

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ АФОБАЗОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИЙ BALB/C И C57BL/6

В. С. Кудрин<sup>1</sup>

Проведено сравнительное изучение влияния анксиолитика нового поколения афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в гипоталамусе, фронтальной коре (ФК), гиппокампе и стриатуме мозга мышей линий BALB/C и C57BL/6 с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показано, что уровень норадреналина (НА) в гипоталамусе интактных мышей C57BL/6 ниже аналогичного показателя у мышей BALB/C, тогда как в стриатуме и ФК мышей C57BL/6 содержание НА в 2 раза выше, чем у животных со слабой реакцией на эмоциональный стресс. Обнаружено, что содержание дофамина (ДА), а также его метаболитов диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот во всех изученных структурах мозга животных линии C57BL/6 снижено в сравнении с теми же параметрами у мышей BALB/C. Афобазол в дозах 1 и 5 мг/кг вызывал увеличение содержания НА в ФК мышей C57BL/6. Препарат в дозе 5 мг/кг вызывал сходное возрастание данного параметра в гиппокампе той же линии мышей. Афобазол в дозе 1 мг/кг снижало уровень ДА у животных BALB/C в большей степени, чем у мышей с активной реакцией на стресс. Полученные результаты свидетельствуют о различном влиянии афобазола на активность нейротрансмедиаторных систем мозга животных с разным эмоциональным фенотипом.

**Ключевые слова:** афобазол, линии мышей, анксиолитический эффект, нейротрансмедиаторы, высокоэффективная жидкостная хроматография, структуры мозга

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для терапии тревожных состояний широко используют соединения бензодиазепинового ряда, обладающие, наряду с несомненными достоинствами и некоторыми серьезными недостатками. К числу последних, в первую очередь, относятся лекарственная зависимость, развивающаяся при длительном применении этих средств, а также узость их терапевтического спектра [1, 7]. В связи с этим одним из приоритетных направлений развития психофармакологии является поиск и создание веществ, обладающих высоким анксиолитическим потенциалом, но не вызывающих значительных побочных эффектов. Среди таких соединений представляет интерес новый препарат афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид) [7]. Данное вещество выгодно отличается от классических анксиолитических средств (в том числе производных бензодиазепинового ряда) отсутствием нежелательных побочных эффектов [5]. Показано, что данное соединение обладает антимуагенными свойствами, а также положительно влияет на кровоснабжение мозга в условиях ише-

мии [2, 9]. Анксиолитическое действие афобазола связывают с его способностью оказывать защитное влияние на ГАМК-рецепторный комплекс в условиях эмоционально-стрессовой реакции [4, 7].

Известно, что проявление седативного либо анксиолитического действия бензодиазепинов в низких дозах в значительной степени зависит от фенотипа эмоционально-стрессовой реакции [6, 15]. У животных, обладающих активной реакцией на стресс, бензодиазепины вызывают седацию, тогда как у особей, реагирующих замиранием (т.н. фризинг-реакцией) наблюдается активация поведения [10, 16]. С увеличением дозы седативное влияние бензодиазепинов проявляется вне зависимости от типа реакции на стресс. На основании наблюдавшихся закономерностей были выведены линии грызунов с генетически обусловленной реакцией страха — мыши BALB/C и крысы MR [10]. Напротив, активность животных линий C57BL/6 (мыши) и MNRA (крысы) не изменяется в условиях стресса [11]. В поведенческих экспериментах обнаружено наличие селективности эффектов афобазола, проявлявшего анксиолитическое действие у животных с фризинговой реакцией, но не вызывавшего седацию у крыс MNRA с активным фенотипом поведения в условиях эмоционального стресса [8]. Несмотря на то, что фармакологические эффекты афобазола хорошо изучены на пове-

<sup>1</sup> Лаборатория нейрохимической фармакологии ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

денческом уровне, нейрoхимические механизмы психотропного действия данного соединения, в частности, возможное взаимодействие с моноаминергическими системами мозга животных, до настоящего времени остаются малоизученными. В связи с этим целью данной работы являлось изучение влияния различных доз афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей линий C57BL/6 и BALB/C с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на мышах-самцах линии BALB/C и C57BL/6 массой тела 20 – 22 г (питомник РАМН Столбовая), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Афобазол в дозах 1 и 5 мг/кг вводили внутривентриально в виде суспензии в 0,9 % NaCl после предварительного растирания с несколькими каплями твин-80. Контрольным животным вводили 0,9 % NaCl с твин-80.

Забой животных осуществлялся через 1 ч после инъекции афобазола или 0,9 % NaCl с твин-80. Структуры мозга (фронтальная кора (ФК), гиппокамп, гипоталамус и стриатум) извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и взвешивали. Перед экспериментами по определению содержания нейромедиаторов пробы размельчали в ручном гомогенизаторе (тефлон-стекло) в 20 объемах 0,1 н. HClO<sub>4</sub> с добавлением диоксибензиламина (0,5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10 000 г в течение 10 мин. Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом ВЭЖХ/ЭД на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с аналитической колонкой Phenomenex (C<sub>18</sub>, 4 × 150 мм, 4 мкм) [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании межлинейных различий нейрoхимических профилей мышей линий C57BL/6 и BALB/C были обнаружены значительные отличия в содержании нейромедиаторов и их метаболитов в структурах мозга (табл. 1). Так, уровень НА в гипоталамусе мышей C57BL/6 был ниже аналогичного показателя у мышей BALB/C. Полученные нами данные согласуются с известными из литературы сведениями [8]. В стриатуме и ФК высокоактивных животных наблюдалась обратная картина — содержание НА в данных структурах было в 2 раза выше, чем у мышей BALB/C. Обнаружено, что содержание дофамина (ДА), также как и его основных метаболитов — диоксифенилуксусной (ДОФУК) и гомованилиновой (ГВК) кислот, во всех изученных структурах мозга животных линии C57BL/6 понижено в сравнении с теми же параметрами у мышей BALB/C. Сходным образом уровень серотонина (5-НТ), а также его метаболита — 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК), практически во всех изученных структурах мозга мышей, обладающих активной реакцией на стресс, был ниже, чем у низкоактивных животных (BALB/C). Данный факт противоречит известным из литературы данным, согласно которым у животных C57BL/6 было обнаружено более высокое содержание 5-НТ и 5-ОИУК в сравнении с другими линиями мышей [12 – 14]. Это расхождение может объясняться различиями в условиях проведения эксперимента (определение содержания моноаминов проводилось указанными авторами в гомогенатах целого мозга [14] либо при повторном стрессовом воздействии [12, 13]). В то же время, комплексный показатель ДОФУК/ДА, характеризующий скорость кругооборота ДА, во всех функциональных образованиях мозга мышей C57BL/6 значительно превышал аналогичный показатель у животных линии BALB/C, что также согласуется с данными других исследователей [8, 12, 13]. Кроме того, соотношение

Таблица 1. Содержание моноаминов и их метаболитов (в нмоль/г ткани) в структурах мозга интактных мышей линий C57BL/6 и BALB/C ( $M \pm S.E.M.$ )

Линия мышей	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	5-НТ	5-ОИУК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОИУК/5-НТ
<i>Гипоталамус</i>									
C57BL/6	0,921 ± 0,044	0,214 ± 0,026	0,041 ± 0,004	0,067 ± 0,013	2,017 ± 0,148	0,512 ± 0,039	0,228 ± 0,053	0,310 ± 0,042	0,254 ± 0,005
BALB/C	1,183 ± 0,062*	0,388 ± 0,017*	0,066 ± 0,008*	0,188 ± 0,031*	2,378 ± 0,121	0,602 ± 0,032	0,171 ± 0,016	0,483 ± 0,077	0,253 ± 0,004
<i>Фронтальная кора</i>									
C57BL/6	0,293 ± 0,014	0,497 ± 0,215	0,041 ± 0,010	0,108 ± 0,018	0,933 ± 0,054	0,169 ± 0,015	0,171 ± 0,051	0,620 ± 0,226	0,181 ± 0,011
BALB/C	0,140 ± 0,034*	1,544 ± 0,535	0,096 ± 0,030	0,202 ± 0,043	1,052 ± 0,051	0,178 ± 0,020	0,100 ± 0,030	2,645 ± 2,222	0,168 ± 0,016
<i>Гиппокамп</i>									
C57BL/6	0,252 ± 0,020	0,051 ± 0,024	0,007 ± 0,001	0,017 ± 0,006	0,652 ± 0,042	0,179 ± 0,015	2,080 ± 1,224	3,829 ± 2,146	0,283 ± 0,031
BALB/C	0,202 ± 0,024	0,226 ± 0,163	0,020 ± 0,008	0,068 ± 0,017*	0,916 ± 0,076*	0,305 ± 0,026*	0,520 ± 0,230	2,828 ± 1,201	0,350 ± 0,052
<i>Стриатум</i>									
C57BL/6	0,150 ± 0,030	4,836 ± 0,769	0,228 ± 0,041	0,373 ± 0,046	0,628 ± 0,055	0,226 ± 0,022	0,047 ± 0,002	0,083 ± 0,007	0,363 ± 0,025
BALB/C	0,068 ± 0,012	6,712 ± 0,382	0,278 ± 0,009	0,718 ± 0,053**	0,882 ± 0,084*	0,295 ± 0,015*	0,042 ± 0,002	0,107 ± 0,004*	0,358 ± 0,039

**Примечание.** Отличия статистически значимы по сравнению с линией мышей C57BL/6 при: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

ГВК/ДА было пониженным во всех изученных структурах мозга (за исключением гиппокампа) у мышей со слабой эмоциональной реакцией на стресс. Что касается соотношения 5-НТ/5-ОИУК, свидетельствующего о скорости биodeградации серотонина, то межлинейных отличий по этому показателю не наблюдалось.

При изучении эффектов различных доз афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей линий C57BL/6 и BALB/C показано (табл. 2), что увеличение содержания НА происходит после введения афобазола в обеих использованных дозах в ФК мышей C57BL/6. Доза 5 мг/кг вызывала сходное возрастание величины данного параметра в гиппокампе той же линии мышей. Наибольшие изменения содержания ДА и его метаболитов отмечались в ФК, в которой анксиолитик в обеих изученных дозах вызывал значительное снижение этих показателей у мышей обеих линий. При этом следует отметить, что афобазол в дозе 1 мг/кг снижал уровень ДА у мышей BALB/C в большей степени, чем у животных с активной реакцией на стресс. Введение афобазола в дозе 5 мг/кг вызывало сходные эффекты на содержание ДА и его метаболитов у мышей обеих линий. Уровень 5-НТ, а также его метаболита 5-ОИУК не претерпевал каких-либо значимых изменений практически ни в одной из изученных структурах мозга. Исключения составляют лишь гиппокамп, в котором афобазол (1 мг/кг) вызывал снижение содержания 5-ОИУК, и ФК, где отмечался сходный эффект при введении дозы 5 мг/кг. Касаясь изменения комплексных показателей

ДОФУК/ДА и ГВК/ДА, необходимо указать, что максимальные межлинейные отличия по этим показателям отмечались в гиппокампе: у низкоактивных мышей (BALB/C) эти параметры значительно снижались, у животных с активной эмоциональной реакцией на стресс наблюдалось значительное увеличение оборота ДА. Что касается соотношения 5-НТ/5-ОИУК, свидетельствующего о скорости биodeградации серотонина, то следует отметить, что афобазол вызывал дозозависимое снижение этого параметра в гипоталамусе мышей BALB/C. Интересно отметить, что сходное снижение оборота 5-НТ наблюдалось в той же структуре животных C57BL/6, однако статистически достоверными были лишь эффекты афобазола в дозе 5 мг/кг.

В целом полученные результаты свидетельствуют о наличии значительных межлинейных различий нейрохимических профилей мышей линий C57BL/6 и BALB/C и подтверждают предположение о большей чувствительности мышей линии BALB/C к эффектам психотропных соединений [13]. Кроме того, сопоставляя наши результаты с литературными данными [8, 12–14], можно отметить значительную вариабельность различий поведенческих и нейрохимических показателей линий мышей C57BL/6 и BALB/C в зависимости от схемы проведения эксперимента (условия введения препарата, помещение животного в “открытое поле”, многократное стрессирование животных). Данные наших исследований позволяют говорить о том, что афобазол различным образом модулирует ак-

Таблица 2. Влияние афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей линий C57BL/6 и BALB/C

Линии мышей	Афобазол, мг/кг	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	5-НТ	5-ОИУК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОИУК/5-НТ
<i>Гипоталамус</i>										
C57BL/6	1	102,6 ± 6,4	105,5 ± 5,9	113,3 ± 20,0	153,6 ± 16,6	95,2 ± 6,3	90,2 ± 9,1	76,0 ± 10,1	144,2 ± 22,0	93,5 ± 4,0
	5	127,2 ± 10,4*	145,1 ± 18,4	69,4 ± 8,7*	171,9 ± 48,0	121,1 ± 8,3	101,0 ± 13,8	41,6 ± 5,4*	106,4 ± 18,7	82,1 ± 6,4*
BALB/C	1	117,4 ± 9,1	120,2 ± 10,1	129,6 ± 12,2	95,9 ± 11,6	108,2 ± 9,3	91,5 ± 10,0	109,5 ± 7,3	86,1 ± 4,6	84,3 ± 4,7*
	5	110,4 ± 3,8	117,4 ± 4,8**	62,3 ± 10,2*	81,0 ± 10,6	112,7 ± 5,1	85,2 ± 3,9	52,4 ± 6,7*	69,2 ± 8,0	75,9 ± 2,3**
<i>Фронтальная кора</i>										
C57BL/6	1	145,1 ± 15,4*	74,1 ± 43,5	59,3 ± 19,9	92,6 ± 22,2	102,2 ± 3,1	85,9 ± 11,0	322,9 ± 184,0	254,0 ± 89,4	83,9 ± 9,8
	5	123,0 ± 7,0*	15,6 ± 2,6*	15,8 ± 4,7*	53,6 ± 15,2*	103,6 ± 4,7	66,5 ± 5,7*	92,3 ± 28,1	249,4 ± 63,1	65,1 ± 6,5*
BALB/C	1	111,0 ± 12,1	5,3 ± 1,1*	10,8 ± 4,9*	61,1 ± 19,1	102,7 ± 6,2	68,5 ± 10,0	129,8 ± 41,6	87,3 ± 37,7	67,6 ± 10,9
	5	157,1 ± 27,2	12,3 ± 6,8*	6,2 ± 1,8*	37,3 ± 12,5*	113,1 ± 7,2	72,7 ± 6,8	63,7 ± 19,9	86,2 ± 54,4	64,6 ± 4,3*
<i>Гиппокамп</i>										
C57BL/6	1	128,9 ± 13,4*	63,5 ± 12,7	85,6 ± 11,3	227,5 ± 30,0	100,8 ± 10,4	123,5 ± 6,2*	99,3 ± 15,6	259,6 ± 49,9	124,3 ± 9,4
	5	126,8 ± 5,2*	44,9 ± 15,6	77,4 ± 20,6	330,6 ± 136,0	113,8 ± 10,4	126,8 ± 10,6	163,3 ± 54,3	228,2 ± 41,0	118,6 ± 21,0
BALB/C	1	105,9 ± 15,6	62,6 ± 12,8	93,2 ± 24,9	88,9 ± 17,0	106,0 ± 11,0	75,3 ± 5,7*	39,1 ± 6,7	23,2 ± 5,0	72,6 ± 8,1
	5	71,3 ± 12,2	72,8 ± 30,1	76,6 ± 12,4	108,1 ± 30,2	104,9 ± 6,2	88,8 ± 5,4	41,3 ± 10,3	42,2 ± 12,4	80,7 ± 2,8
<i>Стриатум</i>										
C57BL/6	1	99,1 ± 4,7	124,2 ± 9,0	94,0 ± 6,8	136,9 ± 12,3	93,0 ± 6,3	97,7 ± 6,6	75,7 ± 2,5*	101,3 ± 5,1	106,1 ± 8,6
	5	119,0 ± 17,1	159,4 ± 8,7*	69,7 ± 6,0	122,1 ± 20,9	113,9 ± 9,1	115,5 ± 10,6	43,5 ± 2,5**	69,1 ± 9,2*	100,4 ± 4,7
BALB/C	1	121,4 ± 36,3	119,5 ± 6,9	113,0 ± 12,8	101,3 ± 11,0	92,6 ± 7,9	85,3 ± 5,9	93,3 ± 8,9	83,6 ± 4,3*	87,6 ± 4,8
	5	99,9 ± 19,7	110,6 ± 4,6	62,3 ± 4,3**	76,3 ± 4,5*	93,4 ± 2,6	85,8 ± 5,5	55,5 ± 2,8**	69,7 ± 4,2*	85,7 ± 4,5

**Примечание.** Приведены средние значения и стандартные ошибки среднего в % от контроля соответствующей линии мышей ( $M \pm S.E.M.$ ). Отличия статистически значимы по сравнению с контролем соответствующей линии мышей при: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

тивность нейромедиаторных (в частности, норадренергической) систем мозга животных с разным эмоциональным фенотипом. С другой стороны, можно предположить, что данный анксиолитик влияет преимущественно на ДА-ергическую передачу в мозге обеих линий мышей и в слабой степени снижает активность серотонинергических систем.

Представляется перспективным изучение эффектов афобазола на другие нейромедиаторные системы мозга, в частности, аминоксидергическую. Участие последней в механизме психотропного действия препарата вполне вероятно в связи с тем, что анксиолитическое действие афобазола связывают с его способностью оказывать защитное влияние на ГАМК-рецепторный комплекс в условиях эмоционально-стрессовой реакции.

## ВЫВОДЫ

1. Уровень норадреналина (НА) в гипоталамусе интактных мышей C57BL/6 ниже аналогичного показателя у мышей BALB/C, тогда как в стриатуме и фронтальной коре (ФК) мышей C57BL/6 содержание НА в 2 раза выше, чем у животных со слабой реакцией на эмоциональный стресс.

2. Афобазол в дозах 1 и 5 мг/кг вызывал увеличение содержания НА в ФК мышей C57BL/6. Доза 5 мг/кг вызывала сходное возрастание данного параметра в гиппокампе той же линии мышей. Изучаемое соединение в дозе 1 мг/кг снижало уровень ДА у животных BALB/C в большей степени, чем у мышей с активной реакцией на стресс.

## A COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECT OF AFOBAZOLE ON BRAIN MONOAMINE SYSTEMS IN BALB/C AND C57BL/6 MICE

V. S. Kudrin

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

The comparative study of the effects of afobazole, a novel anxiolytic drug, on the content of brain monoamines and their metabolites in the frontal cortex (FC), hippocampus (HC), hypothalamus (HT), and striatum of BALB/C and C57BL/6 mice (with weak and strong response to emotional stress, respectively) was carried out using HPLC/ED techniques. The norepinephrine (NE) content in the HT of intact C57BL/6 mice is lower, whereas that in the FC and HC of these mice is twice higher than in BALB/C mice. The levels of dopamine (DA) and its metabolites (dihydroxyphenylacetic and homovanillic acids) in all the brain structures studied was lower in C57BL/6 than in BALB/C mice. Afobazole (1 and 5 mg/kg) increased the NE content in the FC of C57BL/6 mice, while a similar increase in the HC of these mice was observed only upon afobazole injections in a dose of 5 mg/kg. The most prominent changes in the level of DA and its metabolites were observed in the FC, where the DA content significantly decreased after afobazole administration in both doses in BALB/C as well as in C57BL/6 mice. The dose of 1 mg/kg, reduced the DA level in the FC of BALB/C mice more effectively than in animals with active reaction to stress. These results suggest that Afobazole differently modulates the parameters of catecholaminergic neurotransmission, while not affecting substantially the serotonergic system in the brain of animals with the different genetically determined stress reaction.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Александровский, Г. Г. Незнамов, *Нейрофармакология антидепрессантов*, Москва, Медицина (1984) сс. 175 – 184.
2. А. К. Жанатаев, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(2), С. 57 – 60 (2000).
3. И. И. Мирошниченко, В. С. Кудрин, К. С. Раевский, *Фармакол. и токсикол.*, **51**(2), 26 – 29 (1988).
4. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 15 – 19 (2001).
5. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков, Л. Э. Маметова, *Ж. неврол. психиатр.*, **105**(4), 35 – 40 (2005).
6. С. Б. Середенин, Б. А. Бадыштов, М. М. Никитина, *Бюл. экпер. биол.*, **116**(8), 306 – 307 (1982).
7. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Ю. А. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, (11), 3 – 9 (1998).
8. С. Б. Середенин, А. С. Лапицкая, С. А. Надоров, В. С. Кудрин, Б. А. Бадыштов, *Бюл. экпер. биол.*, **134**(5), 574 – 577 (2000).
9. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(5), 2 – 24 (2004).
10. P. L. Broadhurst, *Behav. Genet.*, **5**, 299 – 319.
11. H. Lal and M. W. Emmet-Oglesby, *Neuropharmacol.*, **22**, 1423 – 1441 (1983).
12. F. Messiha, *Comp. Biochem. Physiol.*, **96**, 389 – 392 (1990).
13. F. Messiha, *Toxicol. Letters*, **58**, 77 – 84, (1991).
14. F. Messiha, W. J. Martin, and K. D. Bucher, *Gen. Pharmacol.*, **21**, 459 – 464 (1990).
15. S. B. Seredenin, Yu. A. Blednov, et al., *Drug dependence and emotional behavior*, A. Waldman (ed.), N. Y., Consult Bureau, 49 – 77 (1986).
16. S. B. Seredenin and Yu. A. Blednov, *Biological Basis of Individual Sensitivity to Psychotropic Drugs*, S. B. Seredenin, V. Longo, G. Gaviraghi (eds.), Grasham Press, Edinburgh, 25 – 38 (1994).

Поступила 03.04.06