

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКАМПРОСАТА НА НЕЙРОНЫ ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫС

С. Н. Кожечкин¹, Ю. С. Медникова², Л. Г. Колик¹

Исследовали влияние акампросата (кампрал), используемого для лечения алкоголизма, на спонтанную электрическую активность нейронов фронтальной коры большого мозга крыс. Акампросат при внутрибрюшинном введении (600 мг/кг) и микроионофоретическом подведении уменьшал частоту импульсной активности примерно 30 % исследованных нейронов. Вещество не изменяло величину и форму потенциалов действия клеток. При микроионофоретическом подведении вещество уменьшало величину ответов возбуждающего типа на этанол, подведенный к нейронам в малых дозах, и увеличивало величину торможения, вызываемого этанолом в больших дозах. Эффекты акампросата не зависели от дозы. Акампросат, являясь слабым центрально-депрессирующим агентом, не взаимодействует со специфическими постсинаптическими рецепторами, в основе его фармакологического эффекта лежат пресинаптические механизмы.

Ключевые слова: акампросат; этанол; нейроны; кора большого мозга; микроионофорез

ВВЕДЕНИЕ

Акампросат (кампрал[®]) — лекарственное средство, используемое при лечении алкоголизма. В клинических исследованиях показано, что акампросат увеличивает продолжительность абстиненции и уменьшает количество рецидивов пьянства после детоксикации и воздержания от алкоголя [8]. Вещество уменьшает также некоторые отрицательные симптомы, возникающие после отмены алкоголя: дистимию, нарушения сна, тревогу, фобии и т.п. [5]. Механизм действия акампросата изучен недостаточно.

Акампросат по химическому строению сходен с медиаторами нервной системы — таурином, глицином, ГАМК и глутаминовой кислотой. В настоящее время внимание исследователей направлено, в основном, на обоснование глутаматергической гипотезы механизма действия акампросата [8]. Получены данные, что акампросат ингибирует глутаматные рецепторы NMDA-типа [10] и метаботропные mGluR-рецепторы [4]. Механизм действия акампросата гипотетически представляют как восстановление нормального баланса между центральным торможением и возбуждением, сдвигаемого при отмене алкоголя в сторону глутаматергического возбуждения [5].

Мы исследовали влияние акампросата на возбудимость нейронов фронтальной коры большого мозга

(КБМ) и его взаимодействие с этанолом. Фронтальная кора избрана как объект исследования потому, что она является высшим отделом лимбической системы, ответственным за эмоции, мотивации и аддиктивное поведение [3, 6].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на взрослых крысах-самцах линии Wistar, массой 180–200 г. Трепанацию черепа проводили под галотановым наркозом, после чего переводили животных на искусственное дыхание с использованием миорелаксанта диплацина (10 мг/кг в вену). Для внеклеточного отведения спонтанных потенциалов действия нейронов использовали один из стволцов 5-ствольного стеклянного микроэлектрода, заполненный 3 М NaCl. Оценивали изменение частоты потенциалов действия нейронов. Другие стволцы многоканального микроэлектрода служили для микроионофоретического подведения к мембране нейрона акампросата (0,1 М; pH 4,5) и электроосмотического подведения этанола (5,0 М; pH 5,5). Акампросат вводили также внутрибрюшинно в дозе 600 мг/кг. При статистической обработке использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние внутрибрюшинно введенного акампросата на спонтанную активность нейронов фронтальной коры большого мозга.

¹ ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

² ФГБУ “Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии” РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а.

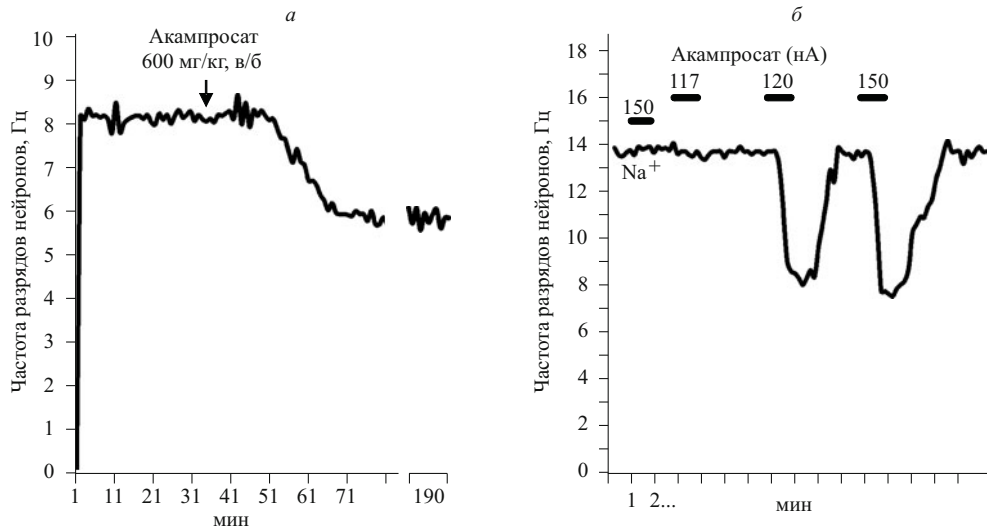


Рис. 1. Акампросат уменьшает частоту спонтанных потенциалов действия нейронов фронтальной коры большого мозга крыс.

a — внутрибрюшинное введение акампросата. *б* — микроионофоретическое подведение акампросата к отдельному нейрону. Здесь и на рис. 2 и 3: линии на графике *б* обозначают продолжительность микроионофоретического подведения акампросата; цифры над ними — величины токов в нА ($1 \cdot 10^{-9}$ А). Na^+ — контрольное испытание тока максимальной величины (150 нА), исключающее токовые артефакты.

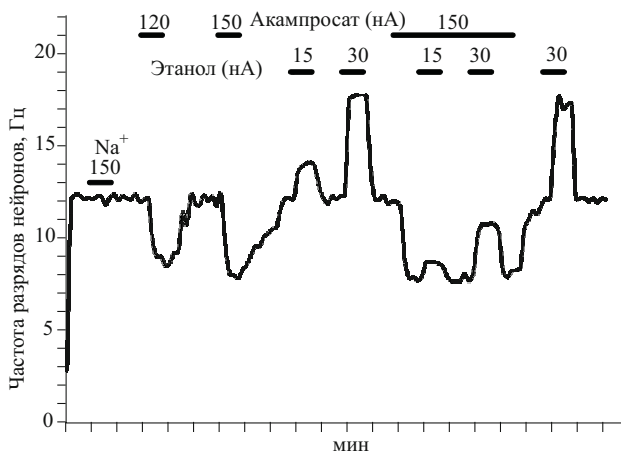


Рис. 2. Акампросат при микроионофоретическом подведении уменьшает ответы нейрона возбуждающего типа, вызванные этанолом, подведенным электроосмотически.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Акампросат, введенный внутрибрюшинно в дозе 600 мг/кг, уменьшал частоту спонтанной электрической активности 3-х нейронов (у 3-х крыс) из 10 исследованных клеток (10 крыс). Депрессия нейрональной активности была достоверной ($p < 0,05$), не превышала 35 % от исходной частоты потенциалов действия, возникала через 50–60 мин и достигала максимума через 60–70 мин после инъекции. Торможение нейронов продолжалось все время, доступное для наблюдения — более 180 мин. Величина и форма потенциалов действия не изменялись (рис. 1, *a*).

2. *Влияние микроионофоретически подводимого акампросата на спонтанную активность нейронов.*

Акампросат при микроионофоретическом подведении непосредственно к постсинаптической мембране

вызывал достоверное ($p < 0,05$) уменьшение частоты спонтанной активности у 20 из 79 исследованных нейронов (8 крыс). Активность остальных нейронов не изменялась. Акампросат не влиял на величину и форму потенциалов действия нейронов.

Для получения эффекта акампросата требовались большие изгоняющие токи — более 100 нА ($100 \cdot 10^{-9}$ А). Торможение развивалось медленно, достигая максимума через 30–40 с после включения изгоняющего тока. Восстановление исходной активности после отключения тока было длительным — 70–90 с. Эффект акампросата не зависел от дозы. При значительном увеличении количества подводимого агента с использованием максимальных токов не наблюдали достоверного углубления нейрональной депрессии. Тормозящий эффект акампросата не превышал 50 % от частоты исходной активности клеток. Полной блокады нейрональной активности не наблюдали даже при максимальном изгоняющем токе 150 нА (рис. 1, *б*).

3. *Изменение ответов нейронов на этанол под влиянием акампросата.*

Этанол при электроосмотическом подведении к нейронам КБМ может оказывать двоякое действие в зависимости от силы изгоняющего тока, т.е. количества (дозы) подводимого агента [1]. В малых дозах при силе тока менее 50 нА этанол вызывает увеличение частоты потенциалов действия многих нейронов. В больших дозах при силе тока больше 50 нА этанол вызывает уменьшение частоты спонтанной активности большинства клеток.

Ответы возбуждающего типа на этанол, подводимый к нейронам в малых дозах, достоверно ($p < 0,05$) уменьшались на фоне микроионофоретически подводимого акампросата у 11 из 42 нейронов (рис. 2). Величина уменьшения возбуждения, вызываемого этано-

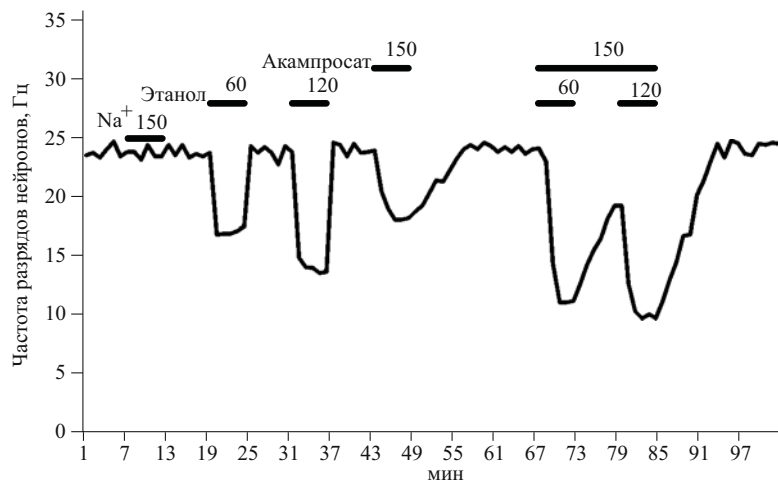


Рис. 3. Акампросат при микроионофоретическом подведении увеличивает ответы нейрона тормозящего типа, вызванные этанолом, подведенным электроосмотически.

Обозначения те же, что на рис. 1.

лом, была равна величине нейрональной депрессии вызываемой акампросатом, подведенным без этанола, и не превышала 50 % от величины возбуждающих ответов на этанол. Таким образом, происходило алгебраическое сложение разнонаправленных эффектов акампросата и этанола по принципу физиологического антагонизма.

Ответы тормозящего типа на этанол, подводимый к нейронам в больших дозах, достоверно ($p < 0,01$) увеличивались на фоне одновременно подводимого акампросата у 18 из 34 исследованных нейронов (рис. 3). Величина прироста этанолового торможения равнялась величине ответов клеток на акампросат, приложенный без этанола. Происходило арифметическое сложение депрессирующих эффектов агентов по принципу синергизма аддитивного типа. Полной блокады нейрональной активности при одновременном подведении акампросата и этанола не наблюдали.

Из приведенных данных следует, что акампросат при внутрибрюшинном введении и микроионофоретическом подведении оказывает тормозящее, депрессирующее действие на нейроны, уменьшая частоту их потенциалов действия. Агент влияет на активность только некоторой, незначительной популяции нервных клеток, составляющей примерно 1/3 нейронов фронтальной области неокортекса.

Угнетение нейрональной активности, вызываемое акампросатом, было неглубоким и составляло не более 35 % от частоты исходной активности нейронов. Невозможно было вызвать полную блокаду генерации потенциалов действия нейронов даже при подведении акампросата к клеткам в больших количествах. Величина и форма потенциалов действия не изменялись под влиянием акампросата при обоих способах введения. Это указывает на отсутствие у агента прямого мембранотропного действия и взаимодействия его со специфическими рецепторами постсинаптической

мембраны. Другие авторы также не обнаружили влияния акампросата на пассивные и активные электрические свойства мембраны нейронов КБМ крыс [10].

Центрально-депрессирующий эффект акампросата не зависел от дозы и возникал по закону “все или ничего” при достижении значительной концентрации агента вблизи нейрона. Такой триггерный механизм эффекта отвергает возможность взаимодействия акампросата со специфическими рецепторами постсинаптической мембраны. В соответствии с классическими представлениями рецепторной теории при возрастании концентрации химического агента у мембраны нервной клетки увеличивается количество активированных на ней рецепторов и физиологический ответ. При отсутствии зависимости эффекта вещества от дозы правомерно предположить, что акампросат действует экстранейронально, вероятнее всего, пресинаптически. Именно такой механизм действия требует значительного количества нейротропного агента вне клеточной мембраны и, следовательно, большой силы тока, изгоняющего исследуемое вещество из микроэлектрода. Это и было особенностью описанных выше экспериментов.

Пресинаптическое действие центрально-депрессирующего агента может реализоваться различными путями. Важнейшие из них — стимуляция выхода и обратного захвата пресинаптическими нервными окончаниями природного нейромедиатора тормозного типа, уменьшение выхода и торможение обратного захвата возбуждающего медиатора, влияние на ферментативный синтез и деградацию нейромедиаторов. Ранее выдвигалась гипотеза о том, что акампросат действует пресинаптически, блокируя ГАМК_B-рецепторы пресинаптических окончаний, регулирующие выход ГАМК [2].

Уменьшение акампросатом возбудимости центральных нейронов может обуславливать и объяснять его

положительный клинический эффект, выражающийся в уменьшении и предотвращении симптомов, вызванных возрастом возбудимости ЦНС при отмене алкоголя у хронических алкоголиков таких, как раздражительность, дистимия, тревога, страх, расстройств сна, судорожный синдром, белая горячка.

Угнетение акампросатом возбуждающих ответов нейронов на этанол, подведенный к ним в малых дозах, с нашей точки зрения, имеет важное значение. Мы предполагаем, что возбуждение нейронов коры под влиянием этанола в малых дозах связано с его положительным подкрепляющим поведенческим эффектом, эйфорией, речедвигательной активацией и другими особенностями легкого алкогольного опьянения, привлекательными для людей и обуславливающими их влечение к спиртному [1].

При хроническом алкоголизме, после прекращения употребления алкоголя и детоксикации рецидивы пьянства провоцируются внешними социальными стимулами (“подсказками”), обстановочными рефлексамии. Внезапно реализуется ранее закрепленная в долговременной памяти энграмма пьянства. Существенным компонентом этой энграммы, по-видимому, является возбуждение нейронов, причастных к алкогольной мотивации. Акампросат, подавляя это возбуждение, предотвращает рецидивы пьянства.

Увеличение акампросатом ответов тормозящего типа на этанол не явилось неожиданностью. Синергизм двух центрально-депрессирующих веществ по аддитивному типу — самый распространенный тип взаимодействия агентов подобного рода. Мишени, рецепторы, чувствительные к таким веществам, обычно различны. Описаны изменения ЭЭГ у крыс при совместном введении в организм акампросата и этанола, свидетельствующие о глубокой депрессии ЦНС [7]. Синергизм акампросата и этанола в их центрально-депрессирующем действии следует учитывать при лечении акампросатом больных, не прекративших упот-

ребление алкоголя. Возможно глубокое угнетение функций ЦНС вплоть до комы.

ВЫВОДЫ

1. Акампросат при внутрибрюшинном введении и микроионофоретическом подведении оказывает тормозящий эффект на спонтанную электрическую активность некоторой популяции нейронов фронтальной коры большого мозга крыс, уменьшая частоту потенциалов действия. Эффект агента не зависит от дозы.

2. Акампросат не изменяет величину и форму потенциалов действия нейронов.

3. Акампросат уменьшает возбуждение нейронов, вызываемое этанолом в малых дозах, и увеличивает торможение нейронов, вызываемое этанолом в больших дозах.

Работа поддержана РФФИ, проект № 13-04-01114.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Н. Кожечкин, *Клинико-биологические основы фармако-терапии алкоголизма*, Москва (1987), сс. 76 – 81.
2. F. Berton, W. G. Francesconi, S. G. Madama, et al., *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **22**(1), 183 – 191 (1998).
3. R. C. Goldstein, N. D. Volkov, *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**(11), 652 – 669 (2011).
4. B. R. Harris, M. A. Prendergast, D. A. Gibson, et al., *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **26**(12), 1779 – 1793 (2002).
5. B. Y. Mason, C. J. Heyser, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **9**(1), 23 – 32 (2010).
6. M. J. Millar, *Meth. Exptl. Clin. Pharmacol.*, **4**(7), 445 – 462 (1982).
7. B. Pietrzak, E. Czarnezka, *Pharmacol. Rep.*, **57**(1), 61 – 69 (2005).
8. M. T. Reilly, I. A. Lobo, L. M. McCracken, et al., *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **32**(2), 188 – 196 (2008).
9. K. Witkiewicz, K. Saville, K. Hamreus, *Ther. Clin. Risk. Manag.*, **8**, 45 – 53 (2012).
10. M. L. Zeise, S. Kasparov, M. Curogna, W. Zieglgansberger, *Eur. J. Pharmacol.*, **231**(1), 47 – 52 (1993).

Поступила 18.04.13

ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF ACAMPROSATE EFFECTS ON FRONTAL CORTICAL NEURONS IN RATS

S. N. Kozhechkin¹, Yu. S. Mednikova², and L. G. Kolik¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Butlerova ul. 5A, Moscow, 117485, Russia

The effect of drug for alcoholism treatment acamprosate (campral) on spontaneous electrical activity of frontal cortical neurons was studied in rats. Acamprosate after acute intraperitoneal administration (600 mg/kg) and microiontophoretic application reduced the frequency of spike activity in about 30 % of cells studied. The agent didn't change the magnitude and form of action potentials. Microiontophoretically applied acamprosate reduced the excitatory responses to ethanol electroosmotically applied to neurons at “small doses” (ejected current < 50 nA) and increased the value of neuronal depression induced by ethanol at the “large doses” (ejected current 50 nA). Effects of acamprosate were dose independent. It is suggested that acamprosate has no interaction with specific postsynaptic receptors and its action is determined by presynaptic mechanisms.

Keywords: acamprosate; ethanol; neurons; brain cortex; microiontophoresis