

ВЛИЯНИЕ ФЕНИБУТА НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ, А ТАКЖЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ АМИНОКИСЛОТ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

Л. Е. Бородкина¹, В. С. Кудрин², П. М. Клодт², В. Б. Наркевич², И. Н. Тюренков¹

Изучено влияние ноотропного препарата фенибута, структурного аналога гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) на содержание моноаминов и их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот в структурах головного мозга крыс Вистар. Установлено, что фенибут в дозе 25 мг/кг при однократном внутривнутрибрюшинном введении вызывает статистически значимое увеличение содержания метаболита дофамина 3,4-диоксифенилукусусной кислоты (ДОФУК), а также тормозной аминокислоты таурина в стриатуме. Выявлено отсутствие статистически достоверного влияния фенибута на уровень ГАМК, серотонина и дофамина в различных структурах мозга и умеренное снижение под действием изучаемого препарата содержания норадреналина в гиппокампе.

Ключевые слова: моноамины, нейромедиаторные аминокислоты, головной мозг, ноотропы, память, производные ГАМК, фенибут, крысы

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое значение придается изучению механизмов действия и внедрению в клиническую практику при заболеваниях нервной системы ноотропных препаратов, облегчающих процессы обучения и памяти, оказывающих влияние на метаболизм нейронов, обладающих вазоактивным и антигипоксическим свойствами [1, 3]. К числу наиболее важных эффектов ноотропов следует отнести их нейропротекторное действие и способность облегчать репаративное восстановление ткани мозга при повреждениях различного генеза [4, 5, 8].

Среди препаратов ноотропного ряда, в частности, циклических производных гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), значительный интерес представляет производное ГАМК фенибут (гидрохлорид γ -амино- β -фенил-масляной кислоты). Последний является оригинальным отечественным ноотропным препаратом с широким спектром сопутствующей фармакологической (в т.ч. анксиолитической) активности [1, 5]. Фенибут повышает умственную и физическую работоспособность, снижает эмоциональное напряжение, тревогу, улучшает сон; уменьшает проявления астении и вазовегетативных симптомов (головная боль, чувство тяжести в голове), раздражительность, эмоциональную лабильность [1, 5], проявляет нейропротекторные свойства в условиях ишемического повреждения головного мозга [8], стресса различного генеза [4] и др.

Несмотря на то что данный препарат находит широкое применение в клинике астенических и тревожно-невротических состояний, молекулярные механизмы его действия изучены слабо. В частности, изучение влияния фенибута на содержание моноаминов — медиаторов возбуждения в ЦНС [норадреналина (НА), дофамина (ДА) и серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ), а также их метаболитов], позволяющее раскрыть механизмы нейропсихотропного действия веществ [6, 7], до настоящего времени не проводилось.

Малоизученным оставался вопрос об эффектах данного соединения на параметры нейротрансдачи посредством аминокислот в различных структурах мозга, подробное исследование которого позволило бы выявить функциональное образование мозга, являющееся преимущественной мишенью фармакологического воздействия фенибута [2]. В настоящее время ключевая роль нейромедиаторных аминокислот мозга в патогенезе разнообразных нарушений центральной нервной системы — эпилептических припадков, ишемии, гипоксии, депрессивных и психотических расстройств, болезни Альцгеймера, паркинсонизма и ряда других доказана многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями [2, 3].

В настоящем исследовании с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) было исследовано влияние фенибута на содержание моноаминов и их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга крыс Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте было использовано 28 крыс-самцов линии Вистар массой 200–220 г (питомник РАМН Столбовая). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме.

¹ Кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей (зав. — проф. И. Н. Тюренков) Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 400066, пл. Павших Борцов, 1.

² Лаборатория нейрохимической фармакологии (зав. — В. С. Кудрин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Эксперименты проводили в интервале с 10 до 14 часов дня. Животных выдерживали в индивидуальных боксах 30 мин до введения фенибута опытным и физиологического раствора контрольным животным.

Фенибут использовали в дозе 25 мг/кг. Фенибут и физиологический раствор вводили за 45 мин до декапитации животных. Структуры мозга [фронтальная кора (ФК), гиппокамп, стриатум], извлекали на лед и замораживали в жидком азоте. Затем выделенные структуры размельчали в гомогенизаторе “стекло-тефлон” (0,2 мм) при 10 °С при скорости вращения пестика 3000 об/мин. В качестве среды выделения использовали 0,1 н. HClO₄ с добавлением 500 пикомоль/мл внутреннего стандарта диоксibenзиламина (ДОБА). Структуры мозга гомогенизировали в 20 объемах среды выделения. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Супернатант использовали в дальнейшем для определения моноаминов, их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот.

Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, “West Lafayette”, США) с инжектором Rheodyne 7125 с петлей на 20 мкл для нанесения образцов. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке (ReproSil-Pur, ODS-3, 4 × 100 мм, диаметр зерен 3 мкм, Dr. Majsch GmbH, ФРГ, “Элсико”, Москва). Маточные стандарты готовили ежемесячно в 0,1 н HClO₄ в концентрации 500 наномоль/мл с добавлением 0,2 мМ

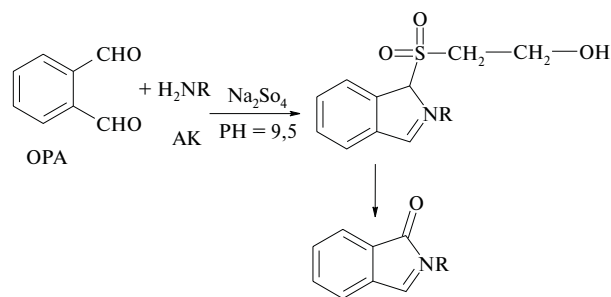


Схема дериватизации аминокислот.

OPA — ортофталевый альдегид (o-phthalaldehyd), АК — аминокислота.

метабисульфита натрия в качестве консерванта. Рабочие стандарты готовили из маточных растворов ежедневно разбавлением в 0,1 н HClO₄, 1:1000. Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: ОСЧ KН₂PO₄ безводный (“Fluka”) — 0,069 М, лимонная кислота моногидрат (“Fluka”) — 0,27 М, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты — (ЭДТА Na₂, “Sigma”) — 0,27 мМ, октилсульфат Na₂ (ионпарный реагент “Диа-фарм”) — 1,9 мМ, ацетонитрил (“Merck”) — 1,871 М, pH 3,0. Для калибровки хроматографа использовали смеси рабочих стандартов определяемых веществ в соотношении 500 пикомоль/мл. Величины концентрации катехоламинов (КА) в опытных образцах рассчитывали,

Таблица 1. Влияние фенибута на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс Вистар, $M \pm S.E.M.$, % по отношению к контролю (0,9 % NaCl)

Вещество	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	5-ОТ	5-ОИУК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОИУК/ 5-ОТ
<i>Фронтальная кора</i>									
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 10,3	100,0 ± 11,0	100,0 ± 13,4	100,0 ± 16,0	100,0 ± 9,4	100,0 ± 8,4	100,0 ± 9,4	100,0 ± 7,1	100,0 ± 5,8
Фенибут (25 мг/кг в/б)	74,7 ± 3,4*	86,7 ± 3,2	82,1 ± 5,9	51,4 ± 6,2*	85,8 ± 2,5	93,8 ± 3,5	94,4 ± 7,4	60,3 ± 6,6*	108,3 ± 5,4
<i>Стриатум</i>									
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 12,9	100,0 ± 6,6	100,0 ± 5,4	100,0 ± 5,5	100,0 ± 6,7	100,0 ± 5,5	100,0 ± 5,3	100,0 ± 2,0	100,0 ± 3,4
Фенибут (25 мг/кг в/б)	82,9 ± 9,2	108,2 ± 2,1	116,8 ± 5,7*	95,4 ± 5,6	101,5 ± 4,7	107,5 ± 4,9	106,1 ± 3,2	87,5 ± 4,2*	105,4 ± 4,6
<i>Гиппокамп</i>									
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 9,6	100,0 ± 54,4	100,0 ± 26,5	100,0 ± 13,0	100,0 ± 4,2	100,0 ± 4,1	100,0 ± 23,0	100,0 ± 23,4	100,0 ± 3,6
Фенибут (25 мг/кг в/б)	65,4 ± 3,9*	43,1 ± 5,4	37,5 ± 8,7	61,3 ± 7,4*	93,1 ± 4,4	101,9 ± 3,6	42,4 ± 11,0	67,6 ± 11,9	110,1 ± 5,2

Примечание. * — Различия достоверны по сравнению с содержанием моноаминов в мозге крыс Вистар, получавших физ. р-р (0,9 % NaCl) при $p < 0,05$ (*t*-критерий Стьюдента). в/б — внутрибрюшинно.

исходя из отношений высот пиков в стандартной смеси и в образце, по следующей формуле:

$$C_{\text{КАiоп}} = \frac{H_{\text{КАiоп}} \times \Phi}{H_{\text{ДГБАоп}}} \text{ пг/мл,}$$

$$\text{где } \Phi_i = \frac{C_{\text{КАiст}}}{H_{\text{КАiст}}/H_{\text{ДГБАст}}},$$

Φ_i — фактор пересчета для концентрации КА_i , $H_{\text{КАiст}}$ — высота пика КА_i стандарта, $H_{\text{КАiоп}}$ — высота пика КА_i , определяемого в пробе, $H_{\text{ДГБАст}}$ — высота пика ДГБА в стандартном растворе, $H_{\text{ДГБАоп}}$ — высота пика ДГБА, определяемого в пробе, $C_{\text{КАiст}}$ — концентрация КА_i в стандарте, $C_{\text{КАiоп}}$ — концентрация КА_i , определяемого в пробе.

Определение содержания возбуждающих (аспарат, глутамат) и тормозных (ГАМК, глицин, таурин) нейромедиаторных аминокислот проводили методом ВЭЖХ/ЭД согласно стандартной методике (Pearson и соавт., 1991). Поскольку аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не поглощаются УФ спектром) и не проявляют электрохимической активности, для их детекции необходимо предварительное проведение химического модифицирования — дериватизации. Для этого использовали ортофталевый альдегид (ОФА), способный флуоресцировать при связывании с аминокислотой.

ГАМК, аспарат, глутамат, таурин, глицин в концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н. HClO_4 использовали в качестве стандартной смеси для калибровки. Через 15 мин после инкубации при комнатной температуре 20 мкл раствора наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкМ, 4,6 × 250. Регистрацию продуктов разделения проводили на флуоресцентном детекторе Agilent 1100 (США) при длине волны возбуждения 230 нм и волны эмиссии 392 нм. Мобильная фаза состояла из 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,6) с 0,025 мМ ЭДТА

и 5 % ацетонитрила. Скорость подвижной фазы составляла 1,5 мл/мин.

Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозный фильтр (диаметр пор — 0,2 мкм) и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом.

В качестве стандарта для определения количества аминокислот в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий аспарат, глутамат, глицин, таурин, ГАМК в концентрации 0,5 ммоль/л (см. схему).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартных методов параметрического статистического анализа t-критерия Стьюдента; однофакторного дисперсионного анализа, критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении эффектов фенибута на содержание моноаминов и их метаболитов обнаружено, что указанное вещество статистически значимо снижает уровень НА в гиппокампе на 35 %. Фенибут не влиял на содержание ДА, однако вызывал статистически достоверное изменение содержания его метаболитов, увеличивая концентрацию ДОФУК в стриатуме и, напротив, снижая содержание ГВК в гиппокампе. Влияния фенибута на уровень 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК обнаружено не было. Не отмечалось также статистически значимого влияния данного соединения на комплексные показатели, характеризующие скорость кругооборота ДА и 5-ОТ, за исключением параметра ГВК/ДА, который незначительно уменьшался в стриатуме (табл. 1).

При изучении влияния фенибута на содержание возбуждающих (аспарат, глутамат) и тормозных (ГАМК, глицин, таурин) нейромедиаторных аминокислот наиболее значительные эффекты отмечались в стриатуме. При этом фенибут вызывал небольшое, но

Таблица 2. Влияние фенибута на содержание нейротрансмиттерных аминокислот во фронтальной коре головного мозга крыс Вистар ($M \pm S.E.M.$) % по отношению к контролю (0,9 % NaCl)

Препарат	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
<i>Фронтальная кора</i>					
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 4,258	100,0 ± 4,085	100,0 ± 3,155	100,0 ± 5,695	100,0 ± 3,999
Фенибут (25 мг/кг в/б)	102,383 ± 4,066	102,517 ± 2,511	106,834 ± 5,422	103,552 ± 3,805	102,673 ± 2,102
<i>Стриатум</i>					
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 5,241	100,0 ± 4,891	100,0 ± 2,922	100,0 ± 4,455	100,0 ± 6,706
Фенибут (25 мг/кг в/б)	113,134 ± 4,493	113,413 ± 4,921	110,738 ± 4,734	114,102 ± 4,547*	103,092 ± 5,893
<i>Гиппокамп</i>					
Физ. р-р (0,9 % NaCl)	100,0 ± 2,397	100,0 ± 1,864	100,0 ± 2,401	100,0 ± 3,616	100,0 ± 1,688
Фенибут (25 мг/кг в/б)	98,475 ± 1,249	94,831 ± 1,477*	95,477 ± 1,968	102,871 ± 3,763	120,178 ± 23,187

Примечание. * — Различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента). в/б — внутривенно.

статистически достоверное увеличение концентрации таурина (табл. 2).

В других структурах головного мозга крыс эффекты фенибута практически не проявлялись, лишь незначительно снижалась концентрация глутамата в гиппокампе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что фенибут вызывает достоверное увеличение содержания метаболита дофамина 3,4-диоксифенилуксусной кислоты, а также тормозной аминокислоты таурина. Влияния фенибута на уровень ГАМК нами не наблюдалось, несмотря на то, что изучаемое вещество является структурным аналогом последней. Не отмечалось и значимого влияния данного ноотропного препарата на серотонинергическую систему.

ВЫВОДЫ

1. Фенибут вызывает выраженное увеличение содержания метаболита дофамина 3,4-диоксифенилуксусной кислоты и тормозной аминокислоты таурина в стриатуме.

2. Препарат не оказывает существенного влияния на ГАМК, серотонин и дофамин в различных структу-

рах головного мозга и умеренно снижает содержание норадреналина в гиппокампе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Б. Арушанян, *Стимуляторы психических процессов*, Ставрополь (2003).
2. Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(2), 10 – 14 (2003).
3. Т. А. Воронина, *Фармакол. и токсикол.*, **54**(2), 5 – 11 (1991).
4. С. В. Грачева, *Фармакология и клиническое применение ней-роактивных аминокислот и их аналогов*, Г. В. Ковалева (ред.), Волгоград (1985), сс. 124 – 129.
5. Г. В. Ковалев, *Ноотропные средства*, Нижне-Волжское книжное издательство, Волгоград (1990).
6. А. Н. Талалаенко, Д. В. Гордиенко, О. П. Маркова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(1), 14 – 18 (2000).
7. А. Н. Талалаенко, Д. В. Гордиенко, О. П. Маркова, Н. В. Гончаренко, Д. В. Панкратьев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 20 – 24 (2001).
8. И. Н. Тюренков, М. Н. Багметов, В. В. Епишина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 19 – 22 (2006).
9. W. R. Pearson, *Genomics*, **11**(3), 635 – 50 (1991).

Поступила 25.09.08

EFFECT OF PHENIBUT ON THE CONTENT OF MONOAMINES, THEIR METABOLITES, AND NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS IN RAT BRAIN STRUCTURES

L. E. Borodkina¹, V. S. Kudrin², P. M. Klodt², V. B. Narkevich², and I. N. Tyurenkov¹

¹ Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov, Volgograd, 400131, Russia

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Effects of the nootropic drug phenibut, which is a structural analog of gamma-aminobutyric acid (GABA), on the content of monoamines, their metabolites, and neurotransmitter amino acids in brain structures have been studied on Wistar rats. It is established that a single administration of phenibut in a dose of 25 mg/kg (i.p.) produces a statistically significant increase in the content of dopamine metabolite (3,4-dioxyphenylacetic acid) and the retarding amino acid taurine in striatum. At the same time, phenibut did not significantly influence the levels of GABA, serotonin, and dopamine in various brain structures and produce a moderate decrease in the level of norepinephrine in the hippocampus.

Key words: Phenibut, monoamines, neurotransmitter amino acids, brain, nootropes, GABA derivatives, memory