

Ингибирование NO-синтазы в устранении тревожности, вызванной локальной ишемией мозга

М.Г. Баласанян

ЕрГМУ им. М.Гераци, кафедра фармакологии

375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: локальная ишемия мозга, L-NAME, 7-NI, тревожность, анксиолитическая активность

Широкий спектр физиологических и патофизиологических процессов, контролируемых монооксидом азота, явился стимулом в развитии многих подходов и средств, экспериментально или терапевтически контролирующих формирование оксида азота (NO). Среди них особо важную значимость приобрели ингибиторы NO-синтазы (NOS), блокирующие NADH- и кислородзависимый метаболический путь формирования NO при конверсии L-аргинина в цитрулин с промежуточным образованием N^ω-гидрокси-L-аргинина [15]. В частности, ингибиторы NOS были широко использованы для выяснения роли NO при экспериментальной ишемии мозга [12]. Доказано, что одним из важных патогенетических механизмов развития церебральной ишемии, наряду с накоплением внутриклеточного кальция, повышением уровня глутаминовой кислоты и образованием свободных радикалов, является усиленная продукция NO.

Экспериментальное исследование церебральных органических нарушений в различных моделях локальной ишемии показало, что среди регионов мозга, обладающих избирательной уязвимостью, высоким уровнем NO-синтазной активности обладают амигдала, гипоталамус и periaqueductal grey [18], последний из них заслуживает особого внимания в отношении процессов, связанных с развитием тревожности [4]. Действительно, одним из важных последствий локальной ишемии, когда нарушения типично региональны и неврологические последствия очевидны, является развитие тревожности [5].

Установленная за последние годы анксиолитическая активность ингибиторов NO-синтазы послужила основой для исследования эффектов селективного ингибитора ее нейрональной изоформы – 7-нитроиндазола (7-NI) [6] и неселективного ингибитора нейрональной и эндотелиальной изоформ – метилового эфира ⁶N-нитро-L-аргинина (L-NAME) [7] в устранении тревожности, вызванной локальной ишемией мозга.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 46 беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария в клетках по 6 особей в каждой в течение не менее двух недель до начала эксперимента на стандартной диете при свободном доступе к воде. Локальную ишемию вызывали перевязкой средней мозговой артерии по методу Tamura et al. [17] в модификации А.В. Топчяна и соавт. [1]. Анксиолитическая активность препаратов исследована в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [14]. Препараты вводились внутривенно по 0,2 мл на 100 г веса животного. L-NAME вводили в физиологическом растворе в дозе 10 мг/кг, 7-NI растворяли после предварительного эмульгирования с несколькими каплями тритона X-100 в дозе 20 мг/кг. Контрольную группу составили интактные животные, которым вводился физраствор.

Статистическая обработка результатов проводилась методом однофакторного дисперсионного анализа по ANOVA [2]. Достоверность полученных данных оценивалась по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты экспериментального материала по влиянию локальной ишемии на поведение животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. Статистический анализ полученных данных свидетельствует о выраженном влиянии окклюзии средней мозговой артерии почти на все измеряемые показатели поведения: время пребывания животных в открытых рукавах – $F_{1,10} = 25,45$ ($P < 0,01$); время задержки в центре лабиринта – $F_{1,10} = 1,28$ ($P > 0,05$); общее число заходов в рукава – $F_{1,10} = 289$ ($P < 0,01$). Через 6 дней после перевязки средней мозговой

Влияние острого и хронического введения 7-NI и L-NAME на поведение крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта в условиях локальной ишемии мозга

Параметры ПКЛ	Контроль	ОСМА 6 дней n=8	Острое введение		Хроническое введение	
			7-NI (20 мг/кг) n=6	L-NAME (10 мг/кг) n=7	7-NI (20 мг/кг) n=6	L-NAME (10 мг/кг) n=7
Число заходов в открытые рукава	2,83±0,75	1,00±0,89** (P)	3,33±0,52** (P ₁)	2,33±0,82 (P ₁)	3,±0,41** (P ₁)	1,67±0,52 (P ₁)
Время в открытых рукавах (сек)	34,17±5,85	10,83±9,70** (P)	44,17±9,17** (P ₁)	41,67±8,16** (P ₁)	151,67±12,52** (P ₁)	26,67±9,31* (P ₁)
Число заходов в открытые рукава, %	31,44±7,58	27,78±22,77 (P)	60,28±10,69* (P ₁)	27,06±8,34 (P ₁)	58,97±5,41** (P ₁)	37,78±3,44 (P ₁)
Время в открытых рукавах, %	11,39±1,95	3,61±3,23** (P)	14,72±3,06** (P ₁)	13,89±2,72** (P ₁)	50,56±4,17** (P ₁)	8,89±3,1* (P ₁)
Число заходов в закрытые рукава	6,17±0,75	2,33±0,52** (P)	2,12±1,03 (P ₁)	6,17±0,75** (P ₁)	2,33±0,52 (P ₁)	2,67±0,52 (P ₁)
Время в закрытых рукавах (сек)	203,33±38,82	243,33±15,06 (P)	216,67±16,33 (P ₁)	206,67±12,11 (P ₁)	155,83±13,93** (P ₁)	236,67±11,69 (P ₁)
Время в центре лабиринта (сек)	62,50±34,46	45,83±10,68 (P)	39,17±8,01 (P ₁)	51,67±8,16 (P ₁)	32,50±6,89 (P ₁)	36,67±6,06 (P ₁)
Общее число заходов в рукава	9,00±0,63	3,33±0,52** (P)	5,67±1,21* (P ₁)	8,5±1,05** (P ₁)	5,67±0,82** (P ₁)	4,33±1,03 (P ₁)

Примечание: P – достоверно по сравнению с контролем; P₁ – по сравнению с перевязкой; * P, P₁ < 0,05; ** P, P₁ < 0,01

вой артерии достоверно уменьшалось время пребывания экспериментальных животных в открытых рукавах лабиринта, а процент заходов в открытые рукава характеризовался тенденцией к уменьшению, не достигая статистически значимого уровня. В то же время после локальной ишемии мозга в условиях избранной модели тревожности уменьшение времени пребывания в открытых рукавах сопровожда-

лось снижением общего числа заходов в рукава лабиринта и времени пребывания на центральной площадке (рис.).

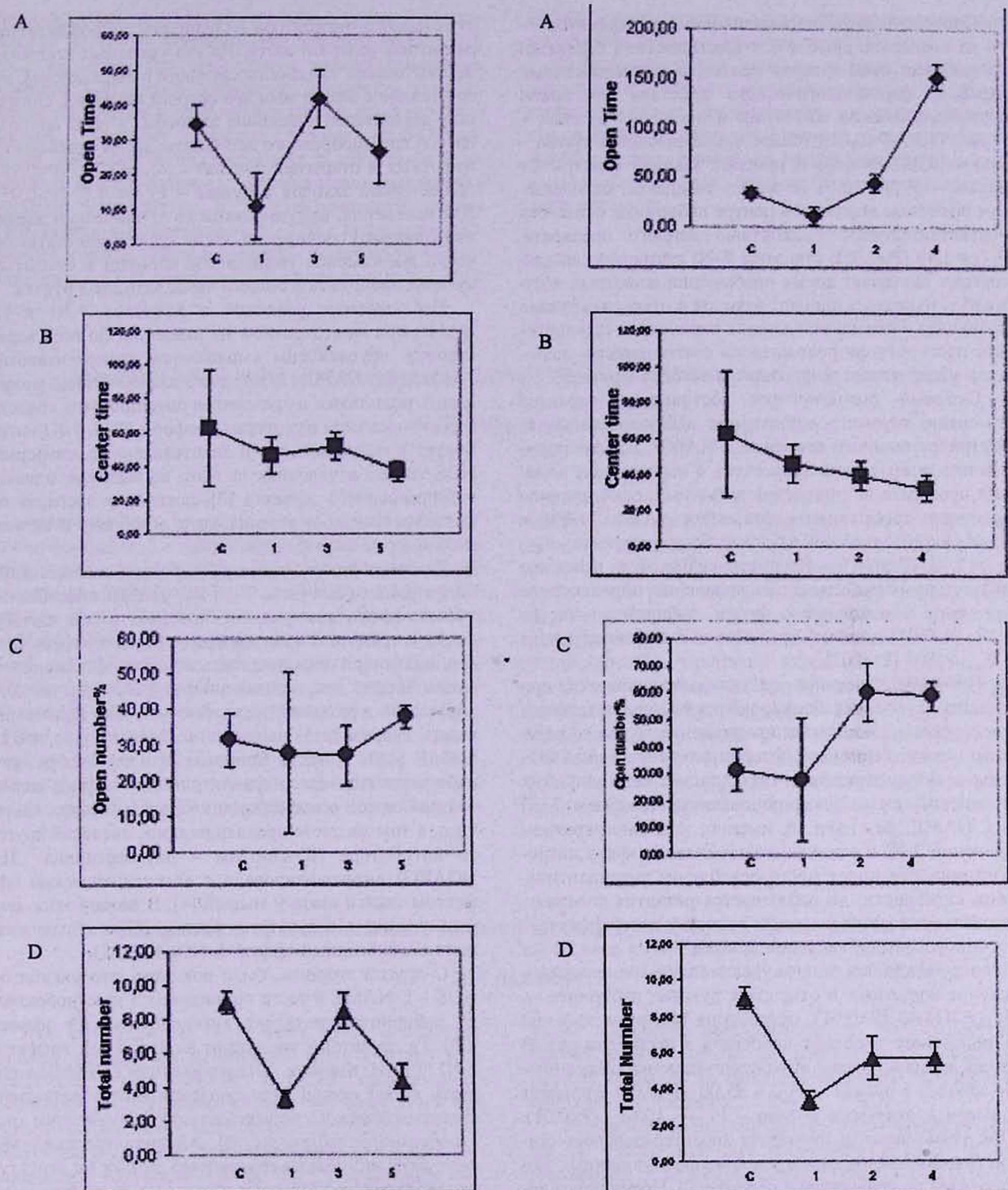


Рис. Влияние ингибиторов NO-синтазы на поведение крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. По оси ординат: А – время в открытых рукавах (сек); В – время задержки в центре лабиринта (сек); С – % заходов в открытые рукава; D – общее число заходов в рукава. По оси абсцисс: С – контроль; 1 – перевязка; 2 – острое введение 7-NI; 3 – острое введение L-NAME; 4 – хроническое введение 7-NI; 5 – хроническое введение L-NAME.

Проведенный дисперсионный анализ эффектов 7-NI на поведение крыс после шестидневной перевязки средней мозговой артерии подтверждает выраженный характер фармакологического действия препарата: время пребывания животных в открытых рукавах – $F_{1,10} = 37,38$ ($P < 0,01$); общее число заходов в рукава – $F_{1,10} = 18,84$ ($P < 0,05$) и процент заходов в открытые рукава – $F_{1,10} = 10,01$ ($P < 0,05$); поведение, определяемое временем задержки в центре лабиринта, оказалось нечувствительным к действию данного препарата: $F_{1,10} = 1,49$ ($P > 0,05$); при этом 7-NI статистически достоверно повышает время пребывания животных в открытых рукавах и процент заходов в открытые рукава лабиринта. Повышение данных параметров при введении препарата сопровождалось статистически значимым увеличением общего числа заходов в рукава.

Сходный статистически достоверный характер изменения параметров поведения наблюдался и после внутрибрюшинного введения L-NAME. Анализ полученных данных свидетельствует о выраженном влиянии препарата на поведение животных, определяемое временем пребывания в открытых рукавах – $F_{1,10} = 35,46$ ($P < 0,01$) и общим числом заходов в рукава – $F_{1,10} = 117,19$ ($P < 0,01$). Нечувствительным к действию данного препарата оказалось поведение, определяемое временем нахождения в центре лабиринта – $F_{1,10} = 1,12$ ($P > 0,05$) и процентом заходов в открытые рукава – $F_{1,10} = 0,05$ ($P > 0,05$).

Изучение динамики развития тревожности при ишемии в условиях блокирования NO-синтазы, когда исследуемые ингибиторы вводились сразу после перевязки средней мозговой артерии в течение 6 дней дважды в сутки, показало, что характер поведенческих изменений, вызванных хроническим введением 7-NI и L-NAME, различен. А именно, при многократном введении 7-NI в отличие от метилового эфира нитроаргинина, где имеет место ослабление анксиолитической активности, не наблюдается развития толерантности и отмечается усиление описываемого эффекта.

Многократное введение крысам 7-NI в дозе 20 мг/кг сопровождается резким увеличением времени нахождения животных в открытых рукавах лабиринта – $F_{1,10} = 474,43$ ($P < 0,01$), превосходя при этом эффекты однократного введения препарата в несколько раз. В то же время препарат выраженно изменял общее число заходов в рукава – $F_{1,10} = 35,00$ ($P < 0,01$) и процент заходов в открытые рукава – $F_{1,10} = 10,65$ ($P < 0,01$). При этом введение препарата характеризовалось статистически достоверным увеличением указанных показателей по сравнению с перевязкой. Время нахождения животных в центре лабиринта аналогично остроуму введению оказалось нечувствительным к действию многократного введения препарата – $F_{1,10} = 6,59$ ($P > 0,05$).

Совершенно иная картина наблюдалась при многократном введении L-NAME. Хроническое введение

отмеченного ингибитора NO-синтазы сопровождается развитием толерантности. На это указывает статистический анализ, свидетельствующий о выраженном, по сравнению с эффектами его острого введения, снижении показателей поведения животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта: время пребывания животных в открытых рукавах – $F_{1,10} = 8,32$ ($P < 0,05$), общее число заходов в рукава – $F_{1,10} = 4,5$ ($P > 0,05$). Для поведения, индуцированного хроническим введением данного соединения, было характерно статистически достоверное уменьшение времени в открытых рукавах лабиринта и общего числа заходов в рукава.

Наблюдаемые различия в эффектах 7-NI и L-NAME при многократном их введении, по всей вероятности, обусловлены выраженным гипертензивным эффектом L-NAME [21]. Однако альтернативно может играть роль также и различная потенция этих средств в ингибировании различных изоформ NOS. 7-NI ингибирует и нейрональную и эндотелиальную изоформы NOS только в условиях *in vitro*, не вызывая, однако, вазопрессорного эффекта [3], поскольку препарат не проникает через эндотелиальную мембрану и не воздействует на цитозольную NOS.

Таким образом, проведенные нами исследования подтвердили наличие у 7-NI и L-NAME анксиолитического эффекта и показали способность этих ингибиторов устранять и предотвращать развитие тревожности, вызванной локально ишемическими поражениями мозга. Между тем, данные литературы о роли ингибиторов NOS в развитии тревожности весьма противоречивы. Так, имеются данные относительно того, что L-NAME [16] в тесте приподнятого крестообразного лабиринта снимает анксиолитический эффект, развивающийся под воздействием хлордиазепоксида. Более того, в том же тесте предварительное введение другого ингибитора NO-синтазы – нитроаргинина (L-NOARG) антагонизировало с анксиолитическим эффектом заиси азота у мышей [4]. В пользу этих данных говорят и результаты исследования, обнаружившего анксиогенный эффект L-NOARG [15].

С другой стороны, было показано, что ингибитор NOS – L-NAME в тесте приподнятого крестообразного лабиринта проявляет анксиолитический эффект [20]. Те же авторы указывают на подобный эффект и 7-NI [19]. И, наконец, микроинъекции L-NAME в область dorsal central gray сопровождаются развитием анксиолитического эффекта в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [8]. Анксиолитический эффект двух химически совершенно разных по структуре ингибиторов NOS четко указывает на то, что генерация NO вовлечена в нейрональные механизмы тревожности.

Предположение, что именно ингибирование NO-синтазы вызывает анксиолитический эффект, становится явным, если принять во внимание наличие непосредственной связи между NMDA и NOS, установ-

ленный анксиолитический профиль прямых антагонистов NMDA и анксиогенное действие NMDA [6]. Тем не менее при обсуждении анксиолитического эффекта 7-NI нельзя полностью исключить возможность вовлечения и другого механизма действия. Возможно, 7-NI имеет и другую отличную от NOS мишень, поскольку в экспериментах *in vitro* была установлена его способность дозозависимо расслаблять гладкую мускулатуру в NOS-независимой манере [10]. Вопрос о взаимодействии 7-NI с нейротрансмиттерами, вовлеченными в процессы развития тревожности, остается невыясненным. Установлено лишь, что с

ГАМК_A рецепторами и с бензодиазепинсвязывающими сайтами 7-NI не взаимодействует [11].

Вышеприведенные данные, а также результаты наших исследований свидетельствуют, что ингибирование NO-синтазы предотвращает развитие тревожности, вызванное локальной ишемией, и может явиться новой мишенью в создании препаратов, устраняющих психоневрологические последствия ишемических нарушений мозга.

Поступила 01.07.02

Տեղային իշեմիայից զարգացած փագնապի վերացումը NO-սինթազի պաշարմամբ

Մ.Գ.Բալասանյան

Բարձրացված խաչածն լարիքի միջոցով թափանցող ռատների մոտ զարգացած միջնախոնքային իշեմիայից զարգացած փագնապի վերացումը ապահովում է ազդեցությունը միջնախոնքային զարգացման մեխանիզմներում՝ միջին ուղեղային զարգացման ինքնակառավարման առկայության մոտ: Պարզվել է, որ իշեմիայից հետո կենդանիները շատ ավելի քիչ ժամանակ են անց կացնում լարիքի միջոցով զարգացած փագնապի վերացումը: Սա դիտարկվում է որպես տագնապածին էֆեկտ, որն առավելագույնս արտահայտվում է իշեմիայի 6-րդ օրը: NO-սինթազի պաշարից՝ L-NAME-ի (միաբարձրացված մեթիլ էսթեր - էնդոթելիալ և ներքին NO-սինթազի ոչ ընտրողական պաշարիչ) և 7-NI-ի (7-միտրոինդազոլ - ներքին NO-

սինթազի ընտրողական պաշարիչ) սուր ներմուծման դեպքում զգալիորեն մեծանում է լարիքի միջոցով զարգացած փագնապի վերացումը և փագնապի ալյուրոսիսի հաճախականությունը: Իսկ խրոնիկական ներմուծման ժամանակ, ի տարբերություն L-NAME-ի, 7-NI-ի տագնապարար չափերը զգալիորեն աճում է:

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ ազդեցությունը ընդգրկված է իշեմիայից առաջ եկած տագնապի զարգացման մեխանիզմներում, իսկ NO-սինթազը կարող է հանդիսանալ մի նոր փոխարինիչ իշեմիայի հոգեկարգային հետևանքները վերացնող միջոցների ստեղծման գործում:

Elimination of local ischemia-induced anxiety by NO-synthase inhibition

M.G.Balasanyan

The involvement of nitric oxide (NO) in ischemia-induced anxiety was investigated using elevated plus-maze test in rats, subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO). Post-ischemic rats spent much less time in the open arms, than the control animals. This was interpreted as an increased anxiety, effect of which was particularly expressed on the 6th post-ischemic day. Acute treatment with NO-synthase inhibitors both L-NAME (^GN-nitro-L-arginine methyl ester - nonselective inhibitor of eNOS and nNOS) and 7-NI (7-Nitroindazole - selective inhibitor of nNOS) significantly increased the time spent in open arms and the frequency of open-arm

visits. Subchronic administration of 7-NI, unlike L-NAME which showed an attenuation of anxiolytic activity, displayed an enhancing anxiolytic efficacy and was devoid of tolerance.

The anxiolytic-like effects of NOS inhibitors after MCAO show that NO is potently involved in the mechanisms of ischemia-induced anxiety and NOS might be a new target in the development of compounds, eliminating neurobehavioral consequences of cerebral ischemia.

Литература

1. Топчян А.В., Мирзоян Р.С., Баласанян М.Г. Эксперим. и клинич. фармакол., 1996, т. 59, 5, с. 62.
2. Analyzing ANOVA Designs. Biometrics Information Handbook No 5. 1995, 07, p. 9.
3. Babbedge R.C., Bland-Ward P.A., Hart S.L., Moore P.K. Br.J.Pharmacol., 1993, 110, p. 225.
4. Caton P.W., Tousman S.A., Quock R.M. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 1994, 48, 3, p. 689.
5. Dhooper A., Young C., Reid K.H. Behav. Brain Res., 1997, 84, p. 57.
6. Dunn R.W., Corbett R., Fielding. Eur. J. Pharmacol., 1989, 169, p.1.
7. Griffith O.W., Gross S.S. In: Methods in Nitric Oxide Research. Ed.: M.Filisch and J.S.Stamler, 1996, p. 187.
8. Guimaraes F.S., De Aguiar J.C., del Bel E.A., Ballejo G. Neuroreport, 1994, 5, p. 1929.
9. Guimaraes F.S., Carobrez A.P., de Aguiar J.C. et al. Psychopharmacol., 1994, 103, p. 91.
10. Medhurst A.D., Greenless C., Parsons A.A., Smith S.J. Eur.J.Pharmacol., 1994, 256, p. R5.
11. Mulsch A., Busse R., Mordvinicev P.I., Vanin A.F., Nielsen E.O., Scheel-Kruger J., Olesen S.P. Neuroreport, 1994, 5, p. 2325.
12. Nanry K., Montecot C., Springhetti V. et al. Stroke, 1998, 29, p. 1248.
13. Oliveira C., Lino D., Del Bel E.A., Guimaraes F.S. Pharmacol.Biochem.Behav., 1997, 56, p. 55.
14. Pellow S., Chopin P., File S.E., M.Briley. J. of Neurosc. Meth., 1985, 14, p. 149.
15. Pufahl R.A., Nanjappan P.G., Woodard R.W., Marletta M.A. Biochemistry, 1992, 31, p. 6822.
16. Quock R.M., Nguyen E. Life Sci., 1992, 51, p. 255.
17. Tamura A., Graham I.D., McCulloch J., Teasdale G.M. J.Cereb.Blood Flow.Metab., 1981, 1, p. 53.
18. Vincent S.R., Kimura H. Neuroscience, 1992, 46, 4, p. 755.
19. Volke V., Koks S., Vasar E., Bourin M. et al. Neuroreport, 1995, 6, p.1285.
20. Volke V., Soosaar A., Koks S. et al. Psychopharmacology, 1997, 131, p. 399.
21. Wang Y.X., Lim S.M., Pang C.C.Y. Br. J. Pharmacol., 1995, 114, p. 1454.