

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## ДЕЙСТВИЕ ПИРАЦЕТАМА НА ПОВЕДЕНИЕ И РЕЦЕПТОРЫ МОЗГА МЫШЕЙ C57BL/6 И BALB/c — НООТРОПНЫЙ И АНКСИОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ

Г. И. Ковалёв, Е. А. Кондрахин, Р. М. Салимов, Г. Г. Незнамов<sup>1</sup>

Исследовано воздействие однократного и многократного введения пирacetама на динамику развития специфического ноотропного и неспецифического анксиолитического поведенческих эффектов и их возможную взаимосвязь с NMDA- и БДЗ-рецепторами в мозге инбредных мышей с различными исходными уровнями когнитивного и эмоционального статусов — C57BL/6 и BALB/c. В лобной коре мозга у BALB/c обнаружено на 17 % меньше мест связывания [<sup>3</sup>H]-флуниотразепама, а в гиппокампе — на 22 % меньше мест связывания для [<sup>3</sup>H]-МК-801, по сравнению с C57BL/6. Меньшая плотность БДЗ-рецепторов соответствовала большей тревожности мышей BALB/c, а меньшее количество NMDA-рецепторов — меньшей когнитивной способности этой линии. На основании этого линия BALB/c была использована в качестве модели психопатологии, сочетающей повышенную тревожность и когнитивный дефицит. Под воздействием 1-, 7- и 14-кратного введения пирacetама в ежедневной дозе 200 мг/кг, внутривентрикулярно, у мышей BALB/c наблюдалось быстрое увеличение плотности NMDA-рецепторов и медленное нарастание специфического ноотропного эффекта. Неспецифический анксиолитический эффект у мышей BALB/c нарастал в течение первой недели без изменения плотности БДЗ-рецепторов, после чего исчезал к концу эксперимента с сопутствующим снижением БДЗ-рецепции. У мышей BALB/c медленно проявляющееся специфическое ноотропное действие пирacetама формируется вслед за увеличением NMDA-рецепторов, а быстро развивающийся анксиолитический эффект предшествует изменению БДЗ-рецепции.

**Ключевые слова:** пирacetам; NMDA-рецептор; бензодиазепиновый рецептор; крестообразный лабиринт; радиолигандное связывание; исследовательское поведение; тревожность; C57BL/6; BALB/c

### ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с представлениями основоположников ноотропной концепции о характеристике препаратов этой группы, они обладают специфическим влиянием на процессы обучения, внимания, памяти и другие когнитивные функции, не сопровождающиеся иными проявлениями фармакологической активности, включая изменения со стороны нейромедиаторных систем мозга [18, 25]. Однако полученные в последние десятилетия клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о наличии в спектре фармакологической активности ноотропных средств как специфического, так и неспецифического компонентов [8, 11].

Известно, что специфические и неспецифические фармакологические эффекты психотропных препаратов имеют различные динамические характеристики при их реализации в клинических условиях. К пер-

вым, ретардированным, медленно развивающимся после предшествующего латентного периода, относят антидепрессивный, антипсихотический и ноотропный. Ко вторым, быстропроявляющимся, в том числе у здоровых лиц без психической патологии — анксиолитический, психостимулирующий и седативный [1, 10].

В последние годы в экспериментах на животных показано, что специфический и неспецифический эффекты после однократного введения ноотропов могут быть не связаны между собой и, возможно, имеют в своей основе разные механизмы действия [3, 9, 12]. Недавно такая независимость в реализации анксиолитического и ноотропного компонентов спектра действия ряда препаратов на поведенческом и рецепторном уровнях после субхронического введения была продемонстрирована в сравнительных экспериментах на линейных мышах C57BL/6 и BALB/c, различающихся по исходным характеристикам исследовательского и тревожного статусов [2].

Целью настоящей работы явилось экспериментальное изучение рецепторных механизмов в динамике формирования ноотропного (специфического) и анксиолитического (неспецифического) действия пи-

<sup>1</sup> Лаборатория радиоизотопных методов исследований (зав. — проф. Г. И. Ковалёв); Лаборатория клинической психофармакологии (зав. — проф. Г. Г. Незнамов) ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

рацетама в условиях одно- и многократного введения мышам C57BL/6 и BALB/c.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Исследование эффективности исследовательского поведения по методике крестообразного лабиринта.

Исследовательское поведение и тревожность оценивали в крестообразном лабиринте [14]. Эксперименты проводили на самцах мышей линий BALB/c ( $n = 45$ ) и C57BL/6 ( $n = 43$ ), полученных из питомника “Столбовая”, массой 23 – 25 г, которых содержали в виварии ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму.

Пирацетам вводили внутривентриально в дозе 200 мг/кг/день. Каждую линию мышей разделяли на контрольную (физраствор) и опытную группу. После однократного, субхронического (в течение 7 суток) и хронического (в течение 14 суток) введения препарата мышам тестировали в крестообразном лабиринте. Подробное описание метода и интерпретации показателей представлены в предыдущих публикациях [15].

Для представления эффективности исследовательского поведения (ЭИП) был введен нормированный параметр, который является совокупностью двух главных параметров ЭИП в крестообразном лабиринте — показателей числа визитов в боковые отсеки во время первого патрулирования и общего числа патрулирований. Нормированный параметр является среднеарифметической суммой данных показателей, при этом вклад каждого из них равноценен. Формула расчета нормированного параметра  $= ((100 - (F_{PtrN} - 4) \cdot 11,111) + PatrIN \cdot 33,33)/2$  (где  $F_{PtrN}$  — длина первого цикла патрулирования и  $PatrIN$  — число циклов патрулирования). Тревожность оценивали по латентному периоду первого захода в боковой отсек лабиринта.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

После исследования в лабиринте мышам декапитировали, извлекали структуры головного мозга и замораживали в жидком азоте для проведения радиоландного анализа с бензодиазепиновыми (БДЗ) и NMDA-рецепторами. Результаты экспериментов *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин  $K_d$  и  $B_{max}$ , отражающих степень сродства рецептора к ли-

ганду (нМ) и количество мест связывания лиганда (фемтомоль/мг белка мембран), соответственно.

### 2. Связывание с NMDA рецепторами.

а) *Выделение фракции мембран гиппокампа* проводили по методу [27]. Гиппокампы размельчали в гомогенизаторе “тефлон-стекло” в 10 объемах буфера № 1 (5 mM HEPES, 4,5 mM Tris, 0,32 M сахароза, pH 7,6). Гомогенат разбавляли 50 объемами буфера № 2 (5 mM HEPES, 4,5 mM Tris, pH 7,6) и центрифугировали при 1000 g 10 мин на ультрацентрифуге Beckman L7 – 35. Супернатант сливали и повторно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Для увеличения выхода белка супернатант центрифугировали дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и вновь центрифугировали при 8000 g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 3 (5 mM HEPES, 4,5 mM Tris, 1 mM  $Na_4EDTA$ , pH 7,6) и троекратно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и однократно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объемах буфера № 2 и замораживали в криобирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли 10 объемами буфера № 2, центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера № 2. Концентрация белка в образцах мембран составляла 2 – 3 мг/мл.

б) *Радиоландный анализ.* В эксперименте использовали меченный тритием канальный блокатор NMDA-рецептора [ $^3H$ ]-Dizocilpine ( $[^3H]$ МК-801) с удельной активностью 210 Кюри/ммоль, полученный методом твердофазного катализа в ОХФВ ИМГ РАН [4]. Реакционная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 200 мкл буфера № 2, 50 мкл раствора меченого лиганда (в диапазоне концентраций от 0,1 до 20 нМ) и 250 мкл суспензии мембран. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого МК-801 (1 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman), предварительно смоченные 0,3 % полиэтиленгликолем в течение 2 ч при 4 °С. Каждую пробирку промывали один раз холодным буфером № 2, затем фильтры промыва-

Таблица 1. Поведенческие и нейрохимические характеристики мышей линии C57BL/6 и BALB/c ( $M \pm S.E.M.$ )

Группа	БДЗ-рецепторы, $B_{max}$ (фмоль/мг белка)	NMDA-рецепторы, $B_{max}$ (фмоль/мг белка)	Эффективность исследова- тельного поведения	Тревожность, с
BALB/c	3016 ± 28,83	2063 ± 25,88	64,53 ± 5,03	14,63 ± 1,10
C57BL/6	3613 ± 102,7**	2654 ± 40,96**	75,31 ± 3,86*	6,02 ± 0,47**

Примечание. \*/\*\* — достоверное отличие от линии BALB/c по *t*-критерию Стьюдента при  $p < 0,05/ p < 0,01$ .

Таблица 2. Влияние пираретама (200 мг/кг/день) при остром, 7- и 14-дневном введении на поведенческие характеристики у мышей линий BALB/с и C57BL/6 ( $M \pm S.E.M$ )

Группа	Эффективность исследовательского поведения		Тревожность, с	
	Контроль	Пираретам	Контроль	Пираретам
BALB/с острое	65,38 ± 4,05	68,65 ± 6,69	13,31 ± 1,20	13,06 ± 1,11
BALB/с субхроническое	66,66 ± 5,65	73,45 ± 4,37	13,34 ± 1,18	10,07 ± 1,34*
BALB/с хроническое	64,21 ± 6,08	85,26 ± 5,53*	13,50 ± 0,93	14,50 ± 1,63
C57BL/6 острое	74,03 ± 5,00	76,21 ± 5,51	5,73 ± 0,36	5,16 ± 0,54
C57BL/6 субхроническое	74,34 ± 3,72	77,00 ± 4,73	5,45 ± 0,47	5,42 ± 0,75
C57BL/6 хроническое	72,96 ± 4,09	84,47 ± 6,16*	5,76 ± 0,55	5,40 ± 0,59

Примечание. \* — достоверное отличие от контрольной группы по t-критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ .

ли три раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе, переносили в сцинтилляционные флаконы, заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола.

### 3. Связывание с бензодиазепиновыми рецепторами.

а) *Выделение фракции мембран коры мозга мышей* проводили по методу [16] с модификациями. Ранее замороженные образцы коры мозга гомогенизировали в 16 мл ледяного (0 – 4 °С) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7,4) используя ручной гомогенизатор “тефлон-стекло”. Полученную суспензию центрифугировали при 42 000 g в течение 25 мин в ультрацентрифуге Allegra 64k R (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 Tris-HCl буфера. Конечная концентрация белка в инкубационной среде составляла 0,5 – 1,0 мг/мл.

#### б) Радиолигандный анализ.

Мембранную фракцию структур головного мозга инкубировали с <sup>3</sup>H-флунизепамом для построения

кривой насыщения в концентрации от 0,1 до 20 нМ (удельная активность 81 Кюри/ммоль, “NEN”) в течение 30 мин при температуре 0 – 4 °С. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого диазепам (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Процесс связывания останавливали путем добавления ледяного буфера и быстрой фильтрации через стекловолокнистые 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 объемом 5 мл и использовали для счета радиоактивности.

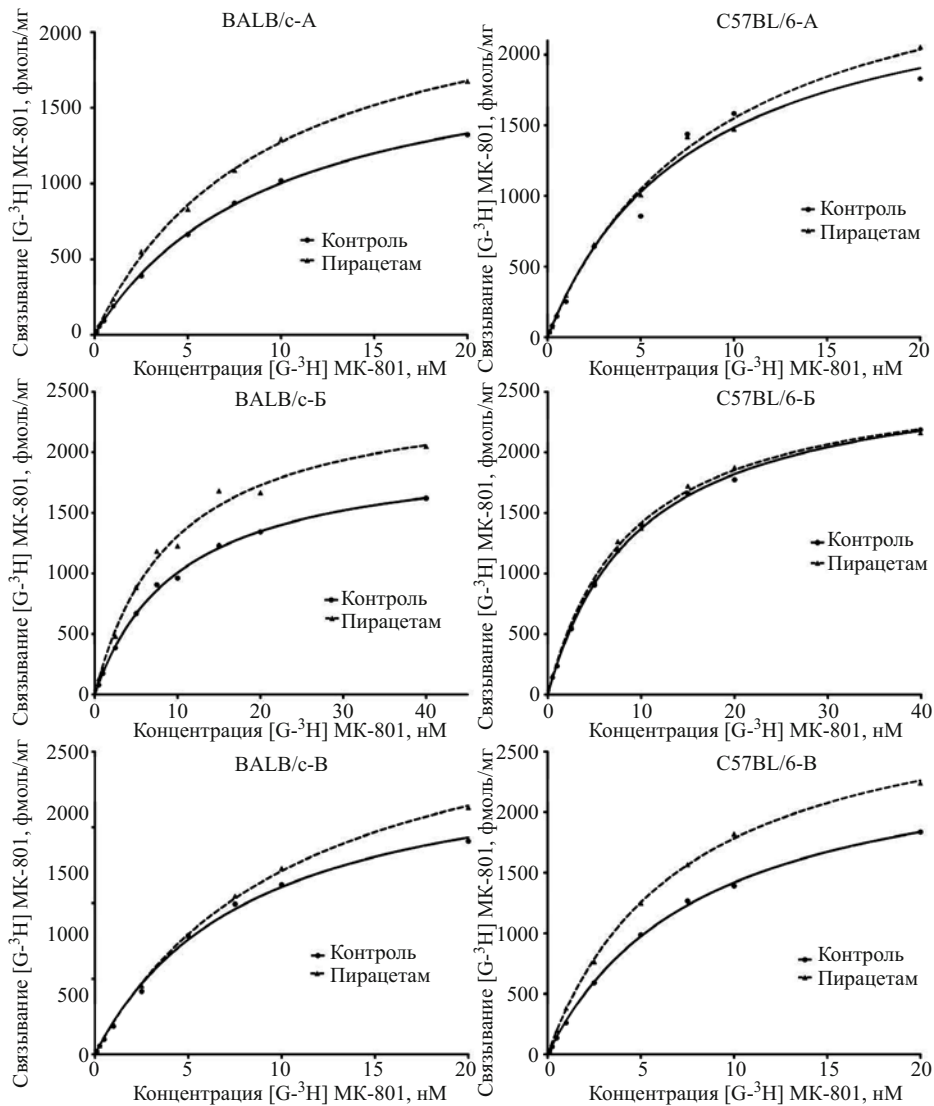
Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2900TR (“PerkinElmer”) с эффективностью счета 45 %. Неспецифическое связывание составляло не более 10 % от общего.

Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури. Показатель количества мест связывания ( $B_{max}$ , фемтомоль/мг белка) и константу диссоциации

Таблица 3. Влияние пираретама (200 мг/кг/день) при остром, 7- и 14-дневном введении на характеристики рецепторного связывания *ex vivo* в мозге мышей BALB/с и C57BL/6

Группы	Параметр	NMDA-рецепторы		Бензодиазепиновые рецепторы	
		Контроль	Пираретам	Контроль	Пираретам
BALB/с острое	$B_{max}$	1974 ± 35	2461 ± 56*	2915 ± 25	2927 ± 59
	$K_d$	9,68 ± 0,36	9,32 ± 0,43	1,87 ± 0,05	1,87 ± 0,13
BALB/с субхроническое	$B_{max}$	2051 ± 49	2546 ± 115*	3015 ± 44	3038 ± 62
	$K_d$	10,26 ± 0,60	9,47 ± 1,08	2,02 ± 0,10	2,34 ± 0,16
BALB/с хроническое	$B_{max}$	2037 ± 88	2550 ± 48*	3117 ± 54	2662 ± 105*
	$K_d$	9,61 ± 0,78	11,0 ± 0,40	1,57 ± 0,15	1,66 ± 0,27
C57BL/6 острое	$B_{max}$	2659 ± 270	2968 ± 147	3656,3 ± 94	4448 ± 84**
	$K_d$	8,90 ± 1,06	9,15 ± 0,94	1,98 ± 0,18	2,0 ± 0,34
C57BL/6 субхроническое	$B_{max}$	2724 ± 44	2679 ± 56	3603 ± 27	3295 ± 25*
	$K_d$	9,71 ± 0,39	8,89 ± 0,47	2,12 ± 0,05	2,18 ± 0,18
C57BL/6 хроническое	$B_{max}$	2602 ± 57	3083 ± 50*	3613 ± 51	2894 ± 75**
	$K_d$	8,34 ± 0,39	8,18 ± 0,27	1,53 ± 0,15	1,63 ± 0,15

Примечание: \*/\*\* — достоверное отличие от контрольной группы по t-критерию Стьюдента при  $p < 0,05/ p < 0,01$ .



**Рис. 1.** Влияние пирацетама (200 мг/кг/день) при различной продолжительности введения (острое (А), 7 дней (Б), 14 дней (В)) на NMDA-рецепторы в мозге мышей BALB/c и C57BL/6.

лиганд-рецепторных комплексов ( $K_d$ , нМ) рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism 5 Demo.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

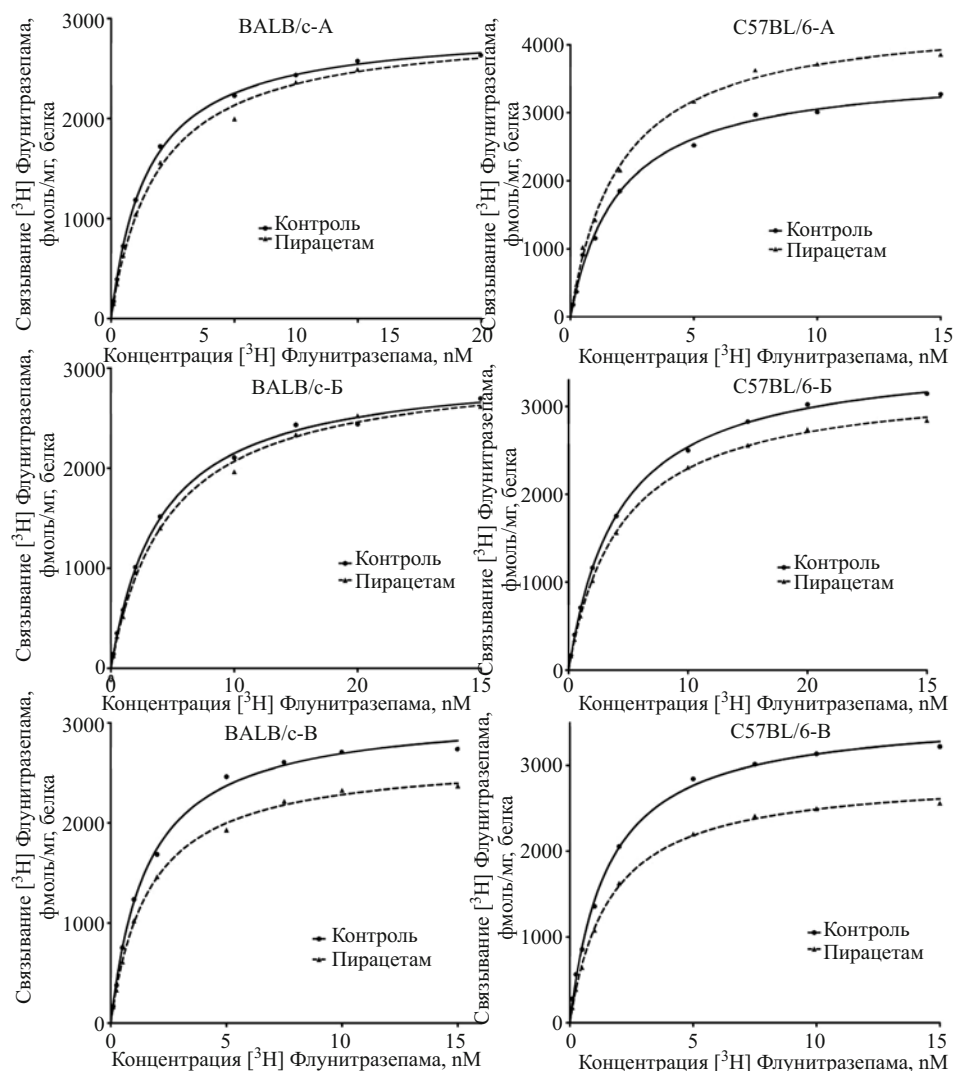
Результаты сравнительного тестирования мышей двух линий приведены в табл. 1: у мышей линии BALB/c нормированный параметр ЭИП был ниже на 15 %, чем у мышей линии C57BL/6 ( $64,5 \pm 5,0$  против  $75,3 \pm 3,9$ ;  $p < 0,05$ ). Более того, BALB/c оказались существенно более тревожными, чем мыши C57BL/6, так как у первых величина латентного периода 1-го захода в боковой отсек в 2 с лишним раза превосходила аналогичный показатель у вторых:  $14,63 \pm 1,06$  с и  $6,0 \pm 0,47$  с ( $p < 0,05$ ).

По плотности NMDA-рецепторов в мембранах гиппокампа мозга мыши линии C57BL/6 превосходили линию BALB/c на 29 %: величина  $B_{max}$  у первых соответствовала  $2654 \pm 40$  фемтомоль/мг белка, тогда как у

вторых  $2063 \pm 25$  фемтомоль/мг белка (табл. 1). При определении концентрации мест связывания для [ $^3H$ ]-флунизтапема с БДЗ-рецепторами коры установлено, что у мышей линии C57BL/6 величина  $B_{max}$  на 20 % больше, чем в популяции BALB/c ( $3613 \pm 102$  фемтомоль/мг белка и  $3016 \pm 28$  фемтомоль/мг белка, соответственно, табл. 1).

Таким образом, мыши линии BALB/c по сравнению с мышами линии C57BL/6 характеризуются меньшей эффективностью исследовательского поведения и большей тревожностью в крестообразном лабиринте, а также меньшей плотностью БДЗ-рецепторов в коре мозга и NMDA-рецепторов в гиппокампе.

Эти же параметры были изучены после трёх режимов системного введения пирацетама. Динамика влияния пирацетама на ЭИП и тревожность после острого, субхронического и хронического введения представлена в табл. 2. Следует отметить, что характерное для



**Рис. 2.** Влияние пирацетама (200 мг/кг/день) при различной продолжительности введения (острое (А), 7 дней (Б), 14 дней (В) на бензодиазепиновые рецепторы в мозге мышей BALB/с и C57BL/6.

обеих линий животных поведение в группах плацебо сохраняется постоянным при всех режимах введения.

Иные результаты были получены при применении пирацетама: после острого введения препарата в дозе 200 мг/кг уровень ЭИП как в группе BALB/с, так и в группе C57BL/6 не отличался от ЭИП в контрольных группах животных. После субхронического введения ноотропа этот параметр у мышей C57BL/6 оставался неизменным, тогда как в группе BALB/с имел тенденцию к увеличению на 7 %. 14-кратное введение препарата приводило к увеличению ЭИП у линии C57BL/6 на 16 %, а у линии BALB/с — на 33 % (табл. 2).

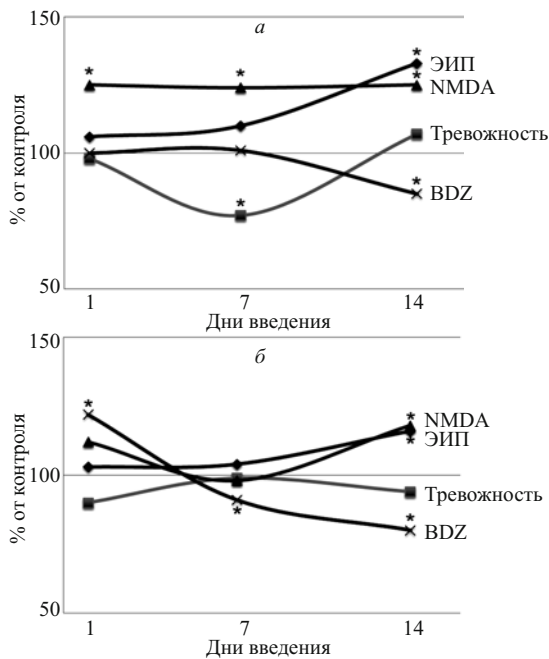
Влияние на тревожность проявилось лишь в случае субхронического введения пирацетама мышам BALB/с — препарат снизил уровень тревожности на 23 % (табл. 2).

Динамика влияния пирацетама на NMDA- и БДЗ-рецепторы мозга мышей обеих сравниваемых линий представлена на рис. 1 и 2. Результаты обработки кривых насыщения для обоих рецепторов приведены в

табл. 3. Надо отметить, что величины  $K_d$  в мембранах структур мозга обеих линий мышей, отражающие сродство рецепторов к радиоактивным лигандам, практически не отличались при различных режимах введения препарата.

Острое, субхроническое и хроническое введение пирацетама приводили к увеличению количества мест связывания  $B_{max}$  для  $[^3H]$ -МК-801 с NMDA-рецепторами гиппокампа мышей BALB/с на 24, 24 и 25 % по сравнению с контролем ( $1974 \pm 35 - 2461 \pm 56$ ,  $2051 \pm 49 - 2546 \pm 115$  и  $2037 \pm 88 - 2550 \pm 48$  фемтомоль/мг белка, соответственно) (рис. 1 А, Б, В).

У мышей C57BL/6 острое и субхроническое введение не вызывали существенных изменений плотности NMDA-рецепторов, тогда как при 14-дневном воздействии препарата обнаружено 18 % увеличение  $B_{max}$  с  $2602 \pm 57$  фемтомоль/мг белка в группе плацебо до  $3083 \pm 50$  фемтомоль/мг белка в опытной группе (рис. 1).



**Рис. 3.** Динамика выраженности поведенческих и рецепторных характеристик мышей BALB/c (а) и C57BL/6 (б) под влиянием пирacetама (200 мг/кг/день).

\* — достоверное ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента) отличие от контроля, принятого за 100 %.

Иная динамика наблюдалась для плотности БДЗ-рецепторов (рис. 2): в мембранах коры мозга мышей BALB/c острое и субхроническое введение пирacetама не влияли на величину  $B_{\max}$ , тогда как хроническое введение вызывало снижение  $B_{\max}$  на 15 % относительно группы плацебо (табл. 3). В популяции мышей C57BL/6 плотность мест связывания [ $^3\text{H}$ ]-флунизтазема после острого введения увеличена на 22 % ( $p < 0,01$ ), субхроническое воздействие приводило к их уменьшению на 9 % ( $p < 0,05$ ), а 14-дневное введение сопровождалось уже 20 % сокращением плотности мест связывания БДЗ-рецепторов ( $p < 0,01$ ).

По рекомендации ВОЗ к группе ноотропных препаратов отнесены лекарственные средства, способные оказывать прямое активирующее влияние на процессы обучения, улучшать память и умственную деятельность, а также повышать устойчивость мозга к агрессивным воздействиям. Надо отметить, что авторы ноотропной концепции изначально указывали на обязательность отсутствия у ноотропов проявлений седации или стимуляции в психофармакологических тестах, равно как и на их инертность в отношении нейромедиаторных систем организма [18, 25].

Однако позже представления о терапевтических, фармакологических и нейрохимических свойствах пирacetама были существенно скорректированы. Во-первых, было установлено, что в спектре фармакологической активности пирacetама присутствуют т. н. “неспецифические” компоненты, в частности, анксиолитический и стимулирующий [8]. Кроме того, эти

“неспецифические” эффекты ноотропов характеризовались быстротой проявления, тогда как “специфический” ноотропный развивался относительно медленно [12, 13].

Аналогичные результаты были получены и в экспериментах с использованием традиционных фармакологических тестов — “открытого поля”, “приподнятого крестообразного лабиринта”, “экстраполяционного избегания”, условной реакции пассивного избегания [12]. В тесте “конфликтная ситуация” анксиолитическую активность пирacetама ослабляли антагонисты ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса — биккукуллин, пикротоксин, флумазенил, что свидетельствует о вовлечении этих рецепторов в механизм проявления “неспецифического” эффекта пирacetама [9].

Действительно, на снижение количества БДЗ-рецепторов в префронтальной коре мозга больных с паническими расстройствами, по сравнению с мозгом здоровых добровольцев было указано с помощью метода нейровизуализации рецепторов *in vivo* — позитрон-эмиссионной томографии (PET, positron emission tomography) с использованием в качестве радиолганда антагониста БДЗ-сайта [ $^{11}\text{C}$ ]-флумазенила [21]. Близкие результаты были получены методом SPECT (single photon emission computed tomography) с радиолгандом [ $^{123}\text{I}$ ]-иомазенилом у больных с генерализованными тревожными расстройствами, а также при посттравматическом синдроме [23].

Эти данные пролили свет на некоторые функции БДЗ-рецепторов в развитии феномена тревожных расстройств в клинике, но и совпали с результатами доклинических исследований на линейных животных с различным эмоционально-стрессовым фенотипом. Действительно, в коре мозга инбредных мышей BALB/c, проявляющих признаки неophobia при исследовании отсеков крестообразного лабиринта, в условиях *ex vivo* обнаруживается меньше рецепторов [ $^3\text{H}$ ]-флунизтазема, чем в мозге “нетревожных” мышей C57BL/6. По-видимому, состоянию повышенной тревожности соответствует сниженная плотность БДЗ-рецепторов в коре мозга.

Хорошо известно, что NMDA-рецепторы играют существенную роль в обучении и памяти, и, соответственно, в психопатологии, вовлекающей эти высшие психические функции [17]. Убедительных данных PET и SPECT, описывающих характеристики NMDA-рецепторов в клинических условиях *in vivo* обнаружить не удалось ввиду того, что разработанные в настоящее время радиолганды, хорошо зарекомендовавшие себя в условиях *in vitro*, в условиях *in vivo* обладают плохой проникаемостью через ГЭБ, быстро метаболизируются и/или проявляют высокую степень неспецифического связывания с рецептором [22].

Однако в экспериментах с использованием моделей когнитивного дефицита накоплен обширный материал. В настоящей работе показано, что инбредные мыши C57BL/6 проявляют большую эффективность

исследовательского поведения в незнакомой обстановке, а величина  $B_{\max}$  связывания [ $^3\text{H}$ ]-МК-801 у них в гиппокампе в условиях *ex vivo* оказывается выше, чем у мышей BALB/c. Аналогичные результаты были получены при сравнении поведения и *ex vivo* рецепторного связывания субпопуляций аутбредных мышей ICR, разделённых по уровню эффективности исследовательского поведения в тесте “крестообразный лабиринт” — у мышей с низкой эффективностью поведения плотность мест связывания [ $^3\text{H}$ ]-МК-801 в мембранах гиппокампа была ниже, чем у мышей с высокой ЭИП [6]. В другой работе у мышей линии BALB/c способность к пространственной ориентации в бассейне Морриса также оказалась ниже, по сравнению с линией C57BL/6 [26]. У животных в модели ускоренного старения, ослабевала когнитивная функция, а плотность NMDA-рецепторов в мозге также оказалась сниженной [24]. Совокупность представленных данных указывает на существование взаимосвязи между исследовательской активностью животных и плотностью NMDA-рецепторов гиппокампа.

Таким образом, представляло интерес исследовать воздействие режимов острого и многократного введения пирарцетама на динамику развития быстрого (неспецифического, анксиолитического) и медленного (специфического, ноотропного) поведенческих эффектов препарата и их возможную взаимосвязь с плотностью NMDA- и БДЗ-рецепторов в мозге инбредных мышей с различными исходными уровнями когнитивного и эмоционального статусов.

В работе были подтверждены полученные ранее данные о межлинейных различиях поведения в условиях незнакомой обстановки: мыши линии BALB/c показали себя более тревожными (в 2,5 раза) и менее эффективными (на 13 %) в обследовании отсеков крестообразного лабиринта, чем мыши линии C57BL/6. В лобной коре мозга у BALB/c обнаружили на 17 % меньше мест связывания [ $^3\text{H}$ ]-флунизепам, а в гиппокампе — на 22 % меньше мест связывания для [ $^3\text{H}$ ]-МК-801. Меньшая плотность БДЗ-рецепторов сопровождалась большей тревожностью мышей BALB/c, а меньшее количество NMDA-рецепторов — меньшей когнитивной способностью мышей этой линии (табл. 1). Таким образом, линия BALB/c предстала в качестве возможной модели психопатологии, сочетающей повышенную тревожность и когнитивный дефицит.

Ранее нами было показано, что исследовательское поведение мышей этих линий в лабиринте и уровень проявленной ими тревожности существуют статистически независимо друг от друга, на основании чего было предположено, что и механизмы их регуляции могут различаться [7].

При исследовании влияния 1-, 7- и 14-дневного введения пирарцетама в дозе 200 мг/кг/сутки на динамику поведенческих и рецепторных характеристик мышей обеих линий (рис. 3) было обнаружено, что уже после

острого введения препарата плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе BALB/c возрастала на 20 – 25 % относительно контроля (физраствор), практически достигая уровня, присущего мышам C57BL/6, и оставаясь на нём как после субхронического, так и после хронического введения. Уровень ЭИП при этом возрастал постепенно, до максимума после 14-й инъекции пирарцетама (рис. 3, А).

В группе межлинейного сравнения (C57BL/6) и уровень ЭИП, и плотность NMDA-рецепторов в гиппокампах практически не изменялись в результате 1- и 7-кратного введения препарата, но оба параметра увеличились после 14-й инъекции препарата (рис. 3, Б).

Можно допустить, что как плотность NMDA-рецепторов, так и связанная с ним ЭИП под действие пирарцетама возрастает преимущественно у мышей с исходным дефицитом когнитивной функции, причём проявление её происходит вслед за быстрым увеличением числа этих рецепторов в гиппокампе. Активизация аналогичных показателей при отсутствии нативного дефицита также наблюдается, но медленней и в более поздние сроки.

Анксиолитический эффект пирарцетама обнаруживает двухфазный характер: нарастает к 7-му дню эксперимента и уменьшается к концу сессии (рис. 3, А). При этом количество БДЗ-рецепторов на протяжении первой половины сессии не изменяется относительно внутрилинейного контроля и уменьшается к концу эксперимента одновременно с увеличением тревожности. В данном случае рецепторный компонент не предшествует, а скорее следует за проявлением поведенческого показателя. У линии C57BL/6 увеличение пластичности БДЗ-рецепторов наблюдается уже после 1-й инъекции пирарцетама, при этом анксиолитический эффект выражен незначительно. В дальнейшем последний практически не проявляется, тогда как плотность БДЗ-рецепторов коры мозга быстро и монотонно снижается к концу периода наблюдения (рис. 3, Б).

Анализ полученных данных позволяет сформулировать следующие обобщения: во-первых, медленно реализуемый ноотропный эффект пирарцетама связан с быстрой активацией NMDA-рецепторного компонента и постепенно развивается вслед за ним. Во-вторых, быстро проявляющийся анксиолитический эффект препарата скорее предшествует, а не следует за изменениями БДЗ-рецепции, что можно связать с полимодальностью механизма формирования анксиолитического эффекта, в который могут быть вовлечены н-холинорецепторы [5], серотониновые [19], глутаматные [20] и некоторые другие рецепторные системы мозга. Становится очевидным, что изучение нейрохимических механизмов формирования и развёртывания “специфических” и “неспецифических” эффектов ноотропов, в целом, и пирарцетама — в частности, нуждается в дальнейшем изучении, результаты которого будут способствовать оптимизации их использования в клинике.

## ВЫВОДЫ

1. Сравнение мышей инбредных линий C57BL/6 и BALB/c в условиях незнакомой обстановки в тесте “закрытый крестообразный лабиринт” обнаружило у BALB/c более высокий уровень тревожности и менее выраженную эффективность исследовательского поведения (ЭИП).

2. Мозг мышей BALB/c характеризуется меньшей плотностью бензодиазепиновых рецепторов в коре мозга и NMDA-рецепторов в гиппокампе.

3. Под воздействием 1-, 7- и 14-кратного введения пирacetам в ежедневной дозе 200 мг/кг, внутривенно, у мышей BALB/c наблюдается быстрое увеличение плотности NMDA-рецепторов и медленное нарастание специфического ноотропного эффекта. У мышей C57BL/6 плотность NMDA-рецепторов и ЭИП увеличиваются лишь в результате хронического введения препарата.

4. Под воздействием 1-, 7- и 14-кратного введения пирacetам в ежедневной дозе 200 мг/кг, в/б, у мышей BALB/c неспецифический анксиолитический эффект увеличивался в течение первой недели без изменения плотности БДЗ-рецепторов, после чего исчезал к концу эксперимента с сопутствующим снижением БДЗ-рецепции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Банщиков, Ф. Б. Березин, *Журн. невропатол. и психиатр.*, № 10, 1561 – 1565 (1966).
2. Е. В. Васильева, Р. М. Салимов, Г. И. Ковалёв, *Экспер. и клин. фармакол.*, **75**(7), 32 – 37 (2012).
3. Т. А. Воронина, Г. М. Молодавкин, Г. Г. Борликова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(2), 9 – 11 (2000).
4. Ю. А. Золотарев, Ю. Ю. Фирстова, Д. А. Абаймов и др., *Биоорганическая химия*, **35**(3), 323 – 333 (2009).
5. Г. И. Ковалев, Ю. Ю. Фирстова, Р. М. Салимов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(1), 12 – 7 (2008).
6. Г. И. Ковалёв, Ю. Ю. Фирстова, *Клиническая фармакология и терапия*, **19**(6), 72 – 73 (2010).
7. Г. И. Ковалёв, Е. А. Кондрахин, Р. М. Салимов, *Нейрохимия*, **30**(2), 1 – 7 (2013).
8. В. Н. Краснов, *Журн. социальн. и клин. психиатр.*, **3**(4), 6 – 19 (1993).
9. Г. М. Молодавкин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 7 – 9 (2006).
10. Г. Г. Незнамов, Ю. Г. Сбытов, *Позраничные нервно-психические расстройства*, Ставрополь (1989), сс. 46 – 58.
11. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, И. А. Давыдова, Е. С. Телешова, *Журн. неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова*, **100**(6), 33 – 37 (2000).
12. Г. Г. Незнамов, В. В. Кошелев, Т. А. Воронина, С. С. Трофимов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2) 12 – 16 (2002).
13. Г. Г. Незнамов, Е. С. Телешова, *Журн. неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова*, **108**(3) 33 – 42 (2008).
14. Р. М. Салимов, *Журн. высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*, **38**(3), 569 – 571 (1988).
15. Р. М. Салимов, Г. И. Ковалев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(3) 3 – 5 (2008).
16. T. Asano and S. Spector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**(2), 977 – 981 (1979).
17. G. L. Collingridge, A. Volianskis, N. Bannister, et al., *Neuropharmacology*, **64**(1) 13 – 26 (2013).
18. C. Giurgea, *Curr. Develop. Psychopharmacol.*, N3, 222 – 273 (1976).
19. A. W. Goddard, A. Shekhar, A. F. Whiteman, Ch. J. McDougle, *Drug Discovery Today*, **13**(7/8), 325 – 332 (2008).
20. B. H. Harvey, M. Shahid, *Pharmacol Biochem Behav*, **100**(4), 775 – 800 (2012).
21. G. Hasler, A. C. Nugent, P. J. Carlson, *Arch. Gen. Psychiatry*, **65**(10), 1166 – 1175 (2008).
22. V. J. Majo, J. Prabakaran, J. J. Mann, J. S. Dileep Kumar, *Drug Discovery Today*, **18**(3/4), 173 – 184 (2013).
23. A. Malizia, *Eur. Neuropsychopharmacology*, **12**, 567 – 574 (2002).
24. Y. Nomura, Y. Kitamura, T. Ohnuki, et al., *Behavioral Brain Research*, **83**, 51 – 55 (1997).
25. V. Scondia, *Nootropic Drugs. In: Ann. Czechoslovak Psychopharmacological Meeting*, Iesenik (1979), 40 – 54.
26. M. Yoshida, K. Goto, S. Watanabe, *Physiology & Behavior*, **73**(1 – 2), 37 – 42 (2001).
27. L. Zhou, Z. Gu, A. Costa, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**(1), 422 – 427 (1997).

Поступила 14.03.13

## THE INFLUENCE OF PIRACETAM ON BEHAVIOR AND BRAIN RECEPTORS IN C57BL/6 AND BALB/c MICE: NOOTROPIC AND ANXIOLYTIC EFFECTS

G. I. Kovalev, E. A. Kondrakhin, R. M. Salimov, and G. G. Neznamov

Laboratory of Radioisotope Research, Laboratory of Clinical Pharmacology, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

The influence of acute and long-term piracetam administration on the dynamics of rapid (non-specific, anxiolytic) and slow (specific, nootropic) behavioral drug effects, as well as on their interrelation with NMDA- and BDZ-receptors was studied in inbred mice strains differing in cognitive and emotional status - C57BL/6 and BALB/c. The BALB/c strain contained 17% less [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam binding sites in frontal cortex and 22% less [<sup>3</sup>H]-MK801 binding sites in hippocampus as compared to those in C57BL/6 mice. Based on these data, BALB/c strain was used as a model of psychopathology, combining increased anxiety and cognitive deficit. Under the action of single, 7-fold, and 14-fold piracetam i.p. injections (200 mg/kg body weight, daily), a fast increase in NMDA-receptor density and slow escalation of the specific nootropic effect was observed in BALB/c mice. Non-specific anxiolytic effects in these mice increased for the first 1 – 7 days without any changes in BDZ-binding and then decreased to initial values accompanied by decrement of brain receptor concentration. Thus, in BALB/c mice, a slowly manifested specific nootropic action of piracetam develops, following an increase in NMDA receptor density, whereas the non-specific anxiolytic effect precedes the fast-paced changes in BDZ-binding site density.

**Keywords:** piracetam; NMDA receptor; benzodiazepine receptor; cross maze test; radioligand assay; exploratory behavior; anxiety; C57BL/6 and BALB/c mice