

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 615.21+612.014

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АФОБАЗОЛА
НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В УСЛОВИЯХ
ДЕФИЦИТА СЕРОТОНИНА В СТРУКТУРАХ МОЗГА МЫШЕЙ
С РАЗЛИЧНЫМ ЭМОЦИОНАЛЬНЫМ ФЕНОТИПОМ

© 2021 г. В. Б. Наркевич¹, *, С. А. Литвинова¹, В. С. Роговский¹, И. Б. Цорин¹, В. С. Кудрин¹

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

После доработки 27.07.2020 г.

Принята к публикации 29.07.2020 г.

Проведено изучение нейрохимических эффектов афобазола в структурах мозга линий мышей BALB/C и C57BL/6 в условиях дефицита серотонина, вызванного введением парахлорфенилаланина (ПХФА), ингибирующего основной фермент синтеза серотонина триптофан-5-гидроксилазу. Установлены межлинейные различия в уровне норадреналина (НА), серотонина (5-ОТ), а также параметров метаболизма дофамина (ДА) во фронтальной коре (ФК), амигдале, стриатуме, гипоталамусе и гиппокампе. Установлено, что ПХФА (350 мг/кг/3 дня) вызывал значительное снижение содержания 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК в исследуемых структурах головного мозга у обеих линий мышей, при этом у мышей BALB/C наблюдалось более интенсивное (в 2–2.5 раза) снижение этих показателей. ПХФА снижал уровень НА в гипоталамусе, амигдале и стриатуме у грызунов линии BALB/C, не влияя на данный показатель у мышей линии C57BL/6. Афобазол (5 мг/кг) в условиях моделирования дефицита 5-ОТ оказывал влияние на параметры дофаминергической нейротрансдачи, снижая содержание ДОФУК и величину показателя ДОФУК/ДА в гипоталамусе и стриатуме мышей обеих линий. Наблюдалось увеличение содержания 5-ОТ и НА, сниженных в результате введения ПХФА, в гипоталамусе и амигдале мышей BALB/C и в гиппокампе и амигдале мышей линии C57BL/6. Величина показателей скорости метаболизма 5-ОИУК/5-ОТ при этом снижалась. Результаты данной работы подтверждают полученные ранее данные об участии серотонинергических систем мозга в механизме действия афобазола. В условиях ПХФА-индуцированного дефицита серотонина препарат воздействует как на стрессоустойчивых (линия C57BL/6), так и на более эмоционально лабильных животных (линия BALB/C), что выражается в восстановлении содержания серотонина и норадреналина в гипоталамусе мышей BALB/C, а также амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6.

Ключевые слова: афобазол, парахлорфенилаланин (ПХФА), линии мышей, структуры мозга, серотонин, норадреналин, дофамин, ВЭЖХ

DOI: 10.31857/S1027813321010088

ВВЕДЕНИЕ

Моделирование дефицита нейротрансмиттеров у животных, фенотипически отличающихся чувствительностью к стрессу, является одним из наиболее часто используемых методов изучения роли моноаминергических систем головного мозга при тревожных состояниях и механизма действия соединений анксиолитического профиля. Основным подходом моделирования дефицита серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) в мозге является ингибирование ключевого фермента синтеза се-

ротонина триптофан-5-гидроксилазы (ТН2) с помощью необратимых ингибиторов пара-хлорфенилаланина (ПХФА) или фенклонина, а также алиментарный прием смеси аминокислот, лишенных триптофана, что приводит к быстрому опустошению запасов 5-ОТ в организме и, в конечном итоге, к значительному снижению содержания данного нейротрансмиттера [1]. Мыши линии BALB/C, отличающиеся от животных линии C57BL/6 пассивной реакцией на моделирование стрессовой ситуации в открытом поле [2], имеют мутацию в гене, кодирующем ТН2, что определяет более низкий базовый уровень и скорость синтеза серотонина в мозге этих животных [3–5].

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, Балтийская ул., 8, тел. (495) 601-21-53; e-mail: narvik@yandex.ru.

Афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этил-тио]-бензимидазола дигидрохлорид), синтезированный в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, обладает высоким анксиолитическим потенциалом. Механизм анксиолитического действия афобазола связывают с его способностью взаимодействовать с σ_1 (сигма) рецепторами, рецепторами мелатонина MT_1 и MT_3 , а также регуляторным участком MAO-A, оказывая модулирующее влияние на основные нейромедиаторные системы мозга [6, 7]. В частности, нами было установлено наличие селективности действия афобазола в отношении различных нейромедиаторных систем мозга мышей указанных линий [8]. Кроме того, в условиях введения ингибитора декарбоксилазы ароматических кислот NSD-1015 афобазол вызывал снижение содержания ДОФУК в гипоталамусе, а также уровня ГВК в стриатуме крыс, что позволяет говорить об ингибирующем влиянии данного соединения на основной фермент биодegradации DA моноаминоксидазу В (MAO-B) [9]. Несмотря на то, что в последнее время накоплен значительный объем данных о фармакологических эффектах афобазола, остается по-прежнему мало сведений о влиянии данного препарата на серотонинергическую систему, которая, как известно, играет ведущую роль в нейрхимическом механизме развития тревожных и депрессивных расстройств.

В связи со сказанным, целью данной работы было нейрхимическое исследование эффектов афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга линий мышей с различным эмоциональным фенотипом BALB/C и C57BL/6 в норме и в условиях дефицита 5-ОТ, вызванного введением ПХФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Опыты проведены на самцах мышей линий C57/Bl/6 и BALB/C массой тела 20–24 г. (питомник РАН “Столбовая”), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Для исключения влияния суточных биоритмов на скорость биосинтеза и метаболизма нейромедиаторов эксперименты проводили между 10 и 12 ч дня. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01.04.2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29.08.2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Ко-

миссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (протокол № 6 от 16.04.2018 г.).

Исследуемые вещества. Афобазол (ФГБНУ “НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова”) растворяли в 0.9% NaCl и вводили в дозе 5 мг/кг внутривентриально за 1 ч до декапитации животных. ПХФА (Sigma) вводился внутривентриально в течение трех дней в дозе 150 мг/кг в первый день и 100 мг/кг в последующие дни). По литературным данным, снижение уровня серотонина, вызванное ПХФА, развивается постепенно, достигает максимума через 3 сут и сохраняется в течение 5–6 сут [10].

Схема эксперимента. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы (в скобках – количество животных):

- 1 группа BALB/C – контроль (0.9% NaCl) ($n = 9$);
- 2 группа BALB/C – 0.9% NaCl + афобазол (5 мг/кг) ($n = 10$);
- 3 группа BALB/C – ПХФА в суммарной дозе 350 мг/кг ($n = 10$);
- 4 группа BALB/C – 0.9% NaCl + афобазол + ПХФА ($n = 10$);
- 5 группа C57BL/6 – контроль (0.9% NaCl) ($n = 10$);
- 6 группа C57BL/6 – 0.9% NaCl + афобазол (5 мг/кг) ($n = 9$);
- 7 группа C57BL/6 – ПХФА в суммарной дозе 350 мг/кг ($n = 10$);
- 8 группа C57BL/6 – 0.9% NaCl + афобазол + ПХФА ($n = 9$).

Нейрхимические исследования. Декапитация животных осуществлялась через 60 мин после введения веществ. Структуры мозга (фронтальная кора (ФК), гиппокамп, гипоталамус, стриатум) извлекались на леду, замораживались, взвешивались и хранились в жидком азоте.

Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в ручном гомогенизаторе Поттера (тефлон–стекло) в 1 мл 0.1 N HClO₄ с добавлением 3,4-диоксифениламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Содержание моноаминов и их метаболитов (норадреналина (НА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и 5-оксииндолилуксусной кислоты (5-ОИУК) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с

аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C_{18} , 100×4 мм, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия) [11].

Обработку полученных данных о содержании моноаминов в структурах мозга проводили следующим образом: нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как распределение результатов измерений было близко к нормальному, статистическую значимость различий анализировали с помощью трехфакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану при критическом уровне значимости $\alpha = 0.05$. Приведены средние значения и стандартные ошибки среднего ($M \pm S.E.M.$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлено содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга контрольных интактных групп линий мышей BALB/C и C57BL/6 (0.9% NaCl), не подвергавшихся внешнему воздействию.

При сравнении нейрохимических показателей двух линий животных установлено, что у мышей линии BALB/C уровень НА в ФК и гиппокампе достоверно ниже соответствующих значений этого параметра у мышей линии C57BL/6. В гипоталамусе, напротив, его содержание было достоверно выше. Уровень метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК в гипоталамусе и амигдале чувствительных к стрессу мышей, а также содержание самого нейротрансмиттера в гипоталамусе был значительно выше уровней соответствующих значений мышей C57BL/6. Параметры серотонинергической системы мышей линии BALB/C статистически достоверно отличались от линии C57BL/6 более высоким содержанием 5-ОТ в амигдале, однако в гиппокампе его уровень был ниже (табл. 1).

Афобазол при однократном введении в дозе 5 мг/кг вызывал изменение содержания нейротрансмиттеров в структурах головного мозга мышей обеих линий, при этом большая часть этих эффектов затрагивала преимущественно функционирование серотонин- и норадренергической систем. В гипоталамусе, амигдале и гиппокампе мышей C57BL/6 отмечалось увеличение уровня НА, в то время как у животных BALB/C его концентрация достоверно снижалась в стриатуме и гиппокампе (табл. 2). Афобазол вызывал увеличение содержания 5-ОТ практически во всех исследуемых структурах мозга (за исключением стриатума) мышей линии C57BL/6, при этом содержание метаболита 5-ОИУК и величина показателя скорости метаболизма 5-ОТ (5-ОИУК/5-ОТ) во всех структурах достоверно снижались. Аналогичное

замедление метаболизма серотонина наблюдалось в структурах мозга (кроме амигдалы) мышей линии BALB/C, однако оно не сопровождалось накоплением самого нейротрансмиттера, напротив, отмечалось снижение его уровня в стриатуме.

Эффекты афобазола на параметры дофаминергической системы характеризовались значительным (до 264%) увеличением содержания ДА в амигдале мышей с пассивной реакцией на стресс. В той же структуре животных линии C57BL/6 также наблюдалось увеличение уровня ДА, но в существенно меньшей степени (до 145%). Было обнаружено снижение содержания ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей с активной (на 47 и 45% соответственно) и пассивной (на 40 и 30% соответственно) реакцией на стресс (табл. 2).

Введение ПХФА в суммарной дозе 350 мг/кг в течение 3-х дней предсказуемо вызвало значительное снижение содержания 5-ОТ и 5-ОИУК в исследуемых структурах головного мозга у обеих линий мышей. Следует отметить, что у мышей с пассивной реакцией на стресс (BALB/C) наблюдалось более интенсивное снижение данных показателей — на 70–80% от значений контрольной группы, что в 2–2.5 раза было ниже показателей мышей линии C57BL/6. ПХФА значительно снижал уровень НА в гипоталамусе, амигдале и стриатуме у чувствительных к стрессу мышей, не влияя на данный показатель у мышей линии C57BL/6. Величины параметров дофаминергической передачи при этом практически не изменялись в структурах мозга обеих линий мышей (табл. 2).

Афобазол в условиях моделирования дефицита серотонина путем субхронического введения ПХФА оказывал влияние на параметры дофаминергической нейротрансмиттерной системы. В гипоталамусе и стриатуме мышей BALB/C и C57BL/6 отмечалось снижение содержания ДОФУК и оборота ДА, показатели ДОФУК/ДА. Наибольший интерес представляют данные о влиянии афобазола на содержание 5-ОТ и 5-ОИУК. Показано, что афобазол вызывал увеличение содержания 5-ОТ, сниженного в результате введения ПХФА, в гипоталамусе мышей с пассивной реакцией на стресс (BALB/C) и во ФК, амигдале, гиппокампе у устойчивых к стрессу мышей (C57BL/6). Величина показателей скорости метаболизма 5-ОИУК/5-ОТ снижалась в ФК, гипоталамусе и амигдале обеих линий мышей в сходной степени. Однако уровень восстановления афобазолом дефицита серотонина был выше у мышей линии C57BL/6. Существенное увеличение содержания НА, сниженного ПХФА, отмечалось в амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6 и гипоталамусе стресс-чувствительных мышей.

Таблица 1. Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга интактных мышей линий C57/Bl и BALB/C

Линии животных	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОТ	5-ОИУК	5-ОИУК/5-ОТ
Фронтальная кора									
C57/Bl	2.97 ± 0.11**	0.88 ± 0.08	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.09	9.50 ± 0.30	1.18 ± 0.06*	0.07 ± 0.01
BALB/C	2.04 ± 0.15	0.86 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.58 ± 0.01	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.02	8.93 ± 0.80	0.98 ± 0.10	0.11 ± 0.00
Гипоталамус									
C57/Bl	5.12 ± 0.18*	1.15 ± 0.09*	0.51 ± 0.03*	0.53 ± 0.05*	0.46 ± 0.03	0.50 ± 0.07	21.63 ± 1.07	3.12 ± 0.18	0.14 ± 0.01
BALB/C	7.28 ± 0.42	1.87 ± 0.13	0.77 ± 0.04	0.83 ± 0.11	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.05	24.28 ± 1.75	3.41 ± 0.31	0.14 ± 0.00
Амигдала									
C57/Bl	4.15 ± 0.20	4.17 ± 0.87	1.20 ± 0.11*	1.16 ± 0.23*	0.33 ± 0.06	0.26 ± 0.03	32.50 ± 1.89*	3.07 ± 0.30	0.09 ± 0.01
BALB/C	4.49 ± 0.55	7.97 ± 1.64	2.21 ± 0.37	2.64 ± 0.55	0.28 ± 0.08	0.302 ± 0.06	44.49 ± 3.94	3.88 ± 0.36	0.08 ± 0.01
Стриатум									
C57/Bl	0.59 ± 0.05	48.89 ± 2.82	2.33 ± 0.20	3.73 ± 0.26*	0.05 ± 0.00**	0.08 ± 0.00**	2.62 ± 0.12	1.21 ± 0.07	0.47 ± 0.03
BALB/C	0.87 ± 0.15	37.44 ± 5.43	2.98 ± 0.55	6.12 ± 1.12	0.06 ± 0.00	0.13 ± 0.01	3.30 ± 0.55	1.48 ± 0.32	0.44 ± 0.03
Гиппокамп									
C57/Bl	2.18 ± 0.11**	0.44 ± 0.08	0.29 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.77 ± 0.118	0.37 ± 0.10	4.87 ± 0.22	2.09 ± 0.17	0.43 ± 0.03
BALB/C	1.424 ± 0.17	0.38 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.65 ± 0.064	0.50 ± 0.12	3.30 ± 0.46*	1.80 ± 0.30	0.50 ± 0.03

Примечание: приведены средние значения и стандартные ошибки ($M \pm S.E.M.$).* достоверность отличий при $p < 0.05$ (трехфакторный анализ с переходом на множественные сравнения по Дункану).

Таблица 2. Влияние ПХФА (350 мг/кг, 3 дня) и афобазола (5 мг/кг, 60 мин) на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей линий С57/В1 и ВАЛВ/С

Вещество	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОТ	5-ОИУК	5-ОИУК/5-ОТ
С57/В1	Афобазол	3.35 ± 0.13	0.84 ± 0.05	0.59 ± 0.07	0.29 ± 0.07	0.71 ± 0.08	11.73 ± 0.62*	0.82 ± 0.05**	0.07 ± 0.00**
	ПХФА	2.77 ± 0.08	0.75 ± 0.06	0.48 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.64 ± 0.02	5.89 ± 0.37**	0.48 ± 0.04**	0.08 ± 0.00**
	Аф + ПХФА	2.81 ± 0.20	0.74 ± 0.11	0.45 ± 0.04	0.52 ± 0.14	0.55 ± 0.03	8.08 ± 0.58[#]	0.40 ± 0.07**	0.05 ± 0.01**[#]
ВАЛВ/С	Афобазол	1.83 ± 0.11	0.84 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.70 ± 0.03	6.69 ± 0.55*	0.58 ± 0.04**	0.09 ± 0.01
	ПХФА	1.74 ± 0.14	0.69 ± 0.10	0.56 ± 0.07	0.44 ± 0.06	0.84 ± 0.06*	2.58 ± 0.28**	0.22 ± 0.03**	0.09 ± 0.01*
	Аф + ПХФА	1.83 ± 0.08	0.78 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.52 ± 0.05^{##}	2.65 ± 0.24**	0.13 ± 0.02**	0.05 ± 0.01**[#]
С57/В1	Афобазол	6.32 ± 0.40*	1.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04*	0.40 ± 0.08	0.28 ± 0.03*	26.38 ± 1.08*	2.32 ± 0.11*	0.09 ± 0.00**
	ПХФА	4.69 ± 0.17	1.20 ± 0.07	0.49 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.41 ± 0.02	12.10 ± 1.24**	1.07 ± 0.14**	0.09 ± 0.00**
	Аф + ПХФА	5.48 ± 0.17	1.19 ± 0.09	0.27 ± 0.04^{##}	0.55 ± 0.14	0.24 ± 0.03^{##}	16.70 ± 1.93**	0.94 ± 0.11**	0.06 ± 0.01[#]
ВАЛВ/С	Афобазол	6.93 ± 0.51	1.84 ± 0.17	0.63 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.35 ± 0.03	21.91 ± 1.65	2.26 ± 0.26*	0.10 ± 0.00**
	ПХФА	5.56 ± 0.17*	1.48 ± 0.07**	0.55 ± 0.02**	0.62 ± 0.04	0.37 ± 0.02	5.70 ± 0.23**	0.44 ± 0.05**	0.08 ± 0.01**
	Аф + ПХФА	6.65 ± 0.38[#]	1.74 ± 0.09	0.27 ± 0.03[#]	0.56 ± 0.06*	0.20 ± 0.04^{##}	7.20 ± 0.43^{##}	0.36 ± 0.04*	0.05 ± 0.01**[#]
С57/В1	Афобазол	5.67 ± 0.27*	6.08 ± 0.80	1.21 ± 0.06	1.07 ± 0.15	0.23 ± 0.04	46.18 ± 1.56*	2.33 ± 0.15	0.05 ± 0.00**
	ПХФА	3.76 ± 0.31	5.85 ± 2.14	1.20 ± 0.21	1.30 ± 0.35	0.29 ± 0.04	19.66 ± 1.30**	0.94 ± 0.13**	0.05 ± 0.01**
	Аф + ПХФА	5.32 ± 0.28[#]	4.12 ± 0.52	1.03 ± 0.08	1.15 ± 0.13	0.24 ± 0.03	31.19 ± 2.38[#]	0.78 ± 0.11**	0.02 ± 0.00**[#]
ВАЛВ/С	Афобазол	5.05 ± 0.75	21.05 ± 3.22**	2.10 ± 0.26	2.77 ± 0.33	0.11 ± 0.01*	38.28 ± 2.14	2.74 ± 0.19*	0.07 ± 0.00
	ПХФА	2.21 ± 0.16**	5.81 ± 1.11	1.05 ± 0.06**	1.49 ± 0.21*	0.22 ± 0.03	11.51 ± 0.70**	0.29 ± 0.05**	0.02 ± 0.00**
	Аф + ПХФА	4.04 ± 0.27[#]	9.36 ± 1.85	0.96 ± 0.08**	0.88 ± 0.19**	0.13 ± 0.03*	16.70 ± 1.58**	0.20 ± 0.08**	0.01 ± 0.00**[#]
С57/В1	Афобазол	0.80 ± 0.08	54.21 ± 2.63	1.23 ± 0.07**	2.07 ± 0.18**	0.02 ± 0.00**	2.83 ± 0.32	0.70 ± 0.09*	0.25 ± 0.01**
	ПХФА	0.89 ± 0.13	49.50 ± 4.18	2.58 ± 0.24	3.94 ± 0.29	0.05 ± 0.00	1.66 ± 0.15**	0.36 ± 0.07**	0.21 ± 0.03**
	Аф + ПХФА	0.71 ± 0.07	58.20 ± 2.49	0.97 ± 0.08^{##}	3.46 ± 0.47	0.02 ± 0.00^{##}	1.94 ± 0.11*	0.34 ± 0.08**	0.17 ± 0.04**
ВАЛВ/С	Афобазол	0.43 ± 0.05*	43.64 ± 1.79	1.77 ± 0.05*	4.22 ± 0.20**	0.04 ± 0.00**	2.04 ± 0.14*	0.68 ± 0.05*	0.34 ± 0.03*
	ПХФА	0.51 ± 0.05*	38.12 ± 1.46	2.19 ± 0.10*	5.12 ± 0.17*	0.06 ± 0.00*	0.82 ± 0.06**	0.10 ± 0.02**	0.13 ± 0.03**
	Аф + ПХФА	0.52 ± 0.09	35.50 ± 3.40	0.67 ± 0.09^{##}	2.06 ± 0.22^{##}	0.02 ± 0.00^{##}	0.49 ± 0.12**	0.17 ± 0.13**	0.08 ± 0.02**
С57/В1	Афобазол	2.82 ± 0.08*	0.40 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.64 ± 0.08	6.66 ± 0.20**	1.68 ± 0.08	0.25 ± 0.02*
	ПХФА	1.96 ± 0.10	0.54 ± 0.10	0.27 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.63 ± 0.12	2.50 ± 0.37**	0.41 ± 0.08**	0.15 ± 0.02**
	Аф + ПХФА	2.46 ± 0.09[#]	0.49 ± 0.07	0.42 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.96 ± 0.14	4.43 ± 0.37[#]	0.51 ± 0.10**	0.11 ± 0.01**
ВАЛВ/С	Афобазол	1.03 ± 0.05*	0.65 ± 0.10	0.30 ± 0.07	0.35 ± 0.15	0.37 ± 0.11	2.90 ± 0.34	1.01 ± 0.10**	0.36 ± 0.02*
	ПХФА	1.30 ± 0.18	0.45 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.76 ± 0.10	0.74 ± 0.13**	0.22 ± 0.06**	0.29 ± 0.07*
	Аф + ПХФА	1.34 ± 0.09	0.47 ± 0.07	0.39 ± 0.08	0.11 ± 0.02	1.02 ± 0.22	0.84 ± 0.18**	0.07 ± 0.02*	0.17 ± 0.09**

Примечание: приведены средние значения и стандартные ошибки (M ± S.E.M.).

* достоверность различий по сравнению с контролем соответствующей линии мышей при $p < 0.05$.

** при $p < 0.001$ (трехфакторный анализ с переходом на множественные сравнения по Дункану).

достоверность различий по сравнению с группой, получавшей ПХФА при $p < 0.05$;

при $p < 0.001$ (трехфакторный анализ с переходом на множественные сравнения по Дункану).

Наблюдавшееся нами снижение содержания 5-ОТ в структурах головного мозга мышей BALB/C и C57BL/6 (табл. 2) согласуется с данными литературных источников, согласно которым субхроническое введение ПХФА в течение 3-х дней приводило к снижению содержания 5-ОТ на 80% от исходных значений. Этот эффект является следствием ингибирования ПХФА триптофан-5-гидроксилазы – основного фермента синтеза 5-ОТ [10, 12]. В нашем исследовании ПХФА вызывал более глубокое снижение уровня серотонина (на 80%) и его метаболита в структурах мозга мышей линии BALB/C, что свидетельствует о нарушении скорости синтеза серотонина у этих животных [13].

Данные о влиянии афобазола на параметры серотонинергической системы согласуются с результатами наших предыдущих исследований. Так, афобазол на модели нарушения синтеза серотонина при введении ингибитора декарбокксилазы ароматических кислот NSD-1015 вызывал увеличение содержания предшественника серотонина 5-окситриптофана (5-ОТФ), самого нейромедиатора и его метаболита 5-ОИУК в гипоталамусе крыс на 50, 60 и 50% соответственно, что позволяет предположить, что данный анксиолитик оказывает влияние на фермент синтеза 5-ОТФ триптофангидроксилазу [9]. В другом исследовании, проведенном нашим коллективом, совместное введение афобазола и антагониста 5-НТ2b/2c рецепторов SB-200646A вызывало увеличение содержания 5-ОТ и 5-ОИУК в гиппокампе мышей BALB/C, что может быть интерпретировано как позитивная модуляция эффекта анксиолитика, обусловленная блокадой серотониновых рецепторов 5-НТ2 типа и, таким образом, свидетельствовать о вовлечении указанных рецепторов в реализацию анксиолитического эффекта афобазола [14]. В настоящем исследовании в условиях дефицита 5-ОТ, вызванного ПХФА, увеличение содержания нейротрансмиттера, вызванное афобазолом, происходило за счет снижения его метаболизма, вызванного, вероятнее всего, ингибированием фермента биodeградации – моноаминоксидазы А (МАО-А) [6]. Важно отметить, что афобазол в наибольшей степени корректировал ПХФА-индуцированный дефицит 5-ОТ в структурах мозга мышей устойчивых к стрессу – линии C57BL/6, практически полностью восстанавливая его уровень в ФК, гипоталамусе и амигдале. Более умеренный эффект препарата на чувствительных к стрессу мышей линии BALB/C можно объяснить генетически детерминированным низким содержанием ферментов МАО-В и МАО-А и, возможно, триптофан-5-гидроксилазы [4–6].

Интересно отметить, что афобазол увеличивает концентрацию НА в тех же структурах мозга, в которых отмечалось и увеличение содержания 5-ОТ. В условиях ПХФА-индуцированного истощения это происходит в амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6 и в гипоталамусе мышей линии BALB/C, а в условиях нормы – в амигдале, гиппокампе и гипоталамусе стресс-устойчивых мышей. Подобное увеличение концентрации норадреналина и серотонина в синаптической щели вызывают практически все антидепрессанты различной структуры. В частности, антидепрессант мirtазапин, блокируя альфа-2 рецепторы норадреналина, по принципу отрицательной обратной связи повышает содержание в синаптической щели НА и 5-ОТ. В нашем эксперименте действие афобазола свидетельствует скорее об ингибировании деградации нейротрансмиттеров за счет угнетения активности фермента МАО-А. Это предположение подтверждают данные, полученные при изучении спектра рецепторного связывания афобазола [6].

Влияние афобазола на показатели дофаминергической нейротрансдачи согласуется с данными, полученными нами ранее. В частности, было показано, что афобазол в условиях введения ингибитора декарбокксилазы ароматических кислот NSD-1015 вызывает снижение содержания ДОФУК в гипоталамусе, а также уровня ГВК в стриатуме крыс, что может говорить об ингибирующем влиянии первого на основной фермент биodeградации ДА моноаминоксидазу В (МАО-В) [9]. В данной работе эффекты афобазола на содержание метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК в гипоталамусе и стриатуме обеих линий мышей также могут объясняться сходным образом – введение афобазола приводит к замедлению утилизации ДА.

Что касается межлинейных отличий поведенческих эффектов афобазола на животных с различным фенотипом эмоционального реагирования, то из литературы известно о влиянии препарата лишь на определенный фенотип – у животных с наследственно детерминированной реакцией страха при эмоционально-стрессовом воздействии (линия BALB/C), у людей с индивидуально-типологическими чертами, характеризующими психическую неустойчивость к стрессорным факторам [15].

Результаты настоящей работы подтверждают полученные нами ранее данные об участии серотонинергических систем мозга в реализации эффектов афобазола и раскрывают роль адренергической системы. В условиях ПХФА-индуцированного дефицита серотонина препарат воздействует как на стрессоустойчивых, так и на эмоционально лабильных животных, что выражается в компенсаторном восстановлении содержания серотонина

во фронтальной коре, амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6 и в гипоталамусе мышей BALB/C. При этом афобазол увеличивает содержание норадреналина в амигдале и гиппокампе мышей C57BL/6 и в гипоталамусе и амигдале мышей BALB/C.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках бюджетной тематики ФГБНУ “НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова” (тема № 0521-2019-0007: Разработка средств лечения эпилепсии, болезни Паркинсона и аутизма на основе новых данных патогенеза заболеваний).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01.04.2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29.08.2014 г. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (протокол № 6 от 16.04.2018 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanchez C.L., Arrant A., Van Swearingen A., Kuhn C., Zepf F.D. // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. P. e35916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035916>
2. Бородин П.М., Шулер Л.М., Беляев Д.К. // Генетика. 1976. Т. 12. № 12. С. 62–71.
3. Bach H., Arango V., Huang Yung-Yu, Leong Sh., Mann J.J., Underwood M.D. // J. Neurochem. 2011. V. 118. № 6. P. 1067–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07379.x>
4. Siesser W.B., Zhang X.D., Jacobsen J.P., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M. // Neurosci. Lett. 2010. V. 481. P. 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.035>
5. Zhang X.D., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. // Science. 2004. V. 305. P. 217. <https://doi.org/10.1126/science.1097540>
6. Середенин С.Б., Воронин М.В. // Эксп. Клин. Фармакол. 2009. Т. 72. № 1. С. 1–6.
7. Werling L.L., Derbez A.E., Nuwayhid S.J. // Modulation of classical neurotransmitter systems by sigma receptors. In: Sigma receptors. Chemistry, cell biology and clinical implications. Springer, 2007. P. 195–215.
8. Раевский К.С., Наркевич В.Б., Клодт П.М., Кудрин В.С. // БЭБиМ. 2012. Т. 153. № 5. С. 644–648.
9. Давыдова А.И., Клодт П.М., Кудрин В.С., Кузнецова Е.А., Наркевич В.Б. // Эксп. Клин. Фармакол. 2010. Т. 73. № 3. С. 38–42.
10. Кое В.К., Weisman A.J. // Pharmacol. Exp. Ther. 1966. V. 154. P. 499–516.
11. Надорова А.В., Колик Л.Г., Клодт П.М., Наркевич В.Б., Наплекова П.Л., Козловская М.М., Кудрин В.С., Середенин С.Б. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 2. С. 1–7.
12. Silvana C., Valina L. // PNAS. 2001. V. 98. № 3. P. 1277–1281.
13. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova, N.K. // Genes, Brain Behav. 2005. V. 4. № 8. P. 482–485. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2005.00145>
14. Раевский К.С., Наркевич В.Б., Клодт П.М., Кудрин В.С. // Эксп. Клин. Фармакол. 2011. Т. 74. № 12. С. 3–7.
15. Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Бочкарев В.К., Бояршинова Т.В., Незнамов Г.Г. // Социальная и клиническая психиатрия. 2006. № 1. С. 38–45.

Study of the Neurochemical Effects of Afobazole on the Content of Monoamines and its Metabolites in the Model of Serotonin Deficiency in the Brain Structures of Mice with Different Emotional Phenotypes

V. B. Narkevich^a, S. A. Litvinova^a, V. S. Rogovsky^a, I. B. Tsorin^a, and V. S. Kudrin^a

^aZakusov's State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

We studied the neurochemical effects of afobazole in the brain structures of two mouse strains with different emotional phenotypes BALB/C and C57BL/6 in the model of serotonin deficiency caused by the parachlorophenylalanine (PCPA), a tryptophan-5-hydroxylase inhibitor. Interstrain differences were found in the levels of norepinephrine (NA), serotonin (5-HT), as well as the parameters of dopamine metabolism (DA) in the frontal cortex (FC), amygdala, striatum, hypothalamus, and hippocampus. PCPA (350 mg/kg/3 days) was found to cause a significant decrease in the content of 5-HT and its metabolite 5-HIAA in the brain structures of both mice lines, while a decrease in these parameters in BALB/C mice was more intense (2–2.5 times). PCPA reduced the level of NA in the hypothalamus, amygdala and striatum in rodents of the BALB/C strain, without effects on this parameter in C57BL/6 mice. Afobazole (5 mg/kg) under conditions of 5-HT deficiency modeling influenced dopaminergic neurotransmission parameters, decreasing the

DOPAC content and the DOPAC/DA index in the hypothalamus and striatum of mice of both lines. Afobazole also caused an increase in the content of 5-HT and NA, reduced as a result of PCPA administration, in the hypothalamus of BALB/C mice and in the hippocampus and amygdala of C57BL/6 mice. The value of the metabolic rate of 5-HIAA/5-HT decreased. Our results confirm the previously obtained data on the involvement of serotonergic brain systems in the mechanism of action of afobazole. Under conditions of PCPA-induced serotonin deficiency, the drug acts on both stress-resistant and more emotionally labile animals, which is reflected in the restoration of serotonin and norepinephrine in the hypothalamus of BALB/C mice, as well as amygdala and hippocampus of C57BL/6 mice.

Keywords: afobazole, parachlorophenylalanine (PCPA), mice strains, brain structures, serotonin, norepinephrine, dopamine, HPLC