

## НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-37-40

### ЭФФЕКТЫ ЭМОПАГА НА ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ ГИППОКАМПА КРЫС

Вик. В. Яснецов<sup>1</sup>, Т. А. Воронина<sup>2</sup>, С. Я. Скачилова<sup>3</sup>,  
В. В. Яснецов<sup>1</sup>

На переживающих срезах гиппокампа крыс эмопаг и мексидол в концентрации 4 мМ подавляли ортодромные популяционные ответы в поле СА1 на  $58 \pm 4\%$  и  $43 \pm 3\%$  соответственно. Специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 ослаблял угнетающее действие эмопага на  $38 \pm 4\%$ , а мексидола — на  $73 \pm 6\%$ , действуя в отношении первого в 1,9 раза менее выражено. Специфический блокатор глутаматных AMPA-рецепторов CNQX практически полностью блокировал депрессирующий эффект эмопага либо ослаблял его на  $54 \pm 5\%$ , действуя по крайней мере в 1,4 раза более выражено, чем МК-801. В пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа крысят эмопаг (2 мМ) угнетал возбуждающий постсинаптический ток, вызванный раздражением коллатералей Шаффера, на  $92 \pm 3\%$ , а на фоне действия специфического блокатора глутаматных AMPA-рецепторов NBQX его депрессирующий эффект практически полностью ослаблялся на  $95 \pm 4\%$ . Следовательно, можно предполагать, что гиппокамп играет существенную роль в реализации центрального действия эмопага. При этом его эффект реализуется через активацию AMPA-рецепторов.

**Ключевые слова:** эмопаг; гиппокамп; поле СА1; AMPA-рецепторы; крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Новый отечественный лекарственный препарат эмопаг (этилметилгидроксипиридина ацетилглутаминат; ЗАО “ФармФирма “Сотекс”) относится к производным 3-гидроксипиридина и обладает выраженными антиамнестическими, нейропротекторными и противогипоксическими свойствами у животных [6]. Он успешно прошел фазу III клинического исследования у пациентов с когнитивными нарушениями сосудистого происхождения.

Как известно, гиппокамп человека и животных — центральная многофункциональная структура лимбической системы, участвующая в процессах памяти (консолидация ее следов, сохранение и забывание информации), обучения, формировании эмоций и выступающая в качестве интегратора мультимодальной сенсорной информации во времени и пространстве. В частности, он предназначен для хранения и обработки

пространственной информации и необходим для ориентации, а также для решения даже простейших задач, требующих пространственной памяти — играет роль в поиске кратчайших путей между уже хорошо известными местами [4, 8 – 10, 12 – 14]. Более того, в нем у животных (крысы) идентифицированы клетки “памяти и места”.

Для расшифровки механизмов действия лекарственных средств принято использовать переживающие поперечные срезы гиппокампа, сохраняющие нормально функционирующие внутренние системы связей, на которые в эксперименте можно локально воздействовать различным образом, применяя как препараты, так и анализаторные вещества [3, 7, 11, 15].

В связи с этим задачей настоящей работы явилось исследование эффектов эмопага на переживающих срезах гиппокампа крыс.

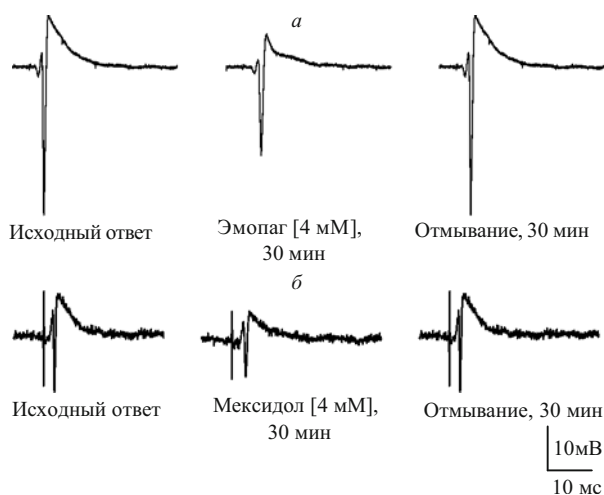
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на переживающих срезах гиппокампа 67 белых нелинейных крыс-самцов массой 180 – 200 г (филиал “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и приказу Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”. Исследования выполне-

<sup>1</sup> ФГБУН “Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук”, Россия, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А.

<sup>2</sup> ФГБНУ “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

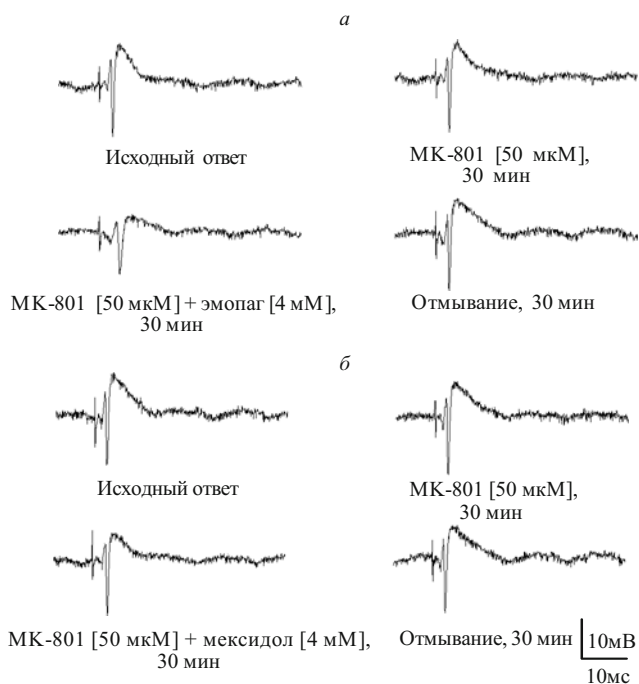
<sup>3</sup> АО “Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ”, Россия, 142450, Московская область, Ногинский район, г. Старая Купавна, ул. Кирова, 23.



**Рис. 1.** Влияние эмопага (а) и мексидола (б) в концентрации 4 мМ на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс.

ны с соблюдением национальных и международных требований по содержанию и гуманному обращению с животными. Приготовление и инкубирование срезов проводили как описано в [1]. Состав перфузионной среды (мМ): NaCl — 126; KCl — 3;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 1,25;  $\text{MgSO}_4$  — 1,2;  $\text{CaCl}_2$  — 2;  $\text{NaHCO}_3$  — 26; глюкоза — 10. Раствор насыщали газовой смесью 95 %  $\text{O}_2$  и 5 %  $\text{CO}_2$  (рН 7,4 при температуре  $35 \pm 0,5$  °С). Скорость протока составляла 2 мл/мин. Период адаптации среза к указанной солевой среде продолжался не менее 1 ч, после чего приступали к регистрации исходных показателей. Суммарную электрическую активность регистрировали в пирамидном слое поля СА1 с помощью одноканальных стеклянных микроэлектродов, заполненных 0,15 М раствором NaCl; регистрировали также ортодромные популяционные ответы [1].

Часть экспериментов проведена на переживающих срезах гиппокампа 16 белых нелинейных крысят-самцов в возрасте 13 – 17 сут. Приготовление и инкубирование срезов толщиной 300 – 400 мкм проводили согласно [1]. Состав перфузионной среды (мМ): NaCl — 126; KCl — 3;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 1,25;  $\text{MgSO}_4$  — 1,2;  $\text{CaCl}_2$  — 2,4;  $\text{NaHCO}_3$  — 26; глюкоза — 10. Раствор насыщали газовой смесью 95 %  $\text{O}_2$  и 5 %  $\text{CO}_2$  (рН 7,4 при температуре  $(20 \pm 0,5)$  °С). Скорость протока составляла 4 мл/мин. Период адаптации среза к указанной солевой среде продолжался не менее 1 ч. С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации “целая клетка” регистрировали нейроны области СА1 гиппокампа, используя усилитель ЕРС-7 для локальной фиксации потенциала и боросиликатные микроэлектроды диаметром 1,5 мм (сопротивление 3 – 6 МОм). Регистрировали возбуждающий постсинаптический ток (ВПСТ), вызванный раздражением коллатералей Шаффера. Нейроны визуализированы с помощью инфракрасной камеры IR-1000Е. Все сигналы были обработаны фильт-



**Рис. 2.** Влияние эмопага (а) и мексидола (б) в концентрации 4 мМ на фоне действия МК-801 в концентрации 50 мкМ на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс.

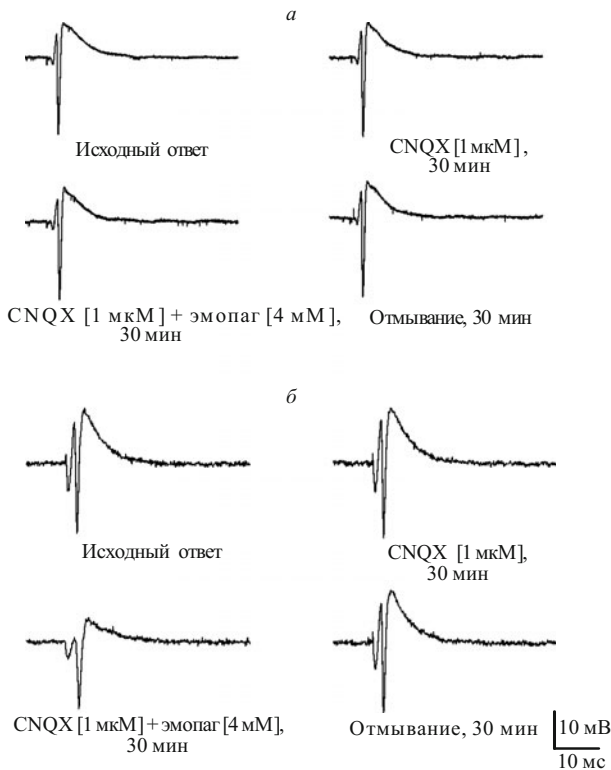
ром 30 кГц и зарегистрированы при помощи аналого-цифрового преобразователя и программы pClamp-7. Для обработки данных использовали программу Clampfit-9. Было исследовано влияние лекарственных препаратов на ВПСТ в пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа. Более подробно методика описана ранее [2].

В работе использовали эмопаг (этилметилгидроксипиридина ацетилглутаминат в виде субстанции; ООО “Бийон”) и мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат в виде субстанции; ООО “Бийон”), а также в качестве анализаторных веществ специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 (Sigma-Aldrich, США) и специфические блокаторы глутаматных AMPA-рецепторов CNQX и NBQX (“Tocris”, Великобритания).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы BioStat 2009 Professional, используя, в том числе, параметрический *t*-критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перфузия срезов ( $n = 12$ ) растворами, содержащими от 1 мкМ до 2 мМ эмопага, существенно не изменяла популяционные ответы (латентный период, амплитуда и их форма не изменялись). Эмопаг в концентрации 4 мМ ( $n = 7$ ) подавлял ортодромные популяционные ответы на  $58 \pm 4$  % ( $p < 0,001$ , рис. 1, а). После отмывания вещества (до 1 ч) ортодромные популяционные ответы полностью восстанавливались (рис. 1, а).



**Рис. 3.** Влияние эмопага в концентрации 4 мМ на фоне действия CNQX в концентрации 1 мкМ на ортодромные популяционные ответы в поле CA1 гиппокампа крыс: *а* — CNQX практически полностью блокирует депрессирующий эффект эмопага; *б* — ослабление CNQX депрессирующего эффекта эмопага.

Мексидол в концентрации 4 мМ ( $n = 7$ ) подавлял ортодромные популяционные ответы на  $(43 \pm 3) \%$  ( $p < 0,001$ , рис. 1, *б*). После отмывания мексидола (до 1 ч) ортодромные популяционные ответы полностью восстанавливались (рис. 1, *б*). Следовательно, эмопаг оказывает более выраженное угнетающее действие, чем мексидол (в 1,3 раза,  $p < 0,02$ ).

На фоне действия специфического неконкурентного антагониста NMDA-рецепторного комплекса МК-801 (добавление в перфузирующую жидкость в концентрации 50 мкМ до введения в среду эмопага ( $n = 7$ ) или мексидола ( $n = 7$ ) в концентрации 4 мМ) депрессирующий эффект веществ ослаблялся на  $38 \pm 4 \%$  и  $73 \pm 6 \%$  соответственно ( $p < 0,05$ , рис. 2). Следовательно, МК-801 более выраженно (в 1,9 раза,  $p < 0,001$ ) ослабляет угнетающее действие мексидола, чем эмопага.

На фоне действия специфического блокатора глутаматных AMPA-рецепторов CNQX (в концентрации 1 мкМ) депрессирующий эффект эмопага (в концентрации 4 мМ) или практически полностью блокировался ( $n = 2$ , рис. 3, *а*), или ослаблялся на  $(54 \pm 5) \%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ , рис. 3, *б*). Следовательно, CNQX более выраженно, чем МК-801 (по крайней мере в 1,4 раза,  $p < 0,05$ ), ослабляет угнетающее действие эмопага.

Таким образом, эмопаг и мексидол в концентрации 4 мМ угнетают синаптическую передачу в системе “коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны” поля CA1 гиппокампа. При этом эмопаг более эффективен, чем мексидол.

В следующей серии экспериментов обнаружено, что в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа крысят эмопаг (2 мМ;  $n = 8$ ) значимо ( $p < 0,001$ ) угнетает ВПСТ, вызванный раздражением коллатералей Шаффера, на  $92 \pm 3 \%$ .

На фоне действия специфического блокатора глутаматных AMPA-рецепторов NBQX (7 мкМ;  $n = 8$ ) депрессирующий эффект эмопага ослаблялся на  $95 \pm 4 \%$  ( $p < 0,001$ ).

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Ранее было установлено, что в основе действия мексидола и 10 испытанных новых производных 3-гидроксипиридина на нейронном уровне лежат ионные механизмы с вовлечением глутамат- и ГАМК-ергического компонентов. Так, например, эффект мексидола реализуется за счет ингибирования ионных токов через каналы NMDA-рецепторного комплекса (почти у 80 % нейронов) и через ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепин-рецепторный комплекс (почти у 60 % клеток), угнетающее влияние 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина L-аспарагината и ИБХФ-27 реализуется, главным образом, через NMDA-рецепторный комплекс, а СК-119 — через ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепин-рецепторный комплекс [2, 5]. Следует отметить, что эмопаг — единственное соединение среди указанных новых веществ, угнетающее действие которого на уровне гиппокампа обусловлено активацией AMPA-рецепторов.

Таким образом, эмопаг подавляет ортодромные популяционные ответы в поле CA1 гиппокампа крыс и угнетает ВПСТ, вызванный раздражением коллатералей Шаффера. При этом данный эффект реализуется через активацию AMPA-рецепторов.

## ВЫВОДЫ

1. На переживающих срезах гиппокампа крыс эмопаг и мексидол (4 мМ) подавляют ортодромные популяционные ответы в поле CA1. Специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 ослабляет угнетающий эффект эмопага и мексидола, действуя в отношении первого менее выраженно. Специфический блокатор глутаматных AMPA-рецепторов CNQX практически полностью блокирует депрессирующий эффект эмопага либо ослабляет его, действуя более выраженно, чем МК-801.

2. В пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа крысят эмопаг (2 мМ) угнетает возбуждающий постсинаптический ток, вызванный раздражением коллатералей Шаффера, а на фоне действия специфического блокатора глутаматных AMPA-рецепторов NBQX его депрессирующий эффект ослабляется.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Мотин, В. В. Яснецов, С. М. Ковалев, И. Н. Крылова, *Бюл. экспер. биол. и мед.*, **130**(9), 252 – 254 (2000).
2. В. Г. Мотин, Вик. В. Яснецов, А. А. Забозлаев и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(1), 3 – 7 (2012).
3. В. Г. Скребицкий, Н. А. Капай, В. И. Деревягин, Р. В. Кондратенко, *Анналы клин. и эксперим. неврол.*, **2**(2), 23 – 27 (2008).
4. В. В. Яснецов, И. Н. Крылова, *Успехи физиол. наук*, **28**(1), 97 – 116 (1997).
5. В. В. Яснецов, Вик. В. Яснецов, *Авиакосм. и эколог. мед.*, **52**(3), 5 – 12 (2018).
6. Вик. В. Яснецов, С. Я. Скачилова, Л. Н. Сернов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **46**(4), 3 – 6 (2012).
7. M. V. Accardi, H. Huang, S. Authier, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, № 93, 59 – 68 (2018).
8. G. Çalışkan, O. Stork, *Psychopharmacology (Berl)*, **236**(1), 321 – 338 (2019).
9. J. Ferbinteanu, *Neurobiol. Learn. Mem.*, № 157, 61 – 78 (2018).
10. G. Fernández, R. G. M. Morris, *Trends Neurosci.*, **41**(10), 654 – 659 (2018).
11. P. Paci, S. Gabriele, L. Ris, *Brain Behav.*, **7**(5), e00692 (2017).
12. C. Pavlides, T. Donishi, S. Ribeiro, et al., *Neurobiol. Learn. Mem.*, pii: S1074 – 7427(19)30065 – 6 (2019).
13. E. T. Rolls, S. Wirth, *Prog. Neurobiol.*, № 171, 90 – 113 (2018).
14. E. Ruzich, M. Crespo-García, S. S. Dalal, J. F. Schneiderman, *Hum. Brain Mapp.*, **40**(4), 1353 – 1375 (2019).
15. L. R. Stein, C. F. Zorumski, Y. Izumi, *Brain Behav.*, **7**(7), e00736 (2017).

Поступила 18.04.19

## EFFECTS OF EMOPAG MANIFESTED ON HIPPOCAMPAL SLICES IN RATS

Vic. V. Yasnetsov<sup>1</sup>, T. A. Voronina<sup>2</sup>, S. Ya. Skachilova<sup>3</sup>, and V. V. Yasnetsov<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Biomedical Problems, State Scientific Center of the Russian Federation, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia<sup>2</sup> V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315 Russia<sup>3</sup> All-Russia Center for Safety Testing of Biologically Active Substances, ul. Kirova 23, Staraya Kupavna, Moscow oblast, 142450 Russia

Electrophysiological studies in hippocampal slices of rats showed that emopag and mexidol (4 mM) suppressed orthodromic population spikes in CA1 area by  $58 \pm 4\%$  and  $43 \pm 3\%$  respectively. Non-competitive NMDA receptor antagonist complex MK-801 weakened the suppressing effect of emopag by  $38 \pm 4\%$  and that of mexidol by  $73 \pm 6\%$ , acting 1.9 times less effectively against the former drug. Competitive AMPA receptor antagonist CNQX almost completely blocked the suppressing effect of emopag or reduced it by  $54 \pm 5\%$ , acting at least 1.4 times stronger than MK-801. Emopag (2 mM) depressed by  $92 \pm 3\%$  the excitatory postsynaptic current caused by Shaffer collaterals stimulation of CA1 pyramidal neurons of hippocampal slices in young rats. Competitive AMPA receptor antagonist NBQX almost completely (by  $95 \pm 4\%$ ) weakened the suppressing effect of the drug. Therefore, it can be concluded that the hippocampus plays an important role in implementation of the central action of emopag and the drug effect is realized through the activation of AMPA receptors.

**Keywords:** emopag; hippocampus; CA1 area; AMPA receptors; rats.