

## ВЛИЯНИЕ ДИАЗЕПАМА НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРЫЗУНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ СУТОК И ПЛОТНОСТИ ГАМК РЕЦЕПТОРОВ МОЗГА

**Изучено влияние диазепама на двигательную активность крыс при утреннем и вечернем введении. Установлено, что максимальное подавляющее действие препарата на коэффициент подвижности в тесте «открытое поле» наблюдается при вечернем введении на высоте плотности ГАМК рецепторов головного мозга. При утреннем введении угнетающее действие проявляется дважды: непосредственно после введения и в вечерние часы, на фоне увеличения количества рецепторов.**

**Ключевые слова:** коэффициент подвижности, диазепам, хронобиологическая организация, ГАМК-рецепторы, головной мозг.

Диазепам является представителем широкого круга лекарственных препаратов бензодиазепинового ряда. Он оказывает анксиолитическое, седативно-снотворное, противосудорожное и центральное миорелаксирующее действие, влияет на двигательную активность [7], [21]. Бензодиазепиновые транквилизаторы успешно вмешиваются во временную динамику поведения и эндокринные ритмы. Хорошо известно гипногенное действие бензодиазепинов легко объясняется нормализацией ими базального ритма сон-бодрствование [17], [18]. Диазепам устраняет, вызываемую стрессом, дизритмию у крыс. Под его влиянием нормализуется циркадный ритм двигательной активности, наблюдаются адаптивные сдвиги во временной динамике принудительного плавания. Механизм действия диазепама обусловлен стимуляцией бензодиазепиновых рецепторов супрамолекулярного ГАМК-бензодиазепин-хлорионофор рецепторного комплекса, приводящей к усилению ингибирующего действия ГАМК на передачу нервных импульсов. Бензодиазепины связываются с  $\alpha$ -субъединицей ГАМК<sub>A</sub>-рецептора и усиливают торможение в центральной нервной системе при состояниях тревоги [13]. Несмотря на важную роль ГАМК-рецепторов в механизме действия бензодиазепинов зависимость эффектов диазепама от плотности ГАМК-рецепторов мозга в суточном ритме изучена недостаточно.

### Материалы и методы

Опыты были поставлены на белых беспородных крысах-самцах. Диазепам первой груп-

пе животных ( $n=10$ ) вводили однократно внутривенно в дозе 10 мг/кг веса [8], [15] в 7 часов 30 минут, второй ( $n=10$ ) – в 19 часов 30 минут. Контрольные животные получали внутривенно 0,2 мл физиологического раствора в те же часы ( $n=20$ ). Опытных и контрольных крыс после инъекции тестировали методом «открытое поле» через каждые 4 часа в течение суток [5].

В индивидуальном поведении крыс выделяли: П – «перемещение», т. е. поступательное перемещение тела в горизонтальной плоскости; С – «сидит»; Ф – «фризинг», т. е. неподвижность. В дальнейшем рассчитывали объемы паттернов (доля одного паттерна среди других поведенческих паттернов с учётом длительности эксперимента) и вычисляли интегральный критерий – коэффициент подвижности по формуле  $K_p = П/С + Ф$  [3].

Для изучения плотности ГАМК-рецепторов использовали радиолиганд [<sup>14</sup>C-ГАМК] (224 Ci/mmol, Amercham, Англия). Животных забивали декапитацией, выделяли мозг, измельчали ножницами, продавливали через поршневой измельчитель, добавляли суспендирующую среду, в качестве которой использовали 0,25 М раствор сахарозы, приготовленный на 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,4). Ткань мозга растирали в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема в течение двух минут при скорости вращения тefлонового пестика 1500 об/мин. Учитывая высокую чувствительность ГАМК-рецепторов к повышению температуры, все манипуляции проводили строго на холоде [16]. Полученный гомогенат фильтровали для освобождения от не-

разрушенных клеток и использовали для выделения мембранной фракции.

С целью получения биологического материала, содержащего наибольшее количество рецепторов гамма-аминомасляной кислоты, выделяли частично очищенную мембранную фракцию методом дифференциального ультрацентрифугирования в гомогенной среде [4].

Полученную фракцию гомогената мозга разводили 50 мМ трис-НСI буфером (рН 7,4) и использовали для определения мест связывания [<sup>14</sup>С-ГАМК]. Определение уровня связывания ГАМК со специфическими рецепторами мозговой ткани проводили радиолигандным методом с небольшими модификациями [14], [16], [20].

Для определения уровня общего связывания аликвоты мембранных препаратов с конечным содержанием белка в инкубационной смеси 0,3-1 мг/мл инкубировали в триплете с [<sup>14</sup>С-ГАМК] в концентрации 11,6 нМ.

Объем инкубационной смеси составил 1 мл. Инкубацию проводили 40 мин при 25°C в 50 мМ трис-НСI буфере, содержащем 5 мМ ЭДТА.

Для определения уровня неспецифического связывания реакцию проводили точно так же, но в присутствии 1000-кратного избытка немеченого ГАМК. Реакция была остановлена путем фильтрования проб через фильтры GFC. Фильтры просушивались и помещались во флаконы с 5 мл сцинтиляционной жидкости на основе диоксана. Через 48 часов радиоактивность растворов была измерена на счетчике импульсов Бета-2. Разница между средними величинами общего и неспецифического связывания соответствует специфически связанному лиганду. Белок определяли по Лоури [19].

Содержание мест связывания выражали в фемтомолях лиганда (10–15 М), специфически связанного с 1 мг белка.

Для определения суточных колебаний плотности ГАМК-рецепторов в головном мозге, изучали динамику специфического связывания [<sup>14</sup>С]-ГАМК с МФГМ интактных крыс в течение суток через каждые 4 часа.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики [12]. Оценку значимости различий средних арифметических проводили с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при

уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Ритмологическую обработку данных осуществляли, вычисляя мезор и размах колебаний [9]. Использовали пакеты стандартных программ статистического анализа.

### Результаты и обсуждения

Сравнение суточной динамики КП крыс, получивших диазепам в 19:30 с КП контрольных животных выявило значительные различия. Так суточная динамика коэффициента подвижности (КП) в контрольной группе описывалась одnogорбой кривой (рис. 1). Высокие значения КП отмечали в вечернее и ночное время. Максимальное значение коэффициента наблюдалось в 20 часов (5,637). В 12 часов двигательная активность контрольных животных была минимальной (0,389). Среднесуточное значение интегрального критерия составило 1,947, размах колебаний равнялся 5,248. В целом, наши результаты согласуются с данными других авторов, которые также отмечали наличие суточных изменений двигательной активности грызунов [6].

У животных, подвергшихся действию диазепама, в 20 часов отмечалось резкое снижение двигательной активности (0,403), КП опыта стал ниже контрольного (5,637) в 14 раз. Подавляющее влияние бензодиазепамина сохранилось и в ночные часы, опытные данные в 24 часа были меньше контрольных более чем в 9 раз (опыт – 0,408, контроль – 3,917). О более выраженном действии диазепама при вечернем введении свидетельствуют и другие авторы. Так, введение диазепама в дозе 0,5 мг/кг в вечерние часы у самцов и самок крыс вызывало отчетливое антиконфликтное действие [10].

В целом, под влиянием исследуемого препарата произошло уплощение кривой суточной динамики КП, значительно снизился размах колебаний и почти в 5 раз уменьшился мезор, сместилась акрофаза.

В последующие сутки определяли влияние утреннего введения препарата на суточную динамику интегрального критерия (рис. 2).

Введение диазепама в утренние часы изменило характер суточной динамики КП. Если в контрольной группе она была представлена двугорбой кривой, то в опытной уже описывалась одnogорбой. Под действием диазепама двигательная активность снизилась в утренние и

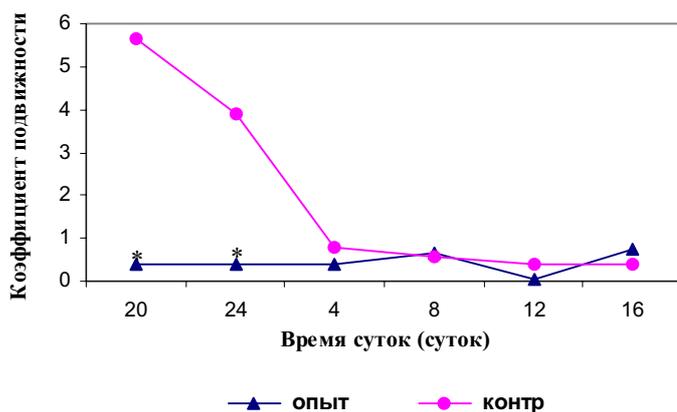


Рисунок 1. Суточная динамика коэффициента подвижности при вечернем введении диазепама  
 Примечание. \* – достоверность различий по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).  
 Представлены средние данные (М) из 6–10 опытов.

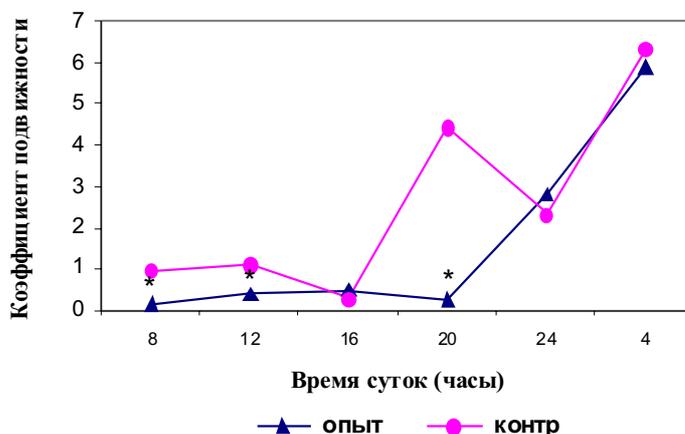


Рисунок 2. Суточная динамика коэффициента подвижности при утреннем введении диазепама  
 Примечание. \* – достоверность различий по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).  
 Представлены средние данные (М) из 7–10 опытов.

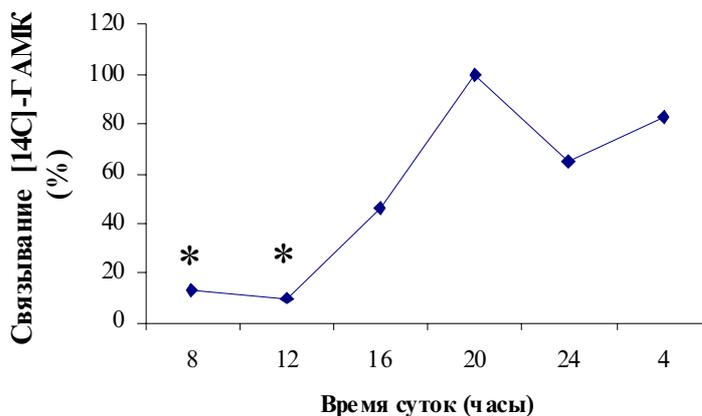


Рисунок 3. Суточная динамика специфического связывания [14С]-ГАМК с МФГМ  
 Примечание. \* – достоверность различий по сравнению с максимальным значением ( $p \leq 0,05$ ).  
 Представлены средние данные из 6–7 опытов в % от максимального значения.

ранне-дневные часы. Отсроченный и максимальный эффект наблюдался в 20 часов, препарат снизил КП до 0,237, что было ниже контроля почти в 19 раз (4,434). В остальные сроки достоверных отличий между КП опытных и контрольных крыс не выявлено. Размах колебаний значений двигательной активности в опыте составил 5,723, мезор интегрального критерия был равен 1,689, что не отличается от контроля.

Таким образом, утреннее введение диазепама дважды подавляет двигательную активность крыс (сразу после введения и в 20 часов) и изменяет характер суточной кривой.

Полученные результаты согласуются с данными ряда авторов. Так по результатам исследований Э.Б. Арушанян и Э.В. Бейер [2] у хомяков и крыс диазепам и коротко действующий бензодиазепиновый препарат триазолам способны на несколько десятков минут смещать фазу циркадианной локомоции. Исследования других авторов также свидетельствуют о том, что выраженность и характер действия бензодиазепинов зависят от времени суток, в которые они были введены [1], [11].

Так как фармакологический эффект лекарственных средств зависит от аффинности и

плотности их специфических рецепторов, мы исследовали характер изменений количества ГАМК-рецепторов головного мозга в течение суток.

Максимальный уровень связывания [14C]-ГАМК наблюдался в 20 часов, далее он постепенно снижался (рис. 3). В 24 часа и 4 часа показатели специфического связывания [14C]-ГАМК составили 64,8% и 82,8% от максимального значения соответственно, в 8 часов – 13,3%. Минимальная плотность сайтов связывания ГАМК определялась в 12 часов (9,9%).

### **Выводы**

Установлено, что плотность ГАМК-рецепторов головного мозга изменяется в течение суток. Увеличение количества рецепторов отмечается в вечерне-ночные часы.

Максимальное подавляющее действие препарата на двигательную активность грызунов отмечается при вечернем введении на фоне максимальной плотности ГАМК-рецепторов головного мозга. При утреннем введении действие проявляется дважды: непосредственно после введения и в вечерние часы, на фоне увеличения количества рецепторов.

14.04.2014

### **Список литературы:**

1. Арушанян Э.Б. Хронобиологические особенности невротических расстройств и анксиолитического эффекта психотропных средств // Российский психиатрический журнал. 2000. №1. – С. 27–32.
2. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Хронобиологические особенности антистрессорного действия анксиолитических средств // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1998. Т.61. №6. – С. 13–16.
3. Атрошенко О.Н., Лосев А.С., Садыков Р.Ф. [и др.] Влияние беметила, этомерзола и тиеназола на индивидуальное поведение мышей // Здоровоохранение Башкортостана. 1999. №2. – С. 53–58.
4. Биологические мембраны /под ред. Дж. Финдлей и У. Эванса. М.: Мир, 1990. – 422 с.
5. Воронина Т.А., Молодавкин Г.М., Бабаев И.И., Смирнов Л.Д. Изучение антистрессорного и анальгетического эффектов мексидола, диазепама, парацетамола и их комбинаций // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006. Т. 69. №4. – С. 6–9.
6. Ермаков Л.Н. Организация ритмов активности грызунов. Новосибирск: Наука, 1984. – 115 с.
7. Зиновьева О.Е., Катушкина Э.А., Мозолевский Ю.В., Голубева В.А., Шенкман Б.С., Чистяков И.Н., Подлубная З.А., Вихлянцева И.М., Яхно Н.Н. Синдром ригидного человека: вопросы патогенеза и лечения // Неврологический журнал. 2009. Т.14. №1. – С. 11–17.
8. Кожечкин С.Н. Сравнительная электроэнцефалографическая оценка анксиолитиков ацефабола и диазепама на инбредных крысах линий MR и MNRA с разным уровнем тревожности освещения // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2003. Т.66. №2. – С. 38–45.
9. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. Москва: Триада-Х, 2000. – 488 с.
10. Манвелян Э.А., Батурин В.А. Половые различия в действии диазепама у крыс в тесте конфликтной ситуации // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т.71. №4. – С. 11–13.
11. Мезенцев В.Е., Ларионов Л.П. Зависимость фармакологического эффекта нейро- и психотропных средств от состояния временной организации рецепторов // Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств: Сборник тезисов докладов I Съезда Российского научного общества фармакологов. Волгоград, 9–13 октября 1995 г. – М., 1995. – С. 274.
12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: Медиасфера, 2002. – 312 с.
13. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. Роль ГАМК-рецепторов в развитии патологических процессов // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. Т.74. №2. – С. 47–52.
14. Agle M.W., Dunn M.N. Kinetics of [3H]-muscimol binding to the GABA<sub>A</sub>-receptor in bovine brain membrane // Biochemistry. 1989. Vol.28. – P.275–285.

15. Flaishon R., Halpern P., Sorkine P. [et al.] Cross-sensitivity between isoflurane and diazepam: Evidence from a bidirectional tolerance study in mice // Brain Res. 1999. Vol. 815. No. 2. – P. 287–293.
16. Grandison L., Cavagnini F., Schmid R. Aminobutyric acid and benzodiazepine – binding sites in human anterior pituitary tissue // Endocrinol. And metabol. 1982. Vol. 54. No. 3. – P. 597–601.
17. Gusev A.G., Swadlow H. A. The impact of 'bursting' thalamic impulses at a neocortical synapse // Nature Neurosci. 2001. Vol. 4. No. 4. – P.402–408.
18. Gelatti U., Samani F., Donato F., Covolo L., Mazzaglia G., Cremaschini F., Simon G., Leggieri G., Balestrieri M. Health-related quality of life in older people using benzo-diazepines: A cross-sectional study // Ann.ig.: Med prev e comunita. 2006. Vol. 18. No. 4. – P. 313–326.
19. Lowry.H., Rosenbrough N.J., Farr L. [et al.] Protein meagument with Folin phenol reagent // J.Biol.Chem. 1951. Vol. 193. No. 1. – P. 265–275.
20. Shyder S.H., Enna S.J. Properties of  $\gamma$ -aminobutyris asid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions // Mol. Pharmacol. 1977. Vol. 13. – P. 442–453.
21. Vekovischeva Olga, Uusi-Oukari Mikko, Korpi Esa R. Tolerance to diazepam-induced motor impairment. A study with GABA $\alpha$  receptor  $\alpha$ 6 subunit knockout mice // Neurochem. Res. 2003. Vol. 28. No. 5. – P. 757–764.

Сведения об авторах:

**Валеева Лиля Анваровна**, декан фармацевтического факультета Башкирского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор  
E-mail: admin@bgmy.ru

**Кулагина Ирина Геннадьевна**, доцент кафедры биологической химии Башкирского государственного медицинского университета, кандидат биологических наук  
E-mail: coolagin@list.ru

**Яфаева Эльвира Гумеровна**, старший методист фармацевтического факультета Башкирского государственного медицинского университета, кандидат медицинских наук  
E-mail: yagret@mail.ru

450000, г.Уфа, ул.Ленина, д.3