

УДК 612.06+612.821.7

ВЛИЯНИЕ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ОКСИПИРИДИНА НА СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЕГО НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ НАРУШЕНИИ СНА

ТАРАНОВА Н. П., НИЛОВА Н. С., *ВОРОНИНА Т. А.,
*НЕРОБКОВА Л. Н., *МАРКИНА Н. В.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград
*Научно-исследовательский институт фармакологии АМН СССР, Москва

Показано, что препарат 2-этил-6-метил-3-оксипиридин в дозе 100 мг/кг, не вызывая каких-либо нейробиологических сдвигов, оказывал ингибирующее действие на активность процессов ПОЛ в синапсоммах головного мозга у контрольных крыс.

При лишении крыс парадоксальной фазы сна в течение 24 ч ингибирующее действие препарата на перекисидацию липидов значительно усиливалось, что коррелировало с нормализацией поведенческих и электрофизиологических сдвигов, вызванных нарушением сна. Предполагается, что антиоксидантный эффект 2-этил-6-метил-3-оксипиридина играет важную роль в реализации его антистрессорного действия и защитного эффекта при нарушении сна.

Фармакологически активные производные 3-оксипиридина (3-ОП) представляют собой новый класс психотропных веществ, обладающих широким спектром биологического действия [1, 2]. Механизмы действия 3-ОП еще недостаточно изучены. В модельных системах *in vitro* была показана антиокислительная активность 3-ОП по отношению к метил-олеату [1] и способность этих соединений реагировать со свободными радикалами [3]. Кроме того, продемонстрировано модулирующее и модифицирующее действие 3-ОП на биологические мембраны различных тканей [4—7]. По-видимому, именно с этими свойствами и связаны лечебные эффекты препаратов группы 3-ОП. Эксперименты показали анксиолитическое, антистрессорное, противогипоксическое, седативное и антагонистическое действие препаратов этой группы [8]. Однако прямых исследований действия 3-ОП на систему ПОЛ нервной ткани в условиях *in vivo* не имеется.

В связи с тем, что одним из основных эффектов 3-ОП является антистрессорное действие, целью настоящей работы было комплексное нейробиологическое и нейрохимическое исследование влияния одного из производных 3-ОП, а именно 2-метил-6-метил-3-оксипиридина (ЭМ-3-ОП) на ряд показателей ПОЛ головного мозга и функций ЦНС у крыс в норме и при нарушениях, вызванных лишением парадоксальной фазы сна (ПФС).

Задачей настоящего исследования было выявление возможной корреляции между влиянием ЭМ-3-ОП на систему ПОЛ и его поведенческими и нейрофизиологическими эффектами.

Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самцах линии *Wistar* массой 160—180 г. Лишения животных ПФС достигали путем помещения крыс на кубики, окруженные водой [9]. Фракцию синапсом из коры больших полушарий получали методом Najos [10]. В синапсоммах коры определяли содержание первичных (дненовые конъюгаты), вторичных (малоновый диальдегид—МДА, ТБК-активные продукты) и конечных (основания Шиффа) продуктов ПОЛ. Кроме того, в опытах *in vitro* изучали динамику неферментативного аскорбатзависимого индуцированного ПОЛ по приросту МДА. Детали всех использованных методик исследования ПОЛ описаны ранее [11, 12].

Параллельно проводили исследование нейрофизиологических эффектов препарата. В течение 5 ч в условиях свободного поведения животных проводили запись ЭЭГ и ЭМГ на электроэнцефалографе «Нейрограф-18» с последующей обработкой на нейрокompьютере BAS-161 («О.Т.Е. «Biomedica», Италия), как описано ранее [13]. Обучение крыс проводили по методике условной реакции пассивного избегания (УРПИ) [14]. Степень эмоциональности определяли по шкале, предложенной Brady, Nauta [15] и модифицированной Гарибовой и соавт. [16], суммируя число баллов по отдельным тестам. Ориентировочно-исследовательское поведение оценивали по тесту «открытого поля», суммируя количество отдельных показателей в течение 2 мин.

Эксперименты проводили на 4 группах животных: 1—контроль (без введения препарата и без депривации ПФС); 2—лишение ПФС в течение 24 ч; 3—введение препарата без депривации ПФС; 4—введение препарата и лишение ПФС в течение 24 ч.

Препарат ЭМ-3-ОП вводили внутривенно (50 мг/кг) перед началом опыта и через 12 ч после помещения крыс на площадки. Животным, не подвергавшимся лишению ПФС (группа 3), препарат вводили по той же схеме. Контрольные животные (группа 1) и крысы, подвергнутые лишению ПФС без введения препарата (группа 2), получали инъекции физиологического раствора.

Результаты и обсуждение

Результаты опытов по влиянию ЭМ-3-ОП *in vivo* на содержание продуктов ПОЛ в синапсоммах коры в норме и на фоне лишения ПФС в течение 24 ч приведены в табл. 1. Введение препарата контрольным животным вызывало достоверное уменьшение содержания дненовых конъюгатов на 24% и оснований Шиффа на 23%. Угнетение процессов ПОЛ под влиянием препарата свидетельствует об антиоксидантном действии ЭМ-3-ОП на синаптические структуры нерв-

ной ткани *in vivo* и хорошо согласуется с данными, полученными на модельных системах и мембранных структурах *in vitro* [1, 3]. Депривация ПФС в течение 24 ч сама по себе также приводила к угнетению процессов ПОЛ в синапсоммах на стадии образования диеновых конъюгатов (снижение содержания на 24%) и на стадии образования шиффовых оснований (уменьшение на 27%), что подтверждает аналогичные исследования, выполненные нами ранее [11].

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ *in vivo* в синапсоммах коры головного мозга крыс при лишении ПФС 24 ч на фоне введения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина

Продукты ПОЛ	Контроль	Лишение ПФС 24 ч	Контроль + препарат	Лишение ПФС 24 ч + препарат
	1	2	3	4
Диеновые конъюгаты (нм г липидов)	4,6±0,22 (10)	3,5±0,21* (9)	3,5±0,31* (11)	2,1±0,22* (11)
ТБК-активные продукты (пкм мг белка)	21±21 (9)	136±13 (9)	182±10 (9)	19±11 (9)
Основания Шиффа (усл. ед/мг липидов)	56,4±3,4 (10)	41,3±3,6* (9)	41,2±3,1* (10)	30,2±2,6** (9)

Примечание. *—достоверно по отношению к 1 ($p < 0,05$), **—достоверно по отношению к 2 ($p < 0,05$). Здесь и в табл. 2, 3 в скобках—число опытов.

В условиях нарушения сна действие препарата на уровень ПОЛ в синапсоммах заметно усиливалось (табл. 1). Особенно это сказывается на содержании шиффовых оснований: дополнительное уменьшение концентрации этих соединений при лишении ПФС на фоне введения препарата по сравнению с влиянием одного нарушения сна составляет 27% и является достоверным. Тенденция к усилению эффектов ЭМ-3-ОП при лишении ПФС наблюдалась и для диеновых конъюгатов, но в этом случае дополнительное уменьшение содержания диеновых конъюгатов на 11% при совместном влиянии лишения ПФС и фармпрепарата было статистически недостоверно. Уменьшение содержания шиффовых оснований и диеновых конъюгатов при введении ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС по сравнению с интактным контролем составляет соответственно 46 и 33%.

Уменьшение уровня ПОЛ под влиянием ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС является, по всей видимости, одним из механизмов антистрессорного действия препарата, так как по литературным данным неустойчивость крыс к стрессу развивается в условиях дисбаланса уровня ПОЛ и антиоксидантной активности нервной ткани [17], а адаптация к стрессу сопровождается уменьшением уровня свободно-радикального окисления липидов в головном мозгу [18].

В параллельных опытах проводили исследование нейрофизиологических эффектов ЭМ-3-ОП. Показано, что введение препарата контрольным животным не влияло на степень эмоциональности крыс. Ли-

лишение ПФС в течение 24 ч, а также введение ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС тоже не меняли этот показатель.

Установлено, что введение ЭМ-3-ОП не влияет на поведение в открытом поле. Нарушение сна приводит к увеличению тревожности, то есть к усилению двигательной активности крыс, регистрируемой этим тестом. Введение ЭМ-3-ОП на фоне лишения ПФС нормализует двигательную активность крыс в открытом поле.

Интересные результаты были получены при изучении влияния ЭМ-3-ОП на фоне нарушения сна на воспроизведение УРПИ, которую применяли как наиболее простую условно-рефлекторную модель, характеризующую способность животных к запоминанию и воспроизведению информации. Критерием этой способности является латентное время захода в темную камеру при воспроизведении реакции: до обучения крысы заходят в темный отсек практически сразу, но после обучения при воспроизведении реакции (тестировании) время захода туда животных значительно увеличивается. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. При тестировании введение

Таблица 2
Влияние препарата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на латентное время захода крыс в темный отсек при выработке условной реакции пассивного избегания (УРПИ)

Воспроизведение УРПИ	Контроль	Лишение ПФС 24 ч	Контроль препарат	Лишение ПФС 24 ч + препарат
	1	2	3	4
Латентное время захода в темный отсек при воспроизведении УРПИ, с	57,7±9,1 (10)	1,4±1,5* (10)	71,5±8,6 (10)	67,5±7,4 (10)

Примечание. *—достоверно по отношению к 1 ($p < 0,05$).

ЭМ-3-ОП контрольным животным не изменяло латентное время захода в темный отсек по сравнению с виварным контролем. Лишение ПФС в течение 24 ч заметно и достоверно снижало латентное время захода, что свидетельствует об амнезии, вызванной нарушением сна. Введение ЭМ-3-ОП животным, подвергнутым лишению ПФС, возвращает латентное время захода до уровня виварного контроля. Таким образом, эти результаты демонстрируют сильное антиамнестическое действие препарата ЭМ-3-ОП, сравнимое с эффектом ноотропов [14]. Можно предположить, что ЭМ-3-ОП по механизму действия близок к ноотропам, но в то же время отличается от классического антистрессорного препарата—транквилизатора феназепама, который не устранял амнезию, вызванную депривацией ПФС [14].

Анализ спектров электрической активности сенсомоторной коры и дорзального гиппокампа показал угнетение гиппокампального тета-ритма в особенности его фазического компонента при лишении крыс ПФС. Введение ЭМ-3-ОП крысам, подвергнутым лишению ПФС,

вызывало синхронизацию тета-ритма, который регистрируется не только в гиппокампограммах, но и в кортикограммах, с выраженностью обоих его компонентов. Синхронизация ЭЭГ в диапазоне тета-ритма под влиянием ЭМ-3-ОП отражает, по-видимому, возникновение новых возможностей для образования и упрочения условных связей. Подобные эффекты ЭМ-3-ОП на поведенческие и электрофизиологические показатели в норме и при лишении ПФС четко воспроизводятся независимо от времени года и популяции животных [13].

Отмеченное нами антистрессорное и антиоксидантное действие ЭМ-3-ОП связано, по-видимому, с мембранотропным эффектом препарата, т. е. с его способностью взаимодействовать с синаптическими мембранами и вызывать их конформационные перестройки. Определенное подтверждение этому было получено в опытах *in vitro* при исследовании влияния препарата на индуцированное аскорбатзависимое ПОЛ в синапсосах нормальных и лишенных ПФС крыс.

Результаты исследования динамики индуцированного аскорбатзависимого ПОЛ в синапсосах коры через 24 ч после введения препарата, а также влияние лишения ПФС на этот процесс показаны в табл. 3. Из результатов следует, что само по себе введение препа-

Таблица 3

Динамика аскорбатзависимого неферментативного индуцированного ПОЛ синапсом коры головного мозга крыс при введении животным 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на фоне лишения ПФС в течение 24 ч по приросту МДА в нм/мг белка

Время инкубации	Контроль	Лишение ПФС 24 ч	Контроль + препарат	Лишение ПФС + 24 ч + препарат
	1	2	3	4
5 мин	4,5±0,38 (13)	4,6±0,28 (13)	4,5±0,39 (13)	4,8±0,28 (13)
10 мин	6,5±0,34 (13)	6,4±0,37 (13)	7,0±0,50 (13)	7,2±0,44 (13)
15 мин	7,1±0,32 (12)	7,7±0,41 (13)	8,0±0,53 (13)	8,3±0,47* (13)
20 мин	9,2±0,42 (13)	9,6±0,53 (13)	10,5±0,81 (13)	11,1±0,72** (10)

Цифры в скобках—число опытов; *—достовечно по отношению к 1 ($p < 0,05$). **—достовечно по отношению к 2 ($p < 0,05$).

рата или лишение ПФС не влияло на прирост МДА при индукции ПОЛ за 5, 10, 15 и 20 мин инкубации. Наблюдали лишь тенденцию к усилению индуцированного ПОЛ при лишении крыс ПФС, а также в группе контрольных животных, получивших препарат. Однако введение ЭМ-3-ОП крысам, подвергнутым нарушению сна, приводило к активации процессов неферментативного индуцированного ПОЛ в конце инкубации проб—через 15 и 20 мин. Увеличение прироста МДА по отношению к контролю—крысам, содержавшимся в обычных клетках и не получавших препарат, составляло 17 и 24% и было статистически достоверно. Несколько меньшую активацию индуцированного

in vitro ПОЛ наблюдали у крыс, подвергнутых лишению ПФС и получивших препарат по сравнению с крысами, лишенными ПФС и не получивших предварительно ЭМ-3-ОП. Однако и здесь в конце инкубации проб *in vitro* (через 20 мин) увеличение прироста МДА в присутствии препарата составляло 19% и было статистически достоверно ($p=0,05$).

Таким образом, в отличие от опытов *in vivo*, где введение препарата на фоне лишения ПФС вызывало дополнительное ингибирование уровня ПОЛ, в опытах *in vitro* мы наблюдали активацию процессов ПОЛ в синапсосамах из коры головного мозга крыс, получивших ЭМ-3-ОП и подвергнутых лишению ПФС, по сравнению с виварным контролем, а также с крысами, лишенными ПФС и не получившими препарат. Вероятно, условия реализации процессов свободно-радикального окисления в условиях *in vivo* и *in vitro* могут отличаться. Следует помнить, что при индукции *in vitro* процессы ПОЛ могут происходить в условиях нарушения естественного контроля со стороны антиоксидантной системы и поэтому липиды—субстраты ПОЛ могут окисляться с другой скоростью. Возможно, что одной из точек приложения действия фармпрепарата *in vivo* является не только взаимодействие со свободными радикалами, но также активация системы ферментов антиоксидантной защиты, приводящая к дополнительному угнетению ПОЛ в нервной ткани при лишении животных ПФС в течение 24 ч. Сохранение быстро окисляемых липидов в результате ингибирования ПОЛ *in vivo* может также приводить к более активному их использованию при индукции ПОЛ *in vitro*.

Вместе с тем активация процессов индуцированного ПОЛ под влиянием препарата в опытах *in vitro* свидетельствует о том, что предварительное введение препарата способствует лучшему сохранению структуры и свойств синаптических мембран при длительных сроках инкубации *in vitro* в присутствии индуктора, а также к изменению геометрии центров радикалообразования при индукции процессов ПОЛ и увеличению прироста МДА в индуцированном *in vitro* процессе ПОЛ. Особенно чувствительными к действию препарата оказываются синапсосы из головного мозга крыс, лишенных ПФС, возможно потому, что лишение ПФС само по себе вызывает функционально-структурные сдвиги синаптических мембран [19, 20]. Мы полагаем, что эти результаты по влиянию предварительного введения препарата ЭМ-3-ОП на уровень ПОЛ свидетельствуют о мембранотропном действии этого препарата на мембранные структуры нервной ткани.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено антиоксидантное действие препарата ЭМ-3-ОП и показано, что облегчение перенесения последствий нарушения сна и нормализация нейрофизиологических функций в присутствии ЭМ-3-ОП коррелирует с еще более глубоким ингибированием уровня ПОЛ в синапсосах мозга *in vivo*. В основе ингибирования процессов ПОЛ, по-видимому, могут лежать не только антиоксидантные свойства препарата, но и возмож-

ность активации им ферментов антиоксидантной защиты, а также способность ЭМ-3-ОП связываться биологическими мембранами и вызывать их структурно-функциональные перестройки.

Следует отметить, что влияние производных 3-ОП на процессы ПОЛ не является единственной точкой приложения их действия. Множественность эффектов препаратов и сложность картины их физиологического влияния на ЦНС требуют дальнейшего многостороннего исследования нейрохимических механизмов действия препаратов этого типа.

THE EFFECT OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE ON LIPID PEROXIDATION IN BRAIN AND ITS NEUROPHYSIOLOGICAL EFFECTS UNDER REM-SLEEP DEPRIVATION

TARANOVA N. P., NILOVA N. S., VORONINA T. A., NEROBKOVA I. N.,
MARKINA N. V.

Parlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad and
Research Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow

Antistressor drug 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine inhibits lipid peroxidation in synaptosomes of control rats at a dose of 100 mg/kg. However, there was no change in electrophysiological characteristics of brain. Owing to the fact that this drug might normalize the behavioral and electrophysiological disturbances induced by REM-sleep deprivation, we propose that the antioxidant action of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine plays an important role in realization of the antistress protective effect under sleep deprivation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М. Хим.-фармац. журн., т. 16, с. 412—428, 1982.
2. Дюмаев К. М., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Вальдман А. В. Вест. АМН СССР, № 11, с. 3—7, 1984.
3. Михаджинова Д. Р., Кузьмин В. И., Смирнов Л. Д., Шарпаты В. А. Изв. АН СССР, серия химич., № 10, с. 2216—2218, 1981.
4. Меерсон Ф. З., Павлова В. В. Вопр. мед. химии, т. 26, с. 827—831, 1980.
5. Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлова А. П. Вопр. мед. химии, т. 30, с. 66—72, 1984.
6. Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М. Вест. АМН СССР, № 11, с. 89—94, 1984.
7. Жердев В. П., Сариев Е. К., Дворянинов А. А., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 101, с. 325—326, 1986.
8. Вальдман А. В., Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, с. 60—62, 1985.
9. Jouvet D., Vimont P., Delorme F., Jouvet M. C. R. Soc. biol., v. 158, p. 756—759, 1964.
10. Hajos F. Brain. Res., v. 93, p. 435—489, 1975.
11. Таранова Н. П., Нилова Н. С. Физиол. журн., т. 72, с. 1065—1069, 1986.
12. Таранова Н. П., Нилова Н. С. Нейрохимия, т. 7, с. 259—263, 1988.

13. Соколови Н. Е., Таранова Н. П., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В. Нейрохимия, т. 7, с. 483—492, 1988.
14. Маркина Н. В., Неробкова Л. Н., Воронина Т. А. Журн. ВНД, т. 36, с. 963—967, 1986.
15. Brady J. V., Nauta W. J. J. Compar. and Physiol. Psychol., v. 6, p. 336, 1953.
16. Гарибова Т. Л., Рожанец В. В., Рахманкулова Н. Х., Воронин К. Э., Цонева-Тютюнкова Н., Стефанова Д., Тимофеева С. Э., Вальдман А. В. Медико-биологическая информация, Болгария, № 4, с. 8, 1985.
17. Гуляева Н. В., Хоничева Н. М., Обидин А. Б. Нейрохимия, т. 6, с. 259—262, 1987.
18. Айрапетянц М. Г., Гуляева Н. В. Вест. АМН СССР, № 11, с. 49—55, 1988.
19. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, с. 20—27, 1982.
20. Нилова Н. С. Цитология, т. 26, с. 1396—1400, 1984.

Поступила 26. XI. 1989г