукава	Число заходов в закрытые рукава
		абс.	%		
<i>1-е сутки</i>					
ЛОЖ	1,92 ± 1,38	3/10	30	2,43 ± 1,54	2,86 ± 1,60
ГИ	2,00 ± 1,89	1/9	11,1	0,44 ± 0,23	1,11 ± 0,25
ГИ+мемантин	6,20 ± 3,96	2/10	20	0,90 ± 0,67	2,40 ± 1,10
<i>7-е сутки</i>					
ЛОЖ	20,57 ± 9,62	4/10	40	2,29 ± 1,10	4,71 ± 1,83
ГИ	1,17 ± 0,76 ^{&}	2/6	33,3	0,50 ± 0,20	1,67 ± 0,56
ГИ+мемантин	14,67 ± 7,39	5/10	50	2,60 ± 1,34	2,89 ± 0,84

[&] — достоверность отличия от ложнопериоперированных животных (ЛОЖ) при $p \leq 0,05$ (критерий Стьюдента).

ническим введением м-холиноблокатора скополамина. В группах крыс, получавших мемантин (2 мг/кг/10 дней), наблюдалась оптимизация нарушенного длительным введением скополамина обучения животных УРАИ по показателям скорости формирования условного и безусловного рефлексов и уменьшению количества отказов от выполнения адекватных реакций. Под влиянием препарата отмечалось и улучшение воспроизведения УРПИ. Вместе с тем вещество в используемой дозе не корректировало вызванный скополамином ангиогенез в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта. На модели геморрагического инсульта мемантин (1 мг/кг 3 дня) предупреждал гибель крыс после операции, ослаблял проявление неврологического дефицита, корректировал поведение крыс с ГИ в ПКЛ. Полученные данные об эффекте мемантина на модели холинергического дефицита согласуются с результатами W. Danysz и соавт. (2003) о способности препарата снижать активность ацетилхолин-трансферазы на модели холинергической дегенерации, вызванной квиналиновой кислотой [7]. Эффект мемантина на модели геморрагического инсульта подтверждает нейпротекторное действие препарата, выявленное ранее на модели ишемического инсульта [6]. Особенно иллюстративно в настоящем исследовании представлена способность мемантина увеличивать выживаемость крыс с ГИ. Позитивное влияние препарата на нарушенные длительным введением скополамина или ГИ процессы обучения и памяти, по-видимому, обусловлены его уникальной способностью стабилизировать баланс между ингибирующей и активирующей нейрональной активностью, возобновляя оптимальное соотношение “сигнал-шум” в глутаматергических синапсах гиппокампа и других структур, ответственных за память [6, 12].

ВЫВОДЫ

1. Мемантин у животных с холинергическим дефицитом, вызванным длительным введением скополами-

на, улучшает обучение условному рефлексу активного и пассивного избегания и не оказывает существенного влияния на повышенную тревожность крыс в методике приподнятого крестообразного лабиринта.

2. У крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморрагическим инсультом) мемантин оказывает позитивное влияние на развившиеся эмоциональные, когнитивные и неврологические нарушения и предупреждает гибель животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. В. Буров, Т. Н. Робакидзе, А. Е. Кадышева, *Бюл. exper. биол.*, **111**, 6, 614 – 617 (1991).
2. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 253 – 263.
3. И. В. Ганушкина, *Функциональная ангиоархитектоника головного мозга*, Медицина, Москва (1977), с. 224.
4. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицин, С. В. Карпенко, В. А. Мишина, *А. с. № 1767518 от 03.11.1990*.
5. R. Ader, W. Weijnen, and P. Moleman, *Psychon. Sci.*, **26**, 125 – 128 (1972).
6. H.-S. V. Chen and A. Lipton, *J. Neurochem.*, **97**, 1611 – 1626 (2006).
7. W. Danysz and C. G. Parsons, *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **18**, 23 – 32 (2003).
8. W. Danysz and C. G. Parsons, *Amino Acids*, **19**, 167 – 172 (2000).
9. K. Iqbal, L. Li, A. Sengupta, and I. Grundke-Iqbal, *J. Neurochem.*, **85**, 42 (2003).
10. J. W. Olney, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **28**, 455 – 474 (1969).
11. J. M. Orgogozo, A. S. Rigau, A. Stoffler, et al., *Stroke*, **33**, 1834 – 1839 (2002).
12. C. G. Parsons, W. Danysz, and G. Quack, *Neuropharmacology*, **38**, 735 – 767, (1999).
13. B. Reisberg, R. Boody, A. Stoffler, F. Schmitt, et al., *Arch. Neurol.*, **63**, 49 – 54 (2006).
14. M. A. Rogawski and G. L. Wenk, *ONS Drug Rev.*, **9**, 275 – 308 (2003).
15. K. Yamada, M. Takayanagi, H. Kamei, T. Nagai, et al., *Behav. Brain Res.*, **162**, 191 – 199 (2005).

Поступила 22.11.07

FEATURES OF MEMANTINE ACTION PROFILE IN CHOLINERGIC DEFICIT AND INTRACEREBRAL POSTTRAUMATIC HEMATOMA (HEMORRHAGIC STROKE) MODELS IN RATS**T. L. Garibova, T. A. Voronina, S. A. Litvinova, A. L. Kuznetsova, A. E. Kul'chikov, and A. V. Alesenko**

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

Memantine, a low-affinity non-competitive antagonist of glutamatergic NMDA-subtype receptors, was used at a daily dose of 1 mg/kg over 10 days for the treatment of rats with cholinergic deficit induced by the chronic administration of scopolamine (1 mg/kg, 20 days). The drug prevented violation of the learning of conditioned active and passive avoidance reflexes and produced no significant effect on the emotional state of animals in elevated plus maze (EPM) test. In animals with intracerebral posttraumatic hematoma (hemorrhagic stroke), memantine (2 mg/kg, for 3 days after operation) completely prevented the loss of animals, reduced the neurological deficit, improved conditioned passive avoidance reflex performance, and decreased emotional stress in the EPM test.