

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ДИМЕБОНА. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТА

С. О. Бачурин¹, Л. М. Михалева², В. В. Григорьев¹, И. В. Королева¹, А. С. Кинзирский¹

На самках мышей линии C57BL/6 показано, что антигистаминный препарат димебон вызывает достоверное увеличение средней и максимальной продолжительности жизни экспериментальных животных. При этом димебон существенно улучшает общее состояние животных. Показатели возрастного снижения массы тела были существенно ниже, чем в группе сравнения.

Ключевые слова: димебон, старение, увеличение продолжительности жизни, поведение

ВВЕДЕНИЕ

В мировой практике поиск и доклинические исследования в области разработки новых лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний позднего возраста выполняются на молодых половозрелых животных, хотя препараты предназначены для лиц пожилого и старческого возраста. Аспекты возрастной фармакологии мало изучены как за рубежом, так и в нашей стране. В середине 90-х годов в ИФАВ РАН было установлено, что отечественный антигистаминный препарат димебон проявляет выраженный когнитивно-стимулирующий эффект в опытах на животных [5] и может быть использован в качестве средства для лечения болезни Альцгеймера (БА) [4].

Болезнь Альцгеймера — это страдание лиц пожилого возраста, поэтому для нас представляло особый интерес изучение длительного 15-месячного воздействия димебона на ряд интегральных показателей хронической токсичности, отдельные признаки старения, а также оценка переносимости препарата при его пожизненном применении.

Ранее нами показано, что димебон оказывает нейропротекторный эффект на клеточной модели нейродегенерации, вызванной нейротоксином — фрагментом 25 – 35 β-амилоидного пептида [6], а также обладает митопротекторными свойствами, повышая устойчивость митохондрий к индукции проапоптотических процессов [7]. Выявленные феномены напрямую ассоциированы с развитием зависимых от возраста дегенеративных процессов [9]. Поэтому можно было предпо-

ложить, что димебон обладает также и геропротекторными свойствами. Решению этих вопросов было посвящено настоящее исследование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мыши-самки линии C57BL/6 были получены в возрасте 8 месяцев. Их содержали в виварии ИФАВ РАН в стандартных условиях. Световой цикл состоял из 12 часов дня и 12 часов ночи. День начинался в 6 часов и заканчивался в 18 часов. Мыши находились в клетках по 9 – 10 особей. В динамике оценивалась масса животных в каждой группе. В возрасте 21 месяца мыши были рандомизированы на 2 равные группы по 49 особей в каждой. Контрольная группа получала обычную питьевую воду. Воду для контрольных и опытных животных заменяли 1 раз в неделю. Обычно на клетку, в которой содержалось 10 мышей, на неделю давали 0,5 литра воды.

Опытная группа мышей получала димебон, растворенный в питьевой воде, *ad libitum*, из расчета 1,5 мг/кг на животное в сутки. Димебон растворяли в воде в количестве 2 – 4 мг в зависимости от количества и общей массы животных. Стабильность водных растворов димебона подтверждалась методом ВЭЖХ (ГФ СССР XI). Доза димебона, взятая в эксперимент, установлена по результатам предварительных исследований по изучению специфической фармакологической оценки препарата в качестве стимулятора когнитивных функций мозга [6].

На протяжении всего эксперимента фиксировали количество мышей с нарушением кожного и волосяного покрова, а в конце эксперимента на гистологических препаратах кожи морфометрическими методами подсчитывали число волосяных фолликулов на единицу длины кожного лоскута [1].

Двигательную активность животных измеряли методом “открытое поле” [3] в конце эксперимента

¹ Учреждение Российской академии наук Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, г. Черноголовка, Московская область.

² Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва.

(30 мес). Эксперимент продолжался до естественной гибели животных с фиксацией даты гибели животных. Учитывали показатели средней и максимальной продолжительности жизни животных, а также показатели выживаемости животных на фиксированный день эксперимента.

У павших животных проводили макроскопическое изучение состояния внутренних органов, определяли их массу с последующим определением весовых коэффициентов внутренних органов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере Pentium IV с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel. Статистическая обработка включала расчет средних арифметических значений (M), ошибок средних арифметических ($\pm m$), определение достоверности различий средних арифметических (p) с помощью t -критерия Стьюдента и χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение первых двух месяцев эксперимента не выявлено каких-либо отличий во внешнем виде и поведении экспериментальных животных в контрольной и опытной группах. Только начиная с третьего месяца, в контрольной группе появилось больше животных с нарушением волосяного покрова — он стал более редким, в нем появились участки алопеции. В дальнейшем эти признаки старения экспериментальных животных в контрольной группе стали нарастать. Показатели смертности животных были практически одинаковыми в обеих группах. Начиная с 7-го месяца от начала эксперимента, частота гибели животных в контрольной группе была значительно выше. Этот разрыв сохранялся до конца эксперимента.

Увеличилась разница в частоте регистрируемых нарушений волосяного покрова; в отдельные месяцы число животных с алопецией в контрольной группе превышало таковые в опытной группе на 60 % ($p \leq 0,0228$). Число волосяных фолликулов на единице площади кожного лоскута по данным морфологических измерений составляло в среднем в контрольной группе $2,19 \pm 1,67$ и $3,54 \pm 1,67$ ($p < 0,04$) в экспериментальной группе.

Во второй половине эксперимента выявилась разница в средней массе животных контрольной и опытной групп. Средняя масса на 30-м месяце жизни животных составляла в контроле 23,16 г, а в опыте — 25,28 г ($p = 0,0436$ в последние 4 месяца).

Массу внутренних органов животных определяли в конце эксперимента. Поскольку имелся значительный разброс в массе животных, помимо абсолютных значений массы внутренних органов для сравнения брали процентное соотношение массы каждого органа к массе животного. Достоверных различий в массе всех органов животных в контрольной и экспериментальной

группах не выявлено, за исключением тимуса ($p < 0,04$).

Двигательная активность животных была измерена в тесте “открытое поле”. Активность молодых животных в возрасте 4–5 месяцев составляла $59,5 \pm 6,16$ ($M \pm m$) по числу пересеченных квадратов; старых контрольных животных — $9,17 \pm 4,27$, старых животных, хронически получающих димебон — $18,83 \pm 4,34$ ($p < 0,05$). Таким образом, животные, получающие димебон, сохранили лучшую двигательную активность (более чем в два раза) по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,05$).

В конце эксперимента средняя продолжительность жизни животных в контроле составила 825 дней, получающих димебон — 849 дней, она выросла на 2,5 % ($p = 0,032$). Максимальная продолжительность жизни в контроле составила 1018 дней, в опыте — 1055 дней, т.е. больше на 37 дней, или на 3,7 %. Однако если сравнить количество живых мышей в каждой возрастной группе — 850, 900, 950 и 1000 дней, то обнаруживается более наглядная картина. Если в группе “850 дней” количество доживших животных опытной группы превышало таковых в контрольной на 28 % ($p \leq 0,05$), то в группе 900 дней в опытной группе количество живых превышало таковых в контрольной в 2,5 раза ($p \leq 0,002$), а в группах 1000 и 1050 дней — в 4 раза ($p \leq 0,0001$).

Таким образом, максимальный эффект увеличения продолжительности жизни димебон проявлял в самых старших возрастных группах, в которых количество доживших до этого возраста животных, получающих димебон, в несколько раз превышало число доживших животных в контрольной группе.

Таким образом, проведенный эксперимент на старых животных — мышцах-самках линии C57BL/6 — показал, что димебон при его ежедневном длительном применении в дозе 1,5 мг/кг в сутки в течение 15 месяцев демонстрирует хорошую переносимость. Он увеличивает показатели средней и максимальной продолжительности жизни.

Что касается обнаруженного геропротекторного действия димебона, то механизм его предстоит исследовать. Наиболее вероятным на настоящий момент представляется связь этого эффекта со стабилизирующим действием димебона на митохондрии. В ряде исследований, проведенных в последние годы по изучению механизма действия димебона, было показано, что он способен предотвращать открытие неспецифических пор (т. н. процесс пермеабиллизации митохондрий), которое обуславливает запуск процесса апоптоза в клетках [10]. Димебон способен также оказывать прямое защитное действие на митохондрии, предохраняя их от токсического эффекта экзогенных и эндогенных токсинов [8]. Помимо этого, димебон оказывает умеренное антиоксидантное действие [7]. Все эти процессы так или иначе связаны с гибелью клеток в ходе

старения организма [2, 11, 12], что свидетельствует в пользу “митопротекторного” механизма геропротекторного эффекта димебона.

ВЫВОДЫ

1. Димебон увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни мышей. У них регистрируется меньше случаев развития алопеции, меньшее возрастное снижение массы тела по сравнению с контрольными животными.

2. Животные, получающие димебон, в тесте “открытое поле” показали достоверно более высокие показатели двигательной активности, чем животные в контрольной группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Автандилов, *Основы количественной патологической анатомии*, Медицина, Москва (2002).
2. В. В. Анисимов, *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, Санкт-Петербург (2003).

3. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), сс. 254 – 264.
4. Н. С. Зефирова, А. З. Афанасьев, С. В. Афанасьева и др., *Изобретения*, № 8, Ч. 2, 323 (1998).
5. Н. Н. Лермонтова, Н. В. Лукоянов, Т. П. Серкова и др., *Бюлл. exper. биол. мед.*, **129**(6), 640 – 642 (2000).
6. S. Bachurin, E. Bukatina, N. Lermontova, et al., *Ann. N. Y Acad. Sci.*, **939**(2), 425 – 435 (2001).
7. S. O. Bachurin, E. P. Shevtsova, E. G. Kireeva, et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, **993**, 334 – 344 (2003).
8. D. Hung, S. Bachurin, A. Protter, *Тез. Конф. “Органическая химия для медицины ОРХИМЕД-2008”*, Черноголовка (2008).
9. B. S. Kristal, I. G. Stavrovskaya, M. V. Narayanan, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **36**(4), 309 – 312 (2004).
10. E. Shevtsova, V. Grigoriev, E. Kireeva, et al., *Biochimica et Biophysica acta*, **14**, 254, (2006).
11. V. P. Skulachev, *Mol. Aspects Med.*, **20**, 139 – 184 (1999).
12. V. P. Skulachev, *Aging Cell*, № 3, 17 – 19 (2004).

Поступила 12.02.10

GEROPROTECTIVE PROPERTIES OF DIMEBON: MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ORGANS AND TISSUES IN MICE AFTER LONG-TERM TREATMENT

S. O. Bachurin¹, L. M. Mikhaleva², V. V. Grigor'ev¹, I. V. Koroleva¹, and A. S. Kinzirskii¹

¹ Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432, Russia;

² Research Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 117418, Russia

It has been experimentally established that dimebon reliably increased the average and maximum life span and significantly improved the general state of C57BL/6 female mice. Compared to the control group, the animals of the test group were more active, had better hair (greater number of hair follicles per unit area of histological section of skin), and lower age-related reduction of the body weight.

Key words: Dimebon, aging, increased life span, behavior