

С. Ю. Макан, И. А. Бойко, С. П. Смутьский, С. А. Андронати

ВЛИЯНИЕ ЦИНАЗЕПАМА НА АФФИНИТЕТ К РЕЦЕПТОРАМ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина, E-mail: physchem@paco.net

Изучено влияние однократного и длительного введения циназепам и зопиклона на аффинитет дофаминовых D_1 и D_2 , серотониновых 5-НТ_{1А}, холинэргических ССК₂ и периферических бенздиазепиновых рецепторов головного мозга крыс. Циназепам при длительном введении в меньшей степени изменяет аффинитет радиолигандов к соответствующим рецепторам нежели зопиклон.

Циназепам (3-гемисукцинилокси-7-бром-5-(*o*-хлорфенил)-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он) в настоящее время изучается в качестве потенциального снотворного средства. В экспериментальных моделях на животных показана высокая гипнотическая и анксиолитическая активность при слабой седации и миорелаксации [1]. По данным электрофизиологических исследований циназепам увеличивает продолжительность как медленноволновой, так и парадоксальной фаз сна, при этом количество эпизодов сна остается неизменным, что делает снотворный эффект циназепам близким к физиологическому [2].

Неудовлетворенность качеством сна является одной из наиболее частых жалоб при различных заболеваниях [3]. Распространенной гипотезой возникновения инсомний является “ГАМК-ергическая”. Считают, что в основе механизма нарушения сна лежит дефицит ГАМК-ергической передачи. Это состояние обусловлено нарушением многих звеньев нейротрансмиссии: синтеза ГАМК, изменением функционального состояния соответствующих рецепторов, сопряженных с ними внутриклеточных трансдукторных механизмов, экспрессией генов и др. [4, 5]. Современная фармакотерапия располагает снотворными средствами, действующими в основном на постсинаптический ГАМК_A-бенздиазепинрецепторный комплекс [6]. Связываясь со специфическими сайтами на ГАМК_A рецепторах, бенздиазепины усиливают ГАМК-потенцирующее торможение, ингибируют активность 1-кетаглутарат-трансаминазы, увеличивают частоту открывания хлорного канала [7].

В большинстве исследований рассматриваются биохимические, электрофизиологические и поведенческие последствия однократного воздействия бенздиазепинов [8]. Однако снотворные средства, как правило, используются длительное время. Хроническое применение бенздиазепинов оказывает влияние на функционирование различных нейромедиаторных систем ЦНС. Эти изменения могут быть на клеточном, субклеточном уровнях, а также на уровне рецепторных взаимодействий и метаболических сдвигов в нейрональных системах. При этом в зависимости от строения и функциональной активности бенздиазепины в

разной степени модулируют активность центральных нейротрансмиттерных систем [9 – 12].

Учитывая важную роль дофаминовых (D_1 и D_2), серотониновых (5-НТ_{1А}), холинэргических (ССК₂) и периферических бенздиазепиновых рецепторов в опосредовании фармакологических эффектов бенздиазепинов, нам представлялось важным провести сравнительный анализ влияния однократного и длительного введения потенциального гипнотика циназепам и известного снотворного средства зопиклона на аффинность рецепторов некоторых нейромедиаторных систем головного мозга крыс.

Экспериментальная часть

В работе использовали циназепам, синтезированный в отделе медицинской химии [1], зопиклон (таблетки “Соннат-КМП”); радиолиганды [³H]ПК-11 195 (2,775 ГБк/моль) NEN, Du Pont, Великобритания; 8-Hydroxy-[³H] DPAT (8,03 ГБк/моль), [³H]ССК₈ (3,11 ГБк/моль) Amersham, Великобритания; [³H]спиперон (3,26 ГБк/моль), [³H]SCH 23 390 (2,6 ГБк/моль) — Радиевый институт им. В. Г. Хлопина, Санкт-Петербург, Россия; немеченые лиганды: спиперон, галоперидол, кетансерин, ПК 111 95 Sigma Aldrich Corporation, Германия; JB-93182, любезно предоставленный Dr. E. A. Harper (James Black Foundation), Лондон, Великобритания.

Для экспериментов *in vitro* зопиклон (субстанция) был выделен из таблеток и очищен перекристаллизацией из этилового спирта. Подлинность субстанции подтверждена данными масс-спектрометрии, величинами R_f и $T_{пл}$. В масс-спектре зопиклона отсутствует молекулярный ион, однако присутствует осколочный ион, соответствующий отщеплению 4-метилпиперазин-1-карбоксилатного фрагмента. $R_f = 0,53$ в системе пиридин – уксусная кислота – вода – бутанол (3:8:11:33). $T_{пл} = 182 – 184$ °С, что соответствует сертификату качества зопиклона фирмы “Tocris”.

Все эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180 – 220 г. Животных содержали на стандартном кормовом рационе при свободном доступе к воде и пище и световом режиме дня и ночи — 12/12 ч. Животные были разделены на семь групп по 4 особи в каждой. Циназепам и зопиклон

вводили внутривенно в виде эмульсии (изотонический раствор NaCl с добавлением Твин-80) в объеме 1 мл, в дозах, соответствующих проявлению максимального фармакологического эффекта — 1 и 7,5 мг/кг массы животного соответственно. Декапитацию и радиолигандные исследования проводили через промежуток времени, соответствующий периоду полувыведения препаратов из организма подопытных животных.

Группа I: интактные животные;

Группа II: контроль 1 — физиологический раствор с добавлением Твин-80 (однократное введение);

Группа III: циназепам, однократное введение;

Группа IV: зопиклон, однократное введение;

Группа V: контроль 2 — физиологический раствор с добавлением Твин-80 (долговременное введение — 14 дней).

Группа VI: циназепам, 1 раз в сутки на протяжении 14 дней;

Группа VII: зопиклон, 1 раз в сутки на протяжении 14 дней.

Влияние циназепама и зопиклона на аффинитет радиолигандов к нейромедиаторным рецепторам оцени-

вали путем сопоставления значений констант конкурентного ингибирования (K_i) комплексов селективных радиолигандов — $[^3\text{H}]\text{PK-11 195}$; $[^3\text{H}]\text{SCH 23390}$, $[^3\text{H}]\text{спиперона}$; $[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$ и $[^3\text{H}]\text{-ССК}_8$ — с рецепторами гомогенатов исследуемых отделов головного мозга крыс. Константу ингибирования определяли по формуле Ченга-Прусофа:

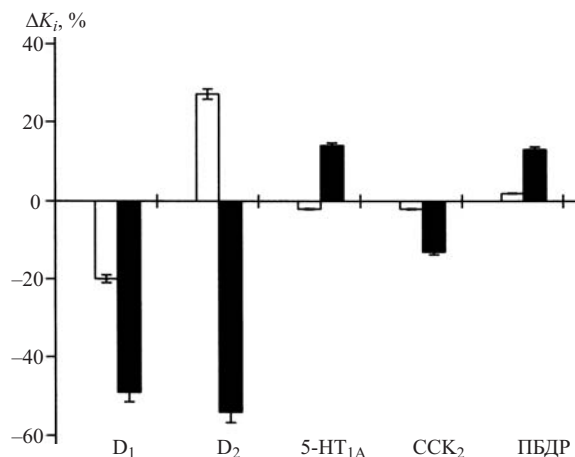
$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

где IC_{50} — концентрация тестируемого лиганда, при которой наблюдается вытеснение 50 % радиолиганда из мест его специфического связывания с рецепторами; $[L]$ — начальная концентрация радиолиганда; K_d — константа диссоциации комплекса радиолиганд — рецептор.

Для определения ингибирующей концентрации IC_{50} использовали 8 концентраций тестируемого соединения в диапазоне 0,1 нМ — 1 мкМ. Каждая экспериментальная точка была получена в шести параллелях. В качестве источника постсинаптических рецепторов

Условия проведения радиолигандного анализа

Эксперимент	Условия	Рецепторы					
		ССК ₂	ПБДР	5-HT _{1A}	D ₁	D ₂	
		Кора мозга	Кора мозга	Передний мозг	Стриатум	Стриатум	
Гомогенизация	Буфер ТРИС-HCl, mM	50	50	50	50	50	
	pH (T, °C)	6,9 (20)	7,4(20)	7,6(25)	7,6(25)	7,5(25)	
	Буфер/белок (объемов)	50	50	20	50	100	
	T, °C	0–4	0–4	20	20	20	
	τ, с	20	20	20	20	20	
	Центрифугирование	τ, мин	20	20	20	10	15
		g	40000	40000	15000	10000	40000
		T, °C	+4	+4	+4	+4	+4
		Количество повторений	3	3	3	3	3
		Радиолиганд	$[^3\text{H}]\text{-ССК}_8$	$[^3\text{H}]\text{-PK 11195}$	$[^3\text{H}]\text{-8OH-DPAT}$	$[^3\text{H}]\text{-SCH 23390}$	$[^3\text{H}]\text{-спиперон}$
Удельная активность, Бк/мМ	$3,11 \cdot 10^{12}$	$3171 \cdot 10^{12}$	$8,03 \cdot 10^{12}$	$2,6 \cdot 10^{12}$	$3,26 \cdot 10^{12}$		
Концентрация, нМ	2	1	0,5	0,6	0,5		
“Холодный” лиганд	JB-93182	Ro 5 – 4864 PK 11195	8OH-DPAT	SCH 23390	галоперидол		
Концентрация	1 мкМ	100 мкМ	10 нМ	100 мкМ	10 мкМ		
Маскирующий агент	–	–	–	–	кетансерин, 10 мкМ		
Инкубация	Концентрация белка, мг/мл	30	30	25	30	15	
	Состав буфера						
	ТРИС-HCl, mM	50	50	50	50	50	
	NaCl, mM	50	–	–	120	100	
	KCl, mM	–	–	–	5	–	
	MgCl ₂ , mM	–	–	–	2	–	
	CaCl ₂ , mM	–	–	5	–	–	
	Бацитрацин, мг/мл	0,2	–	–	–	–	
	Аскорбиновая кислота, %	–	–	5	–	–	
	Na ₂ S ₂ O ₅ , mM	–	–	–	0,2	–	
	EDTA, mM	–	–	–	–	5	
	T, °C	0–4	0–4	20	37	37	
	τ, мин	45	45	40	25	25	



Влияние длительного введения циназепاما (□) и зопиклона (■) на аффинитет рецепторов головного мозга крыс к соответствующим радиолигандам. По оси ординат — изменение величины константы ингибирования связывания рецепторов с соответствующим радиолигандом (% ΔK_i)

использовали гомогенаты различных областей головного мозга крыс (таблица). Определение характеристик специфического связывания радиолигандов с периферическими бензодиазепиновыми (ПБДР) рецепторами, а также с дофаминовыми (D₁ и D₂), серотониновыми (5-НТ_{1А}) и холинэргическими (ССК₂) рецепторами ЦНС гомогенатов различных отделов головного мозга крыс проводили в соответствии с методиками, описанными ранее [13 – 16]. Условия проведения радиолигандного анализа указаны в таблице. Расчет величин IC₅₀ проводили методом нелинейного регрессионного анализа с помощью ПК или графически в координатах log-logit. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t_α-критерия Стьюдента. Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение ($M \pm m$).

Все работы с использованием экспериментальных животных проводились в соответствии с требованиями экспериментального протокола European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), одобренного Animal Ethical Committee of the University of Calgary.

Результаты и их обсуждение

Согласно данным литературы, длительное введение бензодиазепинов приводит к активации не только ГАМК_A-бензодиазепинрецепторной системы, но и модуляции дофамин-, серотонин- холинэргической и других нейромедиаторных систем, занимающих важное значение в механизме возникновения инсомний [17 – 19].

Ранее мы изучали влияние однократного и длительного введения циназепاما и зопиклона на аффинитет к центральным бензодиазепиновым рецепторам и функциональную активность ГАМК_A-бензодиазепинрецепторного комплекса. Показано, что циназепам является

высокоаффинным лигандом центральных бензодиазепиновых рецепторов (ЦБДР) ($K_i = 72,6 \pm 1,7$ нМ); по своей функциональной активности является частичным агонистом ЦБДР с величиной ГАМК-индекса, равной $1,30 \pm 0,04$ [20]. Однократное введение исследованных препаратов не вызывает значимых изменений величин ГАМК-индекса ЦБДР головного мозга крыс. Длительное введение циназепاما приводит к меньшей дезинтеграции функционального сопряжения ГАМК_A рецепторного комплекса в сравнении с зопиклоном, на основании чего высказано предположение о меньшей тенденции в формировании толерантности к циназепаму в сравнении с зопиклоном [21].

Из полученных результатов видно, что после однократного введения циназепاما (III группа подопытных животных) и зопиклона (IV группа) не отмечается статистически значимых изменений величин (K_i) специфического связывания соответствующих радиолигандов с холинэргическими (ССК₂), серотониновыми (5-НТ_{1А}) рецепторами гомогенатов различных отделов мозга, а также с ПБДР экспериментальных животных.

В случае длительного введения циназепاما наблюдается незначительное снижение сродства серотониновых (5-НТ_{1А}) и холинэргических (ССК₂) рецепторов головного мозга крыс к соответствующим селективным лигандам ($[^3H]8\text{-OH-DRAT}$ и $[^3H]ССК_8$), и незначительное увеличение специфического связывания периферических бензодиазепиновых рецепторов с $[^3H]PK\ 11\ 195$. Однако изменения аффинитета этих рецепторов соизмеримы с величиной ошибки эксперимента и не являются достоверными при $P < 0,05$.

Наиболее выраженное влияние длительное введение циназепاما оказывает на аффинитет дофаминовых рецепторов, о чем свидетельствует снижение величины K_i в случае D₁ рецепторов на $20,0 \pm 0,8$ % и увеличение величины K_i для D₂ рецепторов на $26,9 \pm 1,1$ % относительно контроля. Полученные нами результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о влиянии хронического введения бензодиазепинов на функционирование дофаминергической системы головного мозга крыс [22].

Несколько иная картина изменения рецепторной активности имеет место после длительного введения зопиклона. Также как и при введении циназепاما, наиболее существенные изменения наблюдаются в аффинитете дофаминовых рецепторов к их селективным лигандам. Так, после хронического введения зопиклона величины K_i для D₁- и D₂-рецепторов уменьшаются соответственно на $49,2 \pm 2,0$ % и на $53,8 \pm 2,2$ % относительно контроля, то есть длительное введение циназепاما и зопиклона оказывает разнонаправленное влияние на нейрохимические процессы дофаминергической системы (рисунок). В отличие от циназепاما, длительное введение зопиклона в большей степени влияет на аффинитет серотониновых 5-НТ_{1А}, периферических бензодиазепиновых и холинэргических ССК₂ рецепторов головного мозга крыс, о чем свидетельствует достоверное увеличение величины K_i на

13,8 ± 0,6 %, 13,2 ± 0,5 % и ее уменьшение на 13,0 ± 0,5 % соответственно ($P < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент UA № 19803, МПК7: C07D 243/14, А 61 К 31/55 (1997).
2. С. А. Андронати, Т. Л. Карасева, Л. В. Попова и др., *Вісник психіатрії та психофармакотерапії*, **1**(5), 6 – 18 (2004).
3. А. М. Вейн, *Расстройства сна, основные патогенетические механизмы, методы коррекции*, ГЭОТАР Медицина, Москва (1995), сс. 6 – 12.
4. С. Bonnafous and L. Bueno, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **49**, 253 – 256 (1994).
5. И. В. Комиссаров, А. Т. Долженко, И. И. Абрамец, *Вестн. АМН СССР*, **9**, 26 – 30 (1984).
6. М. М. Mitter, *Sleep*, **23**(1), S39 – S46 (2000).
7. А. Plaznik, *Pol. J. Pharmacol.*, **47**, 489 – 499 (1995).
8. А. J. Dunn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **537**, 188 – 205 (1988).
9. R. A. Webster, *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto (2001), p. 521.
10. R. Brus, R. Szkilnik, P. Novak, et al., *Pharm. Rev. Com.*, **10920**, 93 – 100 (1998).
11. L. Lima, E. Trejo, and M. Urbina, *Neuropharm.*, **34**(10), 1327 – 1333 (1995).
12. A. Feigenspan, S. Gustincich, and E. Raviola, *J. Neurophysiol.*, **84**, 1697 (2000).
13. V. M. Korkhov, N. A. Tkachuk, S. Yu. Makan, et al., *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, **22**(1 – 4), 411 – 420 (2002).
14. S. Andronati, V. Sava, S. Makan, et al., *Pharmazie*, **54**(2), 99 – 101 (1999).
15. С. А. Андронати, С. Ю. Мاکан, Г. Е. Колодеев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(11), 11 – 14 (2001).
16. С. Ю. Мاکан, Н. А. Ткачук, В. М. Корхов и др. *Хим.-фарм. журн.*, **39**(6), 19 – 21 (2005).
17. L. Lanfumey, S. Haj-Dahmane, A. M. Laporte, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **323**(2 – 3), 137 – 148 (1997).
18. L. Giardino, L. Calza, P. V. Piazza and G. Amato, *J. Neural. Transm. Gen. Sect.*, **83**(3), 189 – 203 (1991).
19. J. Harro, M. Pold, and E. Vasar, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **341**, 62 – 67 (1990).
20. И. А. Бойко, С. Ю. Мاکан, С. П. Смутьский и С. А. Андронати, *Вісник ОДНУ*, **1**, 49 – 57 (2005).
21. И. А. Бойко, С. Ю. Мاکан, С. П. Смутьский та С. А. Андронати, *Фарм. ж.*, **5**, 93 – 97 (2005).
22. *Молекулярные основы действия психотропных средств*, Москва (1986) сс. 94 – 102.

Поступила 04.07.06

EFFECT OF CINAZEPAM ADMINISTRATION ON THE LIGAND AFFINITY OF NEUROMEDIATOR SYSTEM RECEPTORS IN RAT BRAIN

S. Yu. Makan, I. A. Boiko, S. P. Smul'skii, and S. A. Andronati

Bogatsky Institute of Physical Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 65080 Odessa, Ukraine;
e-mail: physchem@paco.net

The influence of single and long-term administration of cinazepam and zopiclon on the affinity of dopamine D₁ and D₂, serotonin 5-HT_{1A}, cholecystokinin CCK₂ and peripheral benzodiazepine receptors in rat brain has been studied. The long-term administration of cinazepam changes the affinity of radioligands to receptors to a much lower extent as compared to the administration of zopiclon.