

ВЛИЯНИЕ НООТРОПНЫХ СРЕДСТВ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КОРЕ МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

В. П. Акопян, Л. С. Бальян, Н. А. Закарян¹

Исследовано влияние пикамилаона и пирацетама на количественные изменения ГАМК_A-рецепторных комплексов коры мозга экспериментальных крыс в условиях гипокинезии. Установлено, что введение пикамилаона при 7-дневной гипокинезии с 4-дневным восстановительным периодом не приводит к заметным изменениям в количестве исследуемых рецепторов. При 15-дневной гипокинезии с 8-дневным восстановительным периодом пикамилон способствует восстановлению количества рецепторов.

Ключевые слова: гипокинезия, ГАМК_A-рецепторы, пикамилон, пирацетам

ВВЕДЕНИЕ

Опыт применения ноотропных препаратов в экстремальных условиях подтверждает, что эти средства наиболее полно соответствуют требованиям для лекарственных средств при использовании их в условиях напряженной профессиональной деятельности человека. Монотонную мышечную деятельность, вынужденную гипокинезию (ареактивная, сенильная кинезная ситуация или гипокинезия адаптационно-защитного, привычного характера) [7], также можно причислить к экстремальным факторам, значительно ухудшающим качество жизни. Ноотропы оказывают в основном антигипоксическое и эрготропное действие, обуславливающие их, ноотропный, актопротекторный, дезинтоксикационный и другие эффекты. Многокомпонентность фармакологического спектра некоторых классических ноотропных средств [4, 5] предполагает “задействованность” разных медиаторных систем, в том числе ГАМК-ергической [1, 3, 6, 10, 12]. Установлено, что участие системы ГАМК наблюдается при нейропсихических и сосудистых заболеваниях мозга, сопровождающихся определенными изменениями в ГАМК_A-рецепторных комплексах, наиболее широко представленных в ЦНС из всех типов ГАМК-рецепторов. При этом показано, что кора большого мозга, в которой обильно экспрессируется $\alpha 2$ субъединица ГАМК_A-рецепторов, особенно чувствительна к воздействию стресс-факторов [15, 17].

Целью исследования явилось изучение количественных сдвигов в ГАМК_A-макромолекулярных рецепторных комплексах коры большого мозга в условиях 7- и 15-суточной гипокинезии (ГК 7, ГК 15), в восстановительный период после ГК, соответствующий половине сроков ГК, и при введении пикамилаона или пирацетама.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 160 – 180 г. Гипокинезию моделировали по описанному И. В. Федоровым способу [8] в течение 7 и

15 суток. В восстановительном периоде, равном половине сроков 7- и 15-суточной ГК (4 и 8 суток соответственно) т. н. “реадаптированные” крысы находились в условиях вивария. Группе контрольных крыс, которых также содержали в аналогичных условиях вивария, вводили физраствор в том же объеме, что и исследуемые препараты — 0,2 мл. Животные были разделены на следующие группы и подгруппы (по 5 крыс в каждой): I — группа свободного контроля: крысы, получающие физраствор, II — контрольные, т. н. “негипокинетические” крысы, получающие в течение 7 и 15 дней внутрибрюшинно через день пирацетам 300 мг/кг, в течение 7 и 15 дней внутрибрюшинно через день пикамилон 300 мг/кг, III — “гипокинетические” крысы (7-, 15-суточная ГК), которым вводили препараты в той же дозе через день, IV — “реадаптированные” крысы, которым вводили препараты таким же образом. В конце эксперимента крыс декапитировали под эфирным наркозом. Выделение рецепторов проводили по методике, описанной нами ранее [2]. Кору мозга декапитированных животных отделяли и хранили при 20 °С, до выделения не более 30 суток. На всех этапах выделения использовали буферные растворы, содержащие ингибиторы протеаз и трансаминаз. Буферы не содержали Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , чтобы исключить активность транспортеров и ГАМК_B-рецепторов. 1 г коры мозга гомогенизировали в 100 мл 0,32 М сахарозы. Гомогенат подвергали ступенчатому центрифугированию. Фракцию синаптических мембран солиubilизировали 1 % раствором холата калия, осветляли центрифугированием, инкубировали с аффинным сорбентом CPG-ГАМК (CPG-controlled pore glasses, пористое стекло) в течение 20 ч. После промывки сорбента фракцию ГАМК_A-рецепторов десорбировали с помощью 20 мМ раствора бикуккуллина в объеме 10 мл, концентрировали до 1 мл в ячейке Amicon на мембранном фильтре CX 10. Количество белков в препаратах оценивали методом Бредфорда [16]. Встраиванием выделенных белков в БЛМ (бислойные липидные мембраны) регистрировали ионные потоки при аппликации ГАМК.

Близкое подобие результатов по количеству ГАМК_A-рецепторов, полученных в опытах с применением исследуемых препаратов у “негипокинетических” крыс и у крыс

¹ Лаборатория биохимической фармакологии, Институт Биохимии АН РА им. акад. Г. Х. Бунятыана, РА, Ереван, 375005, ул. П. Севака, 5/1.

группы свободного контроля, позволило объединить их в одну группу свободного контроля.

Использовали (-)-Bicuculline methchloride (“Sigma”), пираретам (“Polfa”), пикамилон (субстанция — НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из коры мозга экспериментальных животных выделяли белковую фракцию, содержащую компоненты ГАМК_A-рецепторного комплекса. Фракция ГАМК_A-рецепторов из коры мозга контрольных крыс, получавших физраствор, содержала $45 \pm 1,2$ мкг/мл белка (табл. 1), что было принято за точку отсчета. При 7-суточной ГК уже наблюдаются определенные изменения в содержании ГАМК_A-рецепторов: их количество уменьшается на 22 % (с $45 \pm 1,2$ мкг/мл до $35 \pm 0,9$ мкг/мл). Более резкое уменьшение количества ГАМК_A-рецепторных макромолекулярных комплексов наблюдается при 15-суточной ГК. В сравнении с группой свободного контроля их количество уменьшается на 49 % (с $45 \pm 1,2$ мкг/мл до $23 \pm 0,8$ мкг/мл). В опытах с введением пикамилона (табл. 1) в коре мозга крыс наблюдаются выраженные позитивные сдвиги: на 7-е и, особенно, на 15-е сутки ГК количество ГАМК_A-рецепторных комплексов в мозговой ткани приобретает тенденцию к восстановлению.

Эта тенденция наблюдается и в опытах с “реадаптированными” крысами, когда крыс извлекали из клеток-пеналов и они находились в свободных условиях вивария. В коре мозга крыс с 7-суточной ГК и 4-дневным реадаптационным периодом идет “самостоятельное” восстановление количества ГАМК_A-рецепторов (табл. 1). Введение пикамилона крысам данной серии приводит к восстановлению количества ГАМК_A-рецепторов, близко к показателям контрольного уровня. При 15-суточной ГК количество ГАМК_A-рецепторных комплексов остается на низком уровне и возвращения к исходным параметрам не наблюдается. Введение пикамилона через день крысам

данной серии приводит к увеличению количества ГАМК_A-рецепторов почти в 1,5 раза (с $25 \pm 2,2$ мкг/мл до $39 \pm 1,5$ мкг/мл) в сравнении с показателями коры мозга крыс той же серии, но не получавших пикамилон.

В серии экспериментов с введением пираретама через день крысам, находящимся в условиях 7-суточной ГК, видимых изменений в количестве ГАМК_A-рецепторов не выявлено, а при 15-суточной ГК пираретам способствует некоторому увеличению количества ГАМК_A-рецепторных комплексов (табл. 2).

Анализ данных, полученных в аналогичных сериях экспериментов с введением пираретама “реадаптированным” крысам, свидетельствует о тенденции к восстановлению количества ГАМК_A-рецепторов коры мозга. Введение пираретама крысам с 7-суточной ГК и 4-дневным периодом восстановления способствует приближению показателей к контрольному уровню. При 15-суточной ГК, когда происходит срыв адаптационных реакций, в восстановительном периоде “самостоятельного возвращения” количества ГАМК_A-рецепторов к исходному уровню не отмечается, в то время как введение пираретама при тех же условиях приводит к более заметному восстановительному сдвигу.

На основании полученных данных можно утверждать, что при ГК создаются условия, приводящие к уменьшению количества “активных” макромолекулярных ГАМК_A-рецепторных комплексов в коре мозга, возможно, с одновременным повышением их чувствительности к эндогенным нейромедиаторам, в частности, к ГАМК или ее агонистам. Не исключается также, что при ГК происходит и интернализация рецепторов вплоть до их “поглощения” лизосомами. Также можно предположить, что при стрессе возможны быстрые посттрансляционные модификации популяции ГАМК_A-рецепторов, опосредованные воздействием высвобождаемых нейростероидов и кортикостероидов [10, 17], в ответ на избыточную активность стрессора организм продуцирует модифицированный ГАМК_A-рецепторный комплекс, который менее чувстви-

Таблица 1. Количественные изменения в ГАМК_A-рецепторных комплексах коры мозга крыс (в мкг/мл) при хроническом введении пикамилона (300 мг/кг внутривентриально) в условиях 7- и 15-суточной гипокинезии (ГК) и в реадаптационных периодах (4 и 8 суток соответственно)

Опыт	Контроль	ГК 7	ГК 7 + пикамилон	4-е сутки после ГК 7	4-е сутки после ГК 7+ пикамилон	ГК 15	ГК 15 + пикамилон	8-е сутки после ГК 15	8-е сутки после ГК 15 + пикамилон
ГАМК _A	$45 \pm 1,2$	$35 \pm 0,9^*$	$42 \pm 1,1^{**}$	$39 \pm 2,04^*$	$45 \pm 1,3^{**}$	$23 \pm 0,8^*$	$30 \pm 2,1^{**}$	$25 \pm 2,2^*$	$39 \pm 1,5$

Примечание. * — $p < 0,01$ при сравнении со свободным контролем, ** — $p < 0,01$ с введением пикамилона.

Таблица 2. Количественные изменения в ГАМК_A-рецепторных комплексах коры мозга крыс (в мкг/мл) при хроническом введении пираретама (300 мг/кг внутривентриально) в условиях 7- и 15-суточной гипокинезии (ГК) и в реадаптационных периодах (4 и 8 суток соответственно)

Опыт	Контроль	ГК 7	ГК 7 + пираретам	4-е сутки после ГК 7	4-е сутки после ГК 7 + пираретам	ГК 15	ГК 15 + пираретам	8-е сутки после ГК 15	8-е сутки после ГК 15 + пираретам
ГАМК _A	$45 \pm 1,2$	$35 \pm 0,9^*$	$40 \pm 1,3^{**}$	$39 \pm 2,04^*$	$40 \pm 2,1^{**}$	$23 \pm 0,8^*$	$29 \pm 1,1^{**}$	$25 \pm 2,2^*$	$33 \pm 0,9$

Примечание. * — $p < 0,01$ при сравнении со свободным контролем, ** — $p < 0,01$ при сравнении с введением пираретама.

телен к ингибированию, усиливаемому нейростероидами. При различных моделях стресса у экспериментальных животных наблюдалось уменьшение активности ГАМК-ергической системы. Так, например, установлено [9], что действие различных агентов, индуцирующих окислительный стресс у крыс, приводило к уменьшению количества участков ГАМК_A-рецепторов на 50 % и морфологическим изменениям нейронов. Уменьшение чувствительности ГАМК_A-рецепторов регистрировалось при стрессе вынужденного плавания [17] и при метаболическом стрессе [14]. Возможно, что при ГК, как при стрессовом для организма состоянии, происходят аналогичные изменения. Введение ноотропов в условиях ГК, особенно пикамилона, способствует восстановлению количества ГАМК_A-рецепторов в коре мозга. Известно, что пикамилон и пирацетам оказывают влияние на мозговое кровообращение и функции ЦНС [3, 13]. Ноотропные свойства препаратов обуславливают оптимизацию метаболических процессов в клетках. Пирацетам вызывает выраженные метаболические эффекты, опосредованные как влиянием на энергетический обмен, так и на окислительно-восстановительные и регенеративно-репаративные процессы [6, 7], особенно в условиях нарушения мозгового кровообращения, что имеет место при 15-суточной ГК [1, 11]. Пирацетам — мембраностабилизирующий препарат, улучшающий жидкостные свойства нейрональных мембран, возможно, с повышением аффинности рецепторов к ГАМК. Он модулирует активность нейротрансмиттерных и пластических процессов мозга. Пикамилон, в отличие от пирацетама, хорошо проникает через ГЭБ, является эффективным средством метаболической терапии, сочетает в себе выраженные вазоактивные свойства, ноотропное действие и анксиолитический эффект, что в определенном смысле выгодно отличает его от известных вазоактивных и ноотропных препаратов [1, 3 – 5]. Свойственная ноотропным средствам способность стабилизировать лизосомальные мембраны, возможно, предупреждает количественные изменения рецепторов. Использование ноотропов в качестве корректоров психоневрологических расстройств, возникающих при сильном психоэмоциональном и физическом напряжении, а также при различных стрессовых ситуациях, в том числе и при ограничении двигательной активности, приводит к восстановлению количества ГАМК_A-рецепторов в коре головного мозга.

ВЫВОДЫ

1. При 7- и 15-суточной гипокинезии наблюдается выраженное уменьшение количества ГАМК_A-рецепторов в коре мозга крыс без заметной тенденции к восстановлению в периоде “реадаптации”.
2. Пирацетам и пикамилон при гипокинезии способствуют восстановлению количества рецепторов у гипокинетичных крыс в периоде реадаптации.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Акопян, Л. С. Бальян, Н. А. Аветисян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(26), 10 – 13 (2006).
2. В. П. Акопян, Л. С. Бальян, Н. А. Аветисян, Патент РА № 1717 А (2006).
3. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия мозга*, ГЭОТАР, Москва (2001).
4. Р. С. Мирзоян, Т. С. Ганьшина, *Пикамилон — новый цереброваскулярный препарат*, ч. 1, Уфа (1989), сс. 21 – 25.
5. Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(2), 53 – 56 (2003).
6. П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, В. И. Петров, *Рецепторы физиологически активных веществ*, Семь ветров, Москва-Волгоград (1999).
7. С. Л. Соков, Л. П. Соков, *Вестн. Российского университета дружбы народов*, № 1, Медицина (1999), сс. 91 – 99.
8. И. В. Федоров, *Обмен веществ при гипокинезии*, Наука, Москва (1982).
9. A. Adhikari, C. A. A. Penatti, et al., *Brain research*, **1093**, 95 – 104, (2006).
10. H. Anisman, Z. Merali, and S. Hayley, *Progress in Neurobiology*, **85**, 1 – 74 (2008).
11. L. S. Balyan and N. A. Avetisyan, *1st Greek-Armenian International Medical Forum*, Yerevan (2005), p. 20.
12. A. R. Green, A. H. Hainsworth and D. M. Jackson, *Neuropharmacology*, **39**, 1483 – 149 (2000).
13. V. P. Hakopian, *Hypokinesia and Cerebral Blood circulation Greece*, Athens (2002).
14. N. Matsumoto, E. Noda, and J. Nabekura, *Life Science*, **79**, 1021 – 1026 (2006).
15. H. Mohler, *Handbook of Experimental Pharmacology*, **150**, Sprinser (2001).
16. S. K. Sharma and J. A. Babitch., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2**, 247 – 250 (1979).
17. K. J. Skilbeck, T. Hinton, and G. A. R. Johnson, *Neurochemistry International*, **52**, 1212 – 1219 (2008).

Поступила 03.02.10

EFFECT OF NOOTROPES ON QUANTITATIVE CHANGES IN RAT BRAIN CORTEX GABA_A RECEPTOR COMPLEXES UNDER EXPERIMENTAL HYPOKINESIA CONDITIONS

V. P. Akopyan, L. S. Balyan, and N. A. Zakaryan

Laboratory of Biochemical Pharmacology, Bunyatyan Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Armenia, P. Sevak st. 5/1, Yerevan, 375005, Armenia

The influence of picamilon and piracetam on the quantitative changes in the central GABA_A macromolecular receptor complexes in the rat brain has been investigated under the experimental conditions of hypokinesia. It was found that the injection of these nootropes under the conditions of 7-day hypokinesia and 4-day recovery period did not show visible changes in the amount of active GABA_A receptors. However, the injection of picamilon under the conditions of 15-day hypokinesia and 8-day recovery period showed a tendency to restoration of the number of active GABA_A receptors.

Key words: Hypokinesia, GABA_A receptors, picamilon, piracetam