

ISSN 0494-7304 0207-4419

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI
TOIMETISED

УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ

ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

766

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ
ДЕЙСТВИЯ ПСИХОТРОПНЫХ
ВЕЩЕСТВ

Труды по медицине



TARTU 1987

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS
ALUSTATUD 1893.a. VIINIK 766 ВЫПУСК ОСНОВАНЫ В 1893.g.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ
ДЕЙСТВИЯ ПСИХОТРОПНЫХ
ВЕЩЕСТВ

Труды по медицине

ТАРТУ 1987

Редколлегия: Э.Васар (председатель), Ю.Аренд, К.Гросс,
К.Кырге, А.Ленцнер, Я.Рийв, С.Руссак, Ю.Саарма, Э.Сэпп,
Л.Тамм, Й.Таммеорг, А.Тикк, Л.Тяхепыльд.

Ответственный редактор выпуска А.Алликетс

Ученые записки Тартуского государственного университета.

Выпуск 786.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ.

Труды по медицине.

На русском языке.

Резюме на английском языке.

Тартуский государственный университет.

ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Аликооли, 18.

Ответственный редактор Л. Алликметс.

Корректоры И. Пауска, И. Анвелт.

Подписано к печати 29.01.1987.

МВ 00012.

Формат 60x90/16.

Бумага писчая.

Машинопись. Ротапринт.

Учетно-издательских листов 10,25. Печатных листов 10,5.

Тираж 600.

Заказ № III6.

Цена 1 руб. 50 коп.

Типография ТГУ, ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Тийги, 78.

Предисловие

В XI пятилетке основными направлениями научных исследований на кафедре фармакологии и в лаборатории психофармакологии Тартуского университета стали изыскание и изучение механизма действия новых нейролептиков и ГАМК-ергических веществ. Эти работы координированы общесоюзной программой "Психиатрия", которая связывает фундаментальные исследования с выходом новых лекарств. Так, настоящее издание посвящено исследованиям прежде всего молекулярного механизма действия нейролептиков ГАМК-ергических веществ, а также ноотропов, антидепрессантов и нейропептидов. Исходя из общесоюзных программ психофармакологических исследований в настоящий сборник включены также некоторые работы ленинградских и московских ученых, работающих в области молекулярной фармакологии. Большинство работ посвящено рецепторному действию психотропных веществ (бензодиазепиновые, ГАМК, дофаминовые, серотониновые, пептидные и др. рецепторы), при этом уделено внимание различению подтипов рецепторов и выяснению их физиологического (фармакологического) значения. В работах приведены адаптивные и др. изменения характеристик рецепторов при длительном применении отдельных препаратов, что позволяет построить новые гипотезы о механизме клинического психотропного действия лекарств. В настоящем издании изложены также материалы об иммунофармакологии психотропных препаратов, которые за последние годы получили интенсивное развитие.

Ответственный редактор

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ПРОЯВЛЕНИИ
АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПИРАЦЕТАМА

А.В. Вальдман, В.В. Рожанец, К. Чахбра, Р.А. Ахундов
Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Целый ряд соединений с ноотропной активностью, известных в настоящее время, обладает анксиолитическим действием, проявляющимся в экспериментах на животных. Для некоторых из них, например, для производных никотиновой кислоты и инозина, механизм анксиолитического действия представляется очевидным. Имеются веские основания предполагать, что в эффективных дозах эти соединения реально взаимодействуют с ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом /Ю; II/. Однако для таких ноотропных соединений как пирацетам и его аналоги, а также для производных оксипиридина механизм анксиолитического действия остается невыясненным. Возникает вопрос, возможна ли реализация анксиолитического действия производных пирацетама и оксипиридина без участия ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса с участием иных, альтернативных механизмов.

Для решения этого вопроса мы исследовали пирацетам и его оригинальный аналог - М-22, а также производное оксипиридина ОП-I, аналоги никотиновой кислоты - никотинат лития (николит), никотинамид и его оригинальные производные - соединения А₃Н и НМФ, также проявляющие в определенных дозах элементы ноотропной активности. В качестве препаратов сравнения - анксиолитиков, лишенных ноотропной активности, - мы использовали диазепам и бензофеноновый транквилизатор лонетил (НРБ).

Была изучена аффинность ряда этих соединений к некоторым рецепторам головного мозга *in vitro*, причем особое внимание было обращено на бензодиазепиновые рецепторы в присутствии и отсутствии ГАМК. Исследовали также влияние хронического применения некоторых из этих соединений на характеристики бензодиазепиновых рецепторов головного мозга интактных, нормальных крыс. Кроме того, мы исследовали влияние хронического психогенного стресса /2; 9/ на характеристики ряда

рецепторов головного мозга животных, относящихся к разным этологическим группам, и влияние лонетила, диазепама и пирарцетама при их субхроническом применении на характеристики тех же рецепторов у стрессированных животных.

Материалы и методы

Специфическое связывание ^3H -имиπραмина и ^3H -флунитразепама с мембранами целого мозга крыс проводили по /7/ и /8/. ГАМК-стимулируемое связывание ^3H -флунитразепама проводили по /10/ без существенных изменений. В тесте конфликтной ситуации использовали методику Вороиной с соав. /4/. Распределение беспородных белых крыс на высоко- и низкоактивные группы проводили по видоизмененному плавательному тесту Порсолта /5/. К низкоактивным относили животных, плавающих менее 120 сек, а к высокоактивным - плавающих более 300 сек за 10 минут наблюдения. После разделения на группы, но не ранее, чем через сутки, животных подвергали 15-дневному неизбежному психогенному стрессу по видоизмененной методике Гехта /9/. Раз в сутки в течение 15 минут им предъявляли надпороговые электроболевые воздействия различной продолжительности, чередующиеся по стохастической программе со вспышками света.

Через сутки после окончания стресс-воздействия животным каждой группы в течение 7 дней вводили внутривенно H_2O (0,5 мл), пирарцетам (300 мг/мл) или диазепам (1 мг/кг). Поведение животных в тесте "открытое поле", как и характеристики бензодиазепиновых рецепторов головного мозга изучали за день до начала стрессирования, перед началом введения препаратов и через сутки после прекращения лечения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что пирарцетам *in vitro* не влияет на характеристики специфического связывания ряда ^3H -лигандов, взятых в концентрациях, близких к их K_d /1/.

Из этих данных следовало, что в концентрации 10^{-5}M пирарцетам не взаимодействует с альфа-1 и бета-адренорецепторами, серотониновыми C_1 и C_2 рецепторами, дофаминовыми D_2 рецепторами (стриатум) крысы. Первоначально нам не удалось также показать взаимодействия пирарцетама с местами специфичес-

ческого связывания ^3H -флунизепам и ^3H -имипрамина синаптических мембран мозга крысы. Однако более подробный анализ выявил своеобразный характер взаимодействия пираретама с имипраминами и бензодиазепиновыми рецепторами. Изучение изотермы адсорбции ^3H -имипрамина в координатах Скэтчарда показало, что пираретам в данной концентрации достоверно (на 20%) понижает концентрацию мест специфического связывания имипрамина, в то время как понижение K_D было недостоверным. Роль этого, по-видимому, неконкурентного взаимодействия с местами специфического связывания ^3H -имипрамина в анксиолитическом эффекте пираретама пока остается неясной. Можно лишь предположить, что это взаимодействие каким-то образом отражает принципиальную вовлеченность серотонинергической системы в анксиолитическое действие ряда соединения, известную по данным литературы (табл. I).

Несмотря на то, что с бензодиазепиновыми рецепторами в обычных условиях эксперимента пираретам не взаимодействует нам удалось показать, что он способен вмешиваться во взаимодействие бензодиазепиновых и ГАМК-рецепторов.

Известно, что при определенных условиях инкубации аффинность бензодиазепиновых рецепторов тщательно отмытых мембран гиппокампа крысы можно вдвое повысить добавлением в среду инкубации 10^{-5}M ГАМК; концентрация рецепторов при этом не изменяется /10/. Добавление к таким "активированным" бензодиазепиновым рецепторам 10^{-5}M пираретама приводит к достоверному увеличению константы диссоциации ^3H -флунизепам с одновременным увеличением концентрации мест специфического связывания. Увеличение K_D ^3H -флунизепам (уменьшение аффинности) в присутствии ГАМК происходит также при добавлении в среду инкубации соединения ОП-I, мебикара и лонетила (табл. 2). В отсутствие ГАМК лонетил весьма слабо, хотя и достоверно конкурирует с ^3H -флунизепамом (K_D около 10^{-5}M). В отличие от этого диазепам, никотинамид и его производные - АЭН и НМФ - имеют выраженную аффинность к бензодиазепиновым рецепторам гиппокампа крысы и в отсутствие ГАМК (K_D соответственно $6,2 \pm 1,0$ нМ; $7,6 \pm 1,3$; $0,9 \pm 0,2$ мкМ; $3,1 \pm 0,5$ мМ).

Таким образом, с формальной точки зрения пираретам, соединение ОП-I и мебикар проявляют себя как конкурентные ингибиторы ГАМК-активированного специфического связывания ^3H -флунизепам. Это может объясняться как действительной конкуренцией данных ноотропных соединений с активированным в присутствии ГАМК бензодиазепиновым рецептором, так и взаимо-

действием их с иными центрами, в частности с ГАМК-рецепторами. В пользу последнего предположения свидетельствуют данные /6/ об обратимости анксиолитического действия пираретама с помощью бикикуллина. Однако прямое изучение действия пираретама на связывание ^3H -ГАМК с мембранами головного мозга крысы /3/ свидетельствует об отсутствии прямого действия пираретама на эти мишени. Для решения вопроса о действительной вовлеченности бензодиазепиновых рецепторов *in vivo* в анксиолитическое действие пираретама и других соединений мы исследовали зависимость данного эффекта от специфического антагониста бензодиазепинов - соединения Ro-15 1788.

В тесте конфликтной ситуации с использованием питьевой и оборонительной мотивации /4/ пираретам и другие исследованные соединения в использованных дозах оказывают анксиолитическое действие, несколько менее выраженное, чем у диазепама (табл. 3). Антагонист бензодиазепинов - соединение Ro-15 1788 (10 мг/кг, в/б, за 10 мин до начала тестирования) обращает анксиолитический эффект лишь диазепама. Таким образом мы можем утверждать, что эффект небензодиазепиновых анксиолитиков, исследованных нами, не обусловлен их взаимодействием с бензодиазепиновыми рецепторами головного мозга крысы *in vivo*. Другими словами, "конкурентный" характер взаимодействия пираретама, соединения ОП-I, лонетила с ГАМК-активированными местами специфического связывания ^3H -флунитразепама может объясняться лишь тем, что эти соединения препятствуют ГАМК-активации бензодиазепиновых рецепторов. Можно утверждать, что данные соединения не взаимодействуют *in vivo* с бензодиазепиновыми рецепторами, однако, вмешиваются в работу ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса. Весьма вероятно, что непосредственной мишенью анксиолитического действия пираретама и других исследованных соединений является участок, ответственный за сопряженность этих сущностей, или функционально связанная с ними субъединица рассматриваемого комплекса.

Известно, что хроническое применение психотропных препаратов, необходимое в большинстве случаев для получения выраженного терапевтического эффекта, зачастую приводит к нежелательным побочным явлениям, в частности, к развитию толерантности к используемому препарату. Есть основания считать, что толерантность к некоторым из эффектов транквилизаторов может быть связана с изменениями бензодиазепиновых рецепторов головного мозга. Мы исследовали влияние субхронического применения диазепама, лонетила, пираретама и соединения M-22

на характеристики специфического связывания ^3H -флунизепамом синаптическими мембранами целого мозга крысы. Как следует из результатов, представленных в таблице 4, 15-дневное введение крысам диазепама достоверно снижает концентрацию бензодиазепиновых рецепторов, тогда как лонетид не изменяет данного показателя. Трехнедельное применение пираретама и соединения М-22 у нормальных, интактных животных также не оказывает влияния на характеристики бензодиазепиновых рецепторов. Мы предполагаем, что хроническое применение анксиолитиков небензодиазепиновой природы, взаимодействующих с ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом через места связывания, неидентичны рецепторам ГАМК и бензодиазепинам, не приводит к компенсаторным изменениям последних. Не исключено, что именно с этим связана менее выраженная способность небензодиазепиновых анксиолитиков вызывать толерантность при хроническом применении.

Мы изучили влияние хронического стресса на поведение в "открытом поле" и характеристики бензодиазепиновых рецепторов головного мозга у крыс различных этологических групп. Далее исследовали влияние 7-дневного введения пираретама и диазепама на те же параметры у стрессированных животных тех же групп.

Как следует из данных, представленных на рис. I, как высокоактивные, так и низкоактивные животные после хронического стресса демонстрируют примерно одинаковую "депрессию поведения" в "открытом поле". Однако, если у низкоактивных крыс субхроническое применение диазепама не приводит к эффектам, отличающимся от эффекта плацебо (группа H_2O), то у высокоактивных животных данные препараты приводят к достоверному улучшению поведенческих характеристик. Следует отметить, что пираретам в отличие от диазепама оказался весьма высокоактивным соединением при коррекции "депрессии поведения" у животных обеих групп.

Вместе с тем анализ характеристик специфического связывания ^3H -флунизепамом с синаптическими мембранами головного мозга этих же крыс выявил существенные различия во влиянии пираретама и диазепама у животных различных этологических групп. У низкоактивных крыс, для которых не выявлена эффективность применения диазепама и пираретама, субхроническое применение диазепама приводит к дальнейшему уменьшению концентрации мест специфического связывания ^3H -флунизепамом. В то же время у высокоактивных животных, для которых субхро-

ническое применение пирцетама и диазепама после хронического психогенного стресса оказывается эффективным, характеристики специфического связывания ^3H -флунизтазепама после применения данных препаратов достоверно не отличаются от контрольных (табл. 5). Можно предположить, что эффективность применения пирцетама и диазепама у данных животных зависит от реакции бензодиазепиновых рецепторов на лекарственное воздействие. У высокоактивных животных, не отвечающих редукцией бензодиазепиновых рецепторов при применении диазепама после хронического стресса, данный препарат оказывается эффективным наряду с пирцетамом для коррекции поведенческих нарушений при стрессе.

Таким образом, анксиолитический эффект пирцетама и производного оксипиридина соединения ОП-I, по нашему мнению, обусловлен взаимодействием с одним из компонентов ГАМК-бензодиазепинового комплекса. Вероятнее всего этот компонент не является участком бензодиазепинового или ГАМК-рецепторов. Хроническое и субхроническое применение пирцетама и его аналога не вызывает изменений бензодиазепиновых рецепторов головного мозга ни у нормальных, ни у стрессированных крыс по сравнению с контрольными животными. Тем не менее характеристики этих рецепторов при субхроническом применении пирцетама у стрессированных животных различных этологических групп достоверно отличаются от группы плацебо.

В ы в о д ы

1. Пирцетам в концентрации 10^{-6}M проявляет себя как неконкурентный ингибитор специфического связывания ^3H -имипрамина с мембранами мозга крыс, понижая концентрацию этих мест связывания.

2. В концентрации 10^{-4}M пирцетам уменьшает аффинность ^3H -флунизтазепама к промытым мембранам гиппокампа крысы, одновременно увеличивая концентрацию мест связывания; этот эффект наблюдается лишь в присутствии ГАМК.

3. В тесте конфликтной ситуации бензодиазепиновый антагонист Ro 15-1788 не обращает анксиолитического действия пирцетама, ноотропного соединения ОП-I и мебикара.

4. Не изменяя характеристик бензодиазепиновых рецепторов головного мозга крыс при хроническом применении в сравнении с интактным контролем, пирцетам, в отличие от диазепама, нормализует свойства рецепторов, что совпадает с улучшением поведенческих характеристик стрессированных животных.

Таблица 1

Влияние пираретама на специфическое связывание
³H-имипрамина мембранами мозга крысы

Исследуемые характеристики	Добавление соединения	
	H ₂ O	Пираретам (10 ⁻⁶ М)
K _д , нМ	2,7 ± 0,4	1,9 ± 0,5
V _{маx} , фмоль/мг белка	529 ± 12	413 ± 27*

Приведены значения (M ± m) констант диссоциации (K_д) и концентрации (V_{маx}) мест специфического связывания по результатам 3-х независимых определений. Каждая кривая в координатах Скэтчарда построена по 6 точкам, каждая точка - в трех повторностях. (*) - P ≤ 0,05 по t-критерию Стьюдента.

Таблица 2

Влияние пираретама и других соединений на специфическое связывание
³H-флуниотразапама мембранами гиппокампа крыс

Добавленное соединение, концентрация, число опытов (n)	Характеристики специфического связывания			
	В отсутствие ГАМК		В присутствии 10 ⁻⁵ М ГАМК	
	K _д	V _{маx}	K _д	V _{маx}
Без добавок n = 6	1,52 ± 0,04	1,52 ± 0,01	0,89 ± 0,05	1,52 ± 0,09
Пираретам 10 ⁻⁴ М, n = 3	1,48 ± 0,02	1,62 ± 0,07	1,08 ± 0,01 ^{*,00}	1,84 ± 0,08
Соединение ОН-1, 10 ⁻⁵ М n = 3	1,48 ± 0,02	1,60 ± 0,05	0,99 ± 0,02 ^{*,00}	1,72 ± 0,05
Мебикар, 10 ⁻⁵ М n = 3	1,48 ± 0,08	1,60 ± 0,07	0,99 ± 0,04 ^{*,00}	1,50 ± 0,07
Лонетил, 10 ⁻⁵ М n = 4	1,87 ± 0,12*	1,51 ± 0,03	1,60 ± 0,10 ^{*,00}	1,58 ± 0,06

K_д - нМ, V_{маx} - фмоль/мг белка. (*) - P ≤ 0,05; по сравнению с контролем; (о), (оо) - P ≤ 0,05 и 0,01 по сравнению с соответствующим значением без ГАМК. Остальные обозначения см. по табл. 1.

Таблица 3

Действие пираретама и некоторых других соединений на поведение крыс в конфликтной ситуации

Соединение, доза, мг/кг	Количество полученных электрических ударов (взятой воды) за 3 мин наблюдения			
	Без	Ro-15	I788	C Ro-15 I788
H ₂ O		2,9±0,6		2,8±0,06
Диазепам, I		15,4±1,4		2,3±0,5
Лонетил, 100		12,5±0,7		13,4±1,2**
Пираретам, 300		5,5±0,7*		6,2±0,6*
M-22, 300		5,8±0,8*		5,8±5,7*
OP-I, 100		4,8±0,5*		5,4±0,6*

Приведены величины, полученные на 8-10 животных в каждой группе. (*), (**) - $P \leq 0,05$ и $0,01$ по сравнению с соответствующей группой H₂O.

Таблица 4

Влияние хронического применения пираретама и других соединений на характеристики мест специфического связывания ³H-флунизтазепам с мембранами целого мозга крысы

Соединение	Продолжительность введения, доза (мг/кг в день)	Характеристики специфического связывания в % к группе "H ₂ O"	
		K _d	V _{max}
H ₂ O	15 дней	100± 6	100± 8
Диазепам	15 дней, (I)	97± 9	67± 11*
Лонетил	15 дней, (100)	102± 10	104± 9
H ₂ O	21 день	100± 9	100± 11
Пираретам	21 день, (300)	107± 12	112± 11
OM-22	21 день, (300)	99± 10	93± 8

Приведены M ± m по результатам 3-х экспериментов. Абсолютные значения величин - см. табл. 2. (*) - $P \leq 0,05$ по сравнению с группой H₂O.

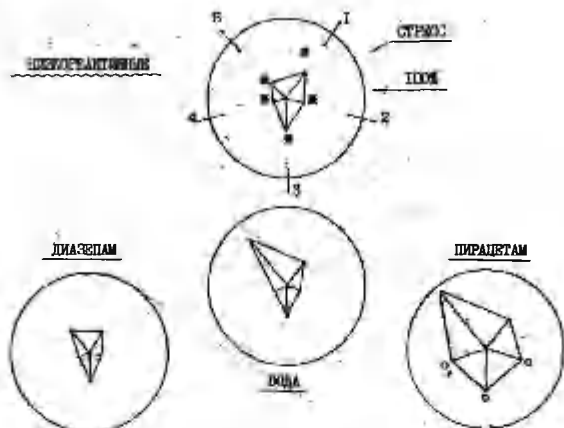
Таблица 5

Влияние хронического стресса и последующего применения диазепама и пирацетама на характеристики специфического связывания ^3H -флунизепема мембранами мозга крыс

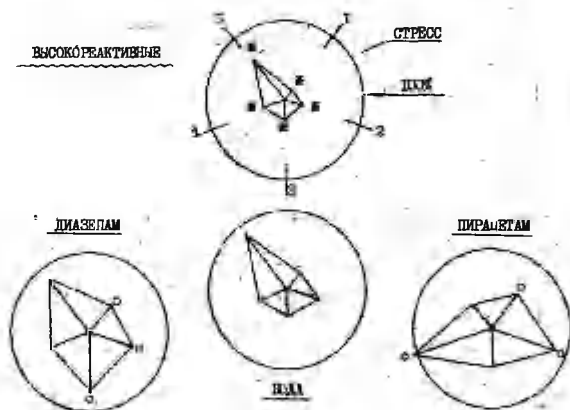
№	Группы животных	Высокоактивные		Низкоактивные	
		Характеристики специфического связывания ^3H -ФЛУ			
		K_d	B_{max}	K_d	B_{max}
1	Контроль	$2,0 \pm 0,2$	1438 ± 145	$1,8 \pm 0,1$	1340 ± 96
2	Стресс 15 дн.	$1,4 \pm 0,1$ (II)	858 ± 67 (I)	$1,3 \pm 0,1$ (I)	980 ± 36 (I)
3	Стресс + H_2O	$1,1 \pm 0,1$ (I)	950 ± 85 (I)	$1,0 \pm 0,1$ (I)	998 ± 20 (I)
4	Стресс + диазепам	$2,5 \pm 0,2$ (2), (3)	1348 ± 101 (2), (3)	$1,7 \pm 0,1$	515 ± 17 (2), (3)
5	Стресс + пирацетам	$1,7 \pm 0,1$ (I)	1006 ± 17 (I), (2)	$1,4 \pm 0,1$ (3)	1240 ± 106

Приведены величины $M \pm m$ констант диссоциации (нМ) и концентрации (B_{max} , фмоль/мг) мест специфического связывания. В скобках указаны номера групп, показатели в которых достоверно отличаются от рассматриваемых.

СРЕДНЕСТАБИЛЬНЫЕ



ВЫСОКОРЕАКТИВНЫЕ



Влияние хронического психогенного стресса в последующем применении диагепам и пиратепам на поведение крыс различных этологических групп в тесте "открытое поле".

Приведены относительные значения различных видов активности по отношению к интактичному контролю (окружности). Радиус круга представляет собой следующие виды активности:

- 1 - исследовательская
- 2 - вертикальная
- 3 - горизонтальная
- 4 - заходы в центральные зоны
- 5 - количество дефекации

Пассивные и активные животные соответствуют низко- и высокоактивным животным в модифицированном тесте Поросата.

(и) - показатели достоверно ($P \leq 0,05$) отличаются от контроля;

(0) - показатели достоверно ($P \leq 0,05$) отличаются от группы $n_{12}0^*$.

Использованная литература

1. Гарибова Т.Д., Рожанец В.В., Рахманкулова И.Х. и др. Поведенческие и радиорецепторные исследования пираретама// Механизмы действия и клиника производных гамма-аминомасляной кислоты. - Тарту, 1984. - С. 79-88.

2. Данчев Н.Д., Рожанец В.В., Вальдман А.В. Влияние хронического психогенного стресса на ряд поведенческих и нейрохимических характеристик крыс//Бюл. exper. биол. - 1986. - № 2.

3. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О.Н., Асланов Х.А. Связывание гамма-аминомасляной кислоты с синаптическими мембранами мозга крыс//Укр. биохим. журнал. - 1982. - Т. 54, № 4. - С. 428-431.

4. Воронина Т.А., Вихляев Ю.И., Неробкова Л.Н. и др. Характеристика фармакологических свойств феназепам//Феназепам. - Киев: Наукова думка, 1982. - Гл. III. - С. 87-169.

5. Кампов-Полевой А.Б. Изучение особенностей формирования алкогольной мотивации у крыс//Фармакология экспериментального алкоголизма. - М., 1982. - С. 130-135.

6. Островская Р.У., Молодавкин Г.М., Трофимов С.С. и др. Нейрофармакологические свойства производных пираретама. - Бюл. exper. биол. - 1982. - Т. 94, № 12. - С. 62-65.

7. Рожанец В.В., Русаков Д.Ю., Данчев Н.Д., Вальдман А.В. Влияние хронического применения антидепрессантов на состояние бензодиазепиновых рецепторов головного мозга мыши// Бюл. exper. биол. - 1983. - Т. 7, - С. 46-48.

8. Рожанец В.В., Русаков Д.Ю., Тарасова Е.В., Вальдман А.В. Влияние хронического введения антидепрессантов на связывание ³H-имипрамина с синаптическими мембранами головного мозга мыши//Бюл. exper. биол. - 1983. - Т. 12. - С. 89-90.

9. Хоничева Н.М., Данчев Н.Д. Проявление пассивности у крыс: влияние транквилизаторов и антидепрессантов//Журн. высшей нервной деятельности. - 1985. - Т. 35, № 2. - С. 339-347.

10. Fannelli R.G., McNamara J.O. Kindled seizures result in decreased responsiveness of benzodiazepine receptors to GABA//J. Pharmacol. Exptl. Pharmaceutics. - 1983. - Vol. 226, N 1. - P. 147-150.

11. Paul S.M., Marangos P.J., Goodwin F.K., Skolnick P. Specific benzodiazepine receptors and putative endogenous benzodiazepine-like compounds//Biological Psychiatry. - 1980. - Vol. 15, N 3. - P. 407-428.

THE ROLE OF RAT BRAIN RECEPTORS IN THE MANIFESTATION
OF PIRACETAM ANXIOLYTIC ACTION

A.V.Valdman, V.V.Rozhanets, K.K.Chakhbra, R.A.Akhundev

S u m m a r y

The mechanism of anxiolytic action of piracetam in vitro was studied. It was shown that piracetam may act as a noncompetitive inhibitor of ^3H -imipramine specific binding as well as a competitive inhibitor of ^3H -flunitrazepam specific binding only in the presence of GABA.

Subsequently, Ro-15-1788 does not reverse the anxiolytic effects of piracetam and other substances which cannot interact directly with benzodiazepine receptors.

Repeated administration of piracetam, in contrast to diazepam, does not lead to any changes in rat brain benzodiazepine receptors in normal and stressed animals. Piracetam significantly improves the behavioural characteristics in animals belonging to groups of low and high activity. Repeated diazepam administration leads to a decrease in the number of benzodiazepine receptors in normal and in stressed rats with low activity. In highly active rats subchronic diazepam administration after stress does not reduce the number of BDR which correlates with behavioural improvement in this group caused by diazepam.

УЧАСТИЕ ДОФАМИНОВЫХ, ОПИАТНЫХ И БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ
РЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ЦЕРУЛЕИНА, АНАЛОГА
ОКТАПЕПТИДА ХОЛЕЦИСТОКИНИНА

Э.Э. Васар, А.Х. Соосаар, А.Э. Ланг

Лаборатория психофармакологии Института общей и молекулярной
патологии

Октапептид холецистокинина (ХЦК-8) является наиболее распространенным нейропептидом в головном мозге /3/. Весьма существенные концентрации ХЦК-8 обнаружены как в коре больших полушарий, так и в подкорковых структурах переднего мозга /7/. Именно значительная распространенность ХЦК-8 в мозге обуславливает его участие в регуляции различных функций мозга. Системное введение ХЦК-8 и его близкого аналога церулеина в малых дозах приводит к подавлению пищевого поведения и феномена электрической самостимуляции мозга у подопытных животных /17/. ХЦК-8 и церулеин оказывают также гипотермическое действие и угнетают ориентировочно-исследовательскую активность животных /16/. В дозе 40 мкг/кг и больше церулеин и ХЦК-8 обладают антиноцицептивным действием /17/ и антагонизируют электроболовую агрессивность мышей. Более высокие дозы нужны для подавления судорог, вызванных пикротоксином, тиосемикарбазидом и электрошоком /17/. Установлено также, что существуют тесные морфофункциональные связи между ХЦК-8, дофамином, ГАМК и энкефалинами в структурах переднего мозга /3/, хотя показано, что ХЦК-8 и церулеин в наномолярных концентрациях взаимодействуют с ХЦК-8-рецепторами мозга /6/. Механизмы многих поведенческих эффектов ХЦК-8 и церулеина остаются до сих пор малоизвестными и требуют подробного нейрофармакологического исследования. Целью настоящей работы было изучение участия дофаминовых, опиатных и бензодиазепиновых рецепторов в реализации трех основных поведенческих (седативного, антиагрессивного и противосудорожного) эффектов церулеина, высокоаффинного аналога ХЦК-8.

Методика

Все поведенческие и биохимические исследования были проведены на мышах самцах весом 25-30 г., разделенных на группы по I0-I2 животных в каждой. Седативный эффект церулеина (*Farnitalia Carlo Erba*, Италия) был исследован у сгруппированных животных (I0-I2 мышей в группе) по методике "открытого поля". Животных помещали сразу после введения церулеина (2-50 мкг/кг) в центр "открытого поля" (размеры 100x100x40 см). С помощью 5 независимых фотоэлектрических каналов регистрировали в течение 30 мин количество импульсов, отражающих общую двигательную активность группы мышей. Исследовали также влияние антагониста ХПК-8 рецепторов проглумида (*Rotta Pharmaceutici*, Италия) на седативное действие церулеина, причем проглумид (5-50 мг/кг) вводили за 10 мин до введения церулеина. В отдельной серии опытов оценивали действие длительного введения галоперидола и внутрижелудочкового введения каиновой кислоты и 6-оксидофамина на седативный эффект церулеина. Галоперидол вводили в дозе 0,25 мг/кг два раза в день на протяжении 15 дней. Через 48-72 часа после последней его инъекции определяли действие церулеина. Каиновую кислоту (1 мкг) и 6-оксидофамин (60 мкг) вводили с помощью микроинъектора в боковые желудочки мозга под эфирным наркозом и спустя 7-8 дней после операции определяли действие церулеина на поведение мышей в "открытом поле". Все эти опыты повторялись 3-4 раза, а затем вычисляли средние показатели для всех групп.

Антиагрессивное действие церулеина исследовали по методике электроболевого раздражения. Через 20 мин после введения церулеина (2-100 мкг/кг) пара мышей помещались в камеру электроболевого раздражения, где животные в течение 20 мин получали 48 электрических ударов напряжением 40 вольт. Параметром интенсивности агрессивного поведения служило число агрессивных контактов между мышами. Определяли влияние проглумида (5-50 мг/кг), опийного антагониста налоксона (0,5 и 2,5 мг/кг) и бензодиазепиновых антагонистов CGS 8216 (5 мг/кг) и Ro 15-1788 (5 мг/кг) на антиагрессивное действие 40 мкг/кг церулеина. Все эти вещества были введены за 10 мин до введения церулеина. Оценивали также антиагрессивное действие церулеина на фоне измененной активности дофаминергической системы после длительного применения галоперидола (0,25 мг/кг два раза в день на протяжении 15 дней) и внутрижелудоч-

чкового введения 6-оксидофамина (60 мкг).

Противосудорожное действие церулеина исследовали в модели пикротоксиновых судорог. Церулеин (50-500 мкг/кг) вводили за 10 мин до введения пикротоксина (10 мг/кг). Определяли латентное время проявления тонических судорог. Влияние церулеина (125 мкг) на пикротоксиновые судороги исследовали также на фоне проглумида (5-25 мг/кг), Ro 15-1788 (10 мг/кг) и CGS 8216 (1 и 10 мг/кг). Потенциальное изменение противосудорожного действия церулеина было исследовано также после длительного, 15-дневного применения галоперидола и внутрижелудочкового введения 6-оксидофамина.

Параллельно с поведенческими опытами изучали влияние церулеина на связывание ^3H -диэтиламида лизергиновой кислоты (^3H -ДЛК, удельная активность 12 Ки/ммоль, ^3H -налоксона (удельная активность 57 Ки/ммоль) и ^3H -флунизтразапама (удельная активность 84 Ки/ммоль). В исследованиях *in vivo* по методике, разработанной нами [2, 14], церулеин (1-500 мкг/кг) во всех случаях вводили подкожно за 10 мин до введения меченых лигандов. Для определения специфического связывания ^3H -ДЛК (100 мКи/кг) части животных вводили 100 мкг/кг N -пропиднорапоморфина, специфическое связывание ^3H -налоксона (100 мКи/кг) определяли с помощью 10 мг/кг налоксона и ^3H -флунизтразапама (60 мКи/кг) с помощью 10 мг/кг диазапама. Через 20 мин после введения меченых лигандов животных декапитировали и уровень радиоактивности в переднем мозге мышей определяли с помощью бета-счетчика LC-6800 (Beckman, США). Все данные поведенческих и биохимических исследований подвергались статистической обработке с использованием t -теста Стьюдента.

Результаты исследования

Системное введение церулеина оказывало доза-зависимое угнетающее влияние на двигательную активность мышей (табл. I). Уже после введения 2 мкг/кг церулеина наблюдалось достоверное уменьшение ориентировочно-исследовательской активности мышей. Антагонист ХЦК-8-рецепторов проглумид (5-50 мг/кг) не влиял на ингибирующее воздействие церулеина. Длительное применение галоперидола несколько уменьшало спонтанную двигательную активность мышей, однако, приводило к заметному ослаблению седативного действия церулеина. Внутрижелудочковое введение 6-оксидофамина вызывало достоверное понижение ориентировочно-исследовательской активности мышей, но суще-

ственно не изменяло действия церулеина (табл. I). Внутривенное введение каиновой кислоты приводило по сравнению с длительным применением галоперидола к еще более значительному ослаблению седативного эффекта церулеина.

Церулеин оказывал при системном введении заметное антиагрессивное действие (табл. 2), однако, по сравнению с седативным действием в более высоких дозах. Проглумид в дозе 5 мг/кг ослаблял эффект церулеина, но в дозе 25 мг/кг полностью антагонизировал и даже усиливало интенсивность агрессивного поведения. Опийный антагонист налоксон (0,5 и 2,5 мг/кг) оказывал также антагонистическое влияние на антиагрессивный эффект церулеина. Бензодиазепиновые антагонисты Ro 15-1788 и CGS 8216 (5 мг/кг) не изменяли поведенческого эффекта церулеина. Длительное введение галоперидола (табл. 2) несколько понижало фоновую агрессивность у мышей, но полностью извращало действие церулеина. Внутривенное введение 6-оксидофамина, наоборот, повышало интенсивность драк между животными и в то же время усиливало антиагрессивное действие церулеина.

Действие против пикротоксиновых судорог стало очевидным после введения 125 мкг/кг церулеина. Дальнейшее повышение дозы существенно не изменяло влияния церулеина (табл. 3). Доза 5 мг/кг проглумида усиливала, в то время как доза 25 мг/кг несколько ингибировала противосудорожный эффект церулеина. Бензодиазепиновый антагонист Ro 15-1788 также несколько потенцировал действие церулеина, но другой антагонист - CGS 8216 (I и IO мг/кг) - устранял угнетающее влияние церулеина на пикротоксиновые судороги. Длительное введение галоперидола, подобно проглумиду, ослабляло эффект церулеина (табл. 3). Внутривенное введение 6-оксидофамина существенным образом повышало чувствительность животных к пикротоксиновым судорогам. Введение церулеина (125 мкг/кг) доводило чувствительность мышей к пикротоксину до уровня контрольных животных.

Сравнительное изучение влияния церулеина на связывание радиолигандов в опытах *in vivo* свидетельствовало о том, что церулеин в наименьших дозах угнетал связывание ^3H -ДЛК (рис.), причем эти дозы были сходными с дозами, которые оказывали седативное действие на мышей. В дозах, угнетающих агрессивное поведение, церулеин достоверно ингибировал связывание ^3H -налоксона. Только высокие дозы церулеина, угнетающие пикротоксиновые судороги, оказывали ингибирующее влияние на связывание ^3H -флунитразепама (рис.).

Обсуждение результатов

Проведенный нейрофармакологический анализ свидетельствует о том, что поведенческие эффекты церулеина имеют неодинаковую нейрохимическую природу. Многие авторы придерживаются мнения, что седативное действие ХЦК-8 и церулеина реализуется через афферентные связи блуждающего нерва /4, 10/. Однако данные настоящего исследования демонстрируют также вовлеченность определенных мозговых механизмов в реализацию этого поведенческого эффекта церулеина. В пользу этого мнения свидетельствует тот факт, что проглумид — более сильный антагонист периферических ХЦК-8-рецепторов, чем центральных /11/ — не изменяет тормозного влияния церулеина на двигательную активность животных. Ослабление ингибирующего влияния церулеина после длительного введения галоперидола говорит о роли определенных дофаминергических механизмов в действии церулеина. Разрушение дофаминергических терминалей с помощью 6-оксидофамина не изменяет чувствительности дофаминергических механизмов к церулеину. Существует также корреляция между седативным действием и ингибирующим влиянием церулеина на связывание ^3H -ДЛК в опытах *in vivo* в переднем мозге мышей. Имеются данные, что ХЦК-8 усиливает высвобождение дофамина из дофаминергических терминалей /13/. Этот механизм, по всей вероятности, лежит в основе угнетения церулеином, близким аналогом ХЦК-8, связывания ^3H -ДЛК с дофаминовыми рецепторами. Внутривенное введение каиновой кислоты, подобно длительному применению галоперидола, ослабляет тормозящее влияние церулеина на поведение мышей. Известно, что под влиянием каиновой кислоты разрушаются дофамин $_2$ -рецепторы, локализованные на вставочных нейронах подкорковых структур переднего мозга /12/ и имеющих высокую аффинность не только к нейролептикам, а также к дофаминовым агонистам /5/. О вовлеченности этих дофаминовых рецепторов в действие церулеина свидетельствуют также наши предыдущие исследования /2, 14/, в ходе которых было выявлено, что 14-дневное введение галоперидола понижает именно плотность высокоаффинных дофамин $_2$ -рецепторов и извращает ингибирующее влияние церулеина на связывание ^3H -спироперидола в переднем мозге мышей в опытах *in vivo*. В отличие от седативного эффекта антиагрессивное действие церулеина коррелирует с угнетением связывания ^3H -налоксона с опиатными рецепторами в опытах *in vivo*. Опиатный антагонист налоксон полностью устраняет антиагрессивное дей-

Таблица I

Влияние однократного введения проглумида, внутримышечного введения б-оксидофамин и каиновой кислоты и длительного введения галоперидола на седативное действие церулеина

Вещество/доза	Физ. раствор	Галоперидол	б-оксидофамин	Каиновая кислота	Число импульсов в течение 30 мин				
					1130 ± 120	980 ± 82	868 ± 70	1085 ± 96	
Церулеин 2 мкг/кг	780 ± 68 ^x	880 ± 78	650 ± 56	1226 ± 108					
10 мкг/кг	560 ± 44 ^x	-	-	-	-	-	-	-	-
20 мкг/кг	324 ± 28 ^{xxx}	520 ± 46 ^{xx}	310 ± 36 ^{xxx}	640 ± 52 ^x					
50 мкг/кг	234 ± 32 ^{xxx}	-	-	-					
Проглумид 5 мг/кг + церулеин 10 мкг/кг	440 ± 38 ^{xx}	-	-	-					
Проглумид 25 мг/кг + церулеин 10 мкг/кг	510 ± 46 ^{xx}	-	-	-					
Проглумид 50 мг/кг + церулеин 10 мкг/кг	520 ± 74 ^{xx}	-	-	-					

x - $p \leq 0,05$; xx - $p \leq 0,02$; xxx - $p \leq 0,01$ (по сравнению с однократным введением физ. раствора)
 Примечание: Дыхательная активность животных, которым физический раствор вводился в боковую
 желудочек мозга, не отличалась от дыхательной активности мышей, получавших в течение
 15 дней физ. раствор подкожно.

Таблица 2

Влияние однократного введения проглумида, налоксона, ссз 8216 и Ро 15-1788, внутримышечного введения денция б-оксидофамина и длительного применения галоперидола на антиагрессивное действие церулеина

Вещество, доза	Физиологический раствор	Галоперидол	б-оксидофамин
Число агрессивных контактов в течение 2 мин			
Физ. раствор	12,6 ± 1,41	8,6 ± 0,93	21,6 ± 2,42
Церулеин 2 мг/кг	13,8 ± 1,78	-	-
20 мг/кг	8,2 ± 1,28 ^x	-	-
40 мг/кг	3,2 ± 0,90 ^{xx}	21,9 ± 2,99 ^{xx}	1,0 ± 0,42 ^{xxx}
100 мг/кг	0,2 ± 0,10 ^{xxx}	-	-
Проглумид 5 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	8,8 ± 2,30 ^x	-	-
Проглумид 25 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	18,0 ± 2,82 ^x	-	-
Проглумид 50 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	7,4 ± 2,8 ^x	-	-
Налоксон 0,5 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	23,4 ± 2,18 ^{xx}	-	-
Надроксон 2,5 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	21,4 ± 2,33 ^{xx}	-	-
Ро 15-1788 5 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	3,8 ± 0,88 ^{xx}	-	-
8216 5 мг/кг + церулеин 40 мг/кг	3,0 ± 0,72 ^{xx}	-	-

x - p ≤ 0,05;

xx - p ≤ 0,02;

xxx - p ≤ 0,01; См. также примечание к табл. I.

Таблица 3

Влияние однократного введения проглумида, Ro 15-1788 и cgs 8216, внутримедуллярного введения б-оксидафина и длительного введения галперидола на противосудорожное действие церулеина

Вещество, доза	Физиологический раствор		
	Галперидол	6-оксидофин	
	Латентное время тошечных судорог в мин		
Физ. раствор	13,7 ± 1,3	13,6 ± 1,4	8,2 ± 0,93
Церулеин 50 мг/кг	16,3 ± 1,7	-	-
125 мг/кг	20,2 ± 1,6 ^{xx}	17,4 ± 1,8 ^x	13,3 ± 0,85 ^{xx}
250 мг/кг	20,5 ± 1,8 ^{xx}	-	-
500 мг/кг	20,9 ± 2,0 ^{xx}	-	-
Проглумид 5 мг/кг + церулеин 125 мг/кг	21,8 ± 2,1	-	-
Проглумид 25 мг/кг + церулеин 125 мг/кг	17,7 ± 1,4 ^x	-	-
cgs 8216 1 мг/кг + церулеин 125 мг/кг	15,9 ± 1,6	-	-
cgs 8216 10 мг/кг + церулеин 125 мг/кг	15,9 ± 1,2	-	-
Ro 15-1788 10 мг/кг + церулеин 125 мг/кг	22,3 ± 1,6 ^{xxx}	-	-

x - p ≤ 0,05;

xx - p ≤ 0,02;

xxx - p ≤ 0,01.

См. также примечание к табл. I.

ствие церулеина. Установлено, что введение ХЦК-8 и церулеина в околоводопроводное серое вещество оказывает сильное анальгетическое действие, устраняемое налоксоном /8/. Известны также данные, что системное введение церулеина повышает содержание бета-эндорфина в спинномозговой жидкости и крови /17/. Хотя антагонист ХЦК-8-рецепторов проглумид усиливает морфиновую анальгезию /15/, в наших опытах проглумид, подобно опиатному антагонисту налоксону, устранял антиагрессивное действие церулеина. На основе этих данных можно полагать, что именно усиление высвобождения эндопептидов в ЦНС находится в основе антиагрессивного действия церулеина. Однако антиагрессивное действие церулеина зависит и от изменения чувствительности дофаминовых рецепторов. Длительное введение галоперидола не только ослабляет, а даже извращает антиагрессивный эффект церулеина, в то время как разрушение дофаминергических терминалей с помощью 6-оксидофамина даже усиливает действие церулеина. По всей вероятности, изменение баланса между дофамин- и эндопептидергическими процессами находится в основе антиагрессивного действия церулеина.

По имеющимся данным, ХЦК-8 и церулеин угнетают пикротоксиновые судороги как после системного, так и после внутримозгового введения /9, 17/. Бензодиазепиновый антагонист CGS 8216, у которого преобладают свойства обратного агониста, полностью устранял противосудорожный эффект церулеина, в то время как другой антагонист - Ro 15-1788 со слабыми агонистическими свойствами - даже несколько потенцировал действие церулеина. Проглумид - антагонист ХЦК-8-рецепторов - является слабым антагонистом противосудорожного действия церулеина. Учитывая действие церулеина против пикротоксиновых судорог, а также факт, что церулеин в относительно низких дозах потенцирует гексобарбиталовый сон /17/, можно полагать, что одна часть ХЦК-8-рецепторов тесно взаимодействует с ионофором хлора. По-видимому, через эти рецепторы и реализуется противосудорожное и ингибирующее влияние церулеина на связывание ³H-флунизепема с бензодиазепиновыми рецепторами в опытах *in vivo*. Разрушение дофаминергических терминалей с помощью 6-оксидофамина значительным образом повышает чувствительность мышей к пикротоксиновым судорогам, но не противодействует эффекту церулеина. Однако длительное применение галоперидола ослабляет и противосудорожное действие церулеина. Этот факт свидетельствует о том, что длительное применение галоперидола оказывает в отличие от антагониста ХЦК-8-

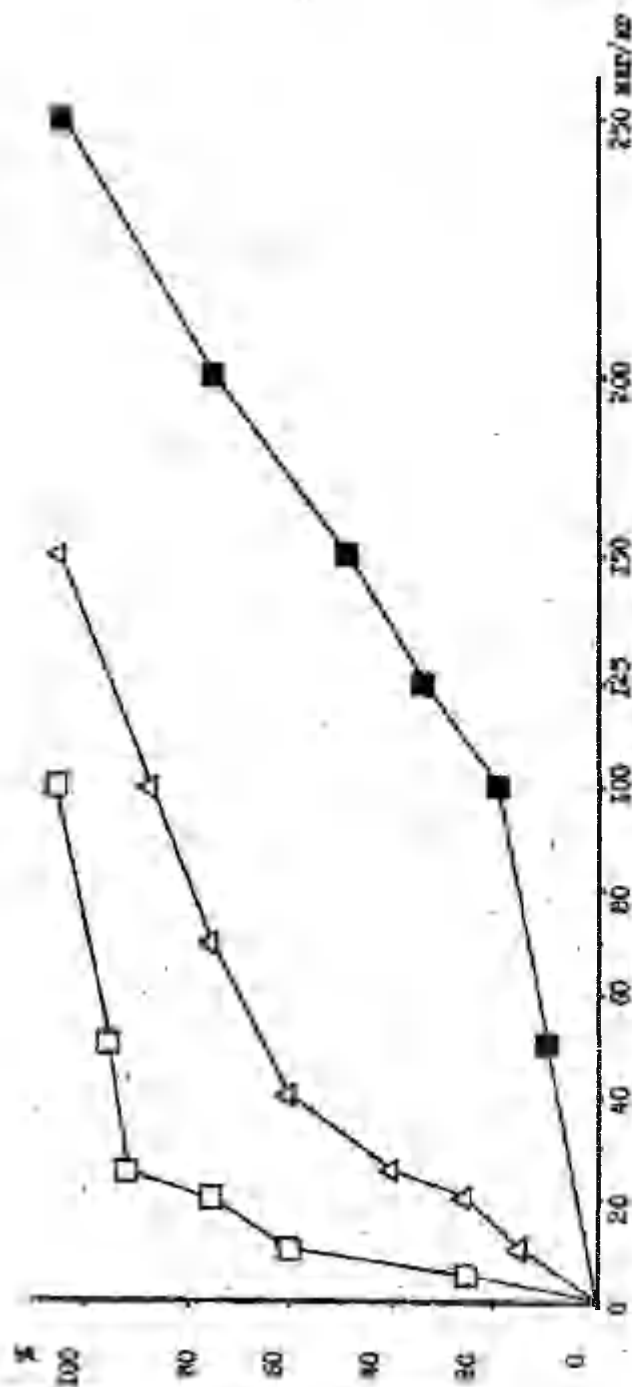


Рис. Влияние количества введенного раствора разных доз перманганата калия на содержание 2,4-ДНФ, 2,4-дихлорфенола и 2,4-дихлорфенола в опилках до 150 мин. в перманганатном растворе.

По оси абсцисс: % калийного перманганата в опилках. По оси ординат: доз перманганата мг/кг. —□— содержание перманганата в опилках. —△— содержание перманганата в опилках. —■— содержание перманганата в опилках.

-рецепторов проглумида одинаковое влияние на все функциональные популяции ХЦК-8-рецепторов.

Таким образом, различные поведенческие эффекты церулеина реализуются через неодинаковые нейрохимические механизмы. В седативном действии церулеина ведущее значение имеет понижение чувствительности высокоаффинных дофамин₂-рецепторов. Антиагрессивное действие церулеина связано с изменением баланса между дофамин- и эндопиоидергическими механизмами в сторону преобладания последних, в то время как действие церулеина против пикротоксиновых судорог обусловлено взаимодействием церулеина с ионофором хлора. Одинаковое влияние на все функциональные подтипы ХЦК-8-рецепторов оказывает длительное применение типичного нейролептика галоперидола. На основе этих данных можно полагать, что галоперидол не только изменяет при длительном введении чувствительность моноаминергических рецепторов /I/, но и понижает чувствительность определенных ХЦК-8-рецепторов, ответственных за реализацию эффектов церулеина при системном введении.

Выводы

1. Понижение чувствительности высокоаффинных дофамин₂-рецепторов лежит в основе седативного действия церулеина.
2. Антиагрессивное действие церулеина связано с изменением баланса между дофамин- и эндопиоидергическими механизмами в сторону преобладания последних.
3. Действие церулеина против пикротоксиновых судорог обусловлено взаимодействием церулеина с ионофором хлора.
4. Различные подтипы холецистокининовых рецепторов, имеющих неодинаковую связь с другими нейромедиаторными системами и участвующих в регуляции различных форм поведения, находятся в переднем мозге мышей.

Использованная литература

1. Алликметс Л.Х., Жарковский А.М., Нурк А.М. и др. Влияние длительного введения нейролептиков на пластичность рецепторов ЦНС // Вест. АМН СССР. - 1984. - № II. - С. 37-42.
2. Васар Э.Э., Нурк А.М., Майметс М.О., Алликметс Л.Х. Стимуляция церулеином - аналогом октапептида холецистоки-

- нина - связывания ^3H -спироперидола после длительного введения нейролептиков//Бюл. exper. биол. мед. - 1985. - № 1. - С. 72-74.
3. Beinfeld M.C. Cholecystokinin in the central nervous system: a minireview//Neuroleptides. - 1983. - Vol. 3. - P. 411-427.
 4. Crawley J.N., Schwaber J.S. Nucleus tractus solitarius lesions block the behavioral actions of cholecystokinin//Peptides. - 1983. - Vol. 4. - P. 743-747.
 5. Creese I., Leff S.E. Dopamine receptors: A classification//J.Clin.Psychopharmacol. - 1982. - Vol. 2. - P.329-335.
 6. Fujimoto M., Igano K., Watanabe K., Irie I., Inouye K., Okabayashi T. Effects of caerulein-related peptides on cholecystokinin receptor bindings in brain and pancreas//Biochem.Pharmacol. - 1985. - Vol. 34. - P. 1103-1107.
 7. Innis R.B., Correa F.M.A., Uhl G., Schneider B., Snyder S.H. Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity: Histochemical localization in rat brain//Proc.Nat.Acad. Sci. USA. - 1979. - Vol. 76. - P. 521-525.
 8. Jurna I., Zetler G. Antinociceptive effect of centrally administered caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8)//Europ.J.Pharmacol. - 1981. - Vol. 73. - P. 323-331.
 9. Kadar T., Pesti A., Penke B., Telegdy G. Inhibition of seizures induced by picrotoxin and electroshock by cholecystokinin octapeptide and their fragments in rats after intracerebroventricular administration//Neuropharmacol. - 1984. - Vol. 23. - P. 955-961.
 10. Kawasaki K., Kodama M., Matshushita A. Caerulein, a cholecystokinin related peptide, depresses somatic function via the vagal afferent system//Life Sci. - 1983. - Vol. 33. - P. 1045-1050.
 11. Lin C.W., Miller T. Characterization of cholecystokinin receptor sites in guinea-pig cortical membranes using ^{125}I -Bolton Hunter-Cholecystokinin octapeptide//J.Pharm. Exp. Ther. - 1985. - Vol. 232. - P. 775-780.
 12. Severson J.A., Randall P.K. Localization of ^3H -propyl-norapomorphine binding in mouse striatum//Brain Res. - 1983. - Vol. 279. - P. 295-298.

13. Starr M.S. Influence of peptides on ^3H -dopamine release from euperfused rat striatal slices//Neurochem. Int. - 1982. - Vol. 4. - P. 233-240.
14. Vasar E., Maimets M., Nurk A., Allikmets L. Caerulein stimulates ^3H -spiperone binding in vivo after long-term haloperidol administration//Psychopharmacol. Bull. - 1984. - Vol. 20. - P. 691-692.
15. Watkina L.R., Kinscheck A., Kaufman E.F.S., Miller J., Funk H., Mayer DJ-Cholecystokinin antagonists selectively potentiate analgesia induced by endogenous opiates//Brain Res. - 1985. - Vol. 327. - P. 181-190.
16. Zetler G. Central depressant effects of caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8) differ from those of diazepam and haloperidol//Neuropharmacol. - 1981. - Vol. 20. - P. 277-283.
17. Zetler G. Behavioral pharmacology of CCK and analogs//Psychopharmacol. Bull. - 1983. - Vol. 19. - P. 347-351.

THE INVOLVEMENT OF DOPAMINE, OPIATE AND BENZO-
DIAZEPINE RECEPTORS IN THE ACTION OF CAERULEIN,
AN ANALOGUE OF CHOLECYSTOKININ OCTAPEPTIDE

E. Vasar, A. Socsaar, A. Lang

S u m m a r y

Caerulein dose (2-50 μ g/kg) dependently reduced the motor activity in male mice. The reduction of motor activity was related to modulation of sensitivity of high-affinity dopamine₂-receptors by caerulein. In somewhat higher doses (over 40 μ g/kg) caerulein suppressed also the footshock-induced aggression in male mice. The antiaggressive activity of caerulein was related to decreased activity of the dopaminergic system and increased release of ~~enkephalin~~ opioid peptides. In doses 125 μ g/kg and higher caerulein decreased the intensity of picrotoxin seizures in mice. The antagonism with picrotoxin seizures was based on caerulein's interaction with chloride ionophor. The results of the present investigation demonstrate the involvement of different neurochemical mechanisms in the realization of the behavioural effects of caerulein, an agonist of CCK-8 receptors. It seems probable that different functional subpopulations of CCK-8 receptors, linked with diverse neurochemical mechanisms, are existing in the brain.

КАЛЬЦИЯ ОКСИБУТИРАТ - НОВЫЙ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

I. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

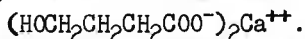
Л.Х.Аликуметс, Л.Г.Полевой, А.М.Жарковский, В.И.Гунар,

В.М.Копелевич, Л.Н.Буланова, М.Я.Оттер

Кафедра фармакологии ТГУ, НПО "Витамины", Москва

Известно, что ГАМК-ергическая система участвует в регуляции сна, мозгового кровообращения в механизмах памяти, секреции гипоталамических гормонов и т.д. /1, 2, 15/. Синтезировано большое количество препаратов - различных производных и солей ГАМК и ГОМК, обладающих транквилизирующим ноотропным (фенибут), противосудорожным (натрия вальпроат, пантогам) и антиспастическим (баклофен) действиями /1, 3, 6, 7, 10, 14/.

Ранее было показано, что ГОМК обладает снотворным и общеанестезирующим действием, а ее натриевая и литиевая соли широко используются в медицинской практике в форме инъекционных растворов /3, 5, 15/. Однако ввиду высокой гигроскопичности этих солей не были получены лекарственные препараты ГОМК для энтерального применения в форме таблеток, драже или капсул. В Научно-производственном объединении "Витамины" в 1976 году была синтезирована впервые негигроскопичная кристаллическая кальциевая соль γ -оксимасляной кислоты, из которой были приготовлены необходимые лекарственные формы для энтерального применения:



Эта соль представляет собой кристаллическое вещество, без запаха, слегка горьковатого вкуса. В его молекуле содержится около 18% кальция, что приводит к заметному изменению его свойств и фармакологических эффектов. Всасывание иона кальция из желудочно-кишечного тракта ограничено, поэтому действие препарата осуществляется за счет аниона оксимасляной кислоты.

Натрия оксibuтират обладает седативным, транквилизирующим, миорелаксирующим, общеанестезирующим, антигипоксическим и др. применяемыми в клинике эффектами. В связи с этим в изучении фармакологического спектра кальция оксibuтирата особое внимание было направлено именно на выявление степени

этих эффектов. Опыты проводились на кафедре фармакологии ТГУ в течение ряда лет (1980-1985) на разных видах лабораторных животных.

Результаты исследования

На первом этапе работы было проведено исследование общих нейрофармакологических эффектов кальция оксибутирата в сравнении с натрия оксибутиратом и фенибутом спустя 0,5-2 часа после внутрибрюшинного введения.

Двигательная активность мышей и крыс определялась по методике фотоэлектрической актометрии /4/. Выяснилось, что препарат оказывает умеренное депримирующее действие, выраженность которого зависела от дозы (табл. I). В дозах 50-100 мг/кг кальция оксибутират выраженно угнетал ориентировочно-двигательную активность подопытных животных и это действие на поведение было сильнее, чем у натрия оксибутирата.

Кальция оксибутират не оказывал миорелаксирующего действия и в дозах 25-100 мг/кг подобно натрия оксибутирату, увеличивал время удержания животных на вращающемся стержне (табл. I). Фенибут нарушал координацию моторики животных.

Для изучения влияния кальция оксибутирата на эмоциональную реактивность и агрессивность была применена методика электроболевого раздражения. Кальция оксибутират в малой дозе (25 мг/кг) не влиял на пороги для вызывания писка (эмоциональная реактивность) и агрессивности, а в дозах 50 и 100 мг/кг выраженно повышал их (табл. I). Этот транквилизирующий эффект в дозе 100 мг/кг сильнее, чем у фенибута или натрия оксибутирата. Кальция оксибутират оказывал и выраженный транквилизирующий эффект на поведение мышей в условиях конфликтной ситуации. Это проявлялось в уменьшении латентного периода и увеличении числа взятий воды (табл. I). В отличие от исследуемого препарата у натрия оксибутирата этот эффект был выражен в меньшей степени. Далее исследовалось действие кальция оксибутирата на эффекты дофаминиметика апоморфина, адрениметика фенамина, м-холиномиметика ареколина и судорожного вещества коразола (табл. 2).

Кальция оксибутират в исследованном диапазоне доз снижал интенсивность апоморфиновой (1 мг/кг) стереотипии. В дозе 100 мг/кг кальция оксибутират угнетал также апоморфиновую (1 мг/кг) агрессивность, что проявлялось в снижении числа драк и продолжительности агрессивной позы (табл. 2). Иссле-

двоем вещества кальция оксибутират, натрия оксибутират и фенбут в дозе 50 мг/кг, введенные одновременно с фенамином (15 мг/кг) в первые 2 часа после введения заметно снижали фенаминовое возбуждение мышей. Кальция оксибутират и натрия оксибутират также уменьшали групповую токсичность фенамина, снижали число погибших животных спустя 24 часа после совместного введения (табл. 2).

В дозах 25-100 мг/кг кальция оксибутират не оказывал защитных свойств при судорогах, вызванных максимальным электрошоком у мышей, и слабое противосудорожное действие отмечалось только в отношении коразоловых судорог (табл. 2). Судорожную дозу коразола титровали внутривенным введением 0,5 % раствора коразола со скоростью введения 0,01 мл/сек.

Кальция оксибутират в дозе 50 мг/кг достоверно предупреждал возникновение тонической и клонической фазы коразоловых судорог (табл. 2). Существенного влияния на ареколиновый тремор (5-8 мг/кг п/к мышам ареколина) кальция оксибутират не оказывал.

Антигипоксическое действие препарата изучалось в сравнении с фенбутом и натрия оксибутиратом по методикам гипоксической и гемической гипоксии. Было выявлено, что кальция оксибутират в дозах 100-200 мг/кг оказывал выраженное антигипоксическое действие по обоим показателям - удлинял продолжительность жизни животных в герметически закрытом пространстве, а также удлинял продолжительность жизни после натрия нитрита (табл. 4).

Влияние кальция оксибутирата на условный рефлекс пассивного избегания у мышей было определено по стандартной методике, в которой в затемненной части камеры мыши получали электрошоковое раздражение. В другой день определяли латентный период перебежки мышей и продолжительность пребывания в темной камере. В дозе 100 мг/кг препарат способствовал выработке условного рефлекса (табл. 3), что говорит о ноотропном действии.

Собственное анальгезирующее действие кальция оксибутирата слабое (табл. 3), однако, он потенцировал морфиновую анальгезию. Морфин вводился в дозе 3 мг/кг подкожно одновременно с внутривенным введением кальция оксибутирата. Вероятно, это усиление анальгезии можно интерпретировать как суммирование эффектов двух препаратов.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что в основе поведенческих эффектов и резистентности жи-

Таблица 2

Влияние исследуемых препаратов при внутривенном введении на эффекты апоморфина, фенамина и коразола у мышей

Вещество, доза мг/кг	Апоморфин I мг/кг		Фенамин мг/кг		Коразол мг/кг			
	Интенсивность стереотипии в баллах	Длительность стереотипии, сек	Число драк	Продолжительность агрессивной позы, сек	Кол-во мышей Воюга Погика до	Клонические крие судороги роги	Тонические судороги	
Контроль: физ. раотюр	3,0 ± 0,1	51 ± 10	19,2 ± 3,5	77 ± 88	40	29	31,3 ± 1,3	81,4 ± 4,5
Дальфия	2,5 ± 0,4	48 ± 8	-	-	-	-	-	-
оксипутирал	2,0 ± 0,4	66 ± 12	16,1 ± 2,4	96 ± 12	20	8 ^x	29,2 ± 2,3	85,9 ± 8,0
	2,4 ± 0,2	50 ± 6	13,4 ± 2,3 ^x	54 ± 7 ^x			39,5 ± 2,9 ^x	94,1 ± 4,8 ^x
Натрия оксипутирал	3,6 ± 0,4	50 ± 3					32,0 ± 2,3	92,4 ± 7,4
	2,4 ± 0,4	49 ± 5	17,6 ± 2,9	72 ± 12	10	3 ^x	36,7 ± 3,7	90,4 ± 8,2
100	2,5 ± 0,2	54 ± 10	14,1 ± 3,3	49 ± 10 ^x			40,6 ± 3,4	85,1 ± 11,6
фенибут			4,2 ± 1,3 ^{xx}	45 ± 11 ^x	10	5		
100			1,2 ± 0,9 ^{xx}	23 ± 10 ^{xx}				

Примечание: разница по сравнению с контролем достоверна при x - P ≤ 0,05; xx - P ≤ 0,01.

Таблица 3

Влияние кальция оксибутирата в опытах на мышах спустя 30-60 мин после внутрибрюшинного введения на условный рефлекс пассивного избегания, на болевую чувствительность и морфиновую (3 мг/кг) анальгезию. Приведены средние арифметические и стандартные ошибки к ним

Вещество, доза мг/кг	Условный рефлекс пассивного избегания		Анальгезия, единицы Хаффнера	
	Латентный период ребежки, сек	Продолжительность пребывания в темноте, сек	Время после введения вещества 30 мин	60 мин
Контроль: физ.раствор	32,3±12,7	92,6±12,7	2,6±0,2	2,9±0,4
Кальция оксибутират				
50	38,2±19,7	100,2±26,2	2,8±0,2	3,1±0,1
100	30,3±18,7	58,7±7,8 ^x	3,0±0,15	3,2±0,4
200	94,2±26,7 ^x	45,2±7,2 ^x	3,8±0,2 ^x	3,7±0,3 ^x
Морфин	3		3,9±0,2 ^x	3,5±0,0 ^x
Морфин+ + кальция окси- бутират	100		4,5±0,1 ^x	5,2±0,6 ^x

Таблица 4

Влияние в/бр введения кальция оксибутирата, натрия оксибутирата и фенибута на гипоксическую гипоксию (закрытый сосуд) и гемическую гипоксию, вызванную внутрибрюшинным введением мышам натрия нитрита (200 мг/кг). Приведены средние арифметические продолжительности жизни в минутах ± стандартные ошибки к ним

Вещество, доза мг/кг	Кол-во мышей в группе	Гемическая гипоксия	Гипоксическая гипоксия	
		Продолжительность жизни в мин.	Продолжительность жизни в сек	
Контроль: натрия нитрит	200	34	29,9 ± 1,4	Контроль 596,3±40,1
Кальция оксибутират	100	10	38,7 ± 2,5 ^x	771,8±44,8
	200	12	49,8 ± 5,4 ^x	1231,5±115 ^x
Натрия оксибутират	100	10	28,4 ± 2,8	685,0±28,5 ^x
	200	10	43,0 ± 2,3 ^x	1732,4±150,1 ^x
Фенибута гидрохлорид	100	10	48,6 ± 3,7 ^x	1154,9±99,2 ^x
	200	12	67,7 ± 5,2 ^x	1510,0±84,5 ^x

x - статистически достоверное различие по сравнению с контролем при P ≤ 0,05.

Таблица 5

Влияние кальция оксибутирата, натрия оксибутирата и фенибута спустя I час после их внутрибрюшинного введения (в мкг на грами ткани мозга) на содержание дофамина (ДА), норадреналина (НА) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в мозге белых крыс. Приведены средние арифметические и стандартные ошибки к ним

Вещество, доза мг/кг	Кол-во животных	Передний мозг		Межуточный мозг			
		ДА	НА	ГВК	ДА		
Контроль физ. раствор	20	1,95±0,09	0,41±0,04	0,08±0,02	1,20±0,02	0,56±0,03	0,06±0,07
Кальция оксибутират	50	2,04±0,10	0,56±0,03 ^x	0,24±0,05 ^x	1,55±0,07 ^x	0,88±0,07 ^x	
	100	2,28±0,07 ^x	0,51±0,03	0,27±0,04 ^x	1,58±0,05 ^x	0,76±0,07 ^x	0,24±0,03
Натрия оксибутират	100	1,82±0,10	0,42±0,06	0,11±0,03	0,72±0,19 ^x	0,52±0,2	0,15±0,06 ^x
Фенибут	100	2,58±0,20 ^x	0,30±0,16 ^x	0,19±0,03 ^x	1,64±1,18	0,68±0,18 ^x	0,07±0,04

x - разница достоверна при $P \leq 0.05$.

вотных к токсическому действию нейро- и психотропных веществ лежит их вмешательство в функционирование нейромедиаторных систем мозга /3, 5, 12/.

Нами исследовалось влияние кальция оксibuтирата на содержание и обмен катехол- и индоламинов в мозге крыс спустя 60 мин после в/бр введения веществ. Определяли содержание самих аминов - дофамина (ДА), норадреналина (НА) и серотонина (5-ОТ), а также их главных метаболитов - гомованилиновой кислоты (ГВК) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в отдельных частях мозга /13/. Результаты опытов приведены в таблицах 5 и 6.

Таблица 6

Влияние исследуемых препаратов спустя 1 час после внутрибрюшинного введения в дозе 100 мг/кг на содержание серотонина (5-ОТ) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в переднем мозге крысы. Приведены средние арифметические в мкг на грамм ткани мозга и стандартные ошибки

Вещество, доза мг/кг	Число крыс	Передний мозг	
		5-ОТ	5-ОИУК
Контроль: физ. раствор	10	0,37±0,03	0,47±0,04
Кальция оксibuтират 100	7	0,46±0,02	0,19±0,02
Натрия оксibuтират 100	7	0,37±0,04	0,37±0,04
Фенибут 100	8	0,48±0,06	0,42±0,11

Выяснено, что после внутрибрюшинного введения кальция оксibuтирата в дозе 50 мг/кг повышается содержание НА и ГВК в переднем мозге и концентрация ДА в межоточном мозге (табл. 5). В дозе 100 мг/кг кальция оксibuтират повышал также концентрацию ДА в переднем мозге на 17 % от исходного уровня. Натрия оксibuтират увеличивал концентрацию ДА и ГВК только в межоточном мозге. Фенибут в дозе 100 мг/кг увеличивал содержание изученных катехоламинов в обоих отделах мозга. Существенные сдвиги наблюдались и в катаболизме серотонина после введения кальция оксibuтирата (табл. 6): спустя 1 час после введения препарата в дозе 100 мг/кг отмечалось значительное повышение содержания серотонина, в то время как уровень его метаболита оксibuтирата понижался. Это свидетельствует о торможении метаболизма 5-ОТ. Увеличение содержания 5-ОТ наблюдалось также после введения фенибута. Натрия оксibuтират не влиял на содержание 5-ОТ и 5-ОИУК в переднем мозге крысы. Таким образом, результаты проведенных опытов показывают, что кальция оксibuтират вмешивается в обмен дофа-

мина и серотонина в головном мозге. Он увеличивает синтез и катаболизм дофамина, повышает синтез 5-ОТ, но блокирует его метаболизм в переднем мозге крысы.

Заключение

Проведенные фармакологические исследования показывают, что кальция оксибутират оказывает умеренное транквилизирующее действие: повышает пороги эмоциональных реакций, увеличивает число взятий воды у мышей в условиях конфликтной ситуации. В дозах, оказывающих транквилизирующий эффект, его действие сильнее, чем у натрия оксибутирата и фенибута. Кальция оксибутират снижает моторику, апоморфиновую стереотипию и агрессивность, фенаминовую стимуляцию моторики и групповую токсичность фенамина, антагонизирует эффектам коразола. Препарат обладает антигипоксическим действием, улучшает выработку УРПИ, подобно фенибуту и натрия оксибутирату ускоряет кругооборот дофамина. Обладает умеренным анальгезирующим и гипотермическим действием.

Использованная литература

1. Алликметс Л.Х. (ред.). Механизм действия и клиника производных гамма-аминомасляной кислоты//Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1984. - Вып. 673. - 146 с.
2. Алликметс Л.Х., Мехилане Л.С., Нурманд Л.Б., Жарковский А.М., Оттер М.Я., Ряго Л.К., Васар Э.Э. Фармакология новых ГАМК-ергических веществ//Медицинский факультет - здравоохранению: Тез. конф. - Тарту, 1980. - С.220-221.
3. Багрова Т.А. Противогипоксическое действие оксибутирата натрия//Актуальн. вопр. нейропатол. и нейрохирург. - Минск, 1977. - Вып. 9. - С. 5-10.
4. Гацуря В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. - М.: Медицина, 1974. - 143 с.
5. Закусов В.В. (ред.) Оксибутират натрия. - М.: Медицина, 1968. - 133 с.
6. Копелевич В.М., Сытинский И.А., Гунар В.И. Современный подход к созданию ноотропных средств на основе γ -аминомасляной кислоты//Хим. фарм. журн. - 1981. - № 5. - С. 27-33.

7. Лапин И.П., Хаунина Р.А. Фармакология и клиническое применение γ -аминомасляной кислоты и ее производных//Роль гамма-аминомасляной кислоты в деятельности нервной системы. - Л., 1984. - С. 101-115.
8. Нурманд Л.Б., Оттер М.Я., Васар Э.Э. Влияние некоторых структурных аналогов гамма-аминомасляной кислоты на серотонин- и дофаминергические механизмы//Фармакол. токсикол. - 1980. - Т. 43. - С. 288-291.
9. Хаунина Р.А. Зависимость между структурой и действием среди фенильных производных гамма-аминомасляной кислоты // Фармакол. токсикол. - 1968. - Т. 31, № 1. - С. 202-205.
10. Хаунина Р.А., Лапин И.П. Фенибут - новый транквилизатор//Хим. фарм. журн. - 1975. - № 12. - С. 125-127.
11. Curtis D. GABA Neurotransmitters. - New York, 1979. - P. 17-27.
12. Giurgea G., Salama M. Nootropic drugs//Prog. Neuro-psychopharmacol. - 1977. - Vol. 1. - P. 235-247.
13. Earley C.J., Leonard B.E. Isolation and assay of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxy-tryptamine and several metabolites from brain tissue using disposable Bio-Rad columns packed with sephadex G-10//J.Pharmacol.Methods.- 1978. - Vol. 1. - P. 67-79.
14. Nishizawa I. Studies on homopantothenic acid//Medical Journ. Osaka Univ. - 1984. - Vol. 35. - P. 41-50.
15. Sytinsky I.A., Soldatenkov A.T., Lajtha A. Neurochemical basis of the therapeutic effect of gamma-aminobutyric acid//Prog. Neurobiol. - 1978. - Vol. 10, N 2. - P.89-134.

A PROMISING DRUG - CALCIUM OXYBUTYRATE
I. PHARMACOLOGICAL SCREENING AND BIOCHEMICAL STUDIES
L.H.Allikmets, L.G.Polevoi, A.M.Zharkovsky,
V.I.Gunar, V.I.Kopelevich, L.N.Bulanova, M.J.Otter

S u m m a r y

In experiments on rats and mice the action of oxybutal was compared with the effects of sodium oxybutyrate and phenibut. Oxybutal exerts moderate tranquillizing action - increases the threshold of emotional reactions, enhances the number of water-intakes in conflict situation. Sedative and muscle-relaxing action begins at the dose 100-150 mg/kg. Oxybutal antagonizes apomorphine stereotypy and aggressiveness inhibits amphetamine-stimulated motor activity, amphetamine group-toxicity, metrazol seizures. In various tests oxybutal exerts an antihypoxic effect, increases the turnover of dopamine, but does not change the metabolism of noradrenaline or serotonin.

КАЛЬЦИЯ ОКСИБУТИРАТ - НОВЫЙ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

II. БИОДОСТУПНОСТЬ И ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

М.Я. Оттер, Л.Х.Адлиметс, А.М.Жарковский, Л.Г.Полевая
Кафедра фармакологии ТГУ

Структурное сходство кальция оксибутирата с гамма-аминомасляной кислотой, которая в ЦНС играет роль медиатора торможения, позволяет думать, что транквилизирующее, анксиолитическое и угнетающее моторику действие препарата связано с физиологическим усилением процессов торможения /3, 4, 5/. Это и отличает его от препаратов бензодиазепинового ряда.

Выяснено, что кальция оксибутират отличается низкой острой и хронической токсичностью и не обладает тератогенным и эмбриотоксическим действиями. Острая токсичность была определена на трех видах лабораторных животных: на мышах, крысах и морских свинках (табл. I). Выяснилось, что препарат в 2-3 раза токсичнее при внутрибрюшинной инъекции, чем при парентеральном введении. Поэтому он может быть рекомендован только для энтерального введения.

Таблица I

Острая токсичность кальция оксибутирата

Животные	Способ введения	LD ₅₀ мг/кг
Мыши беспородные	в/бр	574 (472+675)
	внутри	1915 (1705+2125)
Крысы беспородные	в/бр	565 (493+637)
	внутри	1740 (1520+1960)
Морские свинки	в/бр	362 (328+395)
	внутри	1200

В данной статье изложены результаты исследования биодоступности. Сравнивались эффекты энтерального и внутрибрюшинного, а также длительного введения оксибутала в опытах на мышах и крысах. Сравнение проводилось с оксибутиратом натрия. Опыты проведены по обычным методикам поведенческого скрининга /I/ и обработаны по t-тесту Стьюдента.

Энтеральное введение кальция оксибутирата вызывало угнетение ориентировочно-двигательной активности и моторики в

дозах 100-250 мг/кг. Спустя 90-120 мин после введения дозы 500 мг/кг у крыс наблюдалась выраженная миорелаксация, застывание на месте. Спустя 40 минут после энтерального введения кальция оксибутирата (200 мг/кг) его тормозящее действие на моторику было еще слабо выражено, в то время как спустя 6 часов оно стало заметно выраженнее по сравнению с эффектом внутрибрюшинного введения этой же дозы (табл. 2). Следовательно, действие препарата при энтеральном введении не отличается от эффекта внутрибрюшинного введения, что говорит о хорошей биодоступности препарата. Такая же картина действия кальция оксибутирата наблюдалась на координацию движений в опытах по методике вращающегося стержня. Как при энтеральном, так и при парентеральном введении кальция оксибутират нарушал координацию движений при дозе 100 мг/кг (табл. 2). В результате этих экспериментов было также выяснено, что энтеральное введение кальция оксибутирата оказывает транквилизирующее действие - повышаются пороги эмоциональной реактивности (внимания и писка), в то время как агрессивность угнетается слабо и к 6 часу эффект проходит (табл. 2).

Для изучения анальгезирующего действия кальция оксибутирата на мышцах и крысах были использованы две методики: горячая пластинка, нагретая до температуры 53° С (определялось латентное время лизания лап), и вызывание болевой реакции с помощью щипцов Хаффнера (условные единицы). Выяснилось, что при дозах 250 и 500 мг/кг препарат оказывает умеренное анальгезирующее действие, что, однако, может быть частично связано с миорелаксирующим эффектом этих доз препарата (табл. 3).

Таблица 3

Анальгетический эффект кальция оксибутирата по методике горячей пластинки у мышей. Приведены средние арифметические и стандартные ошибки к ним

Вещество, доза мг/кг	Латентный период лизания передних (П) и задних (З) конечностей в секундах в разное время после введения вещества в мин			
	60 мин		90 мин	
	П	З	П	З
Контроль: физ. раст.	10, 8 [±] 0,9	16, 2 [±] 0,9	8, 8 [±] 0,16	16, 1 [±] 1,2
Кальция оксибутират				
50	9, 3 [±] 1,8	17, 4 [±] 1,2	10, 0 [±] 0,2	18, 0 [±] 0,52
100	12, 0 [±] 1,0	18, 2 [±] 1,3	10, 8 [±] 1,1	17, 5 [±] 1,6
250	14, 1 [±] 0,6 ^x	21, 3 [±] 1,1 ^x	11, 6 [±] 0,3 ^x	17, 2 [±] 1,4
500	15, 2 [±] 1,2 ^x	19, 7 [±] 1,3	9, 7 [±] 1,1	22, 4 [±] 1,5 ^x
Натрия оксибутират				
100	11, 4 [±] 1,9	17, 4 [±] 0,8	10, 2 [±] 0,4	18, 0 [±] 1,1
250	13, 8 [±] 0,4 ^x	20, 7 [±] 1,2 ^x	12, 3 [±] 0,5	17, 4 [±] 1,3

x - разница достоверна по сравнению с контролем при P ≤ 0,05

Влияние кальция оксибутирата в сравнении с натрием оксибутиратом на ориентировочно-двигательную активность, двигательную способность, ректальную температуру, эмоциональность и агрессивность крыс спустя 40 мин и 6 часов после энтерального или внутривенного введения. Приведены средние величины и стандартные ошибки к ним

Вещества, дозы в мг/кг	Время после введения	Моторная активность в течение 5 минут	Время удер- живания на вращающемся стержне в сек	Число им- пульсов	Число вста- ваний	Ректаль- ная тем- пература °C	Электрофизическое исследование в полых		Порог аг- рессивно- сти
							Порог вниме- ния	Порог писка	
Контроль: дист. раст.	40 мин	146±10	9,0±0,5	52,0±3,0	34,9±0,2	12,5±1,0	25,0±0,0	45,0±3,0	
	6 часов	103±9	6,5±1,1	68,0±4,2	35,0±0,1	12,0±1,5	22,5±2,0	45,0±0,0	
Налиция оксибу- тират в/бр	100	40 мин	21,2±4,6 ^x	33,6±0,3	17,5±2,4 ^x	29,2±1,6	46,7±1,1		
	200	40 мин	102±11 ^x	4,2±1,1 ^x	8,4±1,7 ^x	33,7±0,2			
500	40 мин		2,6±0,4 ^x						
100	6 часов	34±7 ^x	51,4±4,7	35,1±0,2	11,7±1,1	19,2±0,6 ^x	46,6±1,0		
200	6 часов		2,3±0,4 ^x	28,6±3,4 ^x	34,7±0,3				
500	6 часов		14,0±4,8						

I	2	3	4	5	6	7	8	9	
Кальция оксиду- рат антераль- но	100	40 мин	157, 3±31,0	48 ±1,2 ^x	39, 3±8,5	33, 8±0,5	13, 8±0,8	22, 5±1,8	46, 5±3,7
	200			5, 1±1,1 ^x	33, 8±0,2 ^x	16, 2±0,8 ^x	29, 4±0,8	48, 4±1,6	
	500			13, 1±5,4 ^x	33, 3±0,3 ^x				
	100	6 часов		55, 3±7,2	34, 8±0,2	12, 7±0,7	22, 0±0,3	41, 3±3,1	
	200		19, 7±5,0 ^x	0, 5±0,3 ^x	15, 7±3,6 ^x	33, 8±0,1 ^x	15, 6±0,4	27, 1±1,8	44, 1±1,2
	500				6, 2±2,4 ^x	33, 2±0,2 ^x			
Натрия оксиду- тират в/бр	200	40 мин		9, 4±2,8 ^x	33, 2±0,2 ^x				
	500	6 часов		38, 2±3,4 ^x	34, 8±0,1				
Натрия оксиду- тират антераль- но	200	40 мин		10, 6±3,4 ^x	33, 3±0,2 ^x	15, 1±0,4	27, 8±1,2 ^x	46, 1±1,3	
	500	6 часов		25, 3±4,1 ^x	34, 2±0,1 ^x	11, 8±1,2	24, 2±0,7	44, 3±0,8	

x - разница по сравнению с контролем статистически достоверна при P ≤ 0,05.

Снотворное и анестетическое действия при энтеральном введении определялись в опытах на белых мышах и крысах обоего пола. Во-первых, было исследовано действие возрастающих доз кальция оксибутирата на наступление миорелаксации, а также взаимодействие кальция оксибутирата с этаминал-натрием. Этаминал-натрий вводился в дозах, вызывающих общую анестезию: у мышей 100 мг/кг, у крыс 50 мг/кг внутривбрюшинно. Кальция оксибутират вводился энтерально за 30 минут до этаминал-натрия. Выяснилось, что у мышей и крыс кальция оксибутират вызывает практически одинаковые изменения общего состояния. Начиная с дозы 200 мг/кг кальция оксибутират вызывал некоторое расслабление мышц, фиксацию на месте (напоминающую катаlepsis), хотя рефлексы положения тела и ответы на внешние раздражители (звук, прикосновение) сохранялись. Выраженное урежение дыхания и боковое положение наблюдались только при очень высоких дозах — 400–500 мг/кг. Эти дозы при внутривбрюшинном введении препарата крысам вызвали редкие одиночные клонические подергивания тела или конечностей, что может быть результатом высокой дозы кальция, который всасывается при внутривбрюшинном (парентеральном) введении. При энтеральном введении кальция оксибутирата до 1000 мг/кг ни одного смертельного исхода не отмечалось. При энтеральном введении его мышам и крысам (табл. 4) латентный период наступления положения фиксации животного не удлинялся по сравнению с эффектом в/бр введения, также продолжительность фиксации и бокового положения были сравнимы с эффектом внутривбрюшинного введения препарата. При энтеральном введении кальция оксибутирата подергиваний тела животных не наблюдалось. При энтеральном введении крысам кальция оксибутирата в дозах 200–500 мг/кг сохранились и анальгетическое и умеренное гипотермическое действия (табл. 2). Антигипоксическое действие у мышей при гипоксической гипоксии (закрытое пространство) и гемической гипоксии (натрия нитрит 200 мг/кг) при энтеральном введении кальция оксибутирата (100–200 мг/кг) было также четко выражено.

В дозе 50 мг/кг у крыс препарат укорачивал продолжительность бокового положения и удлинял латентный период наступления этаминаловой анестезии (табл. 5). На мышах кальция оксибутират (100 мг/кг) также вызывал некоторое укорочение этаминаловой анестезии. Это укорочение барбитуровой анестезии и удлинение периода наступления бокового положения связано, по всей вероятности, с выраженным антигипоксическим

эффектом гамма-оксимасляной кислоты. Более высокие дозы (200-300 мг/кг) кальция оксибутирата крысам уже удлинляли этаминаловую анестезию, однако увеличивалась и токсичность после совместного применения (табл. 5).

Таким образом, кальция оксибутират при энтеральном введении начиная с дозы 100 мг/кг вызывает успокоение животных, своеобразное снотворное состояние. Он потенцирует барбитуровую общую анестезию. В малых дозах препарат уменьшает токсическое действие барбитурата.

Изучение эффектов кальция оксибутирата при длительном введении

В целях выявления развития толерантности (привыкания) к препарату были выполнены опыты с его длительным 30-дневным введением и регулярным повторным определением основных фармакологических эффектов у крыс и мышей. Сравнение проводилось этаминал-натрием и натрия оксибутиратом. В первой серии исследовалось изменение снотворного и миорелаксирующего эффекта кальция оксибутирата на мышах при 30-дневном внутрибрюшинном и энтеральном введении препарата. Определялось время наступления и продолжительность фиксированной позы в минутах на 1, 10, 20 и 30 день введения вещества в дозе 200-300 мг/кг. Также исследовались эффекты 30-дневного введения кальция оксибутирата на ориентировочно-двигательную активность, на двигательную способность и эмоциональную реактивность. Контрольные животные получали в течение 30 дней физиологический раствор. Было выяснено, что в опытах на мышах как при внутрибрюшинном, так и энтеральном введении кальция оксибутирата его свойство вызывать расслабление мышечного тонуса и фиксированное положение тела полностью сохраняется в течение 30-дневного хронического применения. Не наблюдалось достоверных изменений в латентном времени и продолжительности фиксации животных на месте (табл. 6). Также в хронических опытах на мышах и крысах при введении кальция оксибутирата энтерально не наблюдалось ослабления депримирующего действия его на ориентировочно-двигательную активность, двигательную способность и эмоциональную реактивность (табл. 6). Седативное, миорелаксирующее и транквилизирующее свойства препарата сохранялись полностью, привыкания не отмечалось. При десятидневном введении этаминал-натрия было установлено быстрое развитие толерантности. На десятый день вве-

Таблица 4

Скорость наступления и продолжительность (в мин) фиксации на месте у мышей и крыс, вызванной внутрибрюшинным и энтеральным введением кальция оксибутирата. Вычислены средние арифметические и стандартные ошибки к ним

Вещество, доза мг/кг	Кол-во животных	Скорость наступ- ления фиксации мин	Продолжи- тельность фиксации, мин
Кальция оксибути- рат внутрибрюшин- но		Мыши	
100	12	9,4 \pm 3,1	26,5 \pm 11,6
200	10	8,12 \pm 2,4	32,0 \pm 1,5
400	12	6,1 \pm 1,8	94,8 \pm 11,0
500 ^x	10	4,0 \pm 0,6	132,8 \pm 12,7
Энтерально			
100	10	28 \pm 5,8	13,6 \pm 5,1
200	10	18 \pm 3,4	25 \pm 6,8
400	12	10 \pm 3,7	98 \pm 4,5
500 ^{xx}	12	17 \pm 2,1	124 \pm 11,8
Кальция оксибути- рат внутрибрюшин- но		Крысы	
100	8	18,3 \pm 5,0	26,0 \pm 8,3
200	8	14,4 \pm 2,7	47,0 \pm 6,0
500 ^{xx}	10	15,6 \pm 1,2	162,0 \pm 16,8
Энтерально			
100	10	36 \pm 11,2	12 \pm 6,3
200	10	26 \pm 6,5	38 \pm 5,3
500	10	18 \pm 5,1	194 \pm 18,4

x - у двух животных летальный исход

xx - у трех животных летальный исход спустя 1,5 часа после введения препарата

Таблица 5

Влияние энтерального введения кальция оксибутирата (КОБ) на общую анестезию, вызванную этаминал-натрием (50 мг/кг) у крыс и мышей (100 мг/кг). Кальция оксибутират вводился за 30 мин до этаминал-натрия. Приведены средние арифметические \pm стандартные ошибки к ним

Вещество, доза мг/кг	Кол-во животных	Латентный период на- ступления анестезии (мин)	Продолжитель- ность боково- го положения (мин)
Контроль:	Крысы		
Этаминал-натрий 50	8	$9 \pm 0,5$	$142 \pm 7,1$
Этаминал-натрий + КОБ 50	8	30 ± 3	$73,8^{\pm} 8,7^x$
Этаминал-натрий 50 + + КОБ 100	8	10 ± 1	$95,4^{\pm} 15,6^x$
	Мыши		
Контроль:			
Этаминал-натрий 100	12		$129 \pm 4,4$
Этаминал-натрий + + КОБ 100	12		$94,8^{\pm} 11,0^x$
Этаминал-натрий 100+ + КОБ 200	12		$161,5^{\pm} 5,5^x$
Этаминал-натрий 100+ + КОБ 300	12		196 ± 22^{xx}

x - статистически достоверное различие по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$

xx - в группе 4 летального исхода спустя 115-140 мин после введения этаминал-натрия.

дения этиминал-натрия отмечалось трехкратное уменьшение продолжительности сна и удлинение периода наступления этого действия. Следует отметить, что комбинирование этиминал-натрия на 10-й день введения кальция оксibuтиратом и натрия оксibuтиратом (100 мг/кг энтерально) восстанавливало способность этиминала вызывать боковое положение мышей исходной длительности. Отсюда можно заключить, что кальция оксibuтират не вызывает феномена привыкания, который является характерным для эталонных снотворных - барбитуратов.

Заключение

Кальция оксibuтират вызывает основные нейрофармакологические эффекты как при парентеральном (в/бр), так и при энтеральном путях введения, что свидетельствует о хорошем всасывании его из желудочно-кишечного тракта. Основные эффекты препарата (транквилизирующий, седативный, снотворный, антигипоксический и др.) при введении одинаковых доз только около 20-25% слабее при энтеральном введении по сравнению с эффектами внутрибрюшинного введения. Из-за содержания в молекуле кальция препарат при парентеральном (внутрибрюшинном, внутривенном) введении около 3 раз токсичнее, чем при энтеральном введении. Поэтому препарат рекомендован только для энтерального применения, тем более, что лекарственные формы (порошок, таблетки) стойки к атмосферным влияниям, не гигроскопичны. При энтеральном применении всасывание кальция неполное.

В результате выраженного антигипоксического действия, умеренного транквилизирующего и анальгетического эффектов и своеобразного снотворного действия (рефлексы положения тела сохраняются) препарат рекомендован в качестве ноотропного снотворного лекарственного средства при неврозах у людей с нарушениями кровообращения и метаболизма мозга. В отличие от классических снотворных положительной чертой кальция оксibuтирата является отсутствие способности вызывать привыкание и повышение толерантности при повторном введении. Также возможно его положительное антигипоксическое и успокаивающее действие при восстановлении функций организма в экстремальных условиях. По сравнению с натрия оксibuтиратом кальция оксibuтират отличается именно стойкостью таблеток - основной лекарственной формой для энтерального применения.

Таблица 6

Влияние длительного введения кальция оксидутирата мышам на ориентировочно-двигательную активность, двигательную способность и эмоциональную реактивность. Доза 200 мг/кг мышам, 100 мг/кг крысам один раз в сутки за I-II, 5 часа до определения поведенческих показателей. Приведены средние арифметические и стандартные ошибки в мм

Группа животных, вещество.	Сутки введения	Двигательная активность по данным актометра.	Двигательная способность, время удержания на стержне в сек	Эмоциональная реактивность	
				порог (в вольтгах) реакции внимания	порог (в вольтгах) паника
Контроль: физ. раствор I4 мышей самцов	первые	300,8 ± 9,2	96 ± 10	13,6 ± 0,4	18,4 ± 1,2
	десятые	244,4 ± 10,6	80 ± 12	10,7 ± 0,8	17,3 ± 1,3
	двадцатые	234,2 ± 11,5	83 ± 8	12,1 ± 0,3	17,9 ± 1,4
	тридцатые	208,4 ± 13,4	112 ± 11	13,2 ± 0,2	20,2 ± 0,7
	первые	102,3 ± 13,4 ^x	112 ± 21	16,8 ± 0,4 ^x	31,5 ± 2,5 ^x
	десятые	90,6 ± 14,4 ^x	119 ± 14	18,2 ± 1,2 ^x	25,0 ± 0,1 ^x
Кальция оксидутират 200 мг/кг, интервально I4 мышей самцов	двадцатые	104,4 ± 10,3 ^x	133 ± 11	17,6 ± 1,4 ^x	28,4 ± 2,8 ^x
	тридцатые	78,6 ± 8,4 ^x	97 ± 14	20,3 ± 1,7 ^x	25,6 ± 1,4 ^x
	первые	84,6 ± 8,0	52,0 ± 3,0	12,1 ± 0,9	24,5 ± 1,9
Контроль: физ. раствор	десятые	72,2 ± 66,4	66,0 ± 4,4	13,3 ± 0,4	24,6 ± 1,2
	двадцатые	66,6 ± 5,7	59,6 ± 3,8	13,4 ± 1,1	23,2 ± 6,8
	тридцатые	58,0 ± 2,9	48,8 ± 5,1	12,2 ± 0,4	25,4 ± 0,7
	первые	40,8 ± 6,2 ^x	30,6 ± 8,5	15,7 ± 0,7 ^x	26,4 ± 0,7
	десятые	35,7 ± 5,2 ^x	30,6 ± 8,1 ^x	17,9 ± 1,5 ^x	30,0 ± 1,5 ^x
	двадцатые	39,1 ± 4,1	32,3 ± 4,5 ^x	17,9 ± 1,0 ^x	21,3 ± 1,7
тридцатые	34,6 ± 3,9 ^x	29,7 ± 3,5 ^x	16,8 ± 0,7 ^x	32,1 ± 1,0 ^x	

^x - статистически достоверно различие по сравнению с контролем с $P \leq 0,05$

Использованная литература

1. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. - М.: Медицина, 1974.
2. Горягин И.В. О потенцировании и пролонгировании фенибутом и фенилпирролидоном наркотического действия анестетиков//Фармакология и клиника ГАМК и ее аналогов. - Волгоград, 1979. - С. 58-62. - (Труды/Волгоград.мед.ин-т ; Т. 31, - Вып. 3).
3. Жарковский А.М., Ряго Л.К., Алликметс Л.Х. Исследование механизма действия производных ГАМК//Уч. зап./Тарт. ун-т. - 1981. - Вып. 581: Развитие психиатрии и психофармакологии в Тартуском университете. - С. II-III.
4. Островская Р.У., Трофимов С.С. Ноотропные свойства производных ГАМК//Бюл. эксп. биол. мед. - 1984. - № 2. - С. 170-173.
5. Островская Р.У., Трофимов С.С. Соотношение антигипоксического и ноотропного эффектов в спектре действия производных "шунта ГАМК"//Уч. зап./Тарт. ун-т. - 1984. - Вып. 687: Механизм действия и клиника производных гамма-аминомасляной кислоты. - С. 46-59.

A PROMISING DRUG - CALCIUM OXYBUTYRATE
II. BIOAVAILABILITY AND EFFECTS OF CHRONIC ADMINISTRATION
M.J.Otter, L.H.Allikmets, A.M.Zharkovsky, L.G.Polevoi

S u m m a r y

In experiments on rats and mice the effects of oral and intraperitoneal administration of calcium oxybutyrate (oxybutal) were compared in order to establish the bioavailability of drug. By gastro-enteral administration approximately 25% higher doses of oxybutal were needed to elicit psychotropic effects equal to IP injections. During 6 months of daily administration of ED₅₀ no toxic effects were found and no tolerance developed to tranquillizing, antihypoxic and other effects. Oxybutal can be recommended for clinical studies only by oral route of administration.

ВЛИЯНИЕ ГАМКМИМЕТИКА ТГИП НА СВЯЗЫВАНИЕ ³H-ФЛУНИТРАЗЕПАМА В МОЗГЕ КРЫС

А.М. Марковский, А.С. Шаврин, Т.А. Марковская
Кафедра фармакологии ТГУ

Большое количество данных опытов связывания *in vitro* свидетельствует, что агонисты ГАМК рецепторов, такие как ГАМК и муцимол, повышают связывание бензодиазепинов с их рецепторами /3, 5, 7, II, I6, I8/. Повышение связывания обусловлено повышением аффинности бензодиазепиновых (БЗ) рецепторов и оно блокируется антагонистом ГАМК рецепторов (+)- бикакуллином (БИК) /3, I6/. На основании полученных данных было высказано предположение, что БЗ рецепторы, ГАМК рецепторы и хлор-ионофор аллостерически связаны между собой и функционируют в виде единого комплекса /3, 5, II, I4, I6, I7/. Недавно была описана группа специфичных и сильных агонистов БИК-чувствительных ГАМК_A рецепторов /8, 9, IO/. Однако, в отличие от ГАМК и мусцимола, вещества из этой группы 4,5,6,7-тетрагидроизоксазол-(5,4-с)-пиридин-3-ол (ТГИП), изогувацин и пиперидин-4-сульфоновая кислота не обладают стимулирующим влиянием на связывание БЗ /I, 2, 6, 8/. Более того, в отсутствие ионов хлора при 0° С эти вещества угнетали связывание БЗ с немтыми мембранами и антагонизировали стимулирующему эффекту ГАМК и мусцимола /I, I4/. Ингибирующее действие ТГИП и изогувацина наиболее хорошо проявлялось, если связывание проводили с немтыми мембранами в буфере низкой молярности /I4/. Если связывание определяли с хорошо отмтыми мембранами при повышенной температуре в присутствии ионов хлора, то ТГИП, подобно ГАМК или мусцимолу, увеличивал связывание БЗ /7, I9/. Полученные экспериментальные данные объяснялись неспособностью этих веществ вызывать полный фармакологический эффект, несмотря на оккупацию этими веществами ГАМК рецепторов, т.е. эта группа веществ обладает смешанным агонистико/антагонистическим действием, зависящим от конформации ГАМК или БЗ рецепторов /I, 6/. Поскольку известно, что ГАМК-ергические эффекты ТГИП являются БИК-чувствительными, представляло интерес выяснить, будет ли изменяться ингибирующий и

стимулирующий эффекты ТГИП на связывание БЗ в присутствии БИК. В настоящей работе нами было показано, что ТГИП в отличие от ГАМК, может изменять связывание БЗ независимо от присутствия БИК.

Методы исследований

Передний мозг взрослых крыс самцов гомогенизировали (1100 об/мин, 10 пассажей) в 25 объемах 25 мМ ТРИС HCl буфера (pH = 7,3) с использованием стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком. Гомогенат затем разводили тем же буфером так, чтобы содержание ткани составляло 3 мг/мл, и непосредственно использовали в опытах связывания. Этот препарат мембран был обозначен как "немые мембраны". В другой серии экспериментов ткань мозга гомогенизировали 0,32 мМ растворе сахарозы и центрифугировали при 1100 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость центрифугировали снова при 30000 g в течение 20 мин и полученный осадок ресуспендировали в 25 мМ ТРИС HCl буфере и шестикратно отмывали путем центрифугирования и одного цикла замораживания-оттаивания. Конечный осадок ресуспендировали в 100 объемах буфера и использовали в опытах связывания. Этот препарат мембран был обозначен как "отмытые мембраны".

Опыт связывания проводили в трипликатах в стеклянных пробирках. Суспензию мембран инкубировали в конечном объеме 1 мл с 0,5 нМ ³H-флунизепамом (³H-ФНЗ, 83 Ки/ммоль, Amersham plc.) в отсутствие и присутствии БИК и исследуемых веществ при 0° С в течение 1 часа. Суспензию отмытых мембран инкубировали при 30° С в присутствии 150 мМ NaCl. Эти условия инкубации по данным литературы /6, 7, 14/ адекватны для проявления ингибирующего и стимулирующего влияния ТГИП на связывания БЗ. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 5 мМ диазепама, оно составляло обычно 10 - 15 % от общего. По окончании инкубации связанный и свободный лиганд разделяли фильтрованием через фильтры GF/B (Whatman). Радиоактивность, оставшаяся на фильтрах, подсчитывалась с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS - 6800 (Beckman). Кинетику насыщения изучали с помощью анализа Скэтчарда, используя концентрации изотопа в диапазоне 0,25-32 нМ.

Для исследований ТГИП был любезно предоставлен фирмой Ludbeck Co, немеченный диазепам - фирмой La Roche.

Результаты опытов

Во-первых, была определена концентрация БИК, необходимая для полной блокады эффектов агонистов ГАМК_A рецепторов на связывание ^3H -ФНЗ. Как видно из рисунка 1, БИК, добавленный в среду инкубации, угнетал связывание ^3H -ФНЗ с немтыми мембранами. Так, в концентрации $10\ \mu\text{M}$ БИК угнетал связывание на 40%. При повышении концентрации БИК до $100\ \mu\text{M}$ его угнетающее действие существенно не изменялось. В более высоких концентрациях ($200 - 500\ \mu\text{M}$) БИК вызвал добавочное снижение связывания ^3H -ФНЗ. Если связывание определялось с отмтыми мембранами, то БИК вызывал только небольшое (около 5%) снижение связывания ^3H -ФНЗ, свидетельствующее о том, что лишь незначительное количество эндогенной ГАМК присутствует в препарате отмтых мембран. Как показал анализ Скэтчарда, снижение связывания ^3H -ФНЗ, вызываемое $10\ \mu\text{M}$ БИК, обусловлено снижением аффинности B3 рецепторов без изменения плотности рецепторов (табл. I). БИК в концентрации $50\ \mu\text{M}$ не вызывал дополнительного снижения аффинности. На основании этих данных можно считать, что БИК в концентрации $10\ \mu\text{M}$ полностью блокирует эффект эндогенной ГАМК в препарате немтых мембран, поэтому в этой концентрации БИК был использован в дальнейших экспериментах. В более высоких концентрациях БИК вызывал значительное угнетение связывания как в немтых, так и в отмтых мембранах, поэтому этот эффект БИК является неспецифическим, поскольку он не зависит от присутствия эндогенной ГАМК в препаратах мембран.

ТГИП в концентрациях $100 - 500\ \mu\text{M}$ угнетал связывание ^3H -ФНЗ с немтыми мембранами в отсутствие и присутствии БИК (рис. 2). Однако угнетение связывания ^3H -ФНЗ в присутствии БИК было выражено в меньшей степени, чем в отсутствие БИК, по сравнению с их соответствующими контролями. Анализ Скэтчарда показал, что в присутствии БИК ТГИП вызывал как снижение аффинности, так и уменьшение числа рецепторов (табл. I). В присутствии БИК ТГИП не вызывал дополнительного снижения аффинности рецепторов, и снижение связывания происходило исключительно за счет уменьшения числа рецепторов (табл. I). Напротив, ГАМК в концентрациях $1 - 1000\ \mu\text{M}$ в отсутствие БИК вызывал незначительное снижение связывания ^3H -ФНЗ с немтыми мембранами, а в присутствии БИК эффективно антагонизировала его эффекту, повышая связывание до исходного уровня (рис. 3).

Если связывание определялось отмтыми мембранами, то

Таблица I

Параметры связывания ^3H -флуоридозапама с мембранами переднего мозга крыс в присутствии БИК, ТГИП и их комбинаций

Представлены средние величины и стандартные ошибки к ним. Число опытов указано в скобках.
 $k - P < 0,05$ (U-тест Стьюдента).

ВЕЩЕСТВО	K_D (нМ)	В макс. (пмоль/г) ткани
Немытые мембраны		
Контроль (7)	$1,4 \pm 0,2$	$142,4 \pm 5,9$
БИК $10 \mu\text{M}$ (3)	$3,0 \pm 0,3^*$	$140,0 \pm 9,9$
БИК $50 \mu\text{M}$ (3)	$3,2 \pm 0,4^*$	$139,5 \pm 8,9$
ТГИП $200 \mu\text{M}$ (4)	$2,8 \pm 0,3^*$	$101,5 \pm 9,2^*$
ТГИП $200 \mu\text{M}$ + БИК $10 \mu\text{M}$ (4)	$2,9 \pm 0,3^*$	$99,2 \pm 8,4$
Отмытые мембраны		
Контроль (3)	$6,5 \pm 0,5$	$118,6 \pm 5,5$
БИК $10 \mu\text{M}$ (3)	$6,9 \pm 0,3$	$112,0 \pm 9,2$
ТГИП $200 \mu\text{M}$ (3)	$4,1 \pm 0,3^*$	$102,1 \pm 8,5$
БИК $10 \mu\text{M}$ + ТГИП $200 \mu\text{M}$	$6,4 \pm 0,4$	$102,4 \pm 9,1$

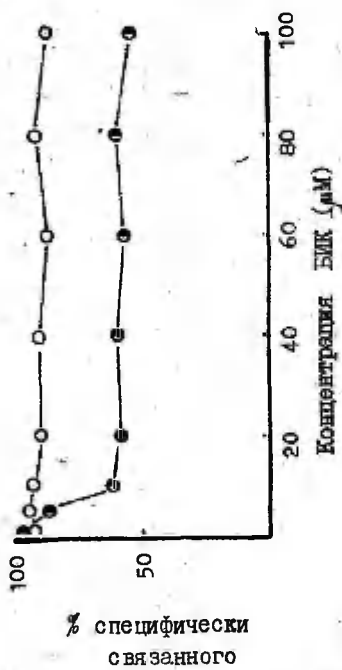


Рис. 1. Влияние БИК на овязывание Д-ФНЗ о нормальными (-○-) и отмытыми (-●-) мембранами переднего мозга крысы.

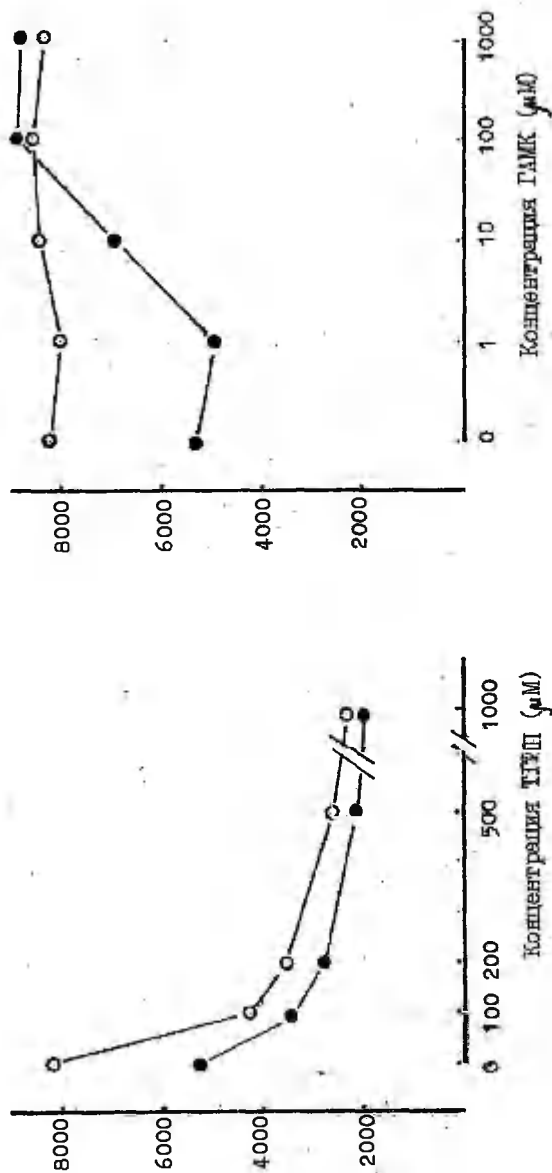


Рис. 2. Влияние ТМП и ГАМК на связывание 3H -ФНЗ с ионными мембранами в отсутствие (- o -) и присутствии (- ● -) БИК (10^{-4} M).

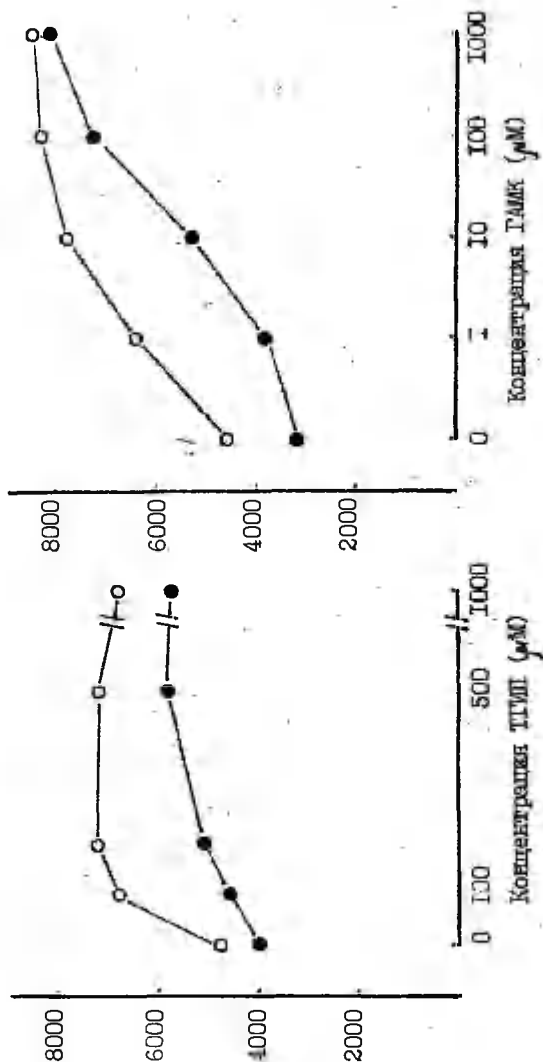


Рис. 3. Влияние ТПИИ и ТАМК на связывание ^3H -ФНЕ с отмытыми мембранами в отсутствие (- ○ -) и присутствии (- ● -) БНК (10 μM).

ТГИП, подобно ГАМК, увеличивал связывание ^3H -ФНЗ (рис. 3). БИК угнетал этот эффект, при этом концентрации ТГИП или ГАМК, вызывавшие стимуляцию связывания, смещались вправо. Эти данные свидетельствуют о том, что усиление связывания, вызываемое ТГИП или ГАМК, чувствительно к БИК. Анализ Скэтчарда показал также, что ТГИП в этих условиях уменьшал K_d , которая увеличивалась при прибавлении БИК (табл. I).

Обсуждение результатов

Данные, полученные в настоящем исследовании, показывают, что ТГИП угнетает связывание с немтыми мембранами при 0°C и увеличивает его с отмытыми мембранами при 30°C в присутствии ионов хлора, что подтверждает данные предыдущих исследований. Как показал анализ Скэтчарда, ТГИП вызывает снижение связывания вследствие снижения аффинности и уменьшения плотности рецепторов. Эти данные частично не соответствуют другим исследованиям, в которых было показано, что эффект ТГИП проявляется только в уменьшении рецепторов /14/. Такие различия, по-видимому, могут быть объяснены тем, что в наших опытах препарат немтых мембран содержал большее количество эндогенной ГАМК, поскольку использовались меньшие разведения, чем в работе /14/. Вероятно, ТГИП, антагонизирует к эндогенной ГАМК, присутствующей в препарате немтых мембран, и тем самым снижает аффинность БЗ рецепторов. В этих условиях ТГИП ведет себя аналогично БИК, что соответствует гипотезе смешанного агонистического/антагонистического действия ТГИП /1/. ГАМК, в противоположность ТГИП, обладает высокой фармакологической активностью и, взаимодействуя с БИК-чувствительными ГАМК рецепторами, восстанавливает аффинность, сниженную БИК.

Помимо воздействия на аффинность БЗ рецепторов, ТГИП снижает и их плотность, причем этот эффект проявляется как в отсутствие, так и в присутствии БИК. Поскольку сам БИК не изменяет плотности БЗ рецепторов, можно предположить, что этот эффект ТГИП не связан с его влиянием на БИК-чувствительные ГАМК_A рецепторы. Можно предположить различные объяснения этого эффекта ТГИП. Так, многочисленные эксперименты показали, что только популяция низкоаффинных ГАМК рецепторов положительно связана с БЗ рецепторами /4, 12/. Недавние исследования показали, что ^3H -ТГИП метит только часть рецепторов ГАМК /4, 13/. Не исключено, что часть этих рецепторов

БИК-нечувствительна и негативно связана с БЗ рецепторами. Процедура промывки мембран, добавление ионов хлора при повышенной температуре частично инактивирует эти рецепторы, поэтому в данных условиях ТГИП, подобно ГАМК, лишь облегчает связывание БЗ через БИК-чувствительные ГАМК рецепторы. Другое объяснение можно выдвинуть, исходя из гипотезы существования ГАМК рецепторов в разной степени аффинности /5/, которые регулируют связывание БЗ противоположным образом. Однако и те, и другие объяснения нуждаются в дальнейших экспериментах.

Использованная литература

1. Braestrup C., Nielsen M., Krogsgaard-Larsen P. and Falch E. Partial agonists for brain GABA/benzodiazepine receptor complex//Nature. - 1979. - Vol. 280. - P.331-333.
2. Braestrup C., Nielsen M., Krogsgaard-Larsen P. and Falch E. Two or more conformations of benzodiazepine receptors depending on GABA receptors and other variables// Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones/ Eds. G. Pepeu, M.J. Kuhar and S.J. Enna. - New York:Raven Press, 1980. - P. 301-312.
3. Briley M.S., Langer S.Z. Influence of GABA receptor agonists and antagonists in the binding of ^3H -diazepam to the benzodiazepine receptor//Europ. J. Pharmacol. - 1978. - Vol. 52. - P. 129-132.
4. Falch E., Krogsgaard-Larsen P. The binding of the GABA agonist ^3H -THIP to rat brain synaptic membranes//Neurochem. - 1982. - Vol. 38. - 1123-1129.
5. Gallager D.W., Mallorga P., Thomas J.W., Tallman J.F. GABA-benzodiazepine interactions: Physiological, pharmacological and developmental aspects//Fed.Proc. - 1980. - Vol. 39. - P. 3043-3049.
6. Karobath M., Lippitsch M. THIP and isoguvacine are partial agonists of GABA stimulated benzodiazepine receptor binding//Europ. J. Pharmacol. - 1979. - Vol. 58. - P.485-488.
7. Karobath M., Sperk G. Stimulation of benzodiazepine receptor binding by γ -aminobutyric acid//Proc. Nat.Acad. Sci. USA. - 1979. - Vol. 76. - P. 1004-1006.
8. Karobath M., Placheta P., Lippitsch M., Krogsgaard-Larsen P. Characterization of GABA stimulated benzodiazepine

- receptor binding//Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones/Eds. G. Pepeu, M.J. Kuhar, S.J. Enna. - New York: Raven Press, 1980. - P. 313-328.
9. Krogsgaard-Larsen P., Johnston G.A.R., Lodge D., Curtis D.R. A new class of GABA agonists//Nature. - 1977. - Vol. 268. - P. 53-55.
 10. Krogsgaard-Larsen P., Falch E., Jacobsen P. GABA agonists: structural requirements for interactions with the GABA-benzodiazepine receptor complex//Actions and Interactions of GABA and Benzodiazepines/Ed. N. 6. - Bowery. - New York: Raven Press, 1984. - P. 109-132.
 11. Martin I.L., Candy J.M. Facilitation of benzodiazepine binding by sodium chloride and GABA//Neuropharmacol. - 1978. - Vol. 17. - P. 993-998.
 12. Olsen R.W., Snowmann A.M. ^3H Bicuculline methochloride binding to low affinity γ -aminobutyric acid receptor sites//J. Neurochem. - 1983. - Vol. 41. - P.1653-1663.
 13. Skeritt J.H., Johnston G.A.R. Diazepam stimulates the binding of GABA and muscimol but not THIP to rat brain membranes//Neurosci. Lett. - 1983. - Vol. 38. - P.315-320.
 14. Squires R.F., Klepner C.A., Benzon D.I. Multiple benzodiazepine receptor complexes: Some benzodiazepine recognition sites are coupled to GABA receptors and ionophores/Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones/Eds. G. Pepeu, M.J. Kuhar, S.J. Enna. - New York: Raven Press. - 1980. - P. 285-293.
 15. Supavilai P., Karobath M. The effect of temperature and chloride ions on the stimulation of ^3H Flunitrazepam binding by the muscimol analogues THIP and piperidine-4-sulfonic acid//Neurosci. Lett. - 1980. - Vol. 19. - P. 337-341.
 16. Tallman J.F., Thomas J.W., Gallager D.W. GABA-ergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity//Nature. - 1978. - Vol. 274. - P. 383-385.
 17. Tallman J.F., Gallager D.W. The GABA-ergic system a locus of benzodiazepine action//Ann. Rev. Neurosci. - 1978. - Vol. 8. - P. 21-44.
 18. Wastek G.J., Speth R.C., Reisine T.D., Yamamura H.I. The effect of γ -aminobutyric acid on ^3H -flunitrazepam binding in rat brain//Europ. J. Pharmacol. - 1978. - Vol. 50. - P. 445-447.

19. Wong E.H.F., Iversen L.L. Modulation of ^3H diazepam binding in rat cortical membranes by GABA_A agonists// J. Neurochem. - 1985. - Vol. 44. - P. 1162-1167.

EFFECT OF THIP ON ^3H -FLUNITRAZEPAM BINDING
IN THE RAT BRAIN

A.M.Zharkovsky, A.S.Shavrin, T.A.Zharkovskaya

S u m m a r y

GABA_A receptor agonist THIP inhibits ^3H -flunitrazepam binding to rat forebrain unwashed membranes at 0°C in the absence of chloride ions, reducing the affinity and B_{max} of benzodiazepine (BZ) receptors. The THIP-elicited decrease in affinity of BZ receptors seems to be due to its antagonism to the effects of endogenous GABA presented in the unwashed membrane preparation in consequence of its partial agonist/antagonist properties. When the binding is determined by washed membranes at 30°C in the presence of chloride ions, THIP like GABA enhance ^3H -flunitrazepam binding via an increase in affinity of BZ receptors. The changes in affinity of BZ receptors induced by THIP seem to be mediated via the bicuculline sensitive receptors. However, in the presence and in absence of bicuculline THIP reduced the total number of BZ sites, probably in bicuculline insensitive manner. These data lead to the proposition that THIP binds to the population of GABA receptors negatively coupled to the BZ receptors.

ЗАВИСИМОСТЬ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ОТВЕТА К БАКЛОФЕНУ ОТ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ
Л.К. Ряго, Р.К. Кийвет, М.А. Пыльд

Кафедра фармакологии

Баклофен является бета-п-хлорфенил производным гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), который в настоящее время с успехом применяется как антиспастическое средство в клинической практике /14/. Недавними исследованиями было показано, что (-)баклофен является стереоселективным лигандом для ГАМК_В рецепторов /7/. Между ГАМК_В и классическими ГАМК_А рецепторами имеются существенные различия. Нечувствительность к бикуккуллину и зависимость от двухвалентных катионов (прежде всего от кальция) позволяет разделять ГАМК_В и классические ГАМК_А рецепторы /12/. Многочисленными работами показана тесная связь между ГАМК_А и бензодиазепиновыми (БД) рецепторами, в то время как взаимодействие ГАМК_В рецепторов с БД рецепторами остается малоизученным /13, 4/. Согласно результатам опытов *in vitro* отрицают существование взаимосвязи между ГАМК_В и БД рецепторами /4, 8/. Однако показано, что введение баклофена *in vivo* способно модулировать БД рецепторы в опытах связывания, а Ro 15-1788 (антагонист БД рецепторов) устраняет некоторые поведенческие эффекты баклофена /1, 5/.

В ходе поведенческих опытов с баклофеном нами неоднократно замечено, что седативное действие умеренных доз (\pm)баклофена (< 3 мг/кг) колеблется в больших пределах. В каждом эксперименте у части животных баклофен вызывает сильную заторможенность, а у части животных, наоборот, умеренное возбуждение. Целью нашей работы было проведение селективного тестирования животных с помощью (-)баклофена, стереоселективного агониста ГАМК_В рецепторов, а далее проанализировать состояние БД рецепторов и поведение баклофен-селектированных животных.

Методы исследования

Опыты были проведены на мышах самцах массой 20-25 г. Селектирование животных проводилось в фотоэлектрическом акто-

метре. В каждую клетку помещалось по одному животному. (-) баклофен (1 мг/кг "Ciba-Geigy", Швейцария) вводили внутривенно за 15 мин до опыта и регистрировали двигательную активность в течение 30 минут. После селектирования животных отмечали по группам и возвращали в домашние клетки, т.е. в течение опытов селектированные группы находились в одной клетке.

Поведенческие эффекты баклофен-селектированных животных исследовались по методу "открытое поле" в нашей модификации. Использовались разделенная на секторы яркая освещенная камера (30x30 см) с 8 отверстиями на поле с присоединенной к ней темной камерой (8x8 см). Регистрировалось число пересеченных секторов, число приниживаний в отверстиях и число вставаний, а также число входов в темную камеру.

Опыты связывания ^3H -флунизепема (78 Ки/ммоль "Amersham" проводились в гомогенатах исследованных структур мозга. Связывание определялось в присутствии 0,125-8 нМ метки в конечном объеме 0,5 мл в течение 60 мин при 0° С. Для определения неспецифического связывания использовали 10 мкМ диазепам. После инкубации пробы фильтровали через фильтры GE/B ("Whatman", Англия).

В опытах с диазепамом (коммерческий раствор, "Gedeon-Richter", Венгрия) инъекционный раствор готовили с добавлением физиологического раствора непосредственно перед опытом.

Результаты опытов

Селектирование животных ранее установленной предельной дозой (-)баклофена позволяет разделить животных на 3 группы: баклофен-чувствительные (19%), баклофен-нечувствительные (15%) и умеренно чувствительные (табл. I).

Найденные различия сохраняются между этими группами животных только в том случае, если они будут находиться в условиях вивария в одной клетке. При помещении селектированных групп в отдельные клетки различия между группами быстро исчезают, т.е. вновь в каждой отдельной группе образуются баклофен-чувствительные, нечувствительные и умеренно чувствительные животные. Сохранение неизменной популяции в клетках гарантирует сохранение найденных различий как минимум в течение 20 дней. Надо отметить, что базальная моторная активность у баклофен-селектированных животных за 3 дня до селектирования

Таблица I

Селектирование мышей с помощью (-)баклофена (I мг/кг) в актометре

Подопытная группа	Кол-во животных	Число импульсов в актометре	%
Физ. раствор	20	298 ± 23	-
(-) Б а к л о ф е н			
Целая группа	155	272 ± 12	100
Нечувствительные	29	456 ± 15 ^{xx}	168
Умеренно чувствительные	106	248 ± 9	91
Чувствительные	20	91 ± 8 ^{xx, x}	33

x - $P < 0,05$ по сравнению с контролем,

xx - $P < 0,01$ по сравнению с целой группой.

и спустя 3 дня после опыта одинаковая (данные не представлены). Это дает основание утверждать, что селектирование животных происходит только по их ответу к действию баклофена.

По тесту "открытое поле" баклофен-чувствительные животные резко отличаются от баклофен-нечувствительных. Баклофен-чувствительные животные являются сильно заторможенными по всем параметрам теста "открытое поле", но при этом их двигательная активность в актометре одинаковая с баклофен-нечувствительными животными (табл. 2).

Таблица 2

Поведенческая характеристика баклофен-селектированных мышей спустя 10 дней после селектирования с помощью (-)баклофена

Поведенческие эффекты	Баклофен-нечувствительные	Баклофен-чувствительные
	А к т о м е т р	
Число импульсов	239 ± 25	249 ± 32
О т к р ы т о е п о л е		
Пройденные секторы	19,7 ± 2,7	7,3 ± 1,2 ^{xx}
Количество вставаний	6,0 ± 1,5	0,6 ± 0,2 ^{xx}
Обнюхивание отверстий	20,1 ± 2,0	8,3 ± 1,8 ^{xx}
Кол-во входов в темную камеру	3,7 ± 0,6	1,6 ± 0,2 ^x
Т е с т У Р П И		
Латентный период до обучения (с)	37 ± 7	41 ± 6
Латентный период после обучения (с)	68 ± 22	163 ± 32 ^x

$x - P < 0,05$, $xx - P < 0,01$ по сравнению с баклофен-нечувствительной группой.

Интересно отметить, что по тесту УРПИ улучшение памяти заметно только у баклофен-чувствительных животных (табл. 2). При тех же условиях у неселектированных животных всегда происходит умеренное, но достоверное улучшение памяти.

Далее выяснилось, что умеренная доза диазепам способна подавлять двигательную активность только у баклофен-чувствительных животных (рис.2). В опытах связывания с ³H-флунитразепамом было показано, что у баклофен-чувствительных мышей число мест связывания в переднем мозге и в мозжечке меньше, чем у баклофен-нечувствительных, аффинность при этом существенно не изменяется (рис.1).

Обсуждение результатов

Полученные данные свидетельствуют о том, что возможно селективировать мышей по их ответу на седативное действие (-) баклофена. Вполне вероятно, что при этом важное значение имеет социальная иерархия, образующаяся в домашних клетках мышей. Можно предполагать, что различная индивидуальная чувствительность мышей к (-)баклофену отражает разную степень активности нейрональных систем, участвующих в седативном действии баклофена. Возникает вопрос, участвуют ли ГАМК_B рецепторы в седативном действии баклофена. Показано, что только (-) изомер баклофена активен в поведенческих опытах и в опытах радиолигандного связывания с ГАМК_B рецепторами /3/, а поведенческие и нейрохимические эффекты баклофена нечувствительны к бикуккуллину /10/. Согласно имеющимся данным в ходе хронического введения фенибута, который также является агонистом ГАМК_B рецепторов, возникает толерантность к седативному действию этого препарата и перекрестная толерантность к действию баклофена в поведенческих опытах и в опытах связывания с ГАМК_B рецепторами /11/. Следовательно, седативное действие баклофена может быть связано с его действием на ГАМК_B рецепторы.

Сравнивая поведенческие эффекты баклофен-селектированных животных, можно полагать, что у баклофен-чувствительных мышей более выражены поведенческие эффекты, свойственные анксиогенным веществам. Интересно отметить, что по тесту УРПИ наблюдалось улучшение памяти только у баклофен-чувствительных животных. Этот эффект также напоминает таковой у анксио-

генных лигандов БД рецепторов (личное сообщение от dr. L.N. Jensen). Так как предполагают, что эндогенный лиганд бензодиазепиновых рецепторов может обладать свойствами, характерными для бета-карболинов /2,6/, то можно выдвинуть гипотезу, что у баклофен-чувствительных животных содержание такого рода эндогенного лиганда существенно выше, чем у баклофен-нечувствительных животных.

Косвенным подтверждением этой гипотезы служат и наши данные о состоянии БД рецепторов у баклофен-селектированных животных. Нами было установлено, что число БД рецепторов у баклофен-чувствительных значительно ниже, чем у баклофен-нечувствительных животных, а поведенческие эффекты предельных доз диазепама сильно выражены только у первых. Таким образом, баклофен-чувствительные животные являются одновременно и диазепам-чувствительными. Эти наши данные коррелируют с литературными данными, в которых показано, что у диазепам-чувствительных животных наблюдается в некоторых структурах мозга понижение числа БД рецепторов /9/.

Предполагаемое повышенное содержание эндогенного лиганда БД рецепторов у баклофен-чувствительных животных может быть причиной того, что у этих животных наблюдается пониженное содержание числа БД рецепторов и высокая поведенческая эффективность диазепама.

В заключение можно отметить, что определенный статус функциональной активности БД рецепторов служит важным звеном в реализации поведенческих эффектов баклофена. В случае, если ГАМК_B рецепторы действительно участвуют в поведенческих эффектах баклофена, то можно утверждать, что ГАМК_B рецепторы являются функционально связанными с БД рецепторами.

Выводы

1. Мышей можно селектировать на основе их реакции на (-)баклофен на две группы: баклофен-чувствительные и -нечувствительные.

2. Различия, найденные в поведенческих эффектах у селектированных животных, указывают на важную роль рецепторов ГАМК_B в реализации различных поведенческих реакций.

3. Можно полагать, что для реализации поведенческих эффектов (-)баклофена нужна определенная функциональная активность бензодиазепиновых рецепторов.

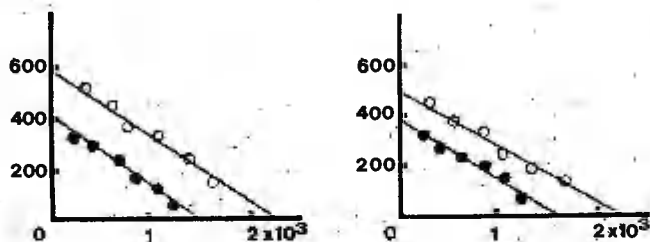


Рис. 1. Связывание ^3H -флунизепема (анализ Скэтчарда) в переднем мозге (А) и в мозжечке (Б) у баклофен-нечувствительных (—○—○) и баклофен-чувствительных (—●—●) мышей. По оси ординат: соотношение связанное/свободное; по оси абсцисс: связанное (фмоль/на мг белка)

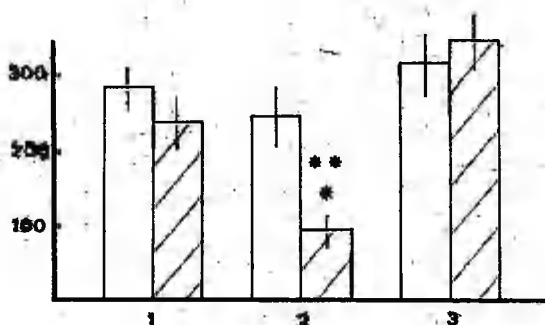


Рис. 2. Эффект диазепам (1, 5 мг/кг) на двигательную активность баклофен-селектированных мышей. 1 - неселектированные, 2 - баклофен-чувствительные и 3 - баклофен-нечувствительные животные. Светлые столбики: контроль (физ. раствор), заштрихованные столбики - диазепам. * - $P < 0,05$ по сравнению с неселектированными, ** - $P < 0,005$ по сравнению с нечувствительными.

4. Функциональная роль ГАМК_B рецепторов, возможно, заключается в регуляции активности ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса.

Использованная литература

1. Allikmets L.H., Rāgo L.K. The effect of benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 on the effects of GABA-ergic drugs//*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* - 1983. - Vol. 324. - P. 235-237.
2. Riggio G. The action of stress, β -carbolines, diazepam and Ro 15-1788 on GABA receptors in rat brain//*Benzodiazepine Recognition Site Ligands: Biochemistry and Pharmacology*/Eds. G. Biggio, E. Costa. - New York: Raven Press. - 1983. - P. 105-119.
3. Bowery N.G. Baclofen: 10 years on//*Trends in Pharmacol. Sci.* - October 1982. - P. 400-403.
4. Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L., Price G.W., Turnbull M.J., Wilkin G.P. Heterogeneity of mammalian GABA receptors//*Actions of GABA and Benzodiazepines*/Ed. Bowery N.G. - New York: Raven Press. - 1984. - P. 81-108.
5. Gallager W.D., Thomas J.W., Tallman J.F. Effect of GABA-ergic drugs on benzodiazepine binding site sensitivity in rat cerebral cortex//*Biochem. Pharm.* - 1978. - Vol. 27. - P. 2745-2749.
6. Guidotti A., Forchetti C.M., Corda M.G., Konkel D., Benet C.D., Costa E. Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogeneous polypeptide with agonistic activity on benzodiazepine receptors//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1983. - Vol. 80. - P. 3531-3535.
7. Hill D.R., Bowery N.G. ^3H -GABA binds to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain//*Nature.* - 1981. - Vol. 290. - P. 149-152.
8. Majewska M.D., Chuang D.W. Modulation by calcium of aminobutyric acid (GABA) binding to GABA_A and GABA_B recognition sites in rat brain//*Mol. Pharmacol.* - 1984. - Vol. 25. - P. 352-359.
9. Patel J.B., Stengel J., Malik J.B., Enna S.J. Neurochemical characteristics of rats distinguished as benzo-

- diazepine responders and nonresponders in a new conflict test//Life Sci. - 1984. - Vol. 34. - P.2647-2653.
10. Rágo L., Zarkovsky A. Bicuculline insensitive effects of baclofen//Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. - 1983. - Vol. 322. - P. 166-169.
 11. Rágo L. Evidence for the existence of functional link between GABA_B and benzodiazepine receptors//4th Capo Boi Conference on Neuroscience: Abstr. - 1985. - P.209.
 12. Simmonds M.A. Multiple GABA receptors and associated regulatory sites//Trends Neurosci. - July 1983. - P. 279-281.
 13. Ticku M.K. Benzodiazepine-GABA-receptor: Ionophore complex: Current concepts//Neuropharmacol. - 1983. - Vol.22. - P. 1459-1470.
 14. Young R.R., Delwaide P.J. Drug therapy: Spasticity//New Eng. J. Med. - 1981. - Vol. 304. - P. 96-99.

DEPENDENCE OF BEHAVIORAL RESPONSE TO BACLOFEN ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF BENZODIAZEPINE RECEPTORS

L.K.Rägo, R.K.Kiivet, M.A.Pöld

S u m m a r y

Mice treated with (-)baclofen (1 mg/kg) displayed profound differences to the motor depressant action of this drug. According to the differences found they were divided into three groups termed as responders, moderate and non-responders. No differences were detected in the spontaneous motor activity between the selected groups. In the holeboard the number of head-dips, locomotor activity and rears of baclofen responders was significantly lower than in non-responders. Learning capability of responders in conditioned avoidance was shown to be much better than that of non-responders. A borderline dose of diazepam (1,5 mg/kg) decreased significantly motor activity in baclofen responders but failed to do this in non-responders. Further, the apparent number of ^3H -flunitrazepam binding sites in vitro was significantly decreased in the forebrain and cerebellum of baclofen responders. The possible involvement of β -carboline-like endogenous benzodiazepine ligand in the observed differences is discussed. It is concluded that some actions of baclofen depend on the functional state of benzodiazepine recognition sites.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОАКТИВНОСТИ КИНУРЕНИНОВ

И.П. Лапин, И.В. Рыжов

Лаборатория психофармакологии Ленинградского научно-исследовательского психоневрологического института им. В.М.Бехтерева

Нейроактивность кинуренинов (метаболитов триптофана на кинурениновом пути его межучного обмена) – новая область физиологических, фармакологических и психоневрологических исследований. Они были начаты в 1969–70 гг. в нашей лаборатории и сперва касались взаимодействия кинуренинов с моноаминергическими веществами и психотропными препаратами /см. 4/. Затем внимание сосредоточилось на судорожном и возбуждающем эффектах L-кинуренина (КИН) и хинолиновой кислоты (ХИК), обнаруженных при их введении в желудочки мозга /5/. Возникшая проблема потенциальных эндогенных конвульсантов и их участия в эпилепсии представлялась чрезвычайно перспективной. В 80-годах интерес к нейроактивности кинуренинов резко возрос в мире, и к ее изучению присоединились исследования ХИК и других кинуренинов как возбуждающих нейроны физиологически активных веществ (Stone, Perkins, см. /13/), как эндогенных нейротоксинов, вызывающих подобно каиновой кислоте дегенерацию аксонов (Schwarcz et al., см. /13/). Началось определение распределения ХИК в отделах мозга человека и животных (Wolfensberger, Moroni, см. /13/), влияния кинуренинов на специфическое связывание родственных аминокислот, моноаминов, гормонов и их высвобождение. Предприняты первые поиски антагонистов нейроактивных кинуренинов. Имеющаяся сейчас информация по проблеме накоплена главным образом в последние 3–4 года. Ее краткий обзор является задачей данной статьи.

Основное внимание мы уделили центральным нейротропным эффектам кинуренинов. Но нельзя оставить без внимания и периферические, поскольку кинуренины находятся на периферии в значительно большем количестве, чем в ЦНС, так как кинурениновый путь межучного обмена триптофана у млекопитающих и человека является основным (около 90% всего триптофана, ос-

тальное - серотониновый и триптаминный пути). В ЦНС же при нормальных физиологических условиях метаболитов кинуренинового пути образуется примерно в два раза меньше, чем метаболитов серотонина. Есть и другие различия. Так, церебральная индоламин-2,3-диоксигеназа, фермент, расщепляющий триптофан до КИН в мозге, в отличие от печеночной триптофанпирролазы, выполняющей ту же функцию на периферии, не имеет гормональной индукции /II/. Фонд КИН в мозге состоит на 60% из КИН, проникшего с периферии через гематоэнцефалический барьер, и на 40% из синтезированного внутри мозга. Соотношение центрального и периферического происхождения ХИК, идентифицированной недавно в разных отделах мозга человека, крысы, морской свинки, еще не установлено /см. I3/.

Кинуренины и нейроактивные аминокислоты

Возбуждающие аминокислоты. По физиологическим эффектам и по структуре КИН и ХИК можно отнести к группе возбуждающих аминокислот, таких как глутамат (ГЛУ), аспартат (АСП) и другие. Поэтому один из основных вопросов - их действие на уровне трех главных рецепторов возбуждающих аминокислот: 1) N-метил-D-аспартатного (NMDA), 2) квинквалатного (агонисты АСП и ГЛУ) и 3) каинатного (КАИ). Так, по данным А.И.Городинского, КИН и ХИК не влияли на рецепторное связывание (^3H)-ГЛУ. ХИК также, по первоначальным исследованиям /см. I3/, не вытесняла L-(^3H)-ГЛУ или (^3H)-КАИ из Cd/Ca^{2+} -зависимых и независимых мест связывания в свежих мембранах гиппокампа крысы. Однако позже эти же авторы установили, что ХИК и кинуреновая кислота (КИК) вытесняют ГЛУ из мест специфического связывания в предварительно обработанных охлажденным тритоном гиппокампальных мембранах. По данным Ю.Е.Мандельштама и сотрудников, КИН и ХИК, у которых расстояние между карбоксильными группами соответствует расстоянию в АСП, даже в высокой ($2 \times 10^{-2} \text{M}$) концентрации, не влияли на величину мембранного потенциала мышечных волокон саранчи, где, по-видимому, наибольшее значение для передачи возбуждения имеют ГЛУ-рецепторы. КИН, ХИК, КИК и антралиловая кислота (АК) не оказывали отчетливого эффекта на систему захвата D-АСП в коре мозга крысы, что предполагает, по мнению авторов, такую же неактивность этих кинуренинов и в отношении захвата L-ГЛУ и L-АСП /см. I3/. Таким образом, в настоящее время пока нельзя сказать, связана ли нейроактивность КИН и ХИК с рецепторами для

ГЛУ и АСП (т.е. квисквалатными).

ХИК и КИН не влияли на связывание (^3H)-КАИ на мембранах мозга крысы /2/. В отношении ХИК это подтверждается и тем, что производные фосфоновой кислоты (2-амино-5-фосфоновалерат, 2-амино-7-фосфонгептанат и др.) блокировали электрофизиологические ответы и судороги, вызванные ХИК и NMDA, но не КАИ. Эти же избирательные антагонисты NMDA-рецепторов предупреждали нейротоксичность только ХИК, но не КАИ /см. 13/. Результаты предполагают, что, во-первых, ХИК и КИН действуют не через КАИ-рецепторы, во-вторых, что ХИК опосредует свое действие через NMDA-рецепторы. В наших опытах это предположение дополнили данные о том, что N-замещенные производные имидазол-4,5-дикарбоновых кислот также равноэффективно предупреждают судороги, вызванные ХИК и NMDA, но не КАИ. В дальнейшем было предположено существование двух подтипов NMDA-рецепторов, с одним из которых, по-видимому, и взаимодействуют ХИК и КИК /см. 13/.

Таким образом, на основании современных нейрофизиологических и биохимических данных можно предполагать, что КИН вряд ли взаимодействует с каким-нибудь известным рецептором для возбуждающих аминокислот. Не исключено, что для КИН в эволюции сформировался свой рецептор, подобно рецепторам для двух других нейроактивных метаболитов триптофана-серотонина и триптамина. ХИК, вероятно, действует через NMDA-рецепторы, также как и КИК. Ни КИН, ни ХИК не влияют на КАИ-рецепторы. Тормозящие аминокислоты. Неодинаковый антагонизм КИН и ХИК с тормозящими аминокислотами, таурином и глицином, которые избирательно ослабляют КИН-судороги, но не ХИК, подтверждает различный механизм их судорожного действия /6/. Пока поиски эндогенных антагонистов кинуренинов на мышцах увенчались успехом лишь в отношении КИН. Выявилась интересная деталь: в больших дозах все тормозящие аминокислоты при интравентрикулярном введении сами вызвали возбуждение и судороги. Однако в отличие от них КИН, ХИК и другие производные янтарной кислоты (ЯК) в дозах, меньших, чем возбуждающие, не обладали противосудорожным действием при введении в желудочки мозга мыши. При введении внутривентрикулярно все производные ЯК (КИН, ХИК, фталевая кислота, АСП, ГЛУ и сама ЯК) оказывали противосудорожное действие /6/, что согласуется с подобными эффектами у других групп веществ, внутри которых есть как конвульсанты, так и антиконвульсанты (например, барбитураты, бензодиазепины, β -карболины, эндорфины и др.). КИН, оказыва-

ший судорожное действие, очевидно, за счет торможения тормозных структур /см. 5/, может иметь в основе этого действия антагонизм именно с тормозящими аминокислотами в эпилептогенных зонах мозга (гиппокамп, хвостатое ядро, перегородка). Механизм судорожного действия ХИК, по-видимому, иной. Если Л-КИН, скорее всего, непосредственно "запускает" механизм судорог и принимает участие в начальных проявлениях судорожного процесса, то его метаболит ХИК - в его разветвлении и генерализации. Очевидно, поэтому дифенин и диазепам, которые влияют в основном на распространение судорожной активности, эффективны против ХИК-судорог и очень мало влияют на КИН-судороги /см. 5/.

Сопоставление структурных формул КИН и аминокислот показывает, что для ослабления судорожного действия КИН необходимо "закрывать" одновременно минимум две активные точки: одну из двух аминогрупп и карбоксильную группу /6/. Так, у таурина, наиболее избирательного антагониста КИН, имеется и наиболее объемная "головка" - SO_3H , прикрывающая карбонильную группу КИН. Глицин был более эффективен против КИН-судорог, чем против стрихниновых, хотя стрихнин - известный блокатор глициновых рецепторов в ЦНС. Можно предположить, что КИН - более сильный блокатор этих рецепторов, чем стрихнин.

Итак, судорожное действие КИН и ХИК частично связано, во-первых, с наличием в структуре фрагмента ЯК ($\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{O}$); во-вторых, в случае КИН - с блокадой действия тормозящих аминокислот глицина и таурина.

По современным представлениям внутри самой системы кинуренинов имеются и конвульсанты: КИН, 3-ОКИН, ХИК и ЯК, а также антиконвульсанты: КИК, пиколиновая (ПИК), ксантуреновая, никотиновая (НИК) кислоты, никотинамид (НАМ) и АК, эффективные против КИН и ХИК. Регуляция в этой системе осуществляется по принципу отрицательной обратной связи.

Система ГАМК

Хотя ГАМК - основной тормозной медиатор в ЦНС, она, как и ее миметик мусцимол, очень слабо противодействует КИН- и ХИК-судорогам /см. 5/. Это может быть связано с недостаточным проникновением препаратов ГАМК и мусцимола в необходимые структуры мозга через гистогематические барьеры из крови или полости мозговых желудочков. Так происходит, по-видимому, и с некоторыми ГАМК-ергическими препаратами: фени-

бутом, оксипутиратом натрия, баклофеном и фепироном, которые избирательно эффективны против судорог, вызванных КИН и ХИК на мышах, однако, не влияют при обычных путях введения на судороги у крыс, но эффективны при их введении непосредственно в гиппокамп /см. 8/. Возможно, что здесь имеет значение и то, что названные ГАМК-ергические препараты действуют в основном на ГАМК_В, а не на ГАМК_А рецепторы /10/. Судорожное действие КИН и ХИК связано, вероятно, и с их ГАМК-негативным эффектом торможением ферментов синтеза и распада ГАМК: ГЛУ-декарбоксилазы и ГАМК-трансаминазы и тем самым о замедлении обновления ГАМК /9/. Кроме того, L-КИН и бикукуллин вытесняли ³H-ГАМК из мест специфического связывания с фракциями синаптических мембран головного мозга. Авторы предполагают, что КИН может оказывать прямое действие на рецепторы ГАМК в дополнение к их влиянию на обмен ГАМК /12/.

Кинуренины и бензодиазепины

Идея о воздействии КИН на рецепторы бензодиазепинов (БДЗ) возникла в 1983 г., когда было найдено, что НК, НАМ, инозин и гипоксантин, предполагаемые эндогенные лиганды БДЗ-рецепторов (БДЗР), препятствовали судорожному эффекту КИН сильнее, чем коразолу /7/. БДЗ, наоборот, в малых дозах предупреждают коразоловые судороги, но даже в больших крайне слабо влияют на КИН-судороги /7/. Структура КИН сходна с бензофенонами, метаболитами диазепам, и имеет четыре общих с диазепамом фрагмента, являющихся важными для связывания с БДЗР. Сами БДЗ - универсальные антиконвульсанты, проявляли уникально низкую эффективность против судорог, вызванных КИН и ХИК. Основываясь на близком структурном и функциональном сходстве КИН и диазепам, было предположено, что КИН может быть возможным эндогенным модулятором или лигандом БДЗР или части этого рецептора и участвовать в генезе тревоги /7/. В отношении ХИК и других метаболитов КИН-подобные взаимосвязи пока не обнаружены.

Определения *in vitro* показали (В.В. Рожанец, А.М. Марковский, А.Я. Корнеев, Volicer), что КИН и ХИК в концентрациях до 10^{-4} М не изменяли специфическое связывание ³H-диазепам и ³H-флуниотразепам тканью мозга мыши и крысы /см. 13/. Отрицательные результаты были получены и на препаратах гиппокампа крысы (Volicer). Вопреки ожиданиям, основанным на тормозящем влиянии КИН и ХИК на скорость обновления ГАМК

/9/, оба вещества не изменяли связывание ^3H -диазепама, ускоренное добавлением ГАМК (TicKu). Опыты *in vitro* могли, естественно, ответить только на вопрос, воздействуют ли испытанные кинуренины прямо на БДЗР-комплекс. Однако нас интересовал прежде всего другой вопрос: реализуются ли физиологические эффекты кинуренинов, например, возбуждающий и судорожный, через этот комплекс. Так как эти эффекты наблюдаются *in vivo*, для ответа на вопрос и эксперименты следовало провести *in vivo*, поскольку нельзя исключить, что не сами КИН и ХИК влияют на комплекс, а их более активный метаболит или какой-то известный или еще неизвестный лиганд БДЗР-комплекса, высвобождаемый кинуренинами. Опыты *in vivo* стали проводить в последнее время. Окончательные результаты еще не сообщены.

После открытия среди семи субъединиц ГАМК-БДЗ-хлорионофорного комплекса барбитуратно-пикротоксиновой, нами был проведен ряд исследований для выяснения связи между активностью кинуренинов и этой субъединицей, ответственной, по многочисленным работам /см. 14/, за эффекты многих конвульсантов и антиконвульсантов. Обнаружено, что все антагонисты КИН и ХИК (КИК, ПИК, фенибут, баклофен и др.) избирательно эффективны и против пикротоксиновых судорог, в судорожное действие КИН и ХИК избирательно потенцировалось также только пикротоксином среди других конвульсантов. Было предположено, что эти конвульсигенные кинуренины опосредуют свое действие через барбитуратно-пикротоксиновую субъединицу комплекса. Ранее нами было найдено, что барбитураты (фенобарбитал, гексамидин, бензонал) - антагонисты КИН и ХИК /см. 5/. Кроме того, исследования радиолигандным методом показали, что ХИК действительно вызывает торможение связывания ^3H -*t*-бутилбициклофосфотрионата, лиганда, специфически связывающегося с барбитуратно-пикротоксиновой субъединицей ГАМК-БДЗ-хлорионофорного комплекса /см. 14/. Прямое действие же КИН очень слабое, что побуждает искать медиаторы его эффекта.

Кинуренины и катехоламины

На периферии кинуренины уменьшают прессорный и усиливают гипертермические эффекты норадреналина. Центральный эффект - удлинение фенаминовых стереотипий на крысах связан, вероятно, с повышением чувствительности дофаминовых рецепторов /см. 4/.

При интравентрикулярном введении мышам дофамин, норадреналин и адреналин предупреждали КИН- и ХИК-судороги, а галоперидол, блокатор дофаминовых рецепторов, предупреждал защитный эффект дофамина /8/. В наших опытах все исследованные нейролептики (бутирофеноны, фенотиазины и резерпин) вызвали "доза-зависимое" потенцирование судорог, вызванных КИН и ХИК. Полученные данные предполагают значительное участие катехоламинов в механизмах КИН- и ХИК-судорог. Это относится прежде всего к дофаминовым рецепторам и α_1 -адренорецепторам, так как изадрин, преимущественный агонист β -адренорецепторов, йохимбин (α_2 -адреноблокатор) и клонидин (агонист α_2 -адренорецепторов) оказывали очень слабое влияние на оба вида судорог. Интересно, что β -адреноблокаторы - пропранолол и пиндолол - оказывали отчетливое защитное действие против КИН- и ХИК-судорог. Однако этот эффект, по-видимому, опосредован тем, что блокируя в ЦНС β -адренорецепторы, пропранолол и пиндолол усиливают воздействие эндогенного норадреналина на α_1 -адренорецепторы. Это подтверждается тем, что фентоламин, блокирующий α_1 -адренорецепторы, предупреждает и защитный эффект β -адреноблокаторов.

Кинуренины и серотонин

Имея общий предшественник-триптофан, КИН и серотонин обладают противоположными эффектами: КИН - антисеротониновой активностью, а серотонин, его предшественник 5-окситриптофан и серотонинергический препарат мексамин - антикинурениновой: ослабляют КИН-судороги /8/. Антисеротониновое действие КИН было обнаружено на изолированной кишке морской свинки по уменьшению сокращений, вызванных серотонином /см. 4/. Подобным эффектом обладали и 3-оксиантраниловая, АК и 3-оксикинуренин. КИН и некоторые его метаболиты уменьшали депрессорный эффект серотонина у наркотизированных крыс /3/. КИН и эти же метаболиты кроме периферического антисеротонинового действия обладали и центральным: они уменьшали количество встряхиваний головы, вызванных 5-окситриптофаном, понижали концентрацию церебрального серотонина на 30%. Внутривентрикулярные инъекции КИН, 3-оксикинуренина и 3-оксиантраниловой кислоты вызвали снижение содержания серотонина и 5-оксииндолацетата в мозге. Антисеротониновая активность кинуренинов может, вероятно, усилить последствия дефицита серотонина в мозге /см. 4/. Уменьшение синтеза серотонина в мозге после инъекции КИН

и его метаболитов не является следствием их прямого влияния на триптофан-5-гидроксилазу или декарбокксилазу. Даже в высоких дозах КИН и его метаболиты мало влияют на активность этих ферментов *in vitro*. Возможно, здесь происходит повышение потребности в пиридоксале, и это может привести к уменьшению образования серотонина в результате низкой активности 5-окситриптофандекарбокксилазы, которая является пиридоксаль-зависимой. Возможно также, что значительную роль в снижении концентрации серотонина в мозге после "периферической" инъекции КИН и 3-оксикинуруенина может играть торможение ими транспорта триптофана /II/.

КИН и его метаболит кинурамин в концентрации 1 мМ не вытесняли ³H-серотонин из мест его связывания на мембранах фронтальной коры мозга людей, взятых посмертно /см. I3/. Предварительное введение серотонинергического нейротоксина 5,7-диокситриптамина не вызывало изменения концентрации ХИК, что говорит, по-видимому, об отсутствии взаимоотношений между серотонинергическими нейронами и местами, где синтезируется ХИК /см. I3/.

Таким образом, существующие взаимоотношения между КИН и его метаболитами и серотонином предполагают наличие лишь функционального, а не рецепторного антагонизма.

Кинуруенины и ацетилхолин

Большинство данных по взаимодействию этих веществ получено на периферических органах. КИН, 3-оксикинуруенин, 3-оксиантраниловая кислота, АК и ПИК усиливали сокращения изолированной прямой кишки крысы, вызванные ацетилхолином (возбуждение М- и Н-холинорецепторов). Сократительная реакция френикодиафрагмального препарата 7-8-дневных крысят на ацетилхолин (возбуждение Н-холинорецепторов) ослаблялась КИН, 3-оксикинуруенином и ХИК /I/. Если принять, что на кишке ацетилхолин вызывает сокращение за счет возбуждения, в основном, М-холинорецепторов, то можно допустить, что КИН оказывает М-холинопозитивное и Н-холинонегативное действие. Однако КИН и ХИК в большинстве опытов не влияли на центральные эффекты оксотреморина (возбуждение, в основном, М-холинорецепторов), а эффекты никотина усиливали ХИК, НК и КИН. Эти результаты показывают, что повышение уровня кинуруенинов в организме может изменять центральные и периферические холин-ергические процессы, но противоположно.

Центральное действие изучалось на модели судорог, вызванных КИН и ХИК на мышцах. М-холинолитики: амизид, атропин, хлорадазин и Н-холинолитики: пентафен, арпенал не изменяли судорожного порога КИН и ХИК. Биохимические исследования, однако, показали, что ХИК способствует высвобождению ацетилхолина из срезов стриатума крысы /см. 13/. Таким образом, в настоящее время нельзя определенно сказать о характере взаимоотношений кинуренинов с ацетилхолином.

Итак, современные представления о молекулярных механизмах нейроактивности кинуренинов основываются на данных, полученных в последние 3-4 года, а поэтому с неодинаковой полнотой отражают пока лишь некоторые из этих механизмов. В обзор не включен ключевой вопрос о наличии или отсутствии в ЦНС специфических рецепторов для кинуренинов, поскольку, по предварительным данным, не найдены места специфического связывания ^3H -ХИК, а для КИН и других кинуренинов это не исследовано из-за отсутствия меченых препаратов. Пока нет информации и о взаимоотношении кинуренинов с другими эндогенными конвульсантами: бета-карболинами, эндорфинами, фолатами и др. Тесно связана с вопросами взаимодействия с моноаминами и локализация нейротропных эффектов кинуренинов. По существу единственной структурой мозга, исследованной подробно, является гиппокамп, да и то в отношении нейротоксичности ХИК и судорожного эффекта ХИК и КИН. Еще не поднимался вопрос и о воздействии кинуренинов на опиатные и гормональные рецепторы, хотя косвенные поведенческие данные предполагают вероятность его. Разнообразие нейротропных эффектов и распространенность кинуренинов в ЦНС, их взаимодействие с физиологически активными веществами говорят об актуальности проблемы молекулярных механизмов нейроактивности кинуренинов для широкого круга исследователей.

Использованная литература

1. Бельгова И.Н., Лапин И.П., Неженцев М.В., Уманская Л. Г. Влияние кинуренинов на эффекты ацетилхолина, оксотреморина и никотина // Фармакол. и токсикол. - 1981. - № 2. - С. 163-166.
2. Жарковский А.М., Жарковская Т.А. Анализ связывания ^3H -каиново́й кислоты с мембранами мозга крысы и лягушки // Бюл. экпер. биол. и мед. - 1985. - № 5. - С. 586-589.

3. Lapin I.P. Interaction of kynurenine and its metabolites with tryptamine, serotonin and its precursors and oxotremorine//Psychopharmacol. - 1972. - Vol. 26. - P. 237-247.
4. Лапин И.П. Кинурениновый путь обмена триптофана и его роль в функции нервной системы и в действии психотропных препаратов//ЖВХО им. Д.И. Менделеева. - 1976. - № 2. - С. 151-157.
5. Lapin I.P. Kynurenines and seizures//Epilepsia. - 1981. - Vol. 22. - P. 257-265.
6. Лапин И.П. Влияние аминокислот на судороги, вызываемые кинуренином и хинолиновой кислотой (связь между химическим строением и действием)//Достижения современной нейрофармакологии. - Л., 1982. - С. 80-86.
7. Lapin I.P. Structure-activity relationships in kynurenine, diazepam and some putative endogenous ligands of the benzodiazepine receptors//Neurosci. Biobehav. Rev. - 1983. - Vol. 7. - P. 107-118.
8. Lapin I.P. Endogenous antagonists of quinolinic acid and kynurenine as links of the defensive mechanism in epilepsy//Acta Neurol. - 1985. - Vol. 40. - P. 203-206.
9. Лапин И.П., Никитина З.С., Сытинский И.А. Снижение активности ферментов обмена гамма-аминомасляной кислоты головного мозга под влиянием кинуренинов судорожного действия//Вопр. мед. химии. - 1981. - № I. - С. 27-30.
10. Ягю Л. К., Нурк А.М., Корнеев А.Я., Алликметс Л.Х. О связывании фенибута с бидукуллин-нечувствительными рецепторами ГАМК в мозге крыс//Блл. эксп. биол. и мед. - 1982. - № II. - С. 58-59.
11. Gal E.M., Sherman A.D. L-kynurenine: Its synthesis and possible regulatory function in brain//Neurochem. Res. - 1980. - Vol. 5. - P. 223-239.
12. Pinelli A., Govoni S., Ossi G., Battanini F., Caimi B.B., Trivulgio S. Kynurenine may directly interact with GABA receptors in rat brain//Pharmacol. - 1985. - Vol. 30. - P. 255-258.
13. Stone T.W., Connick J.H. Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system//Neurosci. - 1985. - Vol. 15. - P. 597-617.
14. Ticku M.K., Maksay G. Convulsant/depressant site of action at the allosteric benzodiazepine-GABA receptor ionophore complex//Life Sci. - 1983. - Vol. 33. - P. 2363-2375.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE NEUROACTIVITY OF KYNURENINES

I.P.Lapin, I.V.Ryzhov

S u m m a r y

A brief review of the recent data, ideas and reflections on this problem, particularly on the convulsant and stimulant effects of kynurenines is given. The major items include interactions with the excitatory and the inhibitory amino acids, respective receptors, benzodiazepine receptors, interactions with catecholamines, serotonin, acetylcholine. It is concluded that the neuroactivity of kynurenines as a new field of physiological, pharmacological and psychoneurological research deserves further studies in the following directions: the specific binding sites for the most active metabolites, e.g. 1-kynurenine and quinolinic acid, interactions with other endogenous convulsants (beta-carbolines, endorphines, folates etc.), brain structures determining the excitatory and the convulsant effects.

ОСОБЕННОСТИ АНТИДЕПРЕССИВНОГО И НЕЙРОХИМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПИРАЗИДОЛА

М.М.Козловская, А.В.Вальдман, В.В.Кушнарев, А.П.Музыченко

НИИ фармакологии АМН СССР, ВНИИ общей и судебной
психиатрии им. В.П.Сербского

В течение долгого времени антидепрессивные препараты были представлены главным образом трициклическими соединениями и в меньшей степени ингибиторами MAO. Однако терапевтическому действию этих препаратов сопутствует ряд побочных эффектов (тахикардия, изменение артериального давления, сухость слизистых и др.), ограничивающих их применение. Поиск новых антидепрессантов в ряду четырехциклических систем оказался весьма плодотворным. Во ВНИХФИ им. С. Орджоникидзе было синтезировано соединение с высокой антидепрессивной активностью, получившее название пиразидол (пирлиндол). Клинические наблюдения показали, что пиразидол обладает своеобразными психотропными свойствами, сочетающими собственно тимоаналептический, активирующий и седативный эффекты, и может применяться при лечении как легких, так и тяжелых депрессивных состояний /7/. Недостаточная изученность индивидуальных психотропных свойств пиразидола в эксперименте, а также неоднозначное представление о его терапевтических свойствах побудили нас более детально, в модельных условиях на животных, исследовать особенности действия препарата на эмоционально-поведенческие проявления, с последующим сопоставлением полученных данных с результатами клинического испытания упомянутого препарата.

Методы исследования

Изучение особенностей развития антидепрессивного действия пиразидола и его индивидуального психофармакологического профиля проводилось в опытах на кошках, предварительно тестируемых по исходному эмоционально-поведенческому статусу /2, 6/,

Оценивался спектр эмоционально-поведенческой реактивно-

сти и характер зоосоциальных отношений с количественным учетом эмоциональных и поведенческих проявлений (в условных единицах – баллах) на основе оценочных "шкал суждения" /2/.

На двух оригинальных моделях депрессивноподобных состояний, развивающихся у кошек, или на основе тонического страха, возникающего после повторных аверсивных воздействий /4/, или после введения резерпина, нарушающего баланс нейрохимических систем мозга, выявились антидепрессивные свойства препарата и динамика его эффекта при остром (однократном) и хроническом (курсовом) введении.

Для количественной оценки выраженности депрессии и эффекта препарата помимо ранее используемого метода применялся метод информационно-статистической классификации /II/, адаптированный к экспериментальным психофармакологическим исследованиям.

В нейрохимических опытах изучалось влияние пиразидола на захват нейромедиаторов (использовалась грубая синаптосомальная фракция из мозга крыс). Радиоактивность определяли с помощью сцинтилляционного счетчика фирмы "Интертехника" с вычислением среднего числа распадов в минуту. Белок определяли по методике Лоури. Результаты обрабатывали статистически с вычислением средних величин и их достоверности при $p=0,05$.

Результаты исследования

Резерпиновая модель депрессии поведения. Эксперименты выполнены на 8 кошках (самцы) с полноценным спектром эмоциональной реактивности и активной формой поведения, выраженной мотивационной активностью (осуществление поведения, связанного с добыванием пищи, охотой, преодолением препятствий, реализацией активного выбора пути избегания при аверсивном раздражении, ориентировочно-исследовательского, поискового поведения) и доброжелательной формой поведения с партнерами по группе (по нашей классификации они были отнесены к I типу). Через 18–20 часов после введения резерпина у животного развивалось патологическое депрессивноподобное состояние, проявляющееся сужением спектра эмоциональной реактивности (с подавлением проявлений положительных эмоций и активно-аффективных форм проявления негативного эмоционального реагирования), редукцией мотивационной деятельности, гиподинамией с развитием каталепсии и позы "оцепенения", нарушением адек-

ватности реагирования и зоосоциальных контактов, а также вегетативными сдвигами (диарея, миоз, расслабление 3-го века), снижением ректальной температуры и ежедневной потерей веса от 50 до 150 г. Депрессия имела хроническое течение с постепенным восстановлением поведения к 6-7 суткам наблюдения.

Повторное введение (в течение 2-3 суток) пиразидола сопровождалось отчетливым антидепрессивным эффектом с редукцией эмоционально-поведенческих и, в меньшей степени, вегетативных компонентов симптомокомплекса депрессии (табл. 1). Ведущим в развитии эффекта пиразидола было расширение (восстановление) спектра проявлений положительных эмоций. Появлялись адекватная реакция на ласку, элементы игривого, исследовательского поведения. Ослабевали страх (в пассивном его проявлении), негативная вокализация, конфликтность при зоосоциальных контактах, появлялись мотивационная активность - поиск пищи, избегание аверсивного воздействия, подход к отдельным предметам, охота. Однако интенсивность проявлений мотивационных и особенно соматомоторных реакций оставалась сниженной. Полное устранение симптомокомплекса депрессии (на третьи сутки) сопровождалось расширением спектра проявлений положительных эмоций, снижением конфликтности при зоосоциальных контактах с партнерами.

Реактивное депрессивноподобное состояние. Эксперименты выполнены на 6 кошках (самцах), предварительно тестируемых по исходному эмоционально-поведенческому статусу. Повторное помещение животных, исходно проявляющих повышенный уровень тревожности (П тип, по нашей классификации), в экспериментальную ситуацию неизбежного аверсивного раздражения вызывало у них через 3-5 дней устойчивое реактивное состояние с депрессией поведенческой и моторной активности, протекающей на фоне высокого уровня эмоционального напряжения и страха (табл. 2). На фоне устойчивого негативного состояния отмечались редукция проявлений положительных эмоций, подавление мотивационных реакций охоты, добывания пищи, избегания аверсивных воздействий, акинезия на фоне повышенного мышечного тонуса, нарушения адекватности реагирования.

Пиразидол устранял реактивное депрессивноподобное состояние после введения небольших доз (2,5-3 мг/кг дважды в сутки) (табл. 2). Отмечалось расширение спектра эмоциональной реактивности за счет восстановления проявлений положительных эмоций и ориентировочно-исследовательской активности. Инициативность поведения, способность к достижению цели

Таблица I

Показатели активности проказовиди в дерматитанне проказенка депрессийк, анимальной резерванком у коньок, м
ка употребленне последуицих введения пиразидола

Признаки (показатели)	Норма (M-m)	Через 18 часов на фоне резерпина	Через 3 часа после однократного введения пиразидола 15 мг/кг	К концу I-x суток лечения после 2-кратного введения пиразидола	К концу 2-x суток после 4-кратного введения пиразидола
Эмоциональный состав	6 ± 1,89	11,2 ± 1,5xx	2,93 ± 0,4x	3,66 ± 0,8x	1,66 ± 0,8x
Позитивное	6,75 ± 1,06	1,28 ± 0,45xxx	5,0 ± 0,8x	10,0 ± 1,3	8,0 ± 1,7
Мотивационная активность	24,12 ± 2,53	2,22 ± 0,76xxx	13,75 ± 5,0xx	20,0 ± 1,7	17,7 ± 1,7x
Фрагментативности поведенческих реакций (элементы неадекватности)	0,0	11,5 ± 0,45xxx	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,0
Моторная активность для активности	3,5 ± 0,53	0,75 ± 1,5xxx	0,7 ± 0,4xx	1,0x	1,25 ± 0,4x
Заторки-запности	0,0	11,75 ± 1,5xxx	11,0 ± 0,8xxx	4,0 ± 1,7xx	3,7 ± 1,3xx
Вегетативные реакции (дисфункции)	0,0	13,62 ± 1,36xxx	12,7 ± 1,3xxx	6,7 ± 0,8xx	2,7 ± 0,4x

Примечание: как при $p < 0,001$, как при $p < 0,01$, x при $p < 0,1$. Цифры в таблице - среднее (M_{ср}) значение выраженности (x баллов) регистрируемых признаков.

Основные проявления комплекса реактивного депрессивноподобного состояния и их устранение при введении тиразидола

Таблица 2

Основные проявления (признаки)	Проявление симптомов/мелко-наки	Тиразидол, мг/кг	5-7
Основные проявления (признаки)	Проявление симптомов/мелко-наки	2,5	5-7
Трансформация исходного спектра эмоциональной реактивности	Подавление проявлений положительных эмоций Эмоциональное напряжение негативного характера Страх, тревога	Восстановление проявлений положительных эмоций Ослабление	Ослабление
Устранение побуждающих мотивов в поведении	Врядность, конфликтность при контактах, злобность	Сохранение	Устранение
Понижение (устранение) реакции (настораживание)	Подавление собственных данному животному мотивационных реакций (охоты, пищевой, зоосоциальных и пр.)	Восстановление мотивационного поведения: исследование, поисковое, пищевого, изобгательного, охоты	Появление стремлений к доминированию, доброжелательным коммуникационным взаимоотношениям
Психомоторное торможение	Затруднение начала двигательного акта Незавершенность начатого действия	Ослабление	Устранение
	Ослабление (утрата) внешних проявлений реакций внимания	Ослабление	Устранение
	Отказ от моторной деятельности	Не наблюдается	Не наблюдается
	Длительное (часами) сокращение продолжительности, отсутствие	Сокращается	Сокращается
	Щепетливость, робость, ступор	Ослабление	Устранение

(кормушек с пищей, объекта охоты, реализация поведения избегания, преодоления препятствий) нормализовались. Групповой статус животного, резко пониженный на фоне депрессивного состояния, восстанавливался.

Составляющие симптомокомплекса реактивного депрессивно-подобного состояния проявляли высокую чувствительность к действию пиразидола; эффект которого даже при однократном введении отмечался в минимальных дозах (2,5 мг/кг).

С увеличением дозы пиразидола (15-25 мг/кг животное стремится занять доминирующее положение в группе, возрастает спровоцированная конфликтность взаимообусловленного поведения и агрессивность, возникающая на провоцирующие тест-воздействия и при невыполнении партнером этологически значимых компонентов взаимообусловленного поведения.

Предпочитаемая мотивация (и их последовательность) определялась путем попарного предъявления животному тест-объектов (или целей). Как видно из таблицы 3, по мере увеличения дозы препарата лидирующее положение занимает вначале стремление к исследовательской деятельности, затем доминирование в группе, свидетельствующее, по-видимому, о высоком зооресоциализирующем действии пиразидола.

Влияние пиразидола на захват нейромедиаторов. Было оценено влияние пиразидола на захват синапсосомами мозга ^3H -серотонина (удельная активность 12 Ки/мМ, "Amersham"), ^3H -ГАМК (10 Ки/мМ, "Amersham"), ^{14}C -Глутамата (50 м Ки/мМ, "Amersham"). Опыты проведены на грубой синапсосомальной фракции мозга беспородных крыс весом 180-200 г. В концентрации 50 мкМ пиразидол, в отличие от имипрамина, незначительно ингибировал обратный захват серотонина и достоверно не влиял на захват ГАМК и глутамата (табл. 4). Было показано, что пиразидол при малых концентрациях (50 мкМ) в меньшей мере, чем имипрамин тормозит захват норадреналина (НА). Однако примерно в том же диапазоне концентраций ($1 \cdot 10^{-6}\text{M}$) пиразидол тормозил (на 50%) дезаминирование НА митохондриями мозга за счет угнетения MAO типа А. Угнетение дезаминирования серотонина развивалось при более высоких концентрациях пиразидола (10^{-5}M). Известно, что захват и высвобождение нейромедиаторов тесно сопряжены с состоянием мембранных транспортных АТФ-аз /5/: как пиразидол, так и имипрамин в высоких концентрациях (500 мкМ) снижают активность Na, K-АТФ-азы. При этом существенно нарушается захват не только НА и 5-ОТ, но и ГАМК и глутамата (табл. 4), что, видимо, отражает неспецифическое

Таблица 3

Динамика развития иерархий мотиваций при повторном введении пиразидола на фоне развития реактивного депрессивноподобного состояния

Тип мотивационной активности	Норма	Депрес- сия	Пиразидол, мг/кг		
			5	10	25
Избегание условий опыта	3	2	6	7	4
Избегание ситуации электроножного раздражения (без дополнительного подкрепления)	2	1	5	6	3
Избегание конфликтных взаимодействий с партнером	8	4	0	0(8)	0
Стремление к свободной форме поведения	6	0	4	5	2
Исследовательская активность	7	0	1	4	5
Процесс охоты	1	0	2	3	6
Поедание вкусной пищи	4	0	3	2	7
Побег в виварий	0	5	0	0	0
Укрытие в черной камере	5	3	0	0	0
Драки с партнером (за доминирование в группе)	9	0	7	1	1

Примечание: цифры в таблице - порядковый номер предпочитаемой мотивации (или иерархия мотивации на момент определения).

Таблица 4

Влияние пиразидола на обратный захват нейромедиаторов грубой синапсосомальной фракцией мозга крыс

Концентрация - мкМ	Захват, % от контроля		
	³ H-серотонин	³ H-ГАМК	¹⁴ C-глутамат
Контроль	100 ± 9	100 ± 10	100 ± 10
Имипрамин 50	30 ± 2	78 ± 9	85 ± 4
500	18 ± 5	14 ± 2	42 ± 3
Пиразидол 50	71 ± 8	99 ± 15	95 ± 10
500	26 ± 3	31 ± 4	63 ± 7

Примечание: за 100% принята величина захвата серотонина, которая составляет 13,8 нмоль на 1 кг белка, ГАМК - 4 нмоль на 1 кг белка и глутамата - 3 нмоль на 1 кг белка за 20 мин.

мембранотропное действие антидепрессантов и коррелирует с проявлением общеседативного эффекта этих соединений.

Наши результаты, полученные нами в опытах, могут быть интерпретированы с точки зрения нейрохимических особенностей действия пиразидола /7/. В экспериментах М.Д. Машковского и Н.И. Андреевой /7/ было обнаружено, что на фоне пиразидола (10, 25 мг/кг) 5-окситриптофан вызывает у мышей феномен "встряхивания головы", который связывают с увеличением мозгового серотонина. В экспериментах Н.А. Паткиной /10/ было показано, что 5-окситриптофан и препараты, увеличивающие содержание серотонина в мозгу, усиливают феномен самостимуляции и ослабляют интенсивность "наказующих" свойств зон негативности при их активации. Пиразидол, как показали проведенные нами опыты, тормозит захват серотонина и оказывает, по данным М.Д. Машковского и Н.И. Андреевой /7/, тормозящее действие на активность моноаминоксидазы. Можно полагать, что резкое и (в начальных дозах) избирательное расширение спектра положительных эмоций у животных является поведенческим выражением активации серотонинергической системы мозга, связанной с "наградой". Возможно, что устранение феномена "негативности" на фоне небольших доз препарата является результатом реципрокного подавления зон "наказания" и "негативности".

Как показали наши эксперименты, пиразидол нарушает захват ГАМК синапсомозгами мозга, что, по-видимому, объясняет его седативное и антифобическое действие, отличающееся от эффекта транквилизаторов.

Пиразидол уменьшает депримирующее действие резерпина. Полагают /7/, что препарат активно тормозит интранейрональный захват норадреналина в меньших дозах и обладает антимоноаминоксидазным эффектом в больших /8/. Центральное адренопозитивное действие препарата, вероятно, лежит в основе усиления спровоцированных реакций активно-оборонительного типа. Возможно также, что активация адренергических систем, связанных с механизмами "наказания", обуславливает двухфазность действия пиразидола на выраженность проявлений положительных эмоций.

Полученные данные, иллюстрирующие рост пассивности поведения котов на фоне больших доз препарата, совпадают с результатами опытов М.Д. Машковского и Н.И. Андреевой /7/, показавших депримирующее действие препарата (25-50 мг/кг) на спонтанное поведение.

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о тропизме пиразидола к моделированным у животных депрессивным состояниям различного генеза (реактивное депрессивноподобное состояние и резерпиновая депрессия поведения).

Клинические испытания пиразидола проводились в Психофармакологическом центре Фармакологического комитета Управления по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники Минздрава СССР в общей сложности у 87 больных. Преобладали женщины с эндогенными депрессивными расстройствами, являющимися эталонными для изучения антидепрессантов (табл. 5).

Исследуемый препарат применялся в клинически разнородных группах больных. Подобный подход давал возможность получить максимально обширную информацию об эффективности изучаемого препарата у больных с разными в клиническом отношении состояниями.

Наряду с признаками, представленными в таблице 5, учитывался еще ряд факторов, способных исказить оценку эффективности лечения пиразидолом (частота предшествующих приступов, продолжительность заболевания, повышенная резистентность к лечению в предшествующих приступах и пр.). Поэтому испытание препарата не проводилось на больных, перенесших Ю и более приступов (фаз), а также пациентах с ранее наблюдавшимися резистентными к терапии депрессивными состояниями.

Препарат назначался, как правило, на чистом фоне, реже в комбинации с другими психотропными лекарственными средствами (нейролептики, транквилизаторы). В этих случаях дозы сопутствующей терапии оставались стабильными на протяжении всего курса лечения, изменялась только дозировка изучаемого антидепрессанта, что позволило отграничить эффективность пиразидола от действия других лекарственных средств.

Положительный терапевтический эффект наблюдался у 57 пациентов (65,5% случаев), получавших пиразидол. Эффект пиразидола начинал проявляться с 3 дня лечения и выражался прежде всего в уменьшении выраженности анергических расстройств, сниженного побуждения, заторможенности, вялости, слабости, повышенной утомляемости (рис. I). Изначальное стимулирующее действие препарата доминировало примерно до середины 2-ой недели лечения. На протяжении всего остального курса терапии преобладающим являлось собственно тимолептическое действие пиразидола, приводящее к ослаблению депрессивного витального аффекта, с уменьшением чувства тоски, явле-

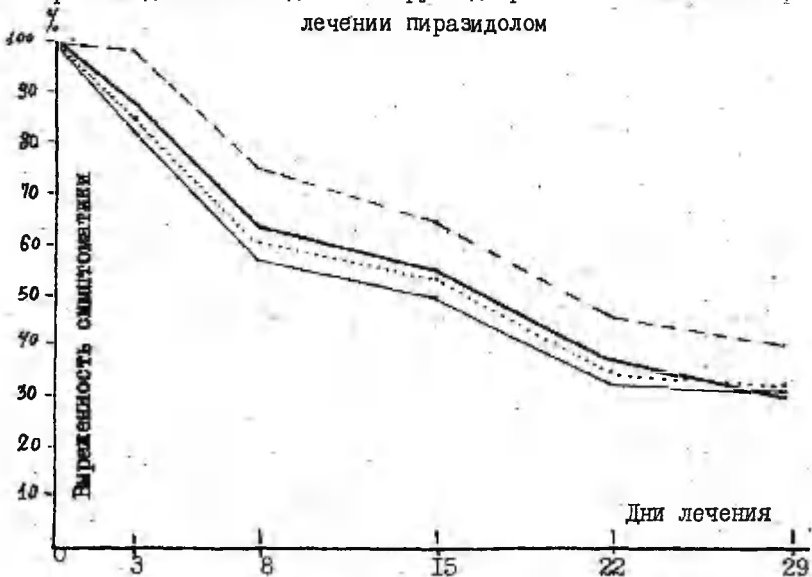
Таблица 5

Общая характеристика больных

Учитываемые признаки		Пиразидол абс. %	
Пол:	муж.	22	25,3
	жен.	65	74,7
Возраст:	до 20 лет	9	10,9
	21-30 лет	20	22,9
	31-40 лет	22	25,3
	41-50 лет	25	28,7
	51-60 лет	11	12,6
Диагноз:	Шизофрения	64	73,4
	МДП	20	24,0
	Реактивная депрессия	3	3,6
Квалификация состояния:	Астено-адинамическая депрессия	29	33,3
	Тревожная депрессия	22	25,3
	Депрессивно-бредовое состояние	15	17,3
	Классическая депрессия	13	14,9
	Депрессия с заторможенностью	8	9,2
Всего:		87	100,0

Рисунок I

Обратная динамика отдельных групп депрессивных симптомов при
лечении пиразидолом



Примечание: группы симптомов — тимпатических, — анергических, - - - тревоги, социальной и трудовой адаптации. x при $P \leq 0,05$.

ний депрессивной деперсонализации и дереализации, депрессивной самооценки и улучшению настроения. Уменьшение тревожных расстройств начинало выявляться в более поздние сроки, с 8-10 дня лечения, а редукция симптомов тревоги была более медленной, чем обратная динамика других психопатологических расстройств.

Однако к 29 дню лечения (срок наблюдения за больными в настоящем исследовании) было отмечено статистически достоверное уменьшение выраженности всех депрессивных признаков.

Особый спектр психотропной активности пиразидола, определяющий эффективность его действия на тимопатические, анергические и тревожные расстройства, обуславливал отсутствие в период клинического изучения препарата резкой смены настроения или инверсии фаз, возникновения или усиления возбужденности, раздражительности или резких нарушений сна, что в свою очередь способствовало быстрому восстановлению социальной и трудовой активности больных.

Особенность действия пиразидола на отдельные психопатологические симптомы определяла его эффективность в типологически разнородных группах депрессивных больных (табл. 6).

Таблица 6

Эффективность лечения пиразидолом больных с различной квалификацией состояния

Квалификация состояния	Количество больных абс/%	Эффективность терапии	
		+ абс/%	- абс/%
Астено-динамическая депрессия	29 100	21 ^x 72,4	8 27,6
Классическая депрессия	13 100	9 ^x 69,2	4 30,8
Депрессия с заторможенностью	8 100	5 ^x 62,5	3 37,5
Тревожная депрессия	22 100	13 ^x 59,1	9 40,9
Депрессивно-бредовое состояние	15 100	9 ^x 60	6 40
Всего:	87 100	57 ^x 65,6	30 34,4

Примечание: x при $P < 0,05$.

Анализ данных эффективности пиразидола при различных депрессивных состояниях также показал, что чем проше струк-

тура депрессии и чем более выражены анергические и адинамические расстройства в клинической картине состояния, тем лучше прогноз при применении препарата. Напротив, полиморфизм клинической картины депрессий, или большая доля тревожных расстройств обуславливали получение отрицательных результатов. Это является следствием определенной зависимости между особенностями психотропной активности пиразидола на симптоматическом и синдромологическом уровнях, с некоторым преимущественным воздействием на астенические и адинамические симптомы в структуре депрессии, а также депрессивные состояния астено-анергического типа. Особенности терапевтического действия пиразидола на отдельные группы психопатологических расстройств (рис. 1), а также выраженная эффективность препарата при лечении депрессий разного типа (табл. 6) не позволяют относить его к антидепрессантам с избирательным спектром психотропной активности.

В настоящем исследовании подтверждается высказанное ранее рядом авторов мнение о широком спектре антидепрессивного действия пиразидола /1, 9/.

Результаты клинического исследования пиразидола совпадают с полученными в эксперименте данными о влиянии препарата на отдельные поведенческие проявления животных при моделировании депрессивноподобных состояний. Достаточно полное совпадение выявленного в модельных ситуациях на животных индивидуального спектра психофармакологического профиля пиразидола с клиническими данными свидетельствует о перспективности использования моделей депрессии (реактивное депрессивное состояние; резерпиновая модель депрессии поведения) для выявления особенностей антидепрессивной активности новых соединений на этапе их доклинического исследования.

В свою очередь, выявленные причинно-следственные взаимоотношения между нейрхимическими изменениями, вызванными пиразидолом (табл. 4) и динамикой отдельных показателей поведения животных, не только вносят вклад в понимание механизма действия "атипичных" антидепрессантов, но и позволяют выводы о влиянии пиразидола на захват нейромедиаторов экстраполировать на его лечебный эффект.

Использованная литература

1. Авруцкий Г.Я., Громова В.В., Зайцев С.Г. Лечение депрессий пиразидолом//Журн.невропатол. и психиатр. - 1975. - Т. 75, № 5. - С. 734-740.

2. Вальдман А.В., Козловская М.М. Изменение зоосоциальных взаимоотношений в группе животных как объективный показатель вызванных электростимуляций мозга нарушений в эмоционально-психической сфере//Нейрофизиологический подход к анализу внутригруппового поведения. - М., 1976. - С. 74-100.

3. Вальдман А.В., Звартау Э.Э., Козловская М.М. Психофармакология эмоций. - М., 1976. - 326 с.

4. Вальдман А.В., Козловская М.М., Медведев О.С. Фармакология эмоционального стресса. - М., 1979. - 360 с.

5. Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н. Функциональная биохимия синапсов. - М., 1978. - 176 с.

6. Козловская М.М. Изучение психофизиологической структуры эмоционального поведения животных в условиях группового взаимодействия//Психофармакология эмоционального стресса и зоосоциального взаимодействия. - Л., 1975. - С. 98-108.

7. Машковский М. Д., Андреева Н. И. Экспериментальное изучение психотропного действия пиразидола//Фармакол. и токсикол. - 1975. - № 1. - С. 5-10.

8. Машковский М.Д., Раевский К.С., Майсов Н.И., Сандалов Ю.Г., Андреева Н.И. Влияние новых психотропных препаратов пиразидола и сиднокарба на захват нейромедиаторов синапсосомами мозга и на активность Na, K-АТФ-азы//Хим.-фарм. журн. - 1976. - № 8. - С. 3-6.

9. Музыченко А.П. Организационные и методические вопросы клинического испытания новых антидепрессантов: Автореф. дис. канд. мед. наук. - М., 1981. - 26 с.

Ю.Паткина Н.А. Фармакологическое изучение систем поощрения и наказания//Нейрофармакологическая регуляция системных процессов. - Л., 1974. - С. 93-115.

II.Собко Г.М. Основы применения математических методов в судебно-почерковедческой экспертизе: Методическое пособие для экспертов. - М., 1980. - 37 с.

PECULIARITIES OF THE ANTIDEPRESSIVE AND NEUROCHEMICAL
EFFECTS OF PYRAZIDOL

M.M.Kozlovskaya, A.V.Valdman, V.V.Kushnarev;
A.P.Muzychenko

S u m m a r y

This study deals with the clinico-experimental investigation of a new Soviet antidepressant - pirazidole. Experimental studies were carried out on adequate models of behavioural depression in cats produced by reserpine injection or on the basis of tonic fear after repeated aversive stimuli in an aversive conflict situation.

It was shown experimentally that the leading feature of pirazidole action was the recovery of the positive emotions spectrum followed by the recovery of drive activity and normalization of somato-autonomic parameters.

These data are in correlation with the clinical observations showing that the main feature of pirazidole action is its tymanoaleptic effect.

Thus it was shown that our models of behavioural depression in cats are useful and promising for the prediction of psychotropic activity spectrum at the preclinical stage of drug studies.

On the basis of our own data and those found in literature, the possible neurochemical mechanisms of pirazidole action are described and discussed.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТИПИЧНОГО
НЕЙРОЛЕПТИКА ГАЛОПЕРИДОЛА И АНТАГОНИСТА
СЕРТОНИН₂-РЕЦЕПТОРОВ ПИРЕНПЕРОНА

М.О. Майметс, А.М. Нурк, Э.Э. Васар

Лаборатория психофармакологии Института общей и молекулярной
патологии

В 1981 году было сообщено о синтезе нового избирательного антагониста рецепторов диэтиламида лизергиновой кислоты - пиренперона /4/. По химической структуре пиренперон относится к производным бутирофенона и содержит химическую группу, свойственную всем нейролептикам бутирофенонового ряда /7/: ароматическое ядро - СО-С-С-С-Н. В дальнейшем было установлено, что пиренперон /6; 8, 9/ является относительно избирательным антагонистом серотонин₂-рецепторов.

В настоящей работе была поставлена задача изучить сравнительно разные поведенческие и биохимические эффекты типичного нейролептика бутирофенонового ряда галоперидола и антагониста серотонин₂-рецепторов пиренперона. Доводами для проведения такого сравнительного анализа были: во-первых, структурное сходство между галоперидолом и пиренпероном; во-вторых, серотониноблокирующие свойства у галоперидола /10/; в-третьих, необходимость уточнить роль серотонинергических механизмов в действии нейролептиков.

Материал и методика

Все опыты были проведены на мышах самцах, массой тела 18-25 г, и на крысах самцах линии Вистар, массой тела 200-250 г. Для выявления дофаминоблокирующих эффектов изучаемых веществ исследовались каталептогенный, антиапоморфиновый и антифенаминовый эффекты препаратов. Интенсивность каталептогенного действия галоперидола и пиренперона определяли по 4-балльной шкале, разработанной К.С. Раевским /3/. Интенсивность каталепсии оценивали через 30, 60, 120 и 180 мин после в/б введения изучаемых веществ. Интенсивность апоморфиновой стереотипии определяли у крыс через каждые 10 мин по шкале

Costall и Naylor/5/ в баллах. Интенсивность апоморфиновой стереотипной вертикализации у мышей оценивали по методике, разработанной Protais /II/. Двигательную активность мышей после введения фенамина (5 мг/кг) и апоморфина (0,1 мг/кг) исследовали с помощью фотозлектрического актометра. Активное избегание у крыс исследовали в челночной камере, где определяли выработку условного рефлекса. В первый день животных приобшляли к условиям эксперимента в течение 10 тестов. Животные должны были в течение 10 секунд покинуть темный отдел челночной камеры, в противном случае они получали два электрических удара напряжением 45 В. На следующий день определяли сохранение активного избегания после введения разных доз пиренперона и галоперидола. Антисеротониновое действие галоперидола и пиренперона оценивали по их антагонизму со встряхиваниями головы, вызванными квиапином, агонистом серотонин₂-рецепторов. Известно, что встряхивания головы, вызванные серотониномиметиками, отражают чувствительность центральных серотонин₂-рецепторов /7, 6, 9/. В опытах *in vitro* оценивали влияние пиренперона и галоперидола на связывание ³H-спироперидола в полосатом теле и фронтальной коре мозга крыс. Связывание ³H-спироперидола (0,5 нМ) определяли после двухкратного мытья мозговой ткани при 48 000 г. Также исследовали действие длительного применения галоперидола и пиренперона на связывание ³H-спироперидола (5 мкг/кг) в опытах *in vivo*. Связывание ³H-спироперидола ингибировали с помощью Н-пропилнорапоморфина (НПА 5 и 100 мкг/кг). В опытах с однократным введением галоперидол (0,01-0,2 мг/кг) и пиренперон (0,01-0,2 мг/кг) вводили, как правило, за 30-60 минут до введения апоморфина, фенамина и квиапина или до начала опыта. При длительном применении галоперидол и пиренперон вводили в дозе 0,2 мг/кг два раза в день на протяжении 14 дней. Опыты проводили 72 часа после последней инъекции веществ.

Результаты исследования

Для проведения острых опытов были выбраны дозы галоперидола и пиренперона, заметно подавляющие двигательную активность подопытных животных. Таким действием обладали галоперидол и пиренперон в дозе 0,2 мг/кг (табл. 2). В отличие от галоперидола пиренперон в этой дозе не вызывал катаlepsии у крыс и мышей, что хорошо коррелирует с опытами радиоли-

Таблица 1

Влияние галоперидола и пиренперона (1-1000 нМ) на специфическое связывание ^3H -спироперидола (0,5 нМ) с мембранами полового тела и фронтальной коры intactных крыс

Вещество	Плотность мест связывания, из которых вытесняется ^3H -спироперидол в молях/мг белка	
	Полосатое тело	Фронтальная кора
Спироперидол (контроль)	286 ± 21	370 ± 25
Пиренперон	80 ± 10 ^{xx}	340 ± 23
Галоперидол	186 ± 18 ^x	182 ± 22 ^x

x - P < 0,05; xx - P < 0,02.

Таблица 2

Поведенческие эффекты после однократного введения галоперидола и пиренперона в дозе 0,2 мг/кг

Вещество	Спонтанная двигательная активность у мышей	Двигательное возбуждение у мышей, вызванное фенамином (5 мг/кг)	Стереотипная вертикальная активность у мышей: средняя сумма баллов 3 определений в течение 30 мин после введения апоморфина (1 мг/кг)	Апоморфиновая стереотипия у крыс, средняя сумма баллов 4 определений в течение 40 мин после введения апоморфина (0,5 мг/кг)
	число импульсов за 45 мин			
Физ. раствор (контроль)	280 ± 22	280 ± 22	9,5 ± 1,4	54,5 ± 5,5
Фенамин	-	753 ± 42	-	-
Галоперидол	74 ± 10 ^x	294 ± 18 ^x	0,2 ± 0,01 ^{xx}	0 ^{xxx}
Пиренперон	86 ± 8 ^x	278 ± 20 ^x	7,0 ± 1,0	45,5 ± 6,0

x - P < 0,05; xx - P < 0,02; xxx - P < 0,01.

Таблица 3

Влияние галоперидола (50 мкг/кг) и пиренперона (30 мкг/кг) на седативное действие апоморфина (100 мкг/кг) у мышей

Вещество, доза	Число импульсов за 30 мин
Физ. раствор	296 ± 28
Апоморфин 100 мкг/кг	97 ± 12 ^{xx}
Апоморфин 100 мкг/кг + галоперидол 50 мкг/кг	187 ± 17 ^x
Апоморфин 100 мкг/кг + пиренперон 30 мкг/кг	52 ± 6 ^{xxx}

x - P < 0,05;

xx - P < 0,02;

xxx - P < 0,01.

Таблица 4

Влияние пиренперона и галоперидола на приобретение реакции активного избегания у крыс

Вещество, доза	% правильных ответов из 10 тестов
Физ. раствор	81 ± 7,22
Пиренперон 0,01 мг/кг	83 ± 4,65
0,05 мг/кг	40 ± 7,18 ^x
0,10 мг/кг	34 ± 8,30 ^{xx}
0,20 мг/кг	16 ± 3,80 ^{xxx}
Галоперидол 0,20 мг/кг	9 ± 6,10 ^{xxx}

x - P < 0,05;

xx - P < 0,02;

xxx - P < 0,01.

Таблица 5

Изменение поведенческих эффектов апоморфина и квиапина после отмены длительного введения галоперидола и пиренперона

Вещество, доза	Стереотипная вертикальная активность у крыс, средняя у крыс в течение 30 мин после введения апо-морфина (0,3 мг/кг)	Апоморфиновая стереотипия у живанги сумма баллов 4 определений в течение 40 мин после введения апо-морфина (0,1 мг/кг)	Число встря-го-вой у крыс в течение 30 мин после введения кви-азина (1 мг/кг)
Физ. раствор	2,8 ± 0,3	20,5 ± 4,5	26 ± 4,2
Галоперидол 0,2 мг/кг	6,8 ± 0,7 ^{xx}	74,0 ± 7,5 ^{xx}	52 ± 5,8 ^x
0,1 мг/кг	-	42,5 ± 4,0 ^x	56 ± 5,2 ^x
0,01 мг/кг	-	28,0 ± 4,5	41 ± 3,8 ^x
Пиренперон 0,2 мг/кг	6,3 ± 0,6 ^{xx}	35,0 ± 4,5 ^x	76 ± 6,7 ^{xx}
0,1 мг/кг	-	29,5 ± 4,6	80 ± 7,5 ^{xx}
0,01 мг/кг	-	27,5 ± 4,2	88 ± 6,9 ^{xx}

x - P < 0,05; xx - P < 0,01.

Таблица 6

Влияние НПА (5 и 100 мкг/кг) на связывание ³H-спироперидола (5 мкг/кг) после 14-дневного введения галоперидола и пиренперона

Группы длитель-ного введения	НПА 5 мкг/кг	НПА 100 мкг/кг	НПА (100-5) мкг/кг
	Число импульсов на г ткани		
	Подкорковые структуры переднего мозга		
Физ. раствор	7800±580	13000±1200	5200±640
Галоперидол	1100±120 ^{xx}	11400±1000	10400±980 ^{xx}
Пиренперон	3950±400 ^x	12550±1100	8800±760 ^x
	Фронтальная кора		
Физ. раствор	7450±620	10950±880	3500±480
Галоперидол	2150±380 ^x	8850±760	6700±530 ^x
Пиренперон	1000±120 ^{xx}	9500±940	8500±680 ^{xx}

x - P < 0,05; xx - P < 0,01.

гандного связывания (табл. I). Галоперидол по сравнению с пиренпероном сильнее влиял на связывание ³H-спироперидола в полосатом теле, в то время как во фронтальной коре более сильным действием обладал пиренперон. Галоперидол и пиренперон в дозе 0,2 мг/кг эффективно подавляли двигательное возбуждение, вызванное фенамином (5 мг/кг) у мышей (табл. 2). Однако в отличие от галоперидола пиренперон не изменял стереотипного поведения, вызванного апоморфином у крыс и мышей. В отдельной серии опытов изучался и антагонизм малой дозы галоперидола и пиренперона с седативным действием апоморфина (0,1 мг/кг) у мышей. Для проведения этих опытов были выбраны такие дозы галоперидола (0,05 мг/кг) и пиренперона (0,03 мг/кг), которые не оказывали угнетающего влияния на спонтанную двигательную активность мышей. Галоперидол и пиренперон вводили вместе с апоморфином сразу перед началом опыта. Выяснилось, что галоперидол заметно угнетал седативное действие апоморфина, в то время как пиренперон оказывал противоположное действие (табл. 3). Подавление реакции активного избегания у крыс является одним из типичных эффектов нейролептиков и используют для выявления новых нейролептических средств. Пиренперон в этом опыте оказывал доза-зависимое ингибирующее влияние на реакцию активного избегания (табл. 4). Эффект дозы 0,2 мг/кг пиренперона только незначительно уступал действию галоперидола (0,2 мг/кг).

Данные, полученные в острых опытах, свидетельствуют о значительных различиях в действии пиренперона и галоперидола. Только на спонтанную двигательную активность, моторное возбуждение, вызванное фенамином, и реакцию активного избегания оказывают галоперидол и пиренперон одинаковое угнетающее влияние. Можно только заключить, что в опытах, где необходимо прямое влияние на дофаминовые рецепторы переднего мозга, пиренперон в исследованных дозах неэффективен.

Известно, что антипсихотическое действие нейролептиков становится очевидным только после 2-3-недельного применения /12/. К этому времени в экспериментальных условиях заметно ослабевают все тормозные эффекты нейролептиков. Создается впечатление, что лечебный эффект нейролептических веществ является результатом существенных перестроек во многих нейромедиаторных системах головного мозга. Следовательно, в скрининге нейролептиков необходимо проведение опытов с длительным применением исследованных веществ.

Во второй части исследования проводились опыты с двух-

недельным применением галоперидола и пиренперона. Длительное применение пиренперона и галоперидола (0,2 мг/кг) вызывало одинаковое повышение чувствительности мышей к синдрому стереотипной вертикализации после введения 0,3 мг/кг апоморфина (табл. 5). Однако действие пиренперона и галоперидола на апоморфиновую стереотипию существенно отличалось. Галоперидол вызывал заметную гиперчувствительность у крыс, в то время как пиренперон существенно не менял поведения животных. Оба вещества вызвали после длительного введения гиперчувствительность крыс к встряхиваниям головы, вызванным квипазином, агонистом серотонин₂-рецепторов (табл. 5). Однако встряхивания головы были более интенсивные после отмены пиренперона по сравнению с галоперидолом. Изменение связывания ³H-спироперидола в опытах *in vivo* было изучено также после длительного введения галоперидола и пиренперона мышам. Для ингибирования связывания ³H-спироперидола использовали НПА в двух дозах: 5 мкг/кг НПА является ЕД₅₀ для седативного действия, в то время как 100 мкг/кг НПА ЕД₅₀ для двигательного возбуждения у мышей. Разница в эффектах двух доз НПА дает нам информацию о функциональном состоянии высоко- и низкоаффинных дофамин₂- и серотонин₂-рецепторов. Длительное введение галоперидола и пиренперона вызывало одинаковое ослабление ингибирующего действия 5 мкг/кг НПА на связывание ³H-спироперидола (табл. 7) как в подкорковых структурах (полосатое и лимбические структуры) переднего мозга, так и во фронтальной коре. Параллельно увеличивалась часть связывания ³H-спироперидола, ингибируемая только 100 мкг/кг НПА (табл. 7). Следует отметить, что галоперидол оказывал более сильное влияние на связывание ³H-спироперидола в подкорковых структурах переднего мозга, в то время как пиренперон сильнее действовал на связывание меченого спироперидола во фронтальной коре.

Обсуждение результатов

Как показывают результаты настоящего исследования, при остром введении пиренперон и галоперидол, несмотря на сходное химическое строение, оказывают весьма неодинаковое влияние на поведение подопытных животных. Пиренперон не обладает каталептогенным действием, не противодействует стереотипному поведению, вызванному апоморфином у крыс и мышей, и в отличие от галоперидола в малых дозах потенцирует седативное

действие апоморфина. Только подавление спонтанной двигательной активности и двигательного возбуждения, вызванного фенамином, а также угнетение рефлекса активного избегания являются сходными в действии пиренперона и галоперидола. Различия в действии пиренперона и галоперидола при однократном применении объясняются их разным влиянием на места связывания нейролептиков в переднем мозге. Галоперидол оказывает более заметное влияние в полосатом теле, где преобладают дофамин₂-рецепторы, в то время как пиренперон сильнее взаимодействует с местами связывания нейролептиков во фронтальной коре, где ведущее значение имеют серотонин₂-рецепторы /12/. Дифференцированное влияние пиренперона на разные формы поведения было установлено в наших предыдущих исследованиях /1, 2/, где пиренперон при длительном совместном введении с апоморфином избирательно угнетал развитие апоморфиновой агрессивности. Галоперидол оказывал такое действие только в дозах, полностью блокирующих стереотипное поведение /2/.

При длительном применении галоперидола и пиренперона картина несколько изменяется. Отмена длительного введения галоперидола вызывает гиперчувствительность к поведенческим эффектам апоморфина и квивазина, однако, преобладает гиперчувствительность дофамин₂-рецепторов. Пиренперон не вызывает существенного усиления апоморфиновой стереотипии у крыс, но достоверно усиливает стереотипную вертикализацию у мышей, вызванную апоморфином. Известно, что данное стереотипное поведение у мышей, в отличие от стереотипии у крыс, реализуется через дофамин₂-рецепторы в мезолимбической системе /13/. В пользу мнения, что пиренперон вызывает гиперчувствительность определенных дофамин₂-рецепторов после отмены длительного его введения, свидетельствуют и данные опытов связывания ³H-спироперидола *in vivo*, показывающих гиперчувствительность низкоаффинных дофамин₂-рецепторов в подкорковых структурах переднего мозга. Однако следует отметить, что и в опытах связывания пиренперон влиял на дофамин₂-рецепторы слабее по сравнению с галоперидолом. После двухнедельного введения пиренперона как в поведенческих тестах, так и в опытах связывания преобладает гиперчувствительность низкоаффинных серотонин₂-рецепторов. На основе полученных данных можно предположить, что пиренперон обладает нейролептическим действием. В пользу этого мнения свидетельствуют следующие его поведенческие и биохимические эффекты, свойственные нейролептикам: торможение спонтанной двигательной активности и двигательной

го возбуждения, вызванного фенамином у подопытных животных, угнетение приобретения навыка активного избегания крыс, антиагрессивное действие и развитие гиперчувствительности определенных дофамин₂- и серотонин₂-рецепторов. Пиренперон, сильный антагонист серотонин₂-рецепторов, скорее всего относится к атипичным нейролептикам, обладающим слабым экстрапирамидным побочным действием. Об этом свидетельствует отсутствие каталептогенного действия и влияния на апоморфиновую стереотипию у крыс. Можно также полагать, что блокада серотонин₂-рецепторов имеет существенное значение для механизма действия нейролептиков.

Выводы

1. По данным острых поведенческих и биохимических исследований пиренперон преимущественно взаимодействует с серотонин₂-рецепторами, в то время как в действии галоперидола преобладает влияние на дофамин₂-рецепторы.

2. После отмены длительного введения пиренперона наблюдается гиперчувствительность серотонин₂- и лимбических дофамин₂-рецепторов, после отмены галоперидола преобладает гиперчувствительность дофамин₂-рецепторов.

3. На основе полученных данных можно предположить, что пиренперон относится к атипичным нейролептикам, обладающим слабым экстрапирамидным побочным действием.

Использованная литература

1. Васар Э.Э., Алликметс Л.Х. Неодинаковое влияние метиопина и пиренперона на поведенческие эффекты апоморфина//Бюл. эксп. биол. и мед. - 1983. - № 6. - С. 70-72.
2. Васар Э.Э., Майметс М.О., Алликметс Л.Х. Роль серотонин₂-рецепторов в регуляции агрессивного поведения// Ш. высш. нерв. деят. - 1984. - Т. 34, № 2. - С. 283-289.
3. Раевский К.С. Фармакология нейролептиков. - М., 1976. - 271 с.
4. Colpaert F.C., Leysen J.E. Characterization of in vivo agonist and antagonist activity of purported 5-hydroxytryptamine antagonists and of R 4765, and LSD antagonist //Abst. 8th Int. Congr. of Pharmacol. - Tokio, 1981.
5. Costall B., Naylor R.J. On the mode of action of apomorphine//Europ. J. Pharmacol. - 1973. - Vol.21. - P.350-361.

6. Green A.R., Youdim M.B.H., Grahame-Smith W.G. Quipazine: its effect on rat brain 5-hydroxytryptamine metabolism, monoamine oxydase activity and behaviour//Neuropharmacol. - 1976. - Vol. 15. - P. 173-179.
7. Janssen M.A.C., Janssen P.A.J. Neuroleptics: chemical structure, pharmacological models and clinical profiles //Medicinal chemistry VI.Proc. 6th Int Symp.Brighton,UK, Sept. 4-7, 1979. - Forest Grove 1979. - P. 461-467.
8. Leysen J.E., Niemegeers C.I.E., Van Nueten J.M., Laduron P.M. ³H Ketanserin (R 41468), a selective ⁵H-ligand. for serotonin₂-receptor binding sites: Binding properties, brain distribution and functional role//Mol.Pharmacol. - - 1982. - Vol. 21. - P. 301-314.
9. Niemegeers C.J.E., Colpaert F.C., Leysen J.E., Awouters F., Janssen P.A.J. Mescaline induced head-twitches in the rat: An in vivo method to evaluate serotonin S₂ antagonists//Drug Develop. Res. - 1983. - Vol. 3. - P.123-125.
10. Ortmann R., Bischoff S., Rademe E., Buech O., Delini-Stula A. Correlation between different measurements of antiserotonin activity of drugs: Study with neuroleptics and serotonin receptor blockers//Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. - 1982. - Vol. 321. - P. 265-270.
11. Protais P., Costentin J., Schwartz J.C. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in the striatum//Psychopharmacol. - 1976. - Vol. 50. - P. 1-6.
12. Reynolds G.P., Rieder P., Jellinger K., Gabriel E. Dopamine receptors and schizophrenia: the neuroleptic drug problem//Neuropharmacol. - 1981. - Vol. 20. - P. 1319-1320.
13. Worms P., Broekkamp C.L.E., Lloyd K.G. Behavioral effects of neuroleptics//Neuroleptics: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives /ed. J.T.Coyle, S.J. Enna. - New York: Raven Press, 1983. - P. 93-117.

PHARMACOLOGICAL COMPARISON OF THE EFFECTS OF HALO-
PERIDOL AND PIRENPERONE, A SEROTONIN₂-RECEPTOR AN-
TAGONIST

M.O.Maimets, A.M.Nurk, E.E.Vasar

S u m m a r y

In acute experiments pirenperone was not cataleptogenic, did not antagonize apomorphine stereotypes and the sedative effect of low-dose apomorphine. Both haloperidol and pirenperone depressed spontaneous motor activity, antagonized amphetamine's facilitation of locomotor activity in mice and significantly inhibited the acquisition of passive avoidance performance in rats. Pirenperone was a more potent antagonist of quipazine-induced head-twitches in rats. The increased sensitivity to monoaminergic drugs was in correlation with the increased number of low-affinity dopamine₂- and serotonin₂-receptors in the forebrain. The number of high-affinity dopamine and serotonin receptors was decreased. In conclusion, the similarities of haloperidol and pirenperone suggest the antipsychotic properties of pirenperone.

ТИП ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СПОСОБНОСТЕЙ БОЛЬНЫХ И ЕГО ВОЗМОЖНОЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Л.Б. Нурманд

Кафедра фармакологии

В настоящее время все больший интерес клиницистов вызывают индивидуальные различия в ответе больного на стандартную дозу лекарства. Одной из причин этих различий являются особенности фармакокинетики лекарства у данного больного.

На нашей кафедре совместно с кафедрой психиатрии Тартуского государственного университета в течение 6 лет проводятся исследования /2, 3, 4/, целью которых является поиск возможности охарактеризовать индивидуальные особенности фармакокинетики психотропных средств. Известно, что фармакокинетика лекарства у конкретного больного определяется по меньшей мере двумя обстоятельствами: во-первых, фармакокинетическими свойствами лекарственного вещества (зависящих от молекулярной массы, липотропности, рКа и др.) и, во-вторых, способностью организма их реализовать (активностью процессов всасывания, особенностями проницаемости мембран, связывающими свойствами белков, активностью ферментных систем печени, выделительных органов и т.д.), что можно назвать "фармакокинетическими способностями организма" (ФС). Если первое определяется экспериментально уже при внедрении препарата в практику и описывается в литературе, то второе подчиняется индивидуальным особенностям и необходимо оценивать в клинических условиях. Как правило, это в свою очередь требует определения содержания применяемого препарата в крови больного. В настоящее время простые и общедоступные методы для этого практически еще отсутствуют и фармакокинетические исследования требуют специально оснащенных лабораторий. Одной из возможностей характеристики ФС являются косвенные определения ФС при помощи какого-либо более просто определяемого "индикаторного" вещества /6/

Фармакокинетика лекарства осуществляется при помощи ряда малоспецифичных процессов - всасывания, распределения, биотрансформации и выделения. Основным направлением биотрансформации является превращение неполярных жирораствори-

ных веществ в более полярные и водорастворимые метаболиты, которые легче выводятся из организма /I, 5, II/. Биотрансформацию осуществляют в основном неспецифические ферментные системы, фиксированные на эндоплазматическом ретикулуме (микросомах) гепатоцитов. При этом одна и та же ферментная система участвует в метаболизме многих веществ. Это обстоятельство и позволяет, в принципе, выбрать "индикаторное" вещество, метаболизируемое ферментами, участвующими в метаболизме назначаемых больному лекарств (в условиях психиатрической клиники - прежде всего психотропных). Одной из основных реакций биотрансформации не только психотропных веществ является их оксидация при участии системы цитохрома P₄₅₀ /5, II/. Для изучения оксидационной способности печени в эксперименте нередко используются барбитураты (гексобарбитал, фенобарбитал и др.) /7, 8/.

В наших работах в качестве "индикаторного" вещества был избран барбитал, барбитурат, почти полностью (до 97%) окисляемый в организме /IO/. Барбитал относительно легко определяется при помощи УФ спектрометрической методики.

Исследование проведено на 76 женщинах, 73 из которых были госпитализированы в Тартускую психоневрологическую больницу, 55 с диагнозом хронической шизофрении и 18 - алкоголизма II и III стадий. Три испытуемых были психически здоровыми добровольцами. Барбитал назначался утром натощак внутрь в дозе 0,4 грамма. В течение 6 последующих часов определяли содержание барбитала в целой венозной крови при помощи модифицированной методики Гольдбаума /9/. На основании полученных концентрационных кривых были высчитаны параметры, характеризующие фармакокинетику барбитала, а именно: константу всасывания k_1 (мин^{-1}), максимальную концентрацию в крови C_M (мг/мл), коэффициент распределения (Δ), период полусуществования $T_{1/2}$ (час) и тотальное очищение O_T (мл/мин·кг). Поскольку существенных различий в параметрах в зависимости от диагноза не наблюдалось, все испытуемые были объединены в одну группу для статистической обработки и дальнейшего анализа.

В наших первых работах была проведена типизация на основании средней арифметической и ее стандартной ошибки на три типа ФС (ТФС), что не вполне оправдано. Составленные гистограммы показали, что распределение частот происходит несимметрично, поэтому в дальнейших работах была вместо средней арифметической избрана мода, определяющая наиболее часто

встречающуюся величину параметра. На основании моды все испытуемые были разделены на две более или менее равные группы ТЭС с индивидуальным параметром меньше или больше соответствующей моды. Типизация проводилась по каждому параметру отдельно, но эти параметры можно было объединить в три группы: характеризующие всасывание (k_I , C_M), проникновение в ткани (Δ') и элиминацию (O_T , k_2 и $T_{I/2}$).

Таблица I

Средние арифметические и моды фармакокинетических показателей

Параметр	Средняя арифметическая	Мода
k_I (мин ⁻¹)	0,034 ± 0,0039	0,029
C_M (мг/л)	10,7 ± 0,9	7,16
Δ' (мл/г)	0,83 ± 0,2	0,76
O_T (мл/мин.кг)	1,53 ± 0,2	0,74
k_2 (мин ⁻¹)	0,0020 ± 0,0002	0,0013
$T_{I/2}$ (час)	11,5 ± 1,5	6,0

Дальнейшему анализу подвергались больные хронической шизофренией (всего 55 женщин). При этом в центре внимания стоял вопрос о том, насколько ТЭС коррелирует с эффективностью психофармакотерапии этих больных. Показателями эффективности служили - средняя продолжительность периодов госпитализации (ПГ), продолжительность ремиссии (Р), подавляемость терапии в стационаре (ТС) и интенсивность психофармакотерапии (ИТ). Критерием подавляемости терапии в стационаре (ТС) был т.н. коэффициент госпитализации (соотношение общей продолжительности периодов госпитализации ко всей продолжительности болезни), чем меньше он, тем лучше больная поддается лечению. Критериями интенсивности психофармакотерапии (ИТ) служили суточные дозы нейролептиков (табл. 2). Кроме этих показателей анализу подвергались еще возраст больных (В) и общий срок лечения (СЛ).

Для анализа были в каждой группе ТЭС высчитаны моды каждого показателя в отдельности (табл. 3).

Из таблиц видно, что типы характеризуются разными преобладающими величинами показателей и хотя данные не подлежат стандартной статистической обработке, можно все же проследить определенную закономерность.

Охарактеризовать эффективность психофармакотерапии при

Таблица 2

Интенсивность психофармакотерапии

Препарат	Интенсивность		
	Малая, I балл	Средняя, 2 балла	большая, 3 балла
Галоперидол	до 5	от 5 до 7,5	более 7,5 мг
Аминазин	до 100	от 100 до 200	более 200 мг
Мажептил	до 10	от 10 до 20	более 20 мг
Трифлазин	до 3,5	от 3,5 до 5	более 5 мг
Лепонекс	до 50	от 50 до 100	более 100 мг
Литий	до 50	от 50 до 150	более 150 мг

Таблица 3

ТЭС и показатели эффективности психофармако-
терапии

ТЭС	М о д а				ТС	ИТ (баллов)	
	В (лет)	СЛ (лет)	ПТ (мес.)	Р (мес.)			
к _I	медл.	28	7	4	5	0,25	1,88
	быстр.	45	2	3	5	0,43	1,97
С _м	низк.	28	7	3	5	0,23	1,88
	выс.	33	10	3	8	0,34	1,97
Δ'	хуже	48	2	3	5	0,38	2,00
	лучше	28	7	3	5	0,24	1,85
O _T	медл.	44	2	3	7	0,37	1,89
	быстр.	28	5	4	8	0,24	1,94
к ₂	медл.	29	2	3	5	0,36	1,82
	быстр.	29	5	3	5	0,23	2,00
T _{1/2}	медл.	28	3	4	8	0,44	1,87
	быстр.	28	6	3	8	0,24	2,20

помощи объективных показателей довольно трудно. Больные имели разную продолжительность заболевания. За это время у них был выработан оптимальный режим лечения, выбраны самые эффективные лекарственные средства и дозы. Всем этим роль фармакокинетических факторов была доведена до минимума.

Таблица 4

Доминирующий ТЭС и некоторые показатели эффективности терапии

Показатель	Всасывание	Проникновение в ткани	Элиминация
Возраст (В)	моложе	медленнее	лучше
	старше	быстрее	хуже
Срок лечения (СЛ)	короче	быстрее	хуже
	длиннее	медленнее	лучше
Средняя продолжительность госпитализации (ПГ)	короче	длиннее	не определено
Средняя продолжительность ремиссии (Р)	короче	длиннее	не определено
Поддаваемость терапии в стационаре (ТС)	лучше	медленнее	лучше
	хуже	быстрее	хуже
Интенсивность психофармакотерапии (ИТ)	меньше	медленнее	лучше
	больше	быстрее	хуже

Из использованных показателей, кроме возраста, ТЭС имеет связь со сроком лечения, поддаваемостью терапии в стационаре и с интенсивностью психофармакотерапии. Возрастные изменения ТЭС хорошо согласуются с литературными данными о фармакокинетике бензодиазепинов и трициклических антидепрессантов /12/. Влияние длительности применения психотропных средств проявляется в замедлении всасывания, улучшении проникновения в ткани и ускорении элиминации. Последнее объяснимо индукцией микросомальных ферментов.

Преобладание определенных ТЭС у лиц, лучше или хуже поддающихся терапии, позволяет сделать обратный вывод, а именно - лица с ТЭС медленного всасывания и лучшего проник-

новения в ткани требуют менее интенсивной фармакотерапии и быстрее поддаются стационарному лечению. Лица с противоположными ТЭС требуют более интенсивной фармакотерапии и труднее поддаются лечению. ТЭС с быстрой элиминацией требует более интенсивной фармакотерапии, но все же быстро поддается стационарному лечению, и наоборот.

Таким образом, результаты настоящего анализа показывают, что определение при помощи "индикаторного" вещества барбитала ТЭС в некоторой степени позволяет судить о потребности больного в психотропных лекарствах и прогнозировать эффективность лечения.

Использованная литература

1. Лакин К.М., Крылов Ю.Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. - М., 1981.
2. Нурманд Л.Б., Мехилане Л.С. Попытка типизации фармакокинетических способностей больных//Фармакол. и токсикол. - 1982. - Т. 45, № 3. - С. 79-82.
3. Нурманд Л.Б., Саарма Ю.М., Мехилане Л.С. Попытка типизации больных на основании их фармакокинетических способностей//Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1981. - Вып. 581. - С. 123-128.
4. Нурманд Л.Б., Саарма Ю.М., Мехилане Л.С. Особенности фармакокинетических способностей больных шизофренией//Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1982. - Вып. 600. - С. 105-111.
5. Парк Д.В. Биохимия чужеродных соединений. - М., 1973.
6. Danhof M. De bepaling van het farmacon - metaboliserend vermogen bij de mens//Pharmaceutisch Weekblad. - 1979. - P. 129-149.
7. Inaba T., Kalow W. Salivatory excretion of amobarbital in man//Clin. Pharmacol. Therap. - 1975. - Vol.18, - P. 558-562.
8. Inaba T., Tang B.K., Kalow W. Amobarbital: probe of hepatic drug oxidation in man//Clin. Pharmacol. Therap. - 1976. - Vol.20. - P. 439-444.
9. Käer-Kingissepp E., Laidna J., Hansson E. Barbitaali kvantitatiivsest määramisest veres ultraviolett-spektrofotomeetrisel meetodil//TRÜ Toimetised. - 1963. - Vihik 141. - Lk. 33-36.
10. Maynert E.W. The alcohol metabolites of pentobarbital and amobarbital in man//J. Pharmacol. Exptl. Therap. - 1965. - Vol.150, - P. 118-121.

11. Remmer H. Die Entgiftung von Pharmaka. Dtach.med. Wschr. 1966. - Bd. 91. - S. 289-296.

THE PATIENTS' PHARMACOKINETIC ABILITY TYPE AND ITS
POSSIBLE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE

L.B.Nurmand

S u m m a r y

This paper is a summary of some results of investigations, which were carried out at the departments of pharmacology and psychiatry of our university in order to find the possible means to characterize the individual peculiarities of psychotropic drug pharmacokinetics in patients.

The investigation was performed on 76 female patients hospitalized at the Tartu Psychoneurological Hospital, 55 of them with the diagnosis of chronic schizophrenia. The characterization was based on the so-called "pharmacokinetic ability type" (PAT) as determined by individual peculiarities of pharmacokinetics of an indicatory drug - amobarbital. All patients were divided into two PATs according to their individual parametres of absorption, distribution and elimination of amobarbital that were smaller or greater than the median values.

The analysis of correlation between the PAT and some indexed of the effectiveness of psychopharmacotherapy showed that the PAT was correlated not only with the patient's age but also with the duration of pharmacotherapy and some indices of its intensity and effectiveness. The patients with the PAT of slower absorption and better distribution of the drug into tissues needed less intensive pharmacotherapy and shorter hospitalizing periods, the patients with the PAT of rapid elimination needed more intensive pharmacotherapy.

БИОПЕРИОДИЧЕСКИЕ КОЛЕБАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ ГАЛОПЕРИДОЛА И ФЕНИБУТА

М.Я. Оттер, Ю.П. Вилу

Кафедра фармакологии

Действие нейролептиков бутирофенонового ряда связано в основном с блокадой дофаминовых рецепторов. На этом основывается как их антипсихотический эффект, так и экстрапирамидальные побочные явления. В изыскании средств для коррекции побочных явлений исследованы многие вещества, в том числе и бета-фенил-ГАМК - фенибут. Фенибут вызывает повышение обмена дофамина (ДА) и, по-видимому, активацию ДА нейронов /4, 10/. Это указывает на перспективность применения фенибута в качестве антикаталептогенного средства. По некоторым эффектам фенибут антагонизирует действие нейролептиков /11/, противодействует способности нейролептиков вызывать проз. По данным А. Нурк /3/ однократное введение фенибута существенно не влияло на галоперидоловую каталепсию, 10-дневное введение фенибута предупреждало развитие толерантности к каталептогенному действию галоперидола. В последнее время фенибут считают ноотропным веществом /1/. Одним из выраженных фармакологических эффектов как ноотропов, так и нейролептиков является антигипоксическое действие. Представляло интерес изучить и этот эффект при их совместном введении.

В настоящей работе использованы естественные суточные и сезонные колебания фоновой активности медиаторных систем в эффектах совместного введения фенибута и галоперидола. В активности нейролептиков обнаружен четкий суточный периодизм. Седативный эффект галоперидола, судя по снижению спонтанной локомоции у крыс, более выражен в темное время суток, когда исходная двигательная активность животных особенно высока. Выраженное каталептогенное действие галоперидола падает у крыс на дневные часы (12-14 ч), а ночью каталепсия минимальная /6, 12; 13/. В мозге крыс содержание галоперидола в 16 ч почти в 6 раз выше, чем в 4 часа ночи. Уровень нейролептика в плазме крови имеет аналогичный циркадианный ритм. Накопление галоперидола в мозге находится в прямой корреляции со значительным усилением вызванной каталепсии /12/, хотя группе япон-

ских исследователей /16, 17/ не удалось найти такой корреляции. Так как фенибут имеет и активирующий компонент действия, особенно при подавленной активности ЦНС /2/, он также повышает координацию движений и это более выражено в утренние часы /9/.

Токсичность обоих препаратов высокая в 18 часов, когда при внутрибрюшинном введении сублетальных доз погибает 75% животных против 0% в утренние часы /6, 9/.

Содержание ДА и норадреналина (НА) в переднем (ПМ) и межучточном мозге (ММ) выше в темном периоде суток. Амплитуда суточного колебания обоих катехоламинов в ПМ в среднем 33%. Содержание метаболита дофамина - гомованилиновой кислоты (ГВК) варьирует еще больше /5/. Чем ниже содержание ГВК в определенный час у контрольных животных, тем сильнее блокада дофаминовых рецепторов под влиянием однократного введения галоперидола /5/. Времени низкого прироста ГВК соответствует и медленное развитие катаlepsии /6/.

Целью настоящего исследования являлось определение суточных ритмов фармакологических эффектов совместного введения фенибута и галоперидола, уточнение влияния последовательности введения веществ на их эффекты, определение влияния сезона года на фармакологические эффекты.

Материал и методика

Опыты проводились на 250 белых крысах самцах (весом 170-230 г) и 240 белых мышах обоего пола (весом 15-25 г).

Для проведения опытов подопытные животные содержались минимально 2 недели в стандартных условиях вивария ($T=20\pm 2^{\circ}$ С, режим - свет:темнота 12:12 часов, пища и вода свободно).

На крысах и мышах определяли изменения ориентировочно-двигательной активности с помощью фотоэлектрического актометра (по количеству вставаний и локомоций), а также координацию движений по времени удержания животных на вращающемся стержне. Катаlepsия оценивалась по десятибалльной шкале спустя 30, 60, 120, 180 и 240 минут после введения препаратов. Выраженность птоза оценивали по четырехбалльной шкале. Температуру тела измеряли ректально с помощью электротермометра ТПЭМ-1 при комнатной температуре $20-22^{\circ}$ С спустя 45 минут после введения изучаемых веществ.

Антигипоксическое действие изучали на модели гипоксической гипоксии на белых мышах, помещая как контрольных, так

и подопытных животных поодиночке спустя 60 мин после введения веществ в герметически закрытый сосуд емкостью 80 см³ без поглощения CO₂. Определяли скорость наступления смерти. Серотонин (5-OT) и 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-OHIAK) были определены спектрофлуориметрически /14/. Галоперидол (Г) вводился в дозе 0,1; 0,2; 0,25 и 1 мг/кг и фенибут (Ф) в дозе 50 и 100 мг/кг внутривентриально. Для изучения суточной ритмики эффектов препараты вводили в 6.00, 12.00, 18.00, 24.00. Действие фенибута изучено в двух вариантах опыта: 1) введение фенибута за 15 минут до галоперидола (Ф+Г), 2) введение фенибута спустя 15 минут после галоперидола (Г+Ф). Для изучения сезонных колебаний эффектов опыты проводились в 9 часов утра.

Результаты опытов и их обсуждение

Было выяснено, что ориентировочно-двигательная активность интактных мышей и крыс варьирует в течение суток, причем самая высокая она в утренние часы, а самая низкая в 18 часов. Галоперидол и фенибут подавляли моторику сильнее в первой половине дня. Эффект фенибута на моторику мышей оказался минимальным в 24 часа. Фенибут потенцировал угнетающий эффект галоперидола. Обе комбинации (Г+Ф и Ф+Г) действовали на моторику в среднем в 3 раза сильнее отдельных препаратов.

Резистентность интактных мышей к гипоксической гипоксии также варьировала в течение суток. Галоперидол только слабо повышал резистентность мышей в условиях гипоксии в 6 часов утра (129%), а эффект фенибута оказался гораздо сильнее (205%) в 24 часа. В 18 часов эффект обоих препаратов и их комбинаций минимальный. Антигипоксическая эффективность комбинации Г+Ф самая высокая (236%) в 6.00, а комбинации Ф+Г несколько ниже - (174%) в 12.00 (табл. 1). При совместном введении фенибута и галоперидола в первой половине дня имела место суммация антигипоксического эффекта отдельных веществ. Во второй половине дня, в 18 часов эффект слабый. В полночь (24.00) антигипоксическое действие выражено у фенибута.

Следует отметить, что антигипоксическое действие комбинации Г+Ф весьма сильное и, вероятно, может найти применение в клинической практике. Если у грызунов (мыши, крысы), которые ведут ночной образ жизни, он особо выражен в первой половине дня, то у людей, ведущих дневной образ жизни, по аналогии высокого эффекта можно ожидать во второй половине дня или ночью.

Таблица I

Суточные колебания ректальной температуры и продолжительности жизни интактных мышей в условиях гипоксической гипоксии, под влиянием галоперидола (Г) 2,5 мг/кг, фенибута (Ф) 100 мг/кг и их комбинаций. Приведены средние данные и стандартные ошибки для группы из 8-10 мышей. Достоверное различие от средней контроля отмечено x при $P \leq 0,05$

Часы	Вещество	Ректальная температура интактных мышей и понижение ее исследуемыми веществами	Длительность жизни в гермокамере (сек) и ее повышение под влиянием веществ	% резистентности по сравнению с суточной средней
		1	2	3
6.00	Физ.р-р.	$33,5 \pm 0,30^0$	$706 \pm 50,7$	92 %
	Г	- $2,3^0$ x	129 %	
	Ф	- $5,1^0$ x	142 % x	
	Г + Ф	- $5,2^0$ x	236 % x	
	Ф + Г	- $4,2^0$ x	134 %	
12.00	Физ.р-р.	$33,5 \pm 0,32^0$	$739 \pm 26,8$	96,6 %
	Г	- $1,8^0$ x	104 %	
	Ф	- $2,8^0$ x	128 %	
	Г + Ф	- $5,0^0$ x	195 % x	
	Ф + Г	- $5,9^0$ x	174 %	
18.00	Физ.р-р.	$31,3 \pm 0,16^0$	$847 \pm 72,6$	110,7 %
	Г	- $1,7^0$ x	98 %	
	Ф	- $2,5^0$ x	93 %	
	Г + Ф	- $4,1^0$ x	127 %	
	Ф + Г	- $2,8^0$ x	127 %	
24.00	Физ.р-р.	$32,4 \pm 0,13^0$	$768 \pm 110,6$	100,4 %
	Г	- $1,8^0$ x	100 %	
	Ф	- $1,0$	205 % x	
	Г + Ф	- $6,8^0$ x	154 %	
	Ф + Г	- $5,0^0$ x	125 %	
Суточ. среднее		$32,7 \pm 0,52^0$	$765 \pm 30,1$	
	Г	- $1,8^0$	$820 \pm 34,1$	
	Ф	- $2,9^0$	$1079 \pm 172,2$	
	Г + Ф	- $5,3^0$	$1342 \pm 131,0$	
	Ф + Г	- $4,5^0$	$1068 \pm 77,2$	

Известно, что в скорости развития гипоксии роль играет моторная активность и скорость основного обмена. Животные с низкой моторной активностью и соответственно обычно с низкой температурой тела к условиям гипоксии резистентнее, чем животные с высокой активностью и повышенной температурой. Считают, что гипотермическое действие нейролептиков осуществляется через блокаду серотонинергической системы, хотя это, вероятно, не является единственным механизмом /15/. Галоперидол и фенибут имеют серотониноблокирующий эффект, который по механизму обратной связи ведет к повышению содержания и скорости обмена 5-ОТ. Фенибут в дозе 50 мг/кг повышал содержание 5-ОТ и 5-ОИУК в целом мозге мышей /4/. При совместном введении галоперидола 1 мг/кг и фенибута 50 мг/кг оба вещества отдельно и в комбинации повышали содержание 5-ОИУК в межучном и заднем мозге, а 5-ОТ - в межучном мозге (табл. 2).

Таблица 2

Влияние галоперидола 1 мг/кг, фенибута 50 мг/кг на синтез и метаболизм серотонина (5-ОТ) в межучном (ММ) и заднем мозге (ЗМ) крыс через 2 часа после введения. Приведены $\bar{x} \pm m$ достоверные различия x при $P \leq 0,05$

Вещество	5-ОТ		5-ОИУК	
	ММ	ЗМ	ММ	ЗМ
Контроль	0,67 \pm 0,05	1,72 \pm 0,17	0,46 \pm 0,04	0,39 \pm 0,03
Фенибут	1,10 \pm 0,08	0,54 \pm 0,05 ^x	0,87 \pm 0,08 ^x	0,63 \pm 0,06 ^x
Галоперидол	1,57 \pm 0,1 ^x	1,84 \pm 0,16	0,77 \pm 0,06	0,39 \pm 0,03
Г + Ф	1,98 \pm 0,15 ^{xx}	1,70 \pm 0,15	0,61 \pm 0,05	0,72 \pm 0,06 ^x
Ф + Г	1,61 \pm 0,15 ^{xx}	1,02 \pm 0,09	0,84 \pm 0,08 ^x	0,52 \pm 0,05

Введение галоперидола в дозе 0,1 и 0,2 мг/кг вызывало у крыс уже через 30 минут катаlepsию и птоз. У классических нейролептиков интенсивность катаlepsии коррелируется с антипсихотическим действием.

В 24 часа катаlepsия развивалась медленно и не достигала максимума даже к четвертому часу после введения, зато в 12 часов дня она развивалась очень быстро и оказалась выраженной.

Как видно из таблицы 3, обе комбинации Ф + Г и Г + Ф в течение первых часов существенно повышали катаlepsию по сравнению с галоперидоловым контролем. Фенибут в комбинации Ф + Г только в начале потенцировал галоперидоловую катаlepsию.

Фенибут антагонизировал вызванный галоперидолом птоз. Комбинация $\Phi + \Gamma$ и в этом случае действовала эффективнее.

Как видно из таблиц 3 и 4, каталептогенное действие зависит от сезонности введения галоперидола. Полученные данные хорошо согласуются с нашими прежними результатами /5, 7, 8/. В настоящих опытах каталептогенное действие галоперидола сильнее в дневные часы (12.00), а в годовом периоде, в сентябре и марте, наиболее низкое в 24.00 и в декабре месяце. Подтвердилось положение, что галоперидоловая каталепсия развивалась в обратной корреляции с содержанием метаболитов дофамина в мозге интактных животных как в течение суток, так и года, т.е., чем ниже скорость кругооборота дофамина, тем сильнее угнетающие эффекты галоперидола.

Заключение

В настоящей работе выяснено, что время введения фармакологических веществ имеет важное значение для силы и продолжительности их эффектов. В течение суток можно различить период (в настоящей работе в 18.00), когда двигательная активность, ректальная температура мышей и крыс низкая, а резистентность мышей к гипоксии самая высокая. Антигипоксический и каталептогенный эффекты галоперидола, фенибута и их комбинаций в 18.00 развиваются медленно. Мы считаем, что причиной этого является общефизиологический принцип, согласно которому низкие функции подавляются слабо, и, видимо, на этот период падает "время наименьшего сопротивления животных" к производным ГАМК.

При совместном введении имеет значение последовательность введения веществ. Фенибут повышает антигипоксический эффект галоперидола лучше в комбинации $\Gamma + \Phi$. Это коррелируется с выраженным понижением температуры тела и моторики мышечной. В данной комбинации сильнее выражены блокирующие эффекты галоперидола.

Для коррекции вызываемого галоперидолом птоза, понижения двигательной и исследовательской активности, а в какой-то мере и каталепсии выраженнее действует комбинация $\Phi + \Gamma$, в которой активирующий компонент фенибута больше. В комбинации $\Phi + \Gamma$ фенибут не дает сильно развиваться угнетающему эффекту галоперидола, в том числе и серотониноблокирующему (табл. 2).

Таблица 3

Колебания каталептогенного действия и птоза у крыс спустя 30-180 мин после совместного введения галоперидола 0,1 мг/кг и фенибута 100 мг/кг в разные часы суток. Приведены средние величины и стандартные ошибки к ним для группы из 8 животных. Достоверное различие при $P \leq 0,05$ от контрольной средней галоперидола отмечено *

Время суток	Вещество	Накапливаемое в баллах						Проба				
		30*	60*	120*	180*	30*	60*	120*	180*			
6,00 Г	0	0,6±0,6	3,0±1,4	6,0±1,6	0	2,8±0,5	1,6±0,5	1,8±0,3				
	Г + Ф	2,6±0,6*	6,4±1,5*	5,2±1,5*	5,4±1,9	0	0,8±0,3*	1,4±0,5	0,6±0,2*			
	Ф + Г	4,2±0,8*	9,2±0,4*	8,8±0,8*	6,4±1,5	0,8±0,3	1,4±0,5*	1,2±0,5	0,4±0,2*			
12,00 Г	0	2,8±1,3	3,8±0,5	5,4±0,8	0,8±0,4	2,4±0,4	2,4±0,6	1,4±0,5				
	Г + Ф	1,6±0,8*	9,2±0,8*	9,6±0,4*	9,0±0,7*	2,0±0,3	1,6±0,4*	1,0±0,4*	0,2±0,2*			
	Ф + Г	7,6±1,4	9,6±0,4*	9,4±0,6*	9,2±0,8*	0,6±0,4	0,4±0,2	0,2±0,2*	0,2±0,2*			
18,00 Г	0	0,2±0,2	1,4±0,4	1,4±0,4	1,4±0,4	-	-	1,6±0,3	2,4±0,5			
	Г + Ф	3,0±0,9*	6,6±1,4*	5,2±1,5*	4,8±0,7	-	-	0,6±0,3	0,6±0,8*			
	Ф + Г	3,2±1,8*	7,8±1,4*	7,2±1,3*	5,2±1,3	-	-	1,6±0,5	0,6±0,2*			
24,00 Г	0	0,8±0,2	0,8±0,2	3,8±0,97	-	-	3,6±0,5	2,2±0,3	3,0±0,3			
	Г + Ф	2,6±0,4	8,8±1,2*	9,6±0,4*	9,2±0,8	-	-	1,1±0,3*	4,0±0,3*	0,8±0,3*		
	Ф + Г	3,2±1,0	7,6±1,1*	5,2±1,6*	5,0±1,0	-	-	1,2±0,4*	0,6±0,2*	0,4±0,2*		
Суммарное		Г	0,6±0,01	1,6±0,69	2,3±0,7	4,2±1,02	0,8±0,4	2,9±0,32	2,0±0,14	2,2±0,35		
среднее		Г + Ф	2,4	7,8	7,4	7,1	2,0	1,2	1,1	0,6		
		Ф + Г	5,0	8,6	7,7	5,5	0,7	1,0	0,9	0,4		

Таблица 4

Колебания двигательной активности, каталептического действия и птоза у крыс после совместного введения фенибута (100 мг/кг) и галоперидола (0,1 и 0,2 мг/кг) в разные месяцы, всегда в 9 часов утра. Приведены средние величины и стандартные ошибки к ним для группы из 8 животных. Достоверное различие от средней суточной при $P \leq 0,05$ отмечено x

Число	Вещество, доза	Двигательная активность				Каталепсия через				Птоз через 120'
		30'	60'	120'	180'	30'	60'	120'	180'	
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
29, IX	Физ. раств.	130 \pm 6,5	3 \pm 1,0	13 \pm 10,0	51 \pm 4,4	0	1,6 \pm 1,5	0	0	0
	Г 0,1 мг/кг	40 \pm 15,1 ^x	25 \pm 8,7	14 \pm 3,9	8 \pm 3,3 ^x	6,6 \pm 2,1 ^x	7,2 \pm 1,7 ^x	8,6 \pm 1,4 ^x	8,6 \pm 1,4 ^x	1,4 \pm 0,9 ^x
	Ф + Г	17 \pm 7,4	23 \pm 2,1	56 \pm 14,5 ^x	59 \pm 16,9 ^x	10 \pm 0 ^x	10 \pm 0	8,0 \pm 2,0	9,2 \pm 0,8	0 ^x
17, XI	Физ. раств.	84 \pm 36,4	12 \pm 5,7	47 \pm 15,5	13 \pm 6,9	0	0	0	0	0
	Г 0,2 мг/кг	27 \pm 14,4 ^x	10 \pm 5,4	7 \pm 3,1	10 \pm 4,1	1,4 \pm 0,4 ^x	2,2 \pm 0,8 ^x	6,2 \pm 1,9 ^x	7,8 \pm 1,7 ^x	2,0 \pm 0,5
	Ф + Г	17 \pm 7,4 ^x	12 \pm 3,6	20 \pm 7,3 ^x	25 \pm 6,4 ^x	1,8 \pm 0,5	8,2 \pm 1,8	7,8 \pm 1,0	10,6 \pm 0	1,0 \pm 0
24, XI	Физ. раств.	93 \pm 36,2	34 \pm 4,6	-	13 \pm 9,7	0	0	-	0	0
	Г 0,1 мг/кг	114 \pm 18,9 ^x	25 \pm 8,8	-	11 \pm 3,7	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	-	1,8 \pm 1,2	1,2 \pm 0,4
	Ф + Г	36 \pm 17,3	16 \pm 12,8	-	51 \pm 12,1	0,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,5	-	-	-
8, XII	Физ. раств.	53 \pm 15,7	28 \pm 14,4	7 \pm 7,0	14 \pm 11,5	0	0	0	0	0
	Г 0,2 мг/кг	24 \pm 10,1 ^x	25 \pm 6,7	2 \pm 1,0	6 \pm 2,7	0,6 \pm 0,2 ^x	3,4 \pm 0,9 ^x	5,2 \pm 1,4 ^x	0,6 \pm 0,4	1,2 \pm 0,4
	Ф + Г	19 \pm 11,2	16 \pm 6,0	2 \pm 2,0	6 \pm 3,0	5,8 \pm 1,7 ^x	9,4 \pm 0,6 ^x	7,8 \pm 1,7	6,6 \pm 0,9	0,8 \pm 0,6
17, III	Физ. раств.	160 \pm 17,2	-	-	-	0	0	0	0	0
	Г 0,1 мг/кг	51 \pm 18,4	10 \pm 4,7	2 \pm 0,9 ^x	6 \pm 2,2 ^x	0	0,6 \pm 0,6	3,0 \pm 1,5 ^x	6,0 \pm 1,6 ^x	1,6 \pm 0,5 ^x
	Ф + Г	2 \pm 6,9 ^x	19 \pm 13,2	20 \pm 13,6	31 \pm 10,6 ^x	4,2 \pm 0,8	9,2 \pm 0,5 ^x	8,8 \pm 0,8	6,4 \pm 1,5	1,2 \pm 0,6
Сред-нее	Физ. раств.	104 \pm 22,4	19,3 \pm 5,5	22,3 \pm 10,8	31,0 \pm 7,6	0	0	0	0	0
	Г 0,1 мг/кг	68 \pm 23,9	20 \pm 5,0	8 \pm 1,0	8 \pm 1,0	2,3 \pm 2,2	2,7 \pm 2,3	5,8 \pm 2,8	7,9 \pm 1,3	1,5 \pm 0,1

Продолжение таблицы 4

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
	Ф + Г	25±10,5	19±7,4	38±14,1	47±14	4,0±0,3	6,9±0,4	8,4±2,2	7,8±0,9	0,6±0,2
	Г 0,2 мг/кг	26±1,5	16±6,0	5±2,5	8±2,0	1,0±0,4	2,8±0,6	5,7±0,5	4,3±0,5	1,9±0,25
	Ф + Г	18±9,3	16±4,8	11±5,6	15±4,7	3,2±1,1	8,8±1,2	7,8±1,3	8,4±0,5	0,9±0,3

Использованная литература

- I. Жарковский А.М., Алликметс Л.Х., Мехилане Л.С. Место фенибута среди психотропных препаратов//Уч. зап. Тарт. ун-та: - 1984. - Вып. 687. - С. 5-16.
2. Мехилане Л.С., Васар В.Э. Спектр клинического действия фенибута//Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1984. - Вып.687. - С. 112-123.
3. Нурк А.М. Изменения чувствительности дофаминовых рецепторов при длительном применении нейролептиков и ее коррекция: Автореф. дис... канд. биол. наук. - Тарту, 1982.
4. Нурманд Л.Б., Оттер М.Я., Васар Э.Э. Влияние некоторых структурных аналогов гамма-аминомасляной кислоты на серотонин- и дофаминергические механизмы//Фарм. токс. - 1980. - № 3. - С. 288-291.
5. Оттер М.Я. Взаимосвязь между биологическими колебаниями содержания моноаминов в мозгу белых крыс и действием нейролептиков//Тезисы совещания по актуальным проблемам нейропсихофармакологии. - Тарту, 1980. - С. 44-46.
6. Оттер М.Я. Суточный ритм в действии и токсичности галоперидола//Тезисы докладов Всесоюзной конференции по хронобиологии. - М., 1981. - 190 с.
7. Оттер М.Я. Физиологические колебания содержания моноаминов в мозге лабораторных животных и их связь с действием нейролептиков//Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1982. - Вып. 600. - С. 41-49.
8. Оттер М.Я. Сезонные изменения действия нейролептиков у лабораторных животных//Актуальные вопросы психиатрии. - Таллин, 1984. - С. 106-108.
9. Оттер М.Я. Суточные колебания фармакологических эффектов и токсичности фенибута на крысах и мышах//Актуальные вопросы разработки, изучения и производства лекарственных средств. - Каунас, 1985. - С. 281.
10. Ханина Р.Л., Хоменко А.М. ГАМК-, дофамин- и холинергические механизмы в развитии и коррекции нейролептической каталепсии//Всесоюзный симпозиум "Фармакология производных гамма-аминомасляной кислоты". - Тарту, 1983. - С. 145-148.
- II. Хаунина Г.А. Влияние фенибута на птоз, вызываемый нейротропными средствами, и некоторые показатели его действия при хроническом введении//Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1984. - Вып. 687. - С. 91-96.

12. Campbell A., Baldessarini R.J. Circadian changes in behavioral effects of haloperidol in rats//Psychopharmacol. - 1982. - Vol. 77. - P. 150-155.
13. Campbell A., Hercul M., Sommer B. Circadian changes in the distribution and effects of haloperidol in the rat//Neuropharmacology. - 1982. - Vol. 21. - P. 663-669.
14. Curson G., Green A.R. Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid in small regions of rat brain//Brit. J. Pharmacol. - 1970. - Vol. 39. - P. 653.
15. McCleary P., Leander J.D. Moperedene-induced hypothermia in the rat//Neuropharmacol. - 1982. - Vol. 21, N 12. - P. 1337-1341.
16. Nagayama H., Takagi A., Nahamura E. Circadian susceptibility rhythm to apomorphine in the brain//Commun. Psychopharmacol. - 1978. - Vol. 2. - P. 301-310.
17. Nagayama H., Takagi A., Takahashi R. Toward Chronotherapy in psychiatry//Proc. of a Satellite Symposium to the 8th International Congress of Pharmacology, Nagasaki, Japan 27 - 28 July, 1981. - Toward Chronopharmacol. - 1982. - P. 43-50.

BIOPERIODIC VARIATIONS OF PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF
SIMULTANEOUSLY ADMINISTERED HALOPERIDOL AND FENIBUT

M.Otter, U.Vilu

S u m m a r y

In order to reveal the possible bioperiodic variation of the simultaneous administration of haloperidol and fenibut, their antihypoxic effect in the model of hypoxic hypoxia and the influence of fenibut on catalepsy, ptosis and motility elicited by haloperidol in rats and mice were investigated. Though both drugs under investigation have antihypoxic action, the antihypoxic action of their simultaneous administration was summarized. There are time-dependent variations of motility, emotionality and resistance to anoxic treatment in rodents. The antihypoxic activity of the investigated drugs has bioperiodic variations with top efficiency levels a.m. The data show that injected together with haloperidol, fenibut antagonizes the ptosis, decrease of motility and exploratory activity. The efficiency of fenibut depends on the time of administration. The diurnal maximums of antineuroleptic efficiency of fenibut are during the dark period.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОЛЕПТИКОВ НА РЕАКТИВНОСТЬ ЛИМ-
ФОЦИТОВ *in vitro*

О.Х. Тоомла, Л.Ю. Тоомаспоэг

Лаборатория психофармакологии Института общей и молекулярной
патологии

Последние 30 лет в терапии психических заболеваний успешно используют нейролептические средства. Их широкое применение в клинической психиатрической практике делает необходимым изучение механизма их действия на иммунную систему человека. Это особенно важно, поскольку некоторые авторы предполагают, что нейролептики могут повреждать иммунную систему /35/ или даже способны вызывать обострение психозов вследствие повреждения функционирования иммунной системы /15/.

Впервые обратили внимание на угнетающее действие нейролептиков на пролиферацию лимфоцитов *in vitro* M. Krowles и соавт. /20/. Добавляя к культуре лимфоцитов разные концентрации перфеназина ($9,7 \times 10^{-6}$ до 3×10^{-4} М), авторы установили, что перфеназин, в зависимости от концентрации, угнетал пролиферацию лимфоцитов. При концентрации 4×10^{-5} М пролиферация лимфоцитов практически отсутствовала.

В исследованиях *in vitro* показано также ингибирующее действие хлорпромазина /3, 4, 8, 13, 24/, тиотиксена, прохлоперазина, флуфеназина, трифлуоперазина /8/, галоперидола /8, 24/, тиопроперазина (3) на бластную реакцию лимфоцитов в концентрациях в пределах 10^{-5} до 10^{-3} М.

Однако необходимо отметить, что большинство авторов не исследовали действия нейролептиков при таких концентрациях, в каких они имеются в крови человека (больных шизофренией), в ходе курса лечения.

Целью настоящей работы было установление вида действия разных нейролептиков на реакцию бласттрансформации лимфоцитов человека в условиях культуры в широких пределах концентраций.

Методика исследования

Выделение лимфоцитов из крови проводили по общепринятой методике /9/. Гепаринизированную венозную кровь здорового человека разводили физиологическим раствором в соотношении 1:1 и наслаивали на смесь фикола-верографина с плотностью 1,077. Центрифугировали при комнатной температуре при 500 г 20 мин. Мононуклеарные клетки удаляли из интерфазной полосы между плазмой и градиентом. Полученные лимфоциты промывали фосфатным буфером pH = 7,40 центрифугированием при 150 г 10 мин. Полученные лимфоциты культивировали по общепринятой методике /32/ в стерильных герметических пробирках в среде Игла, содержащей 20% АВ/IV сыворотки, при температуре 37° С в течение 96 часов. Концентрация лимфоцитов в пробирке составляла 3×10^5 клеток/мл при объеме культуры 0,5 мл. В качестве стимулятора пролифераций лимфоцитов использовали фитогемагглютинин фирмы "Дифко" (США). Интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов оценивали радиометрически.

Для проведения опытов использовали Sol. Aminazini 2,5 % и Sol. Triftazini 0,2 % (оба изготовлены в СССР), Sol. Haloperideli 0,5 %, Sol. Trisedyli 0,25 % и Sol. Prednisoloni 3% (фирмы "Гедеон Рихтер А.О. - Венгрия). Препараты разводили до нужной концентрации физиологическим раствором и вводили в среду культивирования лимфоцитов от начала культивирования до конечной концентрации 10^{-10} , 10^{-9} ; 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М.

Результаты исследования

Преднизолон в концентрациях 10^{-10} до 10^{-6} М не влиял на интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином (табл. I). При концентрации 10^{-5} М наблюдалась легкая супрессия, а при концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М тотальная ингибция реакции бласттрансформации. Хлорпромазин и трифлуоперазин при концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М не влияли на интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов (табл. I), начиная с концентрации 10^{-8} М наблюдалась легкая стимуляция реакции бласттрансформации лимфоцитов, причем максимум стимуляции отмечался при концентрации 10^{-7} М. При дальнейшем нарастании концентрации препаратов шло ослабление стимуляции до ингибции реакции бласттрансформации лимфоцитов при концентрации 10^{-5} М и больше. Галопери-

дол и трифлуперидол при концентрации 10^{-10} М существенно не влияли на интенсивность пролиферации лимфоцитов (табл. 1). При повышении концентрации оба препарата заметно стимулировали пролиферацию лимфоцитов. Максимальный стимулирующий эффект у галоперидола наблюдался при концентрации 10^{-8} М (отличие от величины контрольной культуры без препарата достоверно; соответственно 163100 и 1210000 имп/мин.; $p < 0,05$). Для трифлуперидола пик стимуляции реакции бласттрансформации лимфоцитов отмечался при концентрации 10^{-7} М (отличие от величины контрольной культуры достоверно; соответственно 168900 и 121000 имп/мин.; $p < 0,05$). При дальнейшем нарастании концентрации галоперидола и трифлуперидола стимулирующий эффект ослаблялся, начиная с концентрации 10^{-5} М, оба препарата ингибировали пролиферацию лимфоцитов. Корреляционный анализ показал, что между силой антипсихотического действия и величиной максимального стимулирующего действия нейролептиков на бласттрансформацию лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином, существует тесная взаимосвязь: $r = +0,91$ ($p < 0,05$). Выраженность антипсихотического действия препарата оценивали по Ю.М. Саарма и соавт./5/. Оценивая жизнеспособность лимфоцитов в присутствии препаратов в различных концентрациях, установили, что если при концентрациях 10^{-4} М и меньше жизнеспособность лимфоцитов не менялась, то при концентрации 10^{-3} М отмечалась заметная потеря жизнеспособности лимфоцитов.

Нейролептики и преднизолон влияли на интенсивность пролиферации лимфоцитов, не стимулированных митогеном (спонтанная бласттрансформация), аналогично вышеописанному (табл. 2). Корреляционный анализ выявил наличие тесной взаимосвязи между силой антипсихотического действия нейролептиков и величиной максимальной стимуляции интенсивности реакции спонтанной бласттрансформации: $r = +0,99$ ($p < 0,05$).

Обсуждение результатов

В опубликованных до настоящего времени работах имеются данные лишь об ингибирующем влиянии нейролептиков в концентрациях от 10^{-5} М и больше на интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов *in vitro*. В литературе имеются сведения об ингибирующем действии на реакцию бласттрансформации лимфоцитов и других лекарственных препаратов. Обнаружено, что в пределах 10^{-3} до 10^{-5} М угнетает реакцию бласттранс-

Таблица 1

Влияние нейролептиков на интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином

Концентрация препарата в молях	Контроль без препарата	Интенсивность бласттрансформации ($\times 10^3$ имп/мин)				
		Хлорпромазин	Трифлуоперазин	Галоперидол	Трифлуперидол	Преднизолон
	I21,0					
10^{-10}		I19,8	I22,4	I22,3	I27,8	I17,3
10^{-9}		I22,3	I20,3	I29,6	I38,4	I22,1
10^{-8}		I28,2	I36,3	I63,1 ^x	I41,3	I20,8
10^{-7}		I29,6	I51,7	I40,0	I68,9 ^x	I17,3
10^{-6}		I20,4	I32,3	I32,3	I33,2	I22,1
10^{-5}		I10,4	I08,8	94,0	I00,6	I08,4
10^{-4}		0,62	1,72	5,02	3,23	0,73
10^{-3}		0,43	0,31	1,1	0,62	0,29

^x достоверность различия от величины в культуре без препарата $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние нейролептиков на интенсивность реакции спонтанной бласттрансформации лимфоцитов

Концентрация препарата в молях	Контроль без препарата	Интенсивность бласттрансформации ($\times 10^3$ имп/мин)				
		Хлорпромазин	Трифлуоперазин	Галоперидол	Трифлуперидол	Преднизолон
	I415					
10^{-10}		I390	I430	I604	I538	I390
10^{-9}		I435	I440	I918 ^x	2166 ^x	I410
10^{-8}		I491	I520	I714	I689	I395
10^{-7}		I559	I792	I548	I542	I400
10^{-6}		I277	I456	I452	I567	I244
10^{-5}		I303	819	I030	I251	855
10^{-4}		513	609	418	220	420
10^{-3}		209	225	375	130	189

^x достоверность различия от величины в культуре без препарата $p < 0,05$.

формации лимфоцитов лидокаин /13/, натрий салицилат /14/, винбластин, колхицин /29/, имипрамин, диазепам, хлордиазепоксид, фенилгидантоин, ниламид, кодеин, пентобарбитал, фенобарбитал, мепробамат /24/, азатиоприн, 6-меркаптопурин /7/.

Результаты нашей работы показали, что хлорпромазин, трифлуоперазин, галоперидол, трифлуперидол и контрольный препарат преднизолон начиная с концентрации 10^{-5} М и больше ингибировали спонтанную и стимулированную фитогемагглютинином реакцию бласттрансформации. Данные, полученные нами, об аналогичности действия преднизолона и нейролептиков на интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов и данные других авторов об однородности действия нейротропных и применяющихся в соматической медицине препаратов на пролиферативную активность лимфоцитов указывают на неспецифичность феномена ингибиции бласттрансформации лимфоцитов нейролептиками.

Механизм ингибирующего действия нейролептиков на пролиферативную активность лимфоцитов до настоящего времени остается спорным. Выдвинута гипотеза о том, что ингибирующее действие хлорпромазина на бластный ответ лимфоцитов обусловлено аккумуляцией хлорпромазина в регионах, богатых РНК, таких как микросомы, ядрышки и митохондрии, что ведет к связыванию прекурсоров РНК и рибонуклеопротеидов и подавлению обмена вещества в лимфоцитах /8/. Эту гипотезу подтверждают и исследования других авторов. Обнаружено, что хлорпромазин *in vivo* при концентрации $2,4 \times 10^{-4}$ М разобщал окислительное фосфорилирование в митохондриях головного мозга крыс и угнетал состояние "третьего дыхания" митохондрий /11/, в концентрациях 10^{-6} - 10^{-4} М подавлял активность (Mg^{++} - АТФ-азы в митохондриях, а в концентрации 10^{-3} М полностью блокировал активность (Mg^{++} , K^+ и Na^+) - АТФ-азы /28/. Также показано, что хлорпромазин, трифлуоперазин и пимозид снижали уровень АТФ в лимфоцитах в концентрациях 4×10^{-6} М и больше /33/.

Некоторые авторы предполагают, что обнаруженный исследователями низкий ответ лимфоцитов больных шизофренией на действие фитогемагглютина обусловлен циркулирующей в биологических жидкостях больных шизофренией нейролептических препаратов /12, 20/. Следует, однако, отметить, что концентрация нейролептиков в крови больных при длительном введении гораздо меньше той, которая в условиях культуры подавляет интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов. По дан-

ным исследователей концентрация хлорпромазина в крови больных шизофренией при длительном введении препарата была в пределах $0,3 \times 10^{-7}$ и 2×10^{-7} М /23/. Концентрация галоперидола колебалась в пределах $5,3 \times 10^{-9}$ и 4×10^{-8} М /30/. Концентрация трифлуоперазина колебалась в пределах 5×10^{-9} и $2,8 \times 10^{-8}$ М /19/. Отсюда, по нашему мнению, вытекает необходимость изучения действия нейролептиков на реакцию бласттрансформации лимфоцитов в условиях культуры при таких концентрациях, в которых они содержатся в крови человека при длительном введении, т.е. в пределах 10^{-7} и 10^{-9} М. Результаты данной работы показали, что нейролептики в концентрациях 10^{-7} и 10^{-9} М усиливают интенсивность как спонтанной, так и стимулированной фитогемагглютинином реакции бласттрансформации лимфоцитов. Механизм стимулирующего действия нейролептиков на пролиферативную активность лимфоцитов не ясен. Можно предположить, что обнаруженное нами стимулирующее влияние нейролептиков на пролиферацию лимфоцитов в условиях культуры является неспецифическим, поскольку, по литературным данным, некоторые препараты (индометацин, левамизол, метизопринол, 4-аминопиридин, линестренол), применяющиеся в соматической медицине, также усиливают реакцию бласттрансформации лимфоцитов в условиях культуры /16, 17, 26, 31, 34/. Можно предположить, что нейролептики неспецифически стимулируют обменные процессы в клетках, поскольку показано активирующее действие их в условиях культуры в концентрациях 10^{-7} - 10^{-8} М на дыхание митохондрий /22/ и на синтез катехоламинов в клетках надпочечников /10/.

Полученные нами данные о том, что существует позитивная взаимосвязь между силой антипсихотического действия и интенсивностью стимулирующего эффекта на реакцию бласттрансформации лимфоцитов в условиях культуры, свидетельствуют об участии дофаминовых рецепторов в процессе стимуляции пролиферации лимфоцитов нейролептиками. Литературные данные указывают на существование дофаминовых рецепторов на мембранах лимфоцитов /21/. В то же время в литературе имеются данные об ингибирующем действии дофамина на реакцию бласттрансформации лимфоцитов в условиях культуры при концентрации 10^{-6} М /8/ и установлено, что концентрация дофамина в плазме крови здоровых лиц $2,6 \times 10^{-6}$ М /6/. Отсюда можно предположить, что стимуляция дофаминовых рецепторов на мембране лимфоцитов в условиях культуры ведет к ингибции пролиферации лимфоцитов, а блокада дофаминовых рецепторов нейролептиками приводит к

возникновению процессов, обуславливающих интенсивную пролиферацию лимфоцитов. Так как, с другой стороны, установлено, что стимуляция дофаминергической системы приводит к усилению иммунного ответа /1/, то роль дофаминовых рецепторов в процессе стимуляции реакции бласттрансформации лимфоцитов остается еще спорной.

Поскольку доказано, что нейролептики связываются и с серотониновыми рецепторами /25/, то можно полагать, что на мембране лимфоцита могут существовать не только дофаминовые, но и серотониновые рецепторы. По данным литературы повышение уровня свободного активного серотонина путем введения экзогенного серотонина или его предшественника 5-окситриптофана и блокирование ферментативной инактивации серотонина (блокаторы MAO) приводит к угнетению иммунной реакции /2/ и, напротив, выключение серотонинергической системы (разрушение ядер шва или блокирование ферментов синтеза серотонина п-хлорфенилаланином и п-хлорамфетамином) стимулирует иммунную реакцию /2/. Поэтому можно полагать, что блокада серотониновых рецепторов на мембранах лимфоцитов приводит к стимуляции реакции бласттрансформации лимфоцитов нейролептиками.

Выводы

1. Хлорпромазин, трифлуоперазин, галоперидол и трифлуперидол усиливают в терапевтических концентрациях (меньше 10^{-6} М) в условиях культуры интенсивность реакции бласттрансформации лимфоцитов, что говорит о стимулирующих свойствах нейролептиков на реактивность лимфоцитов.

2. При высоких концентрациях (10^{-5} и больше) нейролептики в условиях культуры угнетают реактивность лимфоцитов, что обусловлено, очевидно, влиянием нейролептиков на обменные процессы в клетках и не связано с токсическим влиянием, которое проявляется при сверхвысоких концентрациях (10^{-3}).

3. Поскольку стимулирующее действие нейролептиков на реактивность лимфоцитов в условиях культуры коррелирует с выраженностью их антипсихотического действия, то можно предположить, что нейролептики действуют на лимфоциты через блокаду дофаминовых или серотониновых рецепторов.

Использованная литература

1. Девойно Л.В., Альперина Е.Л. Влияние апоморфина и галоперидола на иммунную реакцию//Фармакол. и токсикол. - 1980. - № 5. - С. 590.
2. Девойно Л.В., Ильюченко Р.Ю. Моноаминергические системы в регуляции иммунных реакций. - Новосибирск: Наука, 1983.
3. Миткевич С.П., Коляскина Г.И. Влияние аминазина и мажептила на пролиферацию лимфоцитов периферической крови в условиях культивирования с фитогемагглютинином//Ж. невропатол. и психиатр. - 1981. - № 2. - С. 115.
4. Пашук Л.К., Комендантова М.В. Влияние аминазина на реакцию бласттрансформации лимфоцитов//Фармакол. и токсикол. - 1975. - № 8. - С. 582.
5. Саарма Ю.М., Алликметс Л.Х., Мехилане Л.С., Саарма М.М., Вахинг В. В. Клиническая психофармакология. - Таллин: Валгус, 1981. - С. 19 (на эст. яз.).
6. Ткачева Г.А., Балаболкин М.И., Ларичева И.П. Радиоиммунологические методы исследования. - М.: Медицина, 1983. - С. 46.
7. Al-Safi S.A., Maddocks J.L. Effects of azathioprine on the human mixed lymphocyte reaction (MLR)//Brit. J. Clin. Pharmacol. - 1983. - Vol. 15. - P. 203-209.
8. Baker G.A., Santalo R., Blumenstein J. Effects of psychotropics agents upon the blastogenic response of human T-Lymphocytes//Biol. Psychiat. - 1977. - Vol. 12, N 2. - P. 159-169.
9. Boyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow//Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol. 21, suppl. 97. - P. 1-109.
10. Brooks C.J., Treml S. Effect of trifluoperazine on catecholamine secretion by isolated bovine adrenal medullary chromaffin cells//Biochem. Pharmacol. - 1983. - Vol. 32, N 2. - P. 371-373.
11. Byczkowski J.Z., Borysewics R. The action of chlorpromazine and imipramine on rat brain mitochondria//Gen. Pharmacol. - 1979. - Vol. 10, N 5. - P. 369-372.
12. Curry S.H. Chlorpromazine: Concentration in plasms, excretion in urine and duration of effects//Proc. Roy. Soc. Med. - 1971. - Vol. 64. - P. 285-289.
13. Ferguson R.M., Schmidtke J.R., Simmons R.L. (I). Inhibi-

- tion of mitogen-induced lymphocyte transformation by local anesthetics//*J. Immunol.* - 1976. - Vol. 116, N 3. - P. 627-634.
14. Gabourel J.D., Davies G.H., Rittenberg M.B. Effects of salicylate and phenobarbital on lymphocyte proliferation and function//*Clin. Immunol. Immunopath.* - 1977. - Vol. 7. - P. 53-61.
 15. Gammon D.G., Hafes H., Doherty J.P. Chlorpromazine and immunologic considerations of schizophrenia//*Ann. Intern. Med.* - 1980. - Vol. 92, N 3. - P. 441-442.
 16. Gatner E.M.S. Levamisole augmentation of PPD-induced lymphocyte proliferation//*SA Med. J.* - 1981. - Vol. 59. - P. 109-110.
 17. Goodwin J. S., Messner R.P., Peake G.T. Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro//*J. Clin. Invest.* - 1978. - Vol. 62. - P. 753-760.
 18. Gurson G. Biochemical pharmacology of phenothiazine and related substances in biochemical aspects of neurological disorder//*Oxford.* - 1968. - P. 82-87.
 19. Javaid J.I., Davis J.M., Dysken M.W., Janick P., Casper R. Neuroleptic concentration on schizophrenia patients: measurement by radioreceptor assay and gas chromatography//*Psychopharmacol. Bull.* - 1983. - Vol. 19, N 1. - P. 72-74.
 20. Knowles M., Saunder M., McClelland H.A. The effect of phenothiazine therapy on lymphocyte transformation in schizophrenia//*Acta Psychiat. Scand.* - 1970. - Vol. 46. N 1. - P. 70.
 21. Le Fur G., Zarifian E., Phan T., Cuhe H., Flamier A., Bouchami F., Burgevin M.C., Loo H., Gerard A., Uzan A. H³-spiroperidol binding on lymphocytes: changes in two different groups of schizophrenic patients and effect of neuroleptic treatment//*Life Sci.* - 1983. - Vol. 32, N 3. - P. 249-255.
 22. Mainard F., Amory C. Etude de l'effet biphasique de certains neuroleptiques et antidépresseurs chimiquement apparents sur la respiration mitochondriale//*Sci. Med.* - 1975. - Vol. 6, N 5. - P. 361-366.
 23. May P.R.A., Putten T.V., Jenden D.J., Yale C., Dixon W.J., Goldstein W.J. Prognosis in schizophrenia: Individual differences in psychological response to a test dose of antipsychotic drugs and their relationship to

- blood and saliva levels and treatment outcome//Comprehens. Psychiat. - 1981. - Vol. 22, N 2. - P. 147-152.
24. Nahas G.G., Desoires B., Leger C. Effects of psychotropic drugs on DNA synthesis in cultured lymphocytes//Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1979. - Vol. 160, N 3. - P. 344-348.
 25. Ontmann R., Bischoff S., Radeke E., Daleni-Stula A. Correlations between different measures of antiserotonin activity of drugs//Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. - 1982. - Vol. 321. - P. 265-270.
 26. Pasino M., Bellone M., Cornaglia P., Tononi G.P., Massimo L. Methisoprinol effect on enriched B and T lymphocyte populations stimulated with phytohemagglutinin//J. Immunopharmacol. - 1982. - Vol. 4, N 1-2. - P. 101-108.
 27. Portoles A., Ojeda G., Portoles M.P., Rojo M. Effects of several neuroleptic compounds on the blastogenic response of spleen cells from mice//Int. J. Tissue React. - 1982. - Vol. 41, N 2. - P. 133-140.
 28. Radu O., Nora P., Atela N., Train T., Reli S. On the action of chlorpromazine on the brain mitochondria and microsomes of rat//Rev. Roum. Biochim. - 1981. - Vol. 18, N 3. - P. 209-216.
 29. Resch K., Bouillon D., Gemsa D. Drugs which disrupt microtubules do not inhibit the initiation of lymphocyte activation//Nature. - 1977. - Vol. 265, N 5592. - P. 349-351.
 30. Sojadi C., Smith R.C., Shvartsburd A., Morton V., Mirabi R., Gordon J. Neuroleptic blood levels in outpatient maintenance therapy of schizophrenia//Psychopharmacol. Bull. - 1984. - Vol. 20, N 1. - P. 110-113.
 31. Stojanov E. Study of the influence of some reversal agents on the immune system//Anaesthesiol. Reanim. - 1983. - Vol. 8, N 6. - P. 343-348.
 32. Urbaniak S.J., White A.G., Barclay R.G., Wood S.M., Kay A.B. Tests of immune function//Handbook of experimental immunology. - Oxford, 1978. - Chapter 47.
 33. Wolberg G., Zimmerman T.P. Effects of calmodulin antagonists on immune mouse lymphocyte//Mol. Pharmacol.-1984. - Vol. 26, N 2. - P. 286-292.
 34. Wybran J., van Bogaert E., Govaerts A. Lynestrenol, an amplifier of lymphocyte stimulation//Biomed. - 1977. - Vol. 27, N 10. - P. 16-19.

35. Zarrabi M.H., Zucker S., Miller F., Derman R.M., Romano G.S., Hartnett J.A., Varma A.O. Immunologic and coagulation disorders in chlorpromazine-treated patients//Ann. Intern. Med. - 1979. - Vol. 91. - P. 194-199.

THE EFFECTS OF NEUROLEPTICS UPON
BLASTTRANSFORMATION OF LYMPHOCYTES
O.Toomla, L.Toomaspoeg

S u m m a r y

Earlier investigations have shown that neuroleptic drugs such as chlorpromazine, trifluoperazine and haloperidol have an immunosuppressive effect. Both in in vivo and in vitro experiments they inhibited immune response. The aim of this investigation was to study the effect of neuroleptics in vitro upon the reaction of blasttransformation of lymphocytes (RBL) in concentrations in which they are present in human blood during long-term antipsychotic administration, that is in concentrations ranging from 1 to 100 nM. Heparinized venous blood was obtained from a healthy adult donor and lymphocytes were separated by gradient centrifugation according to the conventional technique. Lymphocytes were cultured for 96 hours at 37°C and intensity of RBL was evaluated by the uptake of ³H-thymidine. Chlorpromazine, trifluoperazine, haloperidol, trifluoperidol and control drug prednisolon were added to the culture medium from the beginning of cultivation up to final concentrations from 0,1 nM to 1 mM. The results showed that chlorpromazine trifluoperazine, haloperidol and trifluoperidol in concentrations from 1 to 0,01 mM inhibited, in concentration 1 μM had no effect or later the intensity of spontaneous and stimulated with phytohaemagglutinin RBL. Control drug prednisolon in concentrations from 0,1 nM to 1 μM had no effect and in concentrations from 0,01 to 1 mM suppressed the intensity of RBL. All drugs in concentration 1 mM showed toxic influence upon lymphocytes as it was found by the cell viability test. Thus, our experiments show that neuroleptic drugs enhance the functioning of immunocompetent cells.

АНАЛИЗ ПРИНЦИПОВ РАСПОЗНАВАНИЯ ОБРАЗОВ И КОДИРОВАНИЯ
ХИМИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ В ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
СИСТЕМЕ ГОМЕОСТАЗА НА ПРИМЕРЕ НЕЙРОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ

И. Е. Ковалев

Лаборатория иммунофармакологии Научно-исследовательского
института по биологическим испытаниям химических соединений,
Москва-Купавна

В 1977 г. впервые была сделана попытка рассмотреть понятие иммунитета с принципиально новых позиций, основанных на анализе принципов функционирования цитохром Р-450-зависимой монооксигеназной и иммунологической систем /3/. В результате стало ясно, что роль системы иммунитета в организме выходит далеко за пределы существовавших до сих пор представлений. Достижения молекулярной фармакологии и иммунохимии позволили считать иммунитет функцией системы организма, обеспечивающей распознавание, метаболизм, нейтрализацию и выведение из организма неограниченного круга самых разнообразных химических соединений (ксенобиотиков и эндогенных, макромолекулярных и низкомолекулярных) /3/.

Дальнейшая разработка этой новой проблемы на основе достижений молекулярной биологии, кибернетики, теории гомеостаза Уолтера Кеннона /18/ и теории функциональных систем П.К.Анохина /1/ позволила понять биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям /5, II/. Была сформулирована концепция иммунохимической функциональной системы гомеостаза /5, 6, 8, II/.

В иммунохимической функциональной системе гомеостаза, выявленной нами, системообразующим фактором является химическое соединение, ферментативно или неферментативно образующее реакционноспособные метаболиты, ковалентно связывающиеся с макромолекулами, в том числе с белками. Этот процесс осуществляется разными механизмами и играет глобальную роль в химическом гомеостазе организма. С одной стороны, ковалентное связывание низкомолекулярной химической структуры с белком является повреждением этого белка, но с другой - это образование конъюгированного антигена, в котором присоединяющаяся конкретная химическая структура играет роль гаптена.

Такой, естественно образующийся в организме антиген способен индуцировать систему иммунитета к "производству" соответствующих клонов лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецепторы, связывающие антигенную детерминанту (гаптен), и антитела, также специфически связывающие гаптен. В наших исследованиях и в работах других авторов /4, Ю, II/ показано, что в результате этого развивается устойчивость организма к конкретным химическим соединениям, например, к морфину, барбитуратам, сердечным гликозидам и др.

Свойство специфически реагировать с неограниченным кругом химических веществ (гаптенов) считалось характерной чертой только для системы иммунитета. Однако в последующие годы была открыта другая, ферментативная система, также способная взаимодействовать с разнообразными химическими структурами. Это цитохром Р-450-зависимая монооксигеназная система /23/. Нами же был впервые проведен анализ функций этих двух систем под единым углом зрения /3, 4, II/, позволивший установить то, что они являются подсистемами иммунохимической функциональной системы гомеостаза.

В иммунохимической функциональной системе гомеостаза цитохром Р-450, осуществляющий окисление бесчисленного количества веществ, играет особую роль. Он, по нашему мнению, способен через окисление неограниченного круга ксенобиотиков и многих эндогенных веществ продуцировать системообразующий фактор (естественный конъюгированный антиген) и создавать функциональную систему химического гомеостаза по крайней мере из двух основных подсистем - метаболической и иммунологической.

Известно, что цитохром Р-450 и другие ферменты способны превращать различные химические соединения, попадающие в организм извне, или, при определенных условиях, эндогенные вещества, в высокореакционноспособные интермедиаты (эпоксиды, хиноны, свободнорадикальные соединения), ковалентно связывающиеся с белком. Это связывание, как мы полагаем, вызывает "возмущение" в системе гомеостаза, а далее автоматически организует подключение иммунологической подсистемы, ослабляющей это возмущение при помощи антител и иммунокомпетентных клеток.

Анализ взаимодействий монооксигеназной и иммунологической подсистем в иммунохимической функциональной системе гомеостаза, инициированных появлением конъюгированного антигена, позволил нам установить следующее:/6/. Повреждающий и

одновременно системообразующий фактор, формируя естественные конъюгированные антигены, обеспечивает не только включение высокоспецифических нейтрализующих иммунологических механизмов, т.н. длительно действующая отрицательная обратная связь (I) и регуляцию их интенсивности (II), но и автоматически осуществляет "распознавание образов химических соединений" (III), автоматически организует и подключение подсистемы памяти (подсистема иммунитета), снабжающей иммунохимическую систему гомеостаза памятью о конкретной химической структуре, вызвавшей возмущение в системе (IV), что дает возможность хранить информацию, самообучаться и развиваться на основе приобретенного опыта (V), обеспечивая "направленное внимание" и "упреждающее поведение" (VI) в отношении химического соединения. Высокореакционноспособные метаболиты обеспечивают и ряд других отрицательных обратных связей: повреждение и элиминацию (адаптивную селекцию) определенных молекул фермента (например, цитохрома P-450) среди множественных его форм (VII) и клонов клеток (VIII), неадекватно генерирующих опасные реакционноспособные метаболиты. Таким образом, концепция иммунохимической функциональной системы гомеостаза полностью соответствует всем основным биокibernетическим принципам. В данной статье мы не будем подробно рассматривать все указанные положения, т.к. они изложены нами ранее /5, II/. Остановимся лишь на тех указанных пунктах, которые относятся к проблеме распознавания образов химических соединений и использования организмом химической информации.

Задача распознавания образов является для кибернетики центральной. Распознавание образов становится основной проблемой разумной деятельности. Проблема распознавания образов химических соединений организмом и использования им информации о химических структурах до сих пор не исследовалась, т.к. не были известны какие-либо подходы к этой проблеме. Концепция иммунохимической функциональной системы гомеостаза дала возможность разрабатывать эту проблему.

Согласно десятой теореме Шеннона /13/, которую Эшби /14/ использовал как основу для построения кибернетической теории биологического гомеостаза, организм непрерывно "бомбардируется" информацией, исходящей из окружающей среды и стремящейся вывести его за те границы, в которых возможно выживание. Поэтому для достижения стабильности организм должен, в свете теоремы Шеннона, запастись информацией в некоем

"регуляторе" (аналогичном каналу коррекции) в количестве, по меньшей мере соответствующем числу "нарушений". Этот закон необходимого разнообразия, как его называет Эшби, означает, что организм должен постоянно заниматься накоплением информации (запасаемой против градиента, обусловленного вторым законом термодинамики), причем количество этой информации должно быть достаточно для того, чтобы организм мог противостоять определенным угрожающим его воздействиям среды.

Распознавание образа химического соединения происходит, по нашему мнению, по крайней мере двухэтапно, двумя принципиально разными механизмами. На входе в систему автоматически происходит распознавание повреждающей и неповреждающей молекул, т.е. существует специальный механизм для выделения "значащего" сигнала из непрерывного потока химических воздействий среды. Если молекула высокореакционноспособна и ковалентно связывается с белком, естественно, повреждая его, то она потенциально опасна (вносит возмущение в систему) и требует особого "внимания" со стороны организма. В общем, сначала идет определение "да" или "нет", от которого зависит дальнейшее направление того или иного вещества по двум разным каналам. Организм получает сообщение о веществе: "повреждает" или "не повреждает", т.е. получает количество информации, равное одному биту (по определению, один бит информации есть такое количество информации, которое необходимо, чтобы сделать выбор между двумя равновероятными взаимноисключающими возможностями).

Считается, что всякое получение информации есть "обучение". Если мы включаем простейшее явление, т.е. прием одного бита информации, в понятие обучения, то это уже предопределяет ответ на вопрос, обучается ли вычислительная машина, когда она получает входную информацию /2/. Такое обучение рассматривается как обучение первого порядка. Подсистема, находящаяся на входе химического соединения в организм, например, ферментативная монооксигеназная, не только синтезирует конъюгированные антигены, присоединяя химическое соединение к белку, но и сама способна изменять ответ (интенсивность окисления вещества со всеми вытекающими последствиями), т.к. в ней происходит индукция или ингибция синтеза молекул цитохрома P-450 и ассоциированных ферментов, а также отбор оптимальных изоформ. Таким образом, уже на входе на уровне монооксигеназной подсистемы идет процесс обучения, который можно назвать обучением второго порядка, т.к., по

Бейтсону /2/, обучением второго порядка называется процесс, в котором биологическая система изменяет свою способность получать ответ "да" или "нет" при получении информации. Следует отметить, что "обучение" на уровне окисляющих ферментов не базируется на длительной памяти, хотя в принципе запоминание здесь может происходить /Ю/, и не является специфическим в отношении конкретного соединения. Длительная память о химической структуре и обеспечение более дифференцированных точных адаптивных реакций в иммунохимической функциональной системе гомеостаза обеспечивается иммунологической подсистемой, которая по количеству входящих в ее состав макрофагов и лимфоцитов и по способности распознавать образы химических структур сопоставима с центральной нервной системой. Мы полагаем, что исследование процессов распознавания образов и запоминания химических структур в иммунной системе может оказать существенную помощь в понимании сходных, вероятно, процессов в ЦНС.

Какие же существуют экспериментальные основы положений, указанных выше?

Эксперименты с иммунизацией животных конъюгированными антигенами, содержащими, например, в качестве гаптенa морфин, барбитураты, серотонин, аминазин и др. вещества, показали, что организм отвечает продукцией антител и лимфоцитов, специфически связывающих то или иное соединение в крови и тканевых жидкостях /Ю, II/. Чем же в данном случае является молекула антитела или молекула иммуноглобулинового рецептора? Не чем иным как пептидным носителем информации о конкретном химическом веществе, т.е. в иммунологической подсистеме информация, вносимая в организм химическим веществом (морфин, барбитураты и др.), переводится на пептидный язык, более удобный для хранения информации и ее использования. Активный центр антитела является комплементарным индуцировавшей его появлению (или его отбор) химической структуре, а комплементарность определяется соответствующей аминокислотной последовательностью. Антитело является рецептором конкретной структуры. Проблема хранения информации, как известно, - это в основном проблема ее воспроизведения. Появление антител, специфически связывающих низкомолекулярное соединение, например, морфин, свидетельствует о перекодировании информации о химическом веществе. Антитело - это пептидная структура, несущая обратный код индуцировавшего его вещества.

Встает принципиально важный вопрос: можно ли через иммунологическую систему получить не только обратный, но и прямой пептидный аналог непептидной химической структуры?

В последнее время появились данные, которые позволяют нам утверждать, что такая возможность не только существует, но и постоянно реализуется в организме. После соответствующей обработки химической информации в подсистеме иммунитета индуцируется синтез пептидных аналогов непептидных веществ, попадающих в организм.

Рассмотрим такую возможность на примере морфина. При его введении в организм высокорекреационноспособные метаболиты, образующиеся в результате окисления в системе цитохрома Р-450, ковалентно связываются с белками и формируется конъюгированный антиген /4, II/. Этот конъюгированный антиген индуцирует синтез пептида, входящего в состав антитела в виде активного центра, специфически распознающего молекулу морфина. То есть появляется пептидный антиморфин, встроенный в антитело, являющееся его носителем. Этот антиморфин комплементарен морфину и связывает его. Пептидный антиморфин (антитело) конкурирует с опиатными рецепторами за морфин. Антитело, встроенное в плазматическую мембрану /12/, само является рецептором морфина. В общем, в ответ на морфин в организме появляются циркулирующие антиморфинные антитела и аналогичные рецепторы в иммунокомпетентных клетках, комплементарные молекуле морфина. Следовательно, в ответ на появление в организме какого-то нового вещества автоматически появляется и его рецептор.

Чрезвычайно интересно то, что вслед за пептидным антиморфином должен появляться и пептидный аналог морфина. Такая возможность четко показана для некоторых других веществ, о которой речь пойдет ниже. Сейчас известно, что на антитело вырабатывается свое антитело, распознающее активный центр первого антитела. Это антиантитело и есть пептидный аналог структуры морфина. Итак, путь появления пептидного аналога морфина следующий: морфин → антитело к морфину (антиморфин) → антитело к антиморфинному антителу (пептидный аналог морфина). Если принять эту точку зрения, то можно перевести проблему появления морфиноподобных пептидов в процессе эволюции на принципиально новый уровень.

Нами в опытах на крысах и американскими исследователями в опытах на обезьяне было показано, что у животных с выработанной зависимостью от морфина после соответствующей актив-

ной иммунизации конъюгированным антигеном морфин-белок ослабляется стремление потреблять морфин /7, 16/. Казалось бы, животные, напротив, должны потреблять больше морфина для достижения эйфории и предупреждения абстиненции в условиях нейтрализации морфина антителами в организме. Вполне вероятно, что в ответ на появление антиморфинных антител индуцируется синтез анти-антител с морфиноподобной активностью.

Концепция перекодирования информации о том или ином соединении на пептидный язык не является голословной, а базируется на четко доказанных фактах.

Еще в 1955 г. была описана индивидуальная антигенная специфичность иммуноглобулинов /27/. Это явление позже получило название идиотипии. Главные идиотипические детерминанты, как известно, находятся в гипервариабельных участках, определяющих комплементарность. Иммуноглобулины со сходной специфичностью имеют общие антигенные детерминанты, которые включают центр связывания антител. Реакцию между идиотипическими антителами можно ингибировать гомологичными гаптенами.

Антиидиотипические антитела появляются спонтанно во время иммунизации антигеном, а также при аутоиммунных заболеваниях и, как считают, играют важную роль в регуляции иммунного ответа /19/. Антиидиотипические антитела могут быть определены против разных идиотипов на молекуле иммуноглобулина. Те из них, которые направлены против места связывания в молекуле иммуноглобулина, должны имитировать оригинальный антиген в отношении структуры и функциональных свойств. Этот случай впервые описан для антиидиотипических антител против антител к инсулину /25/ и ретинолсвязывающему белку /26/. Было показано, что инъекции кроликам антиинсулиновых антител приводят к синтезу антиидиотипических антител, которые воспроизводят действие гормона, связываясь с инсулиновыми рецепторами и вызывая тем самым физиологические эффекты инсулина. То есть антиинсулиновые антитела — это функциональный аналог инсулина, несмотря на огромные различия в их строении. Установлено, что инъекции инсулина стимулируют продукцию антиинсулиновых антител, а затем появляются антиидиотипические антитела, способные конкурировать с инсулином как за связывание с рецептором, так и за стимуляцию захвата глюкозы инсулинчувствительными клетками. В последующих работах /22, 24/ было показано, что антиидиотипические антитела, воспроизводящие действие гормона, могут быть получены даже, если оригинальный лиганд (алпронолол) не имеет пептидной

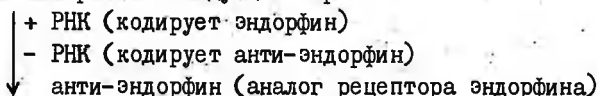
структуры. Затем были получены антитела к антителам для низкомолекулярного агониста холинорецептора, также не имеющего ничего общего с пептидной структурой. Все это показывает, что антиидиотипические антитела могут принимать конфигурацию, которая является комплементарной как к идиотипу антитела, так и к рецепторам, даже несмотря на отсутствие структурного сходства с оригинальными лигандами.

Установлено также, что антитела против транс-3,3'-бис/ α -(триметиламмонио)метил/азобензол бромида, являющегося мощным агонистом ацетилхолинового рецептора, имеет способность взаимодействовать с холиномиметиками и холиноблокаторами так же как и ацетилхолиновый рецептор. Далее установлено, что иммунизация кроликов очищенными антителами к указанному холиномиметику приводит к появлению в крови антител к введенным антителам (антиантител), которые в то же время ведут себя точно так же как антитела к холинорецептору. Следовательно, синтез антител против холинорецептора был индуцирован иммунизацией антителами к лиганду-агонисту холинорецептора. Таким образом, антитела к рецептору можно получать без выделения рецепторов и без иммунизации ими, а вводя в организм антитела к холиномиметику. Недавно /21/ обнаружили, что моноклональные антиидиотипические антитела против антител к ацетилхолиновому рецептору от больных миастенией графис связывают холинергический лиганд α -бунгаротоксин. Это связывание может быть ингибировано другими холинергическими лигандами как антагонистами, так и агонистами. Антиидиотип был также способен индуцировать антирецепторные антитела у мышей. Таким образом, антиидиотип имеет функциональные свойства, сходные с теми, которые существуют у оригинального антигена - ацетилхолинового рецептора /28/.

В последнее время была выявлена интересная закономерность в генетическом коде, которая базируется на гидропатичной антикомплементарности аминокислот, установленной ранее /17/. Кодоны для гидрофильных и гидрофобных аминокислот на одной цепи нуклеиновой кислоты комплементарны кодонам для гидрофобных и гидрофильных аминокислот на другой цепи, соответственно. Общая тенденция кодонов для "незаряженных" (слабогидрофильных) аминокислот - это быть комплементарной кодонам для "незаряженных" (слабогидрофильных) аминокислот. Предположили /17/, что это правило может реализовываться в связывании пептидов, которые кодируются комплементарными цепями РНК, и привели доказательство этому. Показали специфическое

высокоаффинное связывание естественно существующих пептидов (кортикотропина /АКТГ/) и γ -эндорфина с синтетическими копиями, которые комплементарны последовательностям РНК для мРНК для АКТГ и γ -эндорфина, соответственно.

Представленные выше результаты экспериментов можно схематически отобразить следующим образом:



Если получить антитела к указанному анти-эндорфину, то они будут обладать функциональной способностью эндорфина.

Анализ явления продукции в организме антител к разнообразным химическим соединениям (т.е. рецептирующих молекул для конкретной химической структуры) и анти-антител (т.е. пептидных аналогов, вошедших в организм химических соединений) дает нам возможность утверждать, что в иммунохимической функциональной системе гомеостаза происходит перекодирование практически любой (или почти любой) химической структуры в пептидный код и появление пептидных аналогов исходной химической структуры.

Таким образом, анализ функции иммунохимической системы гомеостаза позволил нам обнаружить фундаментальную закономерность, касающуюся получения, хранения и использования информации о химической среде.

Использованная литература

1. Анохин П.К. Избранные труды. Философские аспекты теории функциональных систем. - М.: Наука, 1978.
2. Бейтсон Г. Некоторые особенности процесса обмена информацией между людьми//Концепция информации и биологические системы. - М.: Мир, 1966. - С. 166.
3. Ковалев И.Е. Иммуитет как функция системы организма, инактивирующей чужеродные химические соединения//Хим.-фарм. жур. - 1977. - Т. II, № 12. - С. 3.
4. Ковалев И.Е. Морфин и родственные вещества - индукторы синтеза специфических антител//Хим.-фарм. жур. - 1978. - Т. 12, № 9. - С. 3.
5. Ковалев И.Е. Роль иммунологических механизмов в системе поддержания химического гомеостаза//Химия и биология иммунорегуляторов. - Рига: Зинатне, 1985. - С. 188.

6. Ковалев И.Е. Цитохром Р-450 как центральное звено иммунохимической функциональной системы гомеостаза//Всесоюзн. конф. "Цитохром Р-450 и охрана внутренней среды человека: (Тез. докл.). - Пушкино, 1985. - С. 10.
7. Ковалев И.Е., Звартау Э.Э., Лаврецкая Э.Ф. Влияние активной иммунизации конъюгатом морфина с бычьим сывороточным альбумином на самопотребление морфина//Фармакол. и токсикол. - 1981. - № 2. - С. 251.
8. Ковалев И.Е., Маленков А.Г. Поток чужеродных веществ: влияние на человечество//Природа. - 1980. - № 9. - С.90.
9. Ковалев И.Е., Меткалова С.В., Полевая О.Ю. Ослабление действия морфина у крыс, иммунизированных конъюгированным антигеном морфин-белок//Фармакол. и токсикол. - 1979. - Т. 17, № 6. - С. 615.
10. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. Антитела к физиологически активным веществам. - М.: Медицина, 1981.
11. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. Биологические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. - М.: Наука, 1985.
12. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю., Башарова Д.А. Индукция образования клеток селезенки, связывающих морфин, как проявление иммунной реакции//Фармакол. и токсикол. - 1982. - Т. 20, № 4. - С. 58.
13. Шеннон К. Работы по теории информации и кибернетике. - М.: ИЛ, 1963.
14. Эшби У. Введение в кибернетику. - М.: ИЛ, 1959.
15. Эшби У. Конструкция мозга. - М.: ИЛ, 1962.
16. Bonese K.P., Wainer B.H., Fitch F.W. et al. Changes in heroin self-administration by a rhesus monkey after morphine immunization//Nature. - 1974. - Vol. 252, - P. 708.
17. Bost K.L., Smith E.M., Blalock J.E. Similarity between the corticotropin /ACTH/ receptor and peptide encoded by an RNA that is complementary to ACTHmPNA//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1985. - Vol. 82. - P. 1372.
18. Cannon W. The wisdom of the body. - London, 1932.
19. Jerne N.K. The immune system//Sci. Am. - 1973. - Vol.229 - P. 52.
20. Landsteiner K. The specificity of serological reactions, revised. - Cambridge: Harvard University Press, 1945 (re-published by Dover Publications, N.Y., 1962).
21. Lefvert A.K., Fulpius B.W. Receptor-like activity of a monoclonal anti-idiotypic antibody against an antiace-

- tylcholine receptor antibody//Scand. J. Immunol. -1984.
- Vol. 19. - P. 485.
22. Lu B.-Z., Courand P.O., Schmutz A., Strosberg A. D, The internal image of catecholamines: expression and regulation of a functional network//Ann. New York.Acad.Sci. - 1983. - Vol. 418. - P. 240.
 23. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II: Solubilization, purification and properties//J. Biol. Chem. - 1964. - Vol. 239. -P. 2379.
 24. Schreiber A.B., Conrad P.O., Andre C., Vary B.,Strosberg A.D. Antialprenolol antiidiotypic antibodies bind to β -adrenergic receptors and modulate catecholamine sensitive adenylyl cyclase//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1980. - Vol. 77. - P. 7385.
 25. Sege K., Peterson P. Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes//Proc. Nat. Acad. Sci.USA. - 1978. - Vol. 75. - P. 2443.
 26. Sege K., Peterson P. Anti-idiotypic antibodies against anti-vitamin A transporting protein react with prealbumin//Nature. - 1978a.- Vol. 271. - P. 167.
 27. Slater H.J., Ward S.M., Kunkel H.G. Immunological relationships among the myeloma proteins//J. Exp. Med: - 1955. - Vol. 101. - P. 85.
 28. Wassermann N.H., Penn A.S., Freimuth P.I., Treptow N. et al. Anti-idiotypic route to antiacetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1962. - Vol. 79. - P. 4810.

ANALYSIS OF THE PRINCIPLES OF RECOGNITION OF IMAGES AND
AND CHEMICAL INFORMATION CODING IN IMMUNOCHEMICAL FUNCTIONAL
HOMEOSTASIS SYSTEM ON THE EXAMPLE OF NEUROTROPIC AGENTS
I.E.Kovalev

S u m m a r y

The conception of homeostatic immunochemical functional system made it possible to elucidate the main principle of informational coding of unlimited variety of chemical structures. While being activated in biochemical systems, such as the system of cytochrome P-450, nonpeptide substances, neurotropic drugs for example, covalently bind proteins forming a conjugated antigen. This conjugate induces the synthesis of antibodies with the active center capable of recording the hapten structure. Thus the aminoacid sequence of the antibody's active center contains the information about the hapten chemical structure (inverse code). The antibody formed against the active center of this antibody can be considered as the direct peptide analog of the nonpeptide exogenous substance. The similarity of the biological activity of the basic substance and its peptide analog (antiantibody) is proved by their interaction with the same receptor (cholinoreceptor, adrenoreceptor, opiate receptor, etc.).

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ Na -НАСОСА МОЗГА
ПРИРОДНЫМИ И НЕПРИРОДНЫМИ ЭФФЕКТОРАМИ

М.К.Цильмер, Э.И.Карелоон, Т.Т.Салум, Л.Я.Тяхепильд
Кафедра биоорганической и биологической химии ТГУ

Na , K -АТФаза (Na^+ , K^+ -активируемая, Mg^{2+} -зависимая аденозинтрифосфатаза), считаемая в настоящее время синонимом Na -насоса /1, 19/, является мембранным ферментом, осуществляющим активный транспорт Na^+ и K^+ . Этот сложный шипопротеидный комплекс имеет особое функциональное значение в нейрональных мембранах, так как обеспечивает создание потенциала покоя. Важная общебиологическая функция, олигомерная структура и S-образная кинетика связывания многих эффекторов даёт основание предполагать аллостерическую природу Na , K -АТФазы. Вместе с тем такое предположение к настоящему времени не нашло окончательного подтверждения. Почти не разработаны также вопросы о молекулярном механизме аллостерической регуляции Na -насоса.

В настоящем обзоре характеризуется регуляция Na , K -АТФазы мозга с эссенциальными лигандами (Na^+ , K^+ , АТФ), физиологически активными эффекторами (NH_4^+ , простагландин E_2), а также нейротропными средствами (НС) различных классов.

Изложенные результаты в совокупности представляют интерес как для функциональной нейрохимии, так и для молекулярной нейрофармакологии.

Методика

В большинстве опытов использовались ферментные препараты (ФП), изолированные из головного мозга крупного рогатого скота по разработанному нами методу /11, 14/. При выявлении функциональных групп фермента, участвующих в связывании регуляторных лигандов, использовались более очищенные ФП, полученные с помощью осаждения сульфатом аммония /14/. Исследования механизма действия ПГЕ₂ на Na , K -АТФазный комплекс проводились с ФП головного мозга крыс /6/.

Активность Na , K -АТФазы определялась в течение 20 мин при 37°C в реакционной смеси, содержащей 30 мМ трис-НС1 (рН

7,4), 3 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АТФ-трис, 100 мМ $NaCl$ и 20 мМ KCl . В контрольных опытах либо присутствовал 0,1 мМ уабаина, либо отсутствовали $NaCl$ и KCl . Реакция начиналась внесением ферментного белка (конечная концентрация 3-10 мкг/мл) в реакционную смесь и прекращалась добавлением ледяной 20 % трихлоруксусной кислоты. Φ_n , отщепленный от АТФ, определяли общеизвестным колориметрическим методом /7,15/. В случаях, когда изучаемые лиганды мешали определению Φ_n (образовывалась мутность), они предварительно экстрагировались с хлороформом /26/. К-пНФазную активность (эта активность является частной реакцией Na, K -АТФазной системы) определяли по приросту пНФ (п-нитрофенола), освобожденного из пНФФ под действием ферментного белка (5-10 мкг/мл) в реакционной среде с составом: 30 мМ трис- HCl (рН 7,4), 4,5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ пНФФ-трис и 5 мМ KCl . В контроле KCl отсутствовал. Реакция проводилась при 37°C 15 мин и была остановлена прибавлением 0,25 М $NaOH$. Количество белка Φ_P определяли по /21/.

Для установления кооперативного связывания лигандов с Na, K -АТФазной системой применяли графический метод Хилла /22/. В определенных случаях (опыты с одновалентными катионами и некоторыми HC) был дополнительно использован метод десенсибилизации Φ_P либо с мочевиной (0,5-1 М, 0°C, 15 мин), либо с SDS (0,05 мг на мг белка, 37°C, 20 мин), либо с повышенной температурой (55°C, 5 мин). Защитные эффекты Na^+, K^+ и субстратов (АТФ и пНФФ) от ингибирующего влияния модификаторов были выявлены преинкубацией Φ_P с модификатором в концентрации, соответствующей I_{50} /10/. Преинкубацию проводили в трис- HCl буфере (12,5 мМ, рН 7,4) при 37°C в течение 20 мин. В опытах с водорастворимым карбодимидом (МЦКД) использовался 12,5 мМ имидазол- HCl буфер (рН 6,3). Параллельно был проведен контрольный опыт: преинкубация Φ_P без модификатора. После преинкубации к пробам добавляли соответствующую реакционную смесь и определяли Na, K -АТФазную или К-пНФазную активности. Конкуренция между модификаторами и Na^+ или K^+ за аллостерические центры фермента определялась в присутствии различных концентраций Na^+ ($/K^+/= 5$ мМ) или K^+ ($/Na^+/= 200$ мМ) в реакционной среде. Опыт проводился с модификатором и без него (контроль). На основе экспериментальных данных составляли графики Hunter и Downs /18/.

Влияние $ПЭ_2$ на температурную зависимость Na, K -АТФазной реакции исследовали в интервале 14-37°C. Опыт проводили с 2,0 мМ $ПЭ_2$ и без него (контроль). Полученные данные выража-

ли в виде графиков Аррениуса. Обработку ФП с фосфолипазой A_2 (ФЛА₂) проводили по ранее описанному методу / 6 /.

Результаты исследования

Из наших работ известен сигмовидный характер активирования Na, K -АТФазы с Na^+ и K^+ , а также с Mg^{2+} . Активация K -пНФФазы с K^+ носит такой же характер /8, 13, 25/. Вместе с тем по данным таблицы I коэффициенты Хилла (n_H) для Na^+ , K^+ и Mg^{2+} в отношении Na, K -АТФазы как и для K^+ в отношении Na, K -пНФФазы превышают единицу. Эти факты свидетельствуют о кооперативном связывании названных катионов с соответствующими центрами фермента, т.е. Na^+ , K^+ и Mg^{2+} оказывает гомотропный аллостерический эффект на Na, K -АТФазную систему мозга. Найденное нами возмущение n_H для K^+ с 1,6 до 2,2 при увеличении концентрации Na^+ с 100 мМ до 200 мМ подтверждает гетеротропное кооперативное связывание Na^+ и K^+ с ферментом. В то же время АТФ и пНФФ как субстраты соответственно Na, K -АТФазной и K -пНФФазной реакции не связываются в исследуемых концентрациях с ферментом кооперативно: n_H в пределах единицы (табл. I).

Далее оказалось, что десенсбилизация Na, K -АТФазного комплекса, приводящая к диссоциации его на соответствующие субъединицы, сопровождалась исчезновением положительной кооперативности по Na^+ и K^+ (табл. I): n_H снижался примерно до единицы (с одновременным сохранением активностей Na, K -АТФазы и K -пНФФазы). Последний экспериментальный факт в свою очередь доказывает аллостерическую регуляцию Na, K -АТФазы с Na^+ и K^+ .

Вышеприведенные результаты выдвигали вопрос с структурном составе центров Na, K -АТФазы, участвующих в связывании природных аллостерических регуляторов. Оказалось (табл. 2) /14/, что модификатор карбоксильных групп МЦКД (водорастворимое производное карбодимида) подавляет активность Na, K -АТФазы ($I_{50} = 0,3$ мМ) и K -пНФФазы ($I_{50} = 2,8$ мМ) обратимо. Из таблицы 2 вытекает также, что Na^+ и K^+ проявляют защитное действие в отношении ингибирования Na, K -АТФазы с МЦКД. Это позволяет заключить, что свободные $COOH$ -группы Na, K -АТФазы участвуют в присоединении Na^+ и K^+ к центру аллостерической регуляции. Однако это нельзя сказать в отношении центров, связывающих K^+ с K -пНФФазой: данный эффектор не защищал K -пНФФазу от ингибирования с МЦКД.

Таблица I

Величины n_H для природных эффекторов Na, K-АТФазного комплекса до и после деоенсибилизации ФП мочевиной, повышенной температурой и додецилсульфатом (средние из 5 опытов)

Эффектор	Условия преинкубации ФП	n_H	
K ⁺	без мочевины	1,6 ± 0,02	
K ⁺	с мочевиной	1,0 ± 0,01	p = 0,001
Na ⁺	без мочевины	1,9 ± 0,07	
Na ⁺	с мочевиной	1,1 ± 0,03	p < 0,01
Na ⁺ +K ⁺	без мочевины	1,7 ± 0,06	
Na ⁺ +K ⁺	с мочевиной	0,9 ± 0,03	p < 0,001
Na ⁺	без додецилсульфата	1,9 ± 0,07	
Na ⁺	с додецилсульфатом	1,3 ± 0,04	p < 0,05
K ⁺	комн t°	1,7 ± 0,03	
K ⁺	при 55°C	0,9 ± 0,09	p < 0,01
*K ⁺	без мочевины	1,3 ± 0,06	
*K ⁺	с мочевиной	1,0 ± 0,07	p < 0,05
НН _д ⁺	без преинкубации	1,3 ± 0,1	
*пНФФ	без преинкубации	1,0 ± 0,02	
АТФ	без преинкубации	1,0 ± 0,04	

* опыты с K-пНФФазой

Для выяснения ВН-групп в аллостерических центрах Na, K-АТФазного комплекса были поставлены опыты с пХМБ (п-хлормеркурибензоат). Оказалось, что этот модификатор ингибирует Na, K-АТФазу и K-пНФФазу (I₅₀ 0,5 и 0,4 мкМ соответственно) необратимо. При этом Na⁺ и K⁺ не защищают Na, K-АТФазу и K⁺-K-пНФФазу от этого ингибирования (табл. 2). Эти факты указывают, что ВН-группы не участвуют в формировании регуляторного центра Na, K-АТФазной системы. Заслуживает внимания, что блокатор ОН-групп ФОИ (фосфорорганический ингибитор) угнетал Na, K-АТФазу и K-пНФФазу лишь 10%. На основании этого следует, что ОН-группы не играют ведущей роли в функционировании специфических Na, K-АТФазных центров.

В пользу приведенных предположений говорят результаты по исследованию конкуренции МЦКА или пХМБ с Na⁺ и K⁺ за аллостерический (регуляторный) центр фермента. Данные на рис. I показывают, что МЦКА конкурирует как с Na⁺, так и с K⁺ за центр регуляции Na, K-АТФазного комплекса: величина $\frac{I}{1-i}$

(где I/ — концентрация ингибитора в реакционной среде, i — заторможенная часть ферментативной активности) увеличивается с повышением [Na⁺/ или [K⁺/ в среде реакции. Интересно при

Таблица 2

Защитное действие природных эффекторов Na , K -АТФазы и K - pH Фазы от ингибирования о МЦКД и pXMB (активность, в % от контроля)

Na , K -АТФаза		K - pH Фаза	
Условия преинкубации	актив- ность	Условия преинкубации	актив- ность
Контроль	100	Контроль	100
МЦКД	58 \pm 2,8	МЦКД	54 \pm 2,5
МЦКД+100 мМ Na^+	89 \pm 3,3	МЦКД+5 мМ K^+	53 \pm 1,2
МЦКД+20 мМ K^+	85 \pm 3,6	МЦКД+3 мМ $\text{pH}\Phi\Phi$	53 \pm 2,0
МЦКД+3 мМ АТФ	72 \pm 2,9	МЦКД+5 мМ K^+ +3 мМ $\text{pH}\Phi\Phi$	53 \pm 1,2
МЦКД+100 мМ Na^+ +20 мМ K^+ +3 мМ АТФ	97 \pm 1,1	-	-
pXMB	43 \pm 2,9	pXMB	40 \pm 3,4
pXMB +100 мМ Na^+	37 \pm 1,6	pXMB +5 мМ K^+	42 \pm 2,0
pXMB +20 мМ K^+	39 \pm 1,1	pXMB +3 мМ $\text{pH}\Phi\Phi$	59 \pm 3,3
pXMB +3 мМ АТФ	63 \pm 3,1	pXMB +5 мМ K^+ +3 мМ $\text{pH}\Phi\Phi$	48 \pm 1,5
pXMB +100 мМ Na^+ +20 мМ K^+ +3 мМ АТФ	18 \pm 1,4	-	-

Na , K -АТФазу (8 мкг/кг) преинкубировали с 0,38 мМ МЦКД или 0,6 мМ pXMB и K - pH Фазу (10 мкг/мл) с 3,0 мМ МЦКД или 0,5 мМ pXMB (средние из 5 опытов).

этом отметить, что с pXMB -том такой конкуренции не обнаружилось. Опыты этой серии дополнительно подтверждают существенную роль COOH -групп в связывании регуляторных катионов с аллостерическим центром Na , K -АТФазного комплекса.

Наряду с исследованием регуляции Na , K -АТФазы мозга с природными эффекторами были поставлены опыты с некоторыми неприродными соединениями с нейротропной активностью. Нами показан ингибирующий эффект HC различных классов на Na , K -АТФазный комплекс в мозгу /9, 10, 24/. Внимание настоящей работы было обращено на кооперативное связывание HC с регуляторным центром фермента.

Из таблицы 3 вытекает защитный эффект Na^+ и K^+ от угнетения Na , K -АТФазы с хлорпромазином, галоперидолом, имипраминном, амизидом и фенамином: с Na^+ или с K^+ активность фермента была значительно больше, чем без них /10/.

Таблица 3
 Защитные эффекты Na^+ или K^+ от угнетения Na, K-ATФазы
 с НС (средние из 5 опытов)

НС	Активность, % от контроля		
	Без катионов	100, мМ Na^+	20 мМ K^+
Хлорпромазин	0	47,9 \pm 0,8	45,4 \pm 1,1
Галоперидол	0	49,9 \pm 0,3	48,1 \pm 0,7
Имипрамин	0	51,4 \pm 0,2	53,6 \pm 0,5
Ипрониазид*	74,0 \pm 0,7	86,5 \pm 0,5	87,0 \pm 0,7
Амизил*	54,2 \pm 2,0	90,4 \pm 0,5	89,6 \pm 0,8
Новокаин	53,1 \pm 2,4	55,6 \pm 0,9	56,2 \pm 1,0
Фенамин*	54,5 \pm 0,6	88,0 \pm 3,0	88,9 \pm 0,8

* Ипрониазид, амизил и фенамин ингибировали фермент обратимо, а хлорпромазин, галоперидол, имипрамин и новокаин - необратимо.

Таблица 4
 Конкуренция НС с Na^+ или K^+ за регуляторный центр
 Na, K-ATФазы (средние из 4-5 опытов)

НС	Na^+	K^+
Хлорпромазин	+	-
Галоперидол	-	+
Имипрамин	+	-
Ипрониазид	-	-
Амизил	-	+
Новокаин	-	-
Фенамин	-	+
Центедрин	+	-

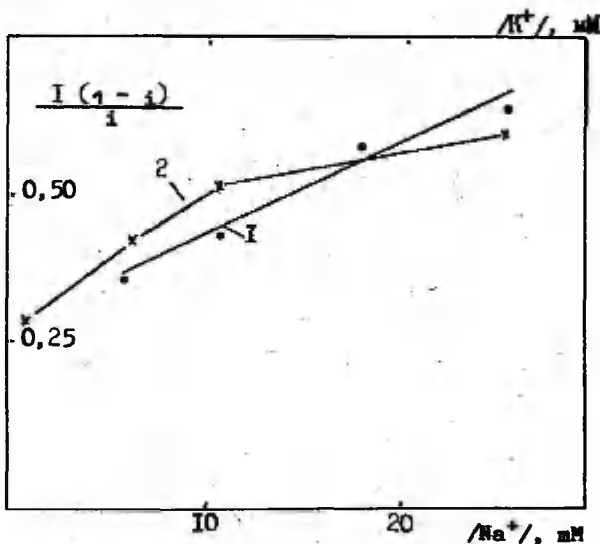


Рис. 1. Конкуренция МЦКД с Na^+ (1) или K^+ (2) за аллостерический центр Na, K-ATФазы (типичный опыт)

В пользу присоединения НС к регуляторному центру Na, K-ATФазы говорит факт, что большинство из них конкурирует с Na^+ или с K^+ за фермент (табл. 4): хлорпромазин, галоперидол, имипрамин и центедрин конкурировали с Na^+ , но не с K^+ , в то же время галоперидол, амизил и фенамин обнаруживали конкуренцию с K^+ , но не с Na^+ . Следует отметить, что ипрониазид и новокаин, от ингибирования с которыми Na^+ и K^+ не защищали фермент, не конкурировали ни с Na^+ , ни с K^+ /8,10/.

Непрямым доказательством связывания НС с аллостерическим центром Na, K-ATФазного комплекса служат результаты в таблице 5 /8/.

Как вытекает из таблицы, НС не изменяют p_H для Na^+ и K^+ , т.е. не обладают гетеротропным кооперативным эффектом. Из этого следует, что НС в основном связываются с теми же центрами Na, K-ATФазы , к которым присоединяются регуляторные катионы.

Обнаруженное нами сродство НС к аллостерическому центру Na, K-ATФазной системы поднимает вопрос их кооперативного связывания с ферментом. Ответом на вопрос служат результаты, приведенные в таблице 6.

Таблица 5

Действие НС на кооперативное связывание Na^+ и K^+ с Na, K-ATФазной (средние из 5 опытов)

НС	Коэффициент Хилла (n_H)			
	Na^+	$\text{Na}^+ + \text{НС}$	K^+	$\text{K}^+ + \text{НС}$
Хлорпромазин	1,3	1,3	1,4	1,3
Галоперидол	1,9	1,9	1,4	1,5
Имипрамин	2,2	2,2	1,4	1,4
Ипрониазид	1,8	1,8	1,4	1,5
Новокаин	1,8	1,8	1,3	1,3
Фенамин	2,1	2,1	1,3	1,3
Центедрин	1,4	1,4	1,1	1,1

Таблица 6

Кооперативное связывание НС с Na, K-ATФазной (средние из 4-5 опытов)

НС	Коэффициент Хилла (n_H)
Хлорпромазин	$1,4 \pm 0,0$
Галоперидол	$1,5 \pm 0,1$
Имипрамин	$2,5 \pm 0,1$
Ипрониазид	$1,0 \pm 0,1$
Новокаин	$1,0 \pm 0,1$
Фенамин	$1,4 \pm 0,0$
Центедрин	$2,5 \pm 0,1$

Как вытекает из таблицы, n_H для большинства НС превышает единицу, т.е. изученные НС (за исключением ипрониазиды и новокаина) являются неприродными аллостерическими регуляторами Na -насоса. Это тем более вероятно, что десенсibilизация Na, K-ATФазы с додецилоульфатом (37°C , 20 мин) приводила к снижению n_H для имипрамина от $2,5 \pm 0,08$ до $1,4 \pm 0,02$ и для центедрина от $2,5 \pm 0,09$ до $0,9 \pm 0,03$. Примерно такой же результат был получен после десенсibilизации фермента мочевиной (0°C , 15 мин).

Приведенные выше результаты показали, что эссенциальные лиганды (Na^+ и K^+) и многие НС регулируют активность Na, K-ATФазной системы путем непосредственного связывания с регуляторным центром фермента. В связи с этим возникает вопрос, является ли такой механизм универсальным (единственным) при регуляции активности мембранно-связанных ферментов. Для уточнения данного вопроса нами были проведены эксперименты с фи-

физиологически активным эффектором - простагландином E_2 ($ШЕ_2$).

Оказалось, что это гидрофобное мембранотропное соединение /2,3/ аллостерически ингибировало как Na, K -АТФазу, так и K -пНФфазу /4,5,6/: p_H для общей Na, K -АТФазы $1,4 \pm 0,1$ и для K -пНФфазу $1,3 \pm 0,1$. При этом десенсибилизация с мочевиной сопровождалась исчезновением положительной кооперативности по $ШЕ_2$ в отношении Na, K -АТФазы и K -пНФфазы.

Поскольку $ШЕ_2$ не конкурировал ни с Na^+ , ни с K^+ за Na, K -АТФазу и не обнаруживал конкуренции с K^+ за K -пНФфазу /5,6/, исключается возможность непосредственного присоединения $ШЕ_2$ к регуляторному центру Na, K -АТФазной системы.

Учитывая гидрофобность молекулы $ШЕ_2$, можно предполагать, что механизмом его кооперативного связывания является модификация липидного окружения (матрикса) фермента. Данные наших дальнейших опытов подтвердили такое предположение: предварительная обработка ФП с фосфолипазой A_2 устраняла кооперативность по $ШЕ_2$ /4,6/. Наряду с этим, под действием $ШЕ_2$ наблюдалось (см. табл. 7) достоверное смещение перегиба графика Аррениуса от $21,6$ до $24,5^\circ C$.

Таблица 7
Влияние $ШЕ_2$ на температурную зависимость
 Na, K -АТФазной реакции

	Контроль	Обработка с $ШЕ_2$
Перегиб графика Аррениуса ($^\circ C$)	$21,6 \pm 1,38$	$24,5 \pm 1,27$ $p < 0,01$
Энергия активации для высокотемпературной области графика: $E_{\neq 1}$; ккал/моль	$16,5 \pm 1,02$	$13,8 \pm 0,53$ $p < 0,1$
Энергия активации для низкотемпературной области: $E_{\propto 2}$, ккал/моль	$28,4 \pm 2,07$	$31,8 \pm 1,11$ $p < 0,2$

Обсуждение результатов

Наши опыты, направленные на выявление характера регуляции Na, K -АТФазного комплекса, показали, что активация Na, K -АТФазы с Na^+ и K^+ , также как и активирование K -пНФфазы с K^+ , является кооперативным процессом с величиной p_H выше единицы. Это позволяет предполагать причастность аллостерического

центра фермента к связыванию данных эссенциальных лигандов. В то же время АТФ и пНФФ как субстраты не связывались с ферментом кооперативно в исследуемых концентрациях (n_H был в пределах единицы), т.е. они не оказывали гомотропного аллоsterического эффекта на Na, K -АТФазу. Однако это не исключает возможности гетеротропной аллоsterической регуляции фермента с субстратами. В частности, показан регуляторный эффект АТФ на олигомерное состояние Na, K -АТФазного комплекса и на сродство фермента к ионам Na^+ и K^+ /1/.

Соответственно классической модели /22/ механизм аллоsterической регуляции предпосылает олигомерную структуру молекулы. Диссоциация олигомерной системы на соответствующие мономеры приводит к исчезновению ее кооперативных свойств. Кинетически соответствует этим изменениям превращение сигмовидных кривых в гиперболические и, следовательно, снижение коэффициентов Хилла до единицы. В наших исследованиях десенсбилизация фермента с различными факторами приводила к снижению n_H для Na^+ и K^+ примерно до единицы. Это показывает, что активация Na, K -АТФазного комплекса с Na^+ и K^+ действительно имеет аллоsterическую природу и происходит с участием более чем одного ион-связывающего центра. При этом, как показали наши дальнейшие эксперименты (неопубликованные данные), для появления кооперативности по Na^+ и K^+ необходима как минимум мономерная организация Na, K -АТФазной системы.

По нашим данным аллоsterическим эффектором Na, K -АТФазы является и NH_4^+ , способный заменять K^+ в соответствующих центрах /1, 13/. Этот вопрос представляет интерес в связи с тем, что уровень свободного (преформированного) аммиака в мозгу, зависящий от его функционального состояния, может стать важным регулятором работы Na -насоса /8, 13/.

Согласно литературным данным в формировании активного центра Na, K -АТФазы участвуют группы $-COOH$ /20, 23/, $-SH$ /16/ и $-OH$ /17, 23/. Наши опыты показали, что $COOH$ -группы, но не SH -группы играют существенную роль в формировании регуляторных центров данного фермента. Так, Na^+ и K^+ оказывают защитный эффект только в отношении МЦКД и конкурируют лишь с ним за фермент (т.е. не защищают фермент от действия пХМБ и не конкурируют с пХМБ). Фосфорорганические соединения ингибируют особенно сильно фермент, имеющий в активном центре OH -группы. Наши исследования не подтвердили роли OH -групп в регуляторном центре Na, K -АТФазы (ФОМ вызывал лишь 10%-ое ингибирование фермента).

НС как неприродные эффекторы Na, K-ATФазного комплекса были включены в исследования в связи с их известным действием на функции (особенно на транспортную) нейрональных мембран. Опыт этих серий разрешает заключить следующее*: p_H для большинства изученных НС оказался выше единицы; десенсибилизация Na, K-ATФазы сопровождалась снижением p_H для НС примерно до единицы (одновременно со снижением p_H для Na^+ и K^+); большинство изученных НС конкурировало с Na^+ или с K^+ за аллостерический центр фермента; Na^+ и K^+ защищали Na, K-ATФазу от действия тех же НС, которые конкурировали с ними за аллостерический центр. Приведенное свидетельствует о том, что изученные НС связываются кооперативно с Na, K-ATФазной системой мозга, присоединяясь при этом к анионному регуляторному центру, с которым в естественных условиях связываются моновалентные (регуляторные) катионы. Это становится понятным, если учесть, что большинство НС в организме диссоциируется на катионы.

Из вышеприведенной информации следует, что механизмом регуляции активности Na, K-ATФазной системы эссенциальными катионами (Na^+ и K^+) и многими НС является их непосредственное кооперативное связывание с регуляторными центрами фермента.

В то же время, как показывают наши данные, существует и другой механизм аллостерической регуляции активности Na, K-ATФазной системы, т.е. модуляция гидрофобности и фазового состояния мембранных липидов, окружающих Na, K-ATФазный комплекс.

Хотя этот механизм является косвенным, в общепарафизиологическом аспекте он, очевидно, имеет немаловажное значение. Через такой механизм реализуется, по-видимому, основной эффект гидрофобных анионных (напр. ПГЕ_2) мембранотропных биорегуляторов. Наконец, интересно отметить, что по предварительным данным для синтетических аналогов ПГЕ_2 последний механизм не характерен (неопубликованные результаты).

* В приведенных сериях составляли исключение ипрониазид и новокаин.

Выводы

1. Коэффициенты Хилла (n_H) для Na^+ , K^+ и NH_4^+ в отношении Na, K -АТФазы, а также для K^+ в отношении K -пНФФазы превышают единицу. n_H для АТФ и пНФФ равняются примерно единице. Десенсибилизация Na, K -АТФазного комплекса вызывает снижение n_H для Na^+ и K^+ до единицы.
2. МЦКД является обратимым ингибитором Na, K -АТФазы. Na^+ и K^+ существенно защищают фермент от ингибирования с МЦКД. Na^+ и K^+ конкурируют с МЦКД за аллостерический центр фермента.
3. пХМБ является необратимым ингибитором Na, K -АТФазы. пХМБ не конкурирует ни с Na^+ , ни с K^+ за фермент, и Na^+ и K^+ не защищают фермент от инактивации с пХМБ. ФОМ не оказывает существенного эффекта на Na, K -АТФазную систему.
4. Хлорпромазин, имипрамин и центедрин конкурируют с Na^+ , но не с K^+ за Na, K -АТФазу. Галоперидол, амизил и фенамин обнаруживают конкуренцию с K^+ , но не с Na^+ за фермент. Na^+ и K^+ защищают Na, K -АТФазу от ингибирующего действия хлорпромазина, имипрамина, центедрина, галоперидола, амизила и фенамина.
5. n_H для хлорпромазина, имипрамина, центедрина, галоперидола и фенамина превышает единицу. Десенсибилизация Na, K -АТФазы вызывает снижение n_H для изученных ИС (имипрамина и центедрина).
6. На основе результатов предполагается причастность $COOH$ -групп к аллостерическим центрам Na, K -АТФазного комплекса. SH -группы не являются необходимыми в формировании указанных центров. ИС, присоединяясь к регуляторному (анионному) центру фермента, являются его аллостерическими эффекторами.
7. n_H для ПГЕ₂ превышает единицу, причем десенсибилизация Na, K -АТФазы или K -пНФФазы мочевиной устраняет кооперативность по ПГЕ₂.
8. Предварительная обработка Na, K -АТФазы с фосфолипазой A_2 приводит к потере кооперативности по ПГЕ₂ ($n_H = 1,0$). Под влиянием ПГЕ₂ происходит достоверное смещение перегиба графика Аррениуса.
9. Предполагается, что ПГЕ₂ является косвенным аллостерическим регулятором Na -насоса в мозгу и эта регуляция реализуется путем модуляции фазового состояния липидного окружения Na, K -АТФазной системы.

Использованная литература

1. Болдырев А.А. Na , K -зависимая АТФаза как олигомерная система//Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. - 1982.- Т. 17. - С. 75-146.
2. Вайну М.К., Вийгимаа М.В., Карелсон Э.И. Простагландин E_2 и Na , K -АТФаза мозга//VI конф. Биохим. Прибалт.Респ. и Белорусок. ССР и Ленингр. - Рига. - 1981. - С. 327-328.
3. Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простагландины - молекулярные биорегуляторы. - М.: Изд-во МГУ, 1985.
4. Вихалемм Т.Э., Карелсон Э.И., Кенгсепп А.-Т.О. и др. Простагландин E_2 как мембранотропный модулятор транспортных АТФаз//I6-я конф. ФЕБО:Тез. докл. - М.: 1984.-С.218.
5. Карелсон Э.И., Цильмер М.К., Тяхепыльд Л.Я. Аллостерическая природа ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазной системы мозга крыс простагландином E_2 //IX Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы. - Ереван, 1983. - С. 145.
6. Карелсон Э.И., Цильмер М.К., Тяхепыльд Л.Я. Простагландин E_2 как липофильный аллостерический модулятор Na -насоса//Вопр. мед. химии. - 1985. - Т. 31. - С. 84-87.
7. Мартинсон Е., Виллако Л. Применение тиомочевны в качестве восстановителя при колориметрическом определении фосфора//Лабор. дело. - 1961. - № 2. - С. 30-32.
8. Паасалу Э.И., Тарве У.С., Тяхепыльд Л.Я., Цильмер М.К. О структурных и функциональных особенностях аллостерической регуляции активности Na^+ , K^+ -АТФазы мозга//Вопр. нейробиологии: Сб. научн. труд. - Л., 1977. - С. 61-70.
9. Паасалу Э.И., Тарве У.С., Тяхепыльд Л.Я. Сравнительное действие психотропных средств на ориентировочно-двигательные реакции и активность Na , K -АТФазы мозга *in vivo*//Фармакол. и токсикол. - 1979. - Т. 42. - С. 7-11.
10. Тарве У.С., Паасалу Э.И., Тяхепыльд Л.Я. Сравнительное изучение влияния некоторых психотропных веществ на активность Na^+ , K^+ -АТФазы мозга *in vitro*//Укр. ioxim. ж., 1976. - Т. 48. - С. 326-331.
11. Тарве У.С., Цильмер М.К. Очистка Na , K^+ -АТФазы мозга//Биофизика мембран: Матер. симп.- Каунас, 1971. - С. 746-754.
12. Тяхепыльд Л.Я., Вихалемм Т.Э., Карелсон Э.И. и др. Взаимодействие простагландина E_2 (PGE_2) с транспортными АТФазами биомембран//У Всесоюзн. биохим. съезд: Тез. симп. докл. - Киев, 1985. - Т. I. - С. 227.

13. Тяхешыльд Л.Я., Карелсон Э.И., Цильмер М.К. Аллостерическая природа и регуляция активности Na, K-ATPазы мозга// Уч. зап./Тарт. ун-т. - 1982. - Вып. 612:Акт. пробл.теор. мед. - С. 96-103.
14. Цильмер М.К., Тарве У.С. Выделение активного препарата $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPазы}$ из мозга крупного рогатого скота и исследование роли карбоксильных сульфгидрильных и гидроксильных групп в ее активности//Укр. биохим. ж. - 1975. - Т. 47. - С. 458-464.
15. Fiske C.R., Subbarow Y. The colorimetric determination on phosphorus//J. Biol. Chem. - 1925. - Vol. 66.-P. 373-400.
16. Hart W.M. Jr., Titus E.O. Sulfhydryl groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase: Protection by physiological ligands and exposure by phosphorylation//J. Biol. Chem. - 1973. - Vol. 248. - P. 4674-4681.
17. Hokin L.E., Sastry P.S., Galsworthy P.R., Yoda A. Evidence that a phosphorylated intermediate in a brain transport adenosine triphosphatase is an acyl phosphate// Proc. Nat. Acad. Sci. - 1965. - Vol. 54. - P. 177-184.
18. Hunter A., Downs C.E. The inhibition of arginase by amino acids//J. Biol. Chem. - 1945. - Vol. 157.- P.427-446.
19. Jørgensen P.L. Mechanism of the Na^+, K^+ pump: Protein structure and conformation of the pure $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ // Biochem. Biophys. Acta. - 1982. - Vol. 694.-P. 27-68.
20. Kahlenberg A., Galsworthy P.R., Hokin L.E. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosinetriphosphatase. II: Characterization of the acyl phosphate intermediate as an 1-glutamyl- γ -phosphate// Arch. Biochem. Biophys. - 1968. - Vol. 126.- P. 331-342.
21. Lowry O.H., Rosenbrcugh N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent//J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - P. 265-275.
22. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model//J. Mol. Biol. - 1965. - Vol. 12. - P. 88-118.
23. Post R.L., Kume S. Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase//J. Biol.Chem. - 1973. - Vol. 248. - P. 6993-7000.

24. Tarve U.S., Paesalu E.J., Tähepõld L.J. The role of brain transport ATPase in the mechanism of trazodone action// Depression and the role of trazodone in antidepressant therapy. - Roma, 1978. - P. 131-134.
25. Tähepõld L., Tarve U., Karelson E., Zilmer M., Kengsepp A.-T. Cooperative interactions Na,K-ATPase with some ligands and effectors//6th Joint Symposium of the Biochem. Soc. of the GDR and USSR. - Tallinn, 1981. - P. 123.
26. Ueda I., Wada T. Determination of inorganic phosphate by the molybdovanadate method in the presence of ATP and some interfering organic bases//Analyt. Biochem. - 1970. - Vol. 37. - P. 169-174.

ON THE REGULATION OF SODIUM PUMP BY SOME NATURAL
AND ARTIFICIAL EFFECTORS
M.K.Zilmer, E.J.Karelson, T.T.Salum, L.J.Tähepõld

S u m m a r y

The allosteric nature of the rat brain Na,K-ATPase system and the regulation of its activity by essential cations (Na^+ , K^+), bioactive effectors (NH_4^+ , prostaglandin E_2) and neurotropic drugs (some neuroleptics, antidepressants and psychostimulators) were studied. Using the Hill coefficient (n_H) the cooperative nature in binding of Na^+ , K^+ and NH_4^+ to the Na,K-ATPase was revealed, which disappeared after the desensitization of the enzyme by urea and temperature treatment. The competition between the carboxyl groups reagent (MCCD) and essential cations with Na,K-ATPase as well as the protective effect of Na^+ and K^+ against the inhibition of enzyme by MCCD suggest that the carboxyl groups are structural components of the Na,K-ATPase allosteric centers and play an important role in the allosteric regulation of its enzymatic activity. Most of the neurotropic drugs are bound to the Na,K-ATPase cooperatively and are able to compete with essential ions (with Na^+ or K^+), thus being allosteric effectors for this enzyme. The allosteric interaction of Na,K-ATPase system with prostaglandin E_2 has been found to be indirect, being realized by the modulation of the membrane lipid phase transition around the Na,K-ATPase. It is concluded that in allosteric regulation of Na,K-ATPase system activity both physiological and artificial compounds are involved.

Содержание - Contents

Предисловие	3
А.В.Вальдман, В.В.Рожанец, К.Чахбра, Р.А.Ахундов. Роль рецепторов головного мозга в проявлении анксиолитического эффекта пираретама	4
The role of rat brain receptors in the manifestation of piracetam anxiolytic action. Summary	15
Э.Э.Васар, А.Х.Соосаар, А.Э.Ланг. Участие дофаминовых, опиатных и бензодиазепиновых рецепторов в механизме действия церулеина, аналога октапептида холецистокинина	16
The involvement of dopamine, opiate and benzodiazepine receptors in the action of caerulein, an analogue of cholecystokinin octapeptide. Summary	29
Л.Х.Алликметс, Л.Г.Полевой, А.М.Жарковский, В.И.Гунар, В.М.Копелевич, Л.Н.Буланова, М.Я.Оттер. Кальция оксибутират - новый потенциальный лекарственный препарат.	
I. Фармакологический скрининг и биохимические исследования	30
A promising drug - calcium oxybutyrate.	
I. Pharmacological screening and biochemical studies. Summary	40
М.Я.Оттер, Л.Х.Алликметс, А.М.Жарковский, Л.Г.Полевой. Кальция оксибутират - новый потенциальный лекарственный препарат.	
II. Биодоступность и эффекты длительного введения	41
A promising drug - calcium oxybutyrate.	
II. Bioavailability and effects of chronic administration. Summary	52
А.М.Жарковский, А.С.Шаврин, Т.А.Жарковская. Влияние гамкмитика ТГИП на связывание ³ H-флунитразепама в мозге крыс	53
Effect of THIP on ³ H-flunitrazepam binding in the rat brain. Summary	63
Л.К.Ряго, Р.К.Кийвет, М.А.Пыльд. Зависимость поведенческого ответа к баклофену от функциональной активности бензодиазепиновых рецепторов	64
Dependence of behavioral response to baclofen on the functional activity of benzodiazepine receptors. Summary	72

И.П.Лапин, И.В.Рижов. Молекулярные механизмы нейроактивности кинуренинов	73
Molecular mechanisms of the neuroactivity of kynureni- nes. Summary	83
М.М.Козловская, А.В.Вальдман, В.В.Кушнарв, А.П.Музы- ченко. Особенности антидепрессивного и нейрохими- ческого действия пиразидола	84
Peculiarities of the antidepressive and neurochemical effects of pyrazidol. Summary	97
М.О.Майметс, А.М.Нурк, Э.Э.Васар. Сравнительный фарма- кологический анализ типичного нейролептика гало- перидола и антагониста серотонин₂-рецепторов пи- ренперона	98
Pharmacological comparison of the effects of haloperi- dol and pirenperone, a serotonin₂-receptor anta- gonist. Summary	108
Д.Б.Нурманд. Тип фармакокинетических способностей боль- ных и его возможное прогностическое значение	109
The patients' pharmacokinetic ability type and its pos- sible prognostic significance. Summary	115
М.Я.Оттер, Ю.П.Вилу. Биопериодические колебания фарма- кологических эффектов совместного введения гало- перидола и фенибута	116
Bioperiodic variations of pharmacological effects of simultaneously administered haloperidol and feni- but. Summary	127
О.Х.Тоомла, Л.Ю.Тоомаспюэг. Влияние нейролептиков на реактивность лимфоцитов in vitro	128
The effects of neuroleptics upon blasttransformation of lymphocytes. Summary	138
И.Е.Ковалев. Анализ принципов распознавания образов и кодирования химической информации в иммунохимиче- ской функциональной системе гомеостаза на примере нейротропных веществ	139
Analysis of the principles of recognition of images and chemical information coding in immunochemical functional homeostasis system on the example of neurotropic agents. Summary	150
М.К.Дильмер, Э.И.Карелсон, Т.Т.Салум, Л.Я.Тяхеппылд. Механизмы регуляции Na-насоса мозга природными и неприродными эффекторами	151
On the regulation of sodium pump by some natural and artificial effectors. Summary	166