

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ

УДК 577

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ РЕЦЕПТОРОВ МОЗГА В МЕХАНИЗМЕ  
ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО  
ОКСИМА 4-БЕНЗОИЛПИРИДИНА ГИЖ-298

© 2023 г. С. А. Литвинова<sup>1</sup>\*, Е. А. Кондрахин<sup>1</sup>, Т. А. Воронина<sup>1</sup>, Е. В. Васильева<sup>1</sup>, Г. И. Ковалев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 07.06.2022 г.

Принята к публикации 08.09.2022 г.

Целью исследования явилось изучение участия глутаматных, дофаминовых и серотониновых рецепторов в механизме противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298). Установлено, что в мозге крыс, после тонико-клонических судорог, вызванных однократным корнеальным воздействием максимального электрошока (МЭШ), наблюдается увеличение на 27% плотности (Bmax) NMDA-рецепторов в гиппокампе и снижение на 25% количества mGluII-рецепторов (mGluR<sub>2/3</sub>) во фронтальной коре, при этом количественные показатели 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов во фронтальной коре не изменялись. ГИЖ-298 (60 мг/кг/однократно) устраняет судорожные проявления, но не противодействует, вызванному МЭШ, количественному изменению глутаматных рецепторов и не влияет на них в условиях нормы, без МЭШ. В тестах на мышах субхроническое (5 дней) корнеальное воздействие МЭШ снижает на 17% плотность (Bmax) D<sub>2</sub>-рецепторов в стриатуме и не изменяет данный параметр во фронтальной коре. ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дней) устраняет клонико-тонические судороги у мышей и препятствует снижению количества D<sub>2</sub>-рецепторов на мембранах стриатума, а также на 13% увеличивает их количество у мышей без МЭШ в той же структуре. Полученные данные свидетельствуют о выраженных изменениях функциональной активности NMDA, mGluII и D<sub>2</sub> рецепторов в мозге животных, перенесших судороги. Противосудорожные эффекты ГИЖ-298 сопровождаются восстановлением количества D<sub>2</sub>-рецепторов в стриатуме.

*Ключевые слова:* эпилепсия, ГИЖ-298, производные оксимов 4-бензоилпиридина, максимальный электрошок, D<sub>2</sub>-рецепторы, радиолигандный метод, рецепторное связывание

DOI: 10.31857/S1027813323010120, EDN: EQQAJJ

ВВЕДЕНИЕ

Основным возбуждающим нейромедиатором в головном мозге является глутамат для всех основных функций головного мозга, включая поддержание уровня бодрствования, психологической и физической активности, регуляцию поведения, обучение, память, восприятие чувствительных и болевых импульсов. Однако, чрезмерно активируя ионотропные (iGlu – NMDA, AMPA) и/или I типа метаботропные (mGluR1) глутаматные рецепторы, глутамат способствует повреждению головного мозга, возникающему в острой форме после эпилептического припадка, что является одним и путей индукции эпилептогенеза. Применение антагонистов iGlu рецепторов в клинической практике эпилепсии ограничено возникновением побочных эффектов, вызванных ингибированием быстрой возбуждающей синаптической передачи. Единственным зарегистрированным препара-

том, избирательно воздействующим на iGlu рецепторы, и применяемый в терапии фокальной эпилепсии, является перампанел [1].

Избыточная активность глутаматергической системы может контролироваться ауторецепторами. К ауторецепторам, осуществляющим пресинаптический контроль высвобождения глутамата и постсинаптический контроль нейрональных ответов относятся метаботропные рецепторы mGluR II типа (mGluR<sub>2/3</sub>), активация которых уменьшает частоту и амплитуду возбуждающего постсинаптического тока, вызывая противосудорожное действие в ряде моделей лимбических и генерализованных моторных припадков [2]. Дофаминергическая система также принимает участие в регуляции активности глутаматергической синаптической передачи посредством модуляции митогенактивируемых киназ (ERK1/2) [3–6]. Стимуляция D<sub>1</sub>-подобных рецепторов вызывает фосфорилирование ERK1/2, что, в свою очередь, приводит к выбросу глутамата и увеличению нейрональной возбудимости, ко-

\* Адресат для корреспонденции: 125315, Москва, Балтийская ул., 8, тел. (495) 601-21-14, e-mail: sa\_litvinova@mail.ru.

торая подавляется при активации  $D_2/D_3$  зависимого пути [4, 7–9]. Влияние серотонергической системы на нейротрансмиттерную передачу зависит от вида и линии животных, а также используемой модели эпилепсии. С одной стороны, серотонин (5-HT) увеличивает глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC) в пирамидных нейронах префронтальной коры и этот эффект опосредован участием 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов [10, 11]. В то же время, активация 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов у крыс линии GAERS (модель абсансной эпилепсии) усиливает тормозные постсинаптические токи (IPSC) таламокортикальных нейронов, уменьшая выраженность абсансов [12, 13]. Таким образом, поиск возможных мишеней регуляции активности нейронального возбуждения в условиях патологической активации нейронов, вызванной условиями модели судорог, может способствовать лучшему пониманию патогенеза эпилепсии и служить предпосылкой к созданию противосудорожных препаратов.

Ранее в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова были синтезированы и изучены производные оксимов бензоилпиридина, которые обладают выраженными противосудорожными свойствами в различных моделях эпилепсий [14]. Среди данного химического ряда соединений наиболее ярким по своим противосудорожным эффектам оказалось соединение ГИЖ-298 (диалкиламино-этиловый эфир оксима 4-бензоилпиридина), обладающее противосудорожным действием в тесте модели максимального электрошока (МЭШ) и в моделях хронической фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии и эпилептического статуса, вызванного введением нейротоксина тиолактона гомоцистеина (D,L-homocysteine thiolactone) [15]. Изученный ранее нейробиохимический профиль ГИЖ-298 выявил способность соединения противодействовать чрезмерной функциональной активности дофаминергической системы в нигростриатных путях крыс в условиях электрошоковой модели судорог [16].

Целью настоящего исследования явилось изучение рецепторных механизмов противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина ГИЖ-298 в условиях судорог, вызванных максимальным электрошоком.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены на беспородных мышках-самцах массой тела 22–24 г. и крысах-самцах массой тела 220–250 г. (питомник “Столбовая”), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-ти часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Для исключения влияния суточных биоритмов на скорость биосинтеза и метаболизма нейромедиаторов, эксперименты проводили между 10 и 13 часами дня.

Животных содержали в условиях лабораторного вивария при 12-ти часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными” от 01 июля 2016 г.

### Тест максимальный электрошок (МЭШ)

Тест МЭШ осуществляли в соответствии с Руководством [17]. МЭШ проводили с помощью установки Rodent Shocker RS 221 (Harvard Apparatus, GmbH) для крыс однократно (параметры тока – 50 Hz, 250 V, 10–11 мА, продолжительность 0.2 с) и для мышей 5-кратно (параметры тока – 50 Hz, 250 V, 10–11 мА, продолжительность 0.3) при помощи специальных корнеальных электродов, смоченных в солевом растворе (физиологический раствор). В результате у животных развивались генерализованные тонико-клонические судороги. Для выраженности судорожных реакций использовали балльную систему оценки, где: 0 баллов – отсутствие судорог; 1 балл – клонические судороги передних и задних конечностей; 2 балла – тонус передних конечностей и клонические подергивания задних конечностей; 3 балла – тоническая экстензия передних и задних конечностей.

Обработку полученных данных в тесте МЭШ проводили следующим образом: нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и стандартных ошибок среднего ( $m \pm S.E.M.$ ). Данные обрабатывали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, а данные, представленные в альтернативной шкале, обрабатывали с помощью метода точной вероятности Фишера. Во всех случаях использовали двухсторонний критерий при критическом уровне значимости  $\alpha = 0.05$ .

Эксперименты проводились в две серии.

**В 1 серии** определяли характеристики связывания с 5-HT<sub>2A</sub>-, NMDA- и mGluII-рецепторами в структурах мозга крыс после однократного (1 дн) нанесения максимального электрошока (МЭШ) и введения ГИЖ-298 (диалкиламино-этиловый эфир оксима 4-бензоилпиридина). ГИЖ-298 вводили в дозе 60 мг/кг (внб) за 40 мин до проведения теста МЭШ. Через 5 мин крыс декапитировали и извлекали на льду префронтальную кору, гиппокамп и стриатум. Структуры замораживали в жидком азоте и взвешивали.

Крысы были разделены случайным образом на 4 экспериментальные группы: 1) Интактный контроль, получали физиологический раствор 1 дн,  $n = 8$ ; 2) ГИЖ-298 без МЭШ (60 мг/кг/1 дн/внб),  $n = 8$ ; 3) контроль МЭШ 1 дн, получали физиологический раствор 1 дн,  $n = 8$ ; 4) МЭШ 1 дн+ ГИЖ-298 (60 мг/кг/1 дн/внб),  $n = 11$ .

**Во 2 серии** опытов определяли характеристики связывания  $D_2$ -рецепторов в структурах мозга мышей после 5-кратного (5 дн) нанесения МЭШ и введения ГИЖ-298. ГИЖ-298 вводили в дозе 60 мг/кг (внб) в течение 5 дней за 40 мин до проведения теста МЭШ. Через 5 мин мышей декапитировали и извлекали на льду префронтальную кору и стриатум, которые замораживали в жидком азоте и взвешивали.

Мыши были разделены случайным образом на следующие экспериментальные группы: 1) интактный контроль, получали физиологический раствор 5 дн,  $n = 8$ ; 2) ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дн/внб),  $n = 8$ ; 3) контроль МЭШ 5 дн, получали физиологический раствор 5 дн,  $n = 14$ ; 4) МЭШ 5 дн + ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дн/внб),  $n = 8$ .

*Выделение плазматических мембран с 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторами коры мозга*

Изучение радиорецепторного связывания с 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторами серотонина проводили по методу Leysen et al. с модификациями [18]. Самцов крыс массой 220–250 г. декапитировали, извлекали фронтальную кору, которую гомогенизировали в 10 мл ледяного (0–4°C) 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7.4 при 4°C), используя гомогенизатор Potter S “тефлон–стекло”.

Полученную суспензию центрифугировали при 40000 g в течение 20 мин в ультрацентрифуге “L7-35” (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 10 мл инкубационного буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания с  $[G\text{-}^3H]$ -лигандами рецепторов. Инкубационный буфер для связывания с 5-HT<sub>2A</sub>-подтипом рецепторов префронтальной коры крыс содержал 50 мМ Tris-base, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (pH 7.4 при 37°C).

*Выделение плазматических мембран с NMDA-рецепторами гиппокампа*

Выделение плазматических мембран гиппокампа проводили по модифицированным методам [19, 20]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –80°C. В день эксперимента гиппокампы размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 10 объемах буфера № 1 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, 0.32 М сахароза, pH 7.6). Гомогенат разбавляли 50 объемами буфера № 2 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, pH 7.6) и центрифугировали при 1000 g 10 мин на ультрацентрифуге

“Optima L-70K” (Beckman Coulter). Супернатант сливали и вновь центрифугировали при 25000 g 20 мин. Для увеличения выхода белка эту операцию проводили дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и центрифугировали при 8000 g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 3 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, 1 мМ Na<sub>4</sub>EDTA, pH 7.6) и троекратно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и однократно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объемах буфера № 2 и замораживали в криопробирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 10 объемах буфера № 2, центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера № 2.

*Выделение плазматических мембран с mGluR-рецепторами коры мозга*

Выделение mGluR-рецепторов проводили по методу [21]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –80°C. В день эксперимента фронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 25 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1). Гомогенат центрифугировали при 48000 g 10 мин. Полученный осадок гомогенизировали в буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1) и инкубировали при 370°C 10 мин, затем центрифугировали при 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера и замораживали в криопробирках при –80°C. В день эксперимента мембраны размораживали и центрифугировали 3 раза в буфере (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). Концентрация белка в образцах мембран составляла 0.25 мг/мл.

*Выделение плазматических мембран с D<sub>2</sub>-рецепторами коры мозга и стриатума*

В экспериментах по радиолигандному анализу  $D_2$ -рецепторов использовали метод, описанный в литературных данных [22]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в холодильнике при температуре –80°C. В день эксперимента фронтальную кору больших полушарий мозга и стриатумы гомогенизировали в 10 объемах ледяного буфера (HEPES, 50 мМ; NaCl, 118 мМ; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 мМ; KCl, 4.8 мМ; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 мМ; pH = 7.4) в гомогенизаторе “стекло–тефлон”. Гомогенат центрифугировали в ультрацен-

**Таблица 1.** Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на выраженность судорожных проявлений у крыс в тесте антагонизма с МЭШ (однократно)

Группа животных	Баллы судорожных реакций	Количество крыс с тонической экстензией %/а.е.
	Крысы-самцы	
МЭШ, однократно	2.88 ± 0.11	87.5 (7/8)
МЭШ + ГИЖ-298, однократно	2.18 ± 0.15*	28 (3/11)#

Примечания: \* – достоверность значений от группы “МЭШ”, при  $P \leq 0.05$  (критерий Манна–Уитни; # – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) при  $P \leq 0.05$  (точный критерий Фишера).

трифуге “Optima L-70K” (Beckman Coulter) в течение 30 мин при 17500 g. Полученный осадок суспендировали в 20 объемах холодной дистиллированной воды и оставляли для гидролиза на час. Взвесь центрифугировали 30 мин при 17500 g. Полученный осадок ресуспендировали в буфере и повторно обрабатывали в том же режиме. Итоговый осадок суспендировали в буфере до конечной концентрации 4–6 мг исходной ткани на 1 мл буфера.

#### *Радиолигандный метод оценки рецепторного связывания*

В экспериментах по радиолигандному связыванию использовали [<sup>3</sup>H]Ketanserin (для 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов) с удельной активностью 60 Кюри/ммоль, [<sup>3</sup>H]МК-801(+) (для NMDA-рецепторов) с удельной активностью 210 Кюри/ммоль, [<sup>3</sup>H]LY354740 (для mGluII-рецепторов) с удельной активностью 42 Кюри/ммоль, [<sup>3</sup>H]Sulpiride(-) (для D<sub>2</sub>-рецепторов) с удельной активностью более 40 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл меченого лиганда, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого лиганда (1 мМ). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч (для 5-HT<sub>2A</sub>- и NMDA-рецепторов), при комнатной температуре в течение 1 ч (для mGluII- и D<sub>2</sub>-рецепторов). По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 ч при комнатной температуре. Каждую пробирку промывали два раза холодным буфером, затем фильтры промывали два раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г РРО, 0.2 г РОРОР на 1 л толуола).

#### *Обработка и представление результатов*

Результаты экспериментов *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин  $K_d$  и  $B_{max}$ , отражающих степень сродства рецептора к лиганду

(нМ) и количество мест связывания лиганда (фмоль/мг белка) соответственно. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания  $B_{max}$  и  $K_d$  измеряли специфическое связывание для NMDA рецепторов в диапазоне концентраций от 0.5 до 20 нМ, для mGluII рецепторов – от 12.5 до 200 нМ, для 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов – от 1.25 до 20 нМ, для D<sub>2</sub>-рецепторов – от 1.25 до 40 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 2-х повторностях.

Радиоактивность определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) с эффективностью счета 42–46%. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури (1951). Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программы GraphPad Prism 8 и Statistica 6.0. GraphPad Prism 8 содержит стандартные алгоритмы обсчета полученных данных по использованным вариациям байдинга. Оценку рассчитанных коэффициентов регрессии и корреляции проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента и доверительных интервалов. Результаты представлены в виде “mean ± S.E.M”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Исследование на крысах*

Однократное нанесение МЭШ у крыс вызывало развитие тонико-клонических судорог, которые заканчивались тонической экстензией передних и задних конечностей в 87.5% случаев. ГИЖ-298 достоверно снижал выраженность судорожных реакций, вызванных МЭШ, и уменьшал количество крыс с полной тонической экстензией конечностей (табл. 1).

В мозге крыс, перенесших однократно МЭШ, наблюдалось увеличение плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе до  $2753 \pm 193$  фмоль/мг по отношению к контролю без МЭШ ( $2161 \pm 105$  соответственно) и снижение метаботропных глутаматных рецепторов mGluII в коре до  $1149 \pm 49$  фмоль/мг относительно контроля ( $1529 \pm 69$  соответствен-

**Таблица 2.** Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на глутаматные и серотониновые рецепторы в структурах мозга крыс (кора, гиппокамп) в тесте МЭШ (однократно)

Рецепторы	Константы связывания	Контроль (физ. р-р)	ГИЖ-298	МЭШ	ГИЖ-298 + МЭШ
NMDA гиппокамп	$B_{\max}$ , фмоль/мг белка	2161 ± 105	2204 ± 90	2753 ± 193*	2481 ± 71*
	$K_d$ , нМ	8.0 ± 1.2	8.3 ± 0.9	9.6 ± 1.3	8.8 ± 1.3
mGluII кора	$B_{\max}$ , фмоль/мг белка	1529 ± 69	1398 ± 53	1149 ± 49*	1156 ± 49*
	$K_d$ , нМ	90.8 ± 18.2	98.1 ± 12	102.0 ± 19.4	99.4 ± 18.1
5-НТ <sub>2A</sub> кора	$B_{\max}$ , фмоль/мг белка	746 ± 35	785 ± 37	790 ± 33	776 ± 71
	$K_d$ , нМ	13.44 ± 1.4	15.2 ± 1.2	13.9 ± 2.3	14.5 ± 2.5

Примечание: \* – статистически значимые отличия от контроля при  $p < 0.05$  (критерий Стьюдента).

**Таблица 3.** Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на выраженность судорожных проявлений у мышей в тесте МЭШ (5 дней)

Группа животных	Баллы судорожных реакций	Количество крыс с тонической экстензией %/a.e.
Мыши-самцы		
МЭШ, 5-й день	2.7 ± 0.29	71 (10/14)
МЭШ + ГИЖ-298, 5-й день	0.4 ± 0.18**	0 (0/8) #

Примечания: данные в таблице представлены за 5-й день эксперимента. \*\* – достоверность значений от группы “МЭШ” при  $P \leq 0.01$  (критерий Манна–Уитни; # – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) при  $P \leq 0.05$  (точный критерий Фишера).

но). При изучении 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов во фронтальной коре крыс было показано, что их плотность не изменялась под воздействием МЭШ (табл. 2). ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг при однократном введении в условиях используемой судорожной модели не влиял на измененные показатели глутаматергических рецепторов – NMDA (в гиппокампе) и mGluII (во фронтальной коре), а также не влиял на их количество без воздействия МЭШ. Плотность 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов во фронтальной коре крыс также не изменялась под воздействием ГИЖ-298 как в условиях нормы, так и после МЭШ (табл. 2).

Исследования величин константы диссоциации ( $K_d$ ) показало, что ГИЖ-298 не изменял степень сродства исследуемых рецепторов к соответствующим лигандам (нМ) – [<sup>3</sup>H]МК-801(+) (NMDA), [<sup>3</sup>H]LY 354740 (mGluII), [<sup>3</sup>H]Ketanserin (5-НТ<sub>2A</sub>) относительно значений контрольной группы крыс (табл. 2).

#### Исследование на мышах

При субхроническом 5-дневном нанесении МЭШ через корнеальные электроды около 70% мышей демонстрировали тонико-клонические судорожные реакции. На фоне ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг/5 дней наблюдалось значительное снижение тяжести судорожных реакций и полная защита от развития тонической экстензии конечностей (табл. 3).

Изучение характеристик связывания с D<sub>2</sub>-рецепторами проводили в стриатуме и коре мы-

шей. Установлено, что МЭШ (5 дней) снижал до  $660 \pm 7.0$  фмоль/мг по отношению к контролю ( $797 \pm 21$  соответственно) характеристики связывания [<sup>3</sup>H](–)Сульпирида с D<sub>2</sub> рецепторами стриатума мышей, однако не влиял на данный показатель во фронтальной коре (табл. 4, рис. 1). После субхронического введения ГИЖ-298 (5 дней) в дозе 60 мг/кг на фоне МЭШ и без МЭШ при определении мест связывания для [<sup>3</sup>H](–)Сульпирида с D<sub>2</sub>-рецепторами было установлено, что в коре не наблюдалось статистически значимых отличий величины  $B_{\max}$  для D<sub>2</sub>-рецепторов от контрольной группы с МЭШ и без МЭШ. В стриатуме ГИЖ-298 статистически достоверно увеличивал до  $821 \pm 29$  фмоль/мг плотность D<sub>2</sub>-рецепторов по сравнению с группой животных, получавших МЭШ ( $660 \pm 7.0$  соответственно). Кроме того, в данной структуре ГИЖ-298 статистически достоверно увеличивал количество D<sub>2</sub>-рецепторов у интактных животных без МЭШ. ГИЖ-298 не изменял величину  $K_d$  по сравнению с контролем (табл. 4, рис. 1).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование направлено на выявление способности соединения с противосудорожным действием, ГИЖ-298, к рецепторной регуляции активности нейронального возбуждения. С этой целью среди мишеней были выбраны возбуждающие глутаматергические рецепторы NMDA подтипа и, модулирующие их активность – mGluII, 5-НТ<sub>2A</sub> и D<sub>2</sub> рецепторы.

**Таблица 4.** Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на D<sub>2</sub>-дофаминовые рецепторы в структурах мозга мышей (кора, стриатум) в тесте МЭШ (5 дней)

Рецепторы	Константы связывания	Контроль (физ. р-р)	ГИЖ-298	МЭШ	ГИЖ-298 + МЭШ
D <sub>2</sub> , кора	B <sub>max</sub> , фмоль/мг белка	554 ± 91	533 ± 89	529 ± 62	505 ± 77
	K <sub>d</sub> , нМ	17.8 ± 2.2	16.9 ± 3.1	16.6 ± 2.2	15.4 ± 2.7
D <sub>2</sub> , стриатум	B <sub>max</sub> , фмоль/мг белка	797 ± 21	<b>899 ± 30*</b>	<b>660 ± 7.0*</b>	<b>821 ± 29#</b>
	K <sub>d</sub> , нМ	16.8 ± 1.0	16.6 ± 1.2	16.7 ± 0.3	16.3 ± 1.3

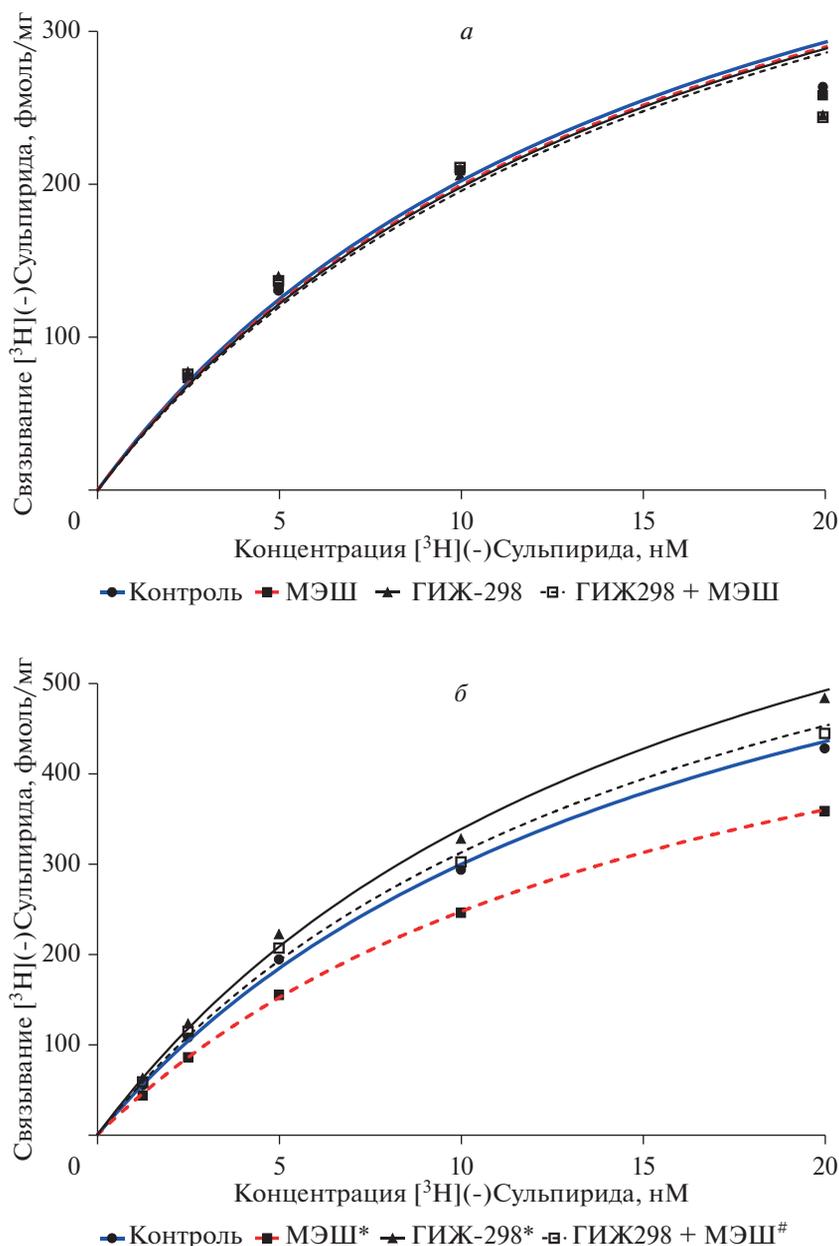
Примечание: данные в таблице представлены за 5-й день эксперимента. \* – статистически значимые отличия от контроля при  $p < 0.05$  (критерий Стьюдента); # < 0.05 статистически значимое отличие от группы МЭШ ( $t$ -критерий Стьюдента).

Анализ рецепторного профиля мозга крыс после судорог, вызванных однократным нанесением МЭШ, показал увеличение плотности NMDA-рецепторов (на 27%) в гиппокампе и уменьшение количества mGluII рецепторов (на 25%) во фронтальной коре животных. ГИЖ-298 не противодействовал количественному изменению NMDA и mGluRII глутаматных рецепторов и не изменял их константы диссоциации (Kd) с соответствующими лигандами. По данным литературы количественное увеличение NMDA рецепторов в мозге животных наблюдается при многих моделях эпилепсии, что сопровождается изменением субъединичного состава, в основном, за счет увеличения кальций-проницаемых NR2B-содержащих субъединиц [23, 24]. Одновременно с этим у модельных животных изменяются свойства метаботропных глутаматных подтипов рецепторов [25, 26], контролирующих активность NMDAR в норме. Их распределение в центральной нервной системе обеспечивает платформу как для пресинаптического контроля высвобождения глутамата, так и для постсинаптического контроля нейронных ответов на глутамат [2, 27, 28]. Подобные количественные и качественные перестройки ионотропных [29, 30] и метаботропных [2, 28] глутаматных рецепторов определяются у больных эпилепсией, и приводят к нарушению процесса обратного торможения в синаптической щели, делая ткани мозга более возбудимыми. ГИЖ-298 не препятствует возрастающей при судорогах активности глутаматергической нейротрансмиттерной передачи на NMDA подтип, ни посредством модуляции метаботропных mGluII глутаматергических рецепторов.

Серотониновые рецепторы также участвуют в регуляции судорожных порогов, а препараты с серотонергическим механизмом действия, например, флуоксетин и сертралин, снижают выраженность судорожных реакций. Однако сведения о влиянии серотонергической системы на судорожную активность мозга, несмотря на множество работ, остаются противоречивыми. С одной стороны, постулируется, что увеличение концентрации серотонина (5-НТ) в синаптической щели, вызванное ингибиторами обратного захвата серотонина

(СИОЗ) или в ЦНС, вызванное за счет введения большего количества триптофана в рацион, вызывает ослабление судорог, а дефицит нейромедиатора приводит к снижению судорожного порога [31]. С другой стороны, прижизненные и постмортум (*postmortem*) исследования в тканях мозга пациентов эпилепсией выявили усиление метаболизма серотонина в эпилептических зонах мозга [32–34]. Известно, что значительная часть возбуждающих пирамидных нейронов коры экспрессирует 5-НТ<sub>2A</sub>-рецептор, который, в свою очередь, оказывает возбуждающее действие на экспрессирующие его клетки, усиливая глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC). В тоже время активация 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов, расположенных на интернейронах ГАМК в голубом пятне (Locus Coeruleus, LC), снижает скорость возбуждения нейронов дорсального ядра шва (DRN) и их корковых проекций. Такое же облегчение ГАМКергического ингибирования, за счет увеличения частоты и амплитуды спонтанных тормозных постсинаптических токов (sIPSC), было продемонстрировано в миндалиновидном теле и гиппокампе [35]. В нашем исследовании количественные и качественные характеристики связывания 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов измеренные во фронтальной коре крыс не изменялись ни после однократного нанесения МЭШ, ни после введения ГИЖ-298. Возможно, для видимого изменения субъединичного состава серотонергических рецепторов на мембране 5 мин после однократного нанесения МЭШ недостаточно, в отличие от NMDAR, которые встраиваются в мембрану из депо глутаматных рецепторов при участии транспортных белков (миозины 5 и 6) быстро (в течение 30–60 с). Интернализация 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов осуществляется в течение 10 мин, а для их рециркуляции на клеточную поверхность требуется около 2.5 ч [36]. А возможно функциональная активность 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов в коре не играет существенной роли в модуляции судорожных реакций, вызванных МЭШ, у животных.

Дофаминергическая система также принимает участие в регуляции глутаматергической синаптической нейротрансмиттерной передачи. NMDA-опосредуемая



**Рис. 1.** Характеристики связывания [<sup>3</sup>H](-)Сульпирида с D<sub>2</sub>-рецепторами коры (а) и стриатума (б) мышей под влиянием введения ГИЖ-298 на фоне МЭШ (5 дней) модели. Примечание. \**p* < 0.05 статистически значимое отличие от контрольной группы, # < 0.05 статистически значимое отличие от группы МЭШ (*t*-критерий Стьюдента).

нейротрансмиссия регулируется D<sub>2</sub> и D<sub>1</sub> рецепторами. В тканях мозга передача сигналов от D<sub>1</sub>-подобных рецепторов будет стимулировать активность NMDAR и является “проэпилептогенной”, тогда как передача сигналов от D<sub>2</sub>-подобных рецепторов оказывает “антиэпилептогенное” действие [5, 9, 37]. В экспериментах на мышах с субхроническим (5 дней) нанесением МЭШ было выявлено значительное уменьшение количества D<sub>2</sub>-рецепторов в стриатуме без изменения их плотности во фронтальной коре, что, возможно, свидетельствует

о высокой вовлеченности стриатума в процессы эпилептогенеза. Известно, что в стриатуме выявляется одна из самых высоких концентраций D<sub>2</sub>-рецепторов, тесно локализованных с D<sub>1</sub>-рецепторами на ингибиторных ГАМК-ергических нейронах, составляющих 95% клеток человека стриатума [38]. Дисбаланс D<sub>2</sub>/D<sub>1</sub> рецепторов в лимбических структурах приводит к ослаблению торможения возбуждающих сигналов и, как следствие, к повышенной нейрональной возбудимости, что отмечается как у больных эпилепсией, так и у модельных живот-

ных [39–45]. В нашем исследовании ГИЖ-298 защищает от развития судорожных реакций у мышей, вызванных субхроническим нанесением МЭШ, полностью устраняя клонические проявления и тоническую экстензию конечностей, и препятствует снижению количества  $D_2$ -рецепторов в стриатуме. Более того, ГИЖ-298 достоверно увеличивает плотность  $D_2$ -рецепторов в данной структуре у интактных животных без МЭШ. Полученные результаты демонстрируют вовлеченность  $D_2$ -рецепторов стриатума в механизм противосудорожного действия ГИЖ-298 и согласуются с работами, подтверждающими применение позитивных модуляторов  $D_2$ -рецепторов для снижения выраженности судорожных реакций [7–9]. Среди известных противоэпилептических препаратов подобным механизмом действия обладает фенитоин [46].

Таким образом, в ходе экспериментальной работы установлено, что одним из компонентов механизма противосудорожного действия ГИЖ-298 является регуляция  $D_2$ -рецепторов стриатума, что согласуется с полученными нами ранее данными о вовлечении чрезмерной функциональной активности дофаминергической системы данной структуры в судорожных реакциях и защитному противодействующему эффекту ГИЖ-298 [16].

## ВЫВОДЫ

1 ГИЖ-298 защищает от развития судорожных реакций у мышей и крыс, вызванных МЭШ, устраняя тоническую экстензию конечностей.

2 Судороги, вызванные однократным воздействием МЭШ через корнеальные электроды, изменяют баланс глутаматных рецепторов в мозге: увеличивается плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе и снижается количество mGluII рецепторов во фронтальной коре.

3. ГИЖ-298 не влияет на измененные количественные и качественные характеристики исследуемых глутаматергических рецепторов в мозге крыс, подвергнутых однократному воздействию МЭШ.

4. Судороги, вызванные субхроническим воздействием МЭШ (5 дн), вызывают снижение количества  $D_2$ -рецепторов в стриатуме мышей.

5. ГИЖ-298 препятствует МЭШ – индуцированному снижению плотности  $D_2$ -рецепторов в стриатуме и способствует их увеличению в данной структуре у интактных животных без МЭШ.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Госпрограммой № FGFG-2022-0004.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (Протокол № 1 комиссии по биомедицинской этике от 21 января 2021 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Celli R., Fornai F.* // *Curr. Neuropharmacol.* 2021. V. 19. № 6. P. 747–765.
2. *Alexander G.M., Godwin D.W.* // *Epilepsy Research.* 2006. V. 71. P. 1–22.
3. *Nateri A.S., Raivich G., Gebhardt C., Da Costa C., Naumann H., Vreugdenhil M., Makwana M., Brandner S., Adams R.H., Jefferys J.G., Kann O., Behrens A.* // *The EMBO Journal.* 2007. V. 26. P. 4891–4901.
4. *Doyle S., Pyndiah S., De Gois S., Erickson J.D.* // *The Journal of Biological Chemistry.* 2010. V. 285. P. 14366–14376.
5. *Gangarossa G., Di Benedetto M., O’Sullivan G.J., Dunleavy M., Alcacer C., Bonito-Oliva A., Henshall D.C., Waddington J.L., Valjent E., Fisone G.* // *PLoS One.* 2011. V. 6. e19415.
6. *Gangarossa G., Castell L., Castro L., Tarot P., Veyrunes F., Vincent P., Bertaso F., Valjent E.* // *Journal of Neurochemistry.* 2019. V. 151. P. 204–226.
7. *Glazova M.V., Nikitina L.S., Hudik K.A., Kirillova O.D., Dorofeeva N.A., Korotkov A.A., Chernigovskaya E.V.* // *Journal of Neurochemistry.* 2015. V. 132. P. 218–229.
8. *Jiang W., Van Cleemput J., Sheerin A.H., Ji S.P., Zhang Y., Saucier D.M., Corcoran M.E., Zhang X.* // *Journal of Neuroscience Research.* 2005. V. 81. P. 581–588.
9. *Bozzi Y., Borrelli E.* // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2013. V. 7. P. 157.
10. *Aghajanian G.K., Marek G.J.* // *Brain Res.* 1999. V.825 (1–2). P. 161–71.
11. *Celada P., Puig M.V., Artigas F.* // *Frontiers in Integrative Neuroscience.* 2013. V. 7. Article 25.
12. *Crunelli V. et al.* // *Xjenza Online.* 2017. V. 5. P. 3–14.
13. *Crunelli V., Di Giovanni G.* // *CNS Neurosci. Ther.* 2021. V. 12. P. 967–970.
14. *Жмуренко Л.А., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Гайдуков И.О., Мокров Г.В., Гудашева Т.А.* // *Химико-фармацевтический журнал.* 2018. Т. 52. № 1. С. 19–28.
15. *Gaydukov I.O., Voronina T.A., Litvinova S.A., Kutepova I.S.* // *Medicinal Chemistry Research.* 2020. V. 29. P. 783–792.
16. *Литвинова С.А., Наркевич В.Б., Гайдуков И.О., Кудрин В.С., Воронина Т.А.* // *Нейрохимия.* 2019. Т. 36. № 3. С. 239–245.
17. *Воронина Т.А., Неробкова Л.Н.* // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть.1.* ФГБУ “НЦЭМСП”. М.: Гриф и К, 2012. Глава 14. С. 235–250.
18. *Leysen J.E., Niemegeers C.J.* // *Mol. Pharmacol.* 1982. V. 21. № 2. P. 301–14.
19. *Zhou L.M., Gu Z.Q., Costa A.M., Yamada K.A., Mansson P.E.* // *J. Farm. Exp. Ter.* 1997. V. 280(1). P. 422–427.

20. LaPage K.T., Ishmael J.E., Low C.W., Traynelis S.F., Murray T.F. // *Neuropharm.* 2005. V. 49. P. 1–16.
21. Schaffhauser H., Richards J.G., Cartmell J., et al. // *Mol. Pharmacol.* 1998. V. 53. P. 228–233.
22. Sun W., Ginovart N., Ko F., Seeman P., Kapur S. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 63. № 2. P. 456–462.
23. Naylor D.E., Liu H., Niquet J., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2013. V. 54. P. 225–238.
24. Jaideep Kapur. // *Epilepsia Open.* 2018. V. 3. P. 165–168.
25. Garrido-Sanabria E.R., Otalora L.F., Arshadmansab M.F., Herrera B., Francisco S., Ermolinsky B.S. // *Brain Res.* 2008. V. 13. P. 165–176.
26. Watanabe Y., Kaida Y., Fukuhara S., Takechi K., Uehara T., Kamei C. // *Epilepsia.* 2011. V. 52. P. 140–150.
27. Doherty J.J., Alagarsamy S., Bough K.J., Conn P.J., Dingle-dine R., Mott D.D. // *J. Physiol.* 2004. V. 2. P. 395–401.
28. Bocchio M., Lukacs I.P., Stacey R., Plaha P., Apostolopoulos V., Livermore L., Sen A., Anson O., Gillies M.J., Somogyi P., Capogna M. // *Front. Cell Neurosci.* 2018. V. 12. P. 508.
29. Mathern G.W., Pretorius J.K., Kornblum H.I., et al. // *Brain.* 1997. V. 120. P. 1937–1959.
30. Mathern G.W., Pretorius J.K., Mendoza D., et al. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998. V. 57. P. 615–634.
31. Bagdy G., Kecskemeti V., Riba P., Jakus R. // *J. Neurochem.* 2007. V. 100. № 5. P. 857–873.
32. Asano E., Chugani D.C., Muzik O., Shen C., Juhasz C., Janisse J., Ager J., Canady A., Shah J.R., Shah A.K., Watxon C., Chugani H.T. // *Neurology.* 2000. V. 54. P. 1976–1984.
33. Fedi M., Reutens D., Okazawa H., Andermann F., Boling W., Dubeau F., White C., Nakai A., Gross D.W., Andermann E., Diksic M. // *Neurology.* 2001. V. 57. P. 1629–1636.
34. Chugani D.C. // *Biomark. Med.* 2011. V. 5. № 5. P. 567–575.
35. Jiang X., Xing G., Yang C., Verma A., Zhang L. & Li H. // *Neuropsychopharmacology.* 2009. V. 34. P. 410–423.
36. Raote I., Bhattacharya A., Panicker M.M. // In *Chattopadhyay A.*, editor. *Serotonin Receptors in Neurobiology.* CRC Press/Taylor & Francis. 2007. Chapter 6.
37. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. // *Pharmacological Reviews.* 2011. V. 63. P. 182–217.
38. Lalchandani R.R., van der Goes M.S., Partridge J.G., Vicini S. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. P. 14075–14086.
39. Landvogt C., Buchholz H.G., Bernedo V., Schreckenberger M., Werhahn K.J. // *Epilepsia.* 2010. V. 51. P. 1699–1706.
40. Yakushev I.Y., Dupont E., Buchholz H.-G., Tillmanns J., Debus F., Cumming P., Heimann A., Fellgiebel A., Luhmann H.J., Landvogt C., Werhahn K.J., Schreckenberger M., Potschka H., Bartenstein P. // *Epilepsia.* 2010. V. 51. P. 415–422.
41. Rocha L., Alonso-Vanegas M., Villeda-Hernández J., Mújica M., Cisneros-Franco J.M., López-Gómez M., Zavala-Tecuapetla C., Frías-Soria C.L., Segovia-Vila J., Borsodi A. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 45. P. 499–507.
42. Bernedo Paredes V.E., Buchholz H.G., Gartenschläger M., Breimhorst M., Schreckenberger M., Werhahn K.J. // *PLoS One.* 2015. V. 10. e0141098.
43. Dorofeeva N.A., Grigorieva Y.S., Nikitina L.S., Lavrova E.A., Nasluzova E.V., Glazova M.V., Chernigovskaya E.V. // *Neurological Research.* 2017. V. 39. P. 918–925.
44. Strome E.M., Zis A.P., Doudet D.J. // *J. Psychiatry Neurosci.* 2007. V. 32. P. 193–202.
45. Landau A.M., Chakravarty M.M., Clark C.M., Zis A.P., Doudet D.J. // *Neuropsychopharmacology.* 2011. V. 36. P. 511–518.
46. Khan T.A., Momin W.M., Phadke A.G. // *Journal of Contemporary Medicine and Dentistry.* 2014. V. 2. P. 29–32.

## Participation of Brain Receptors in the Mechanism of Anticonvulsant Action of a New 4-Benzoylpyridine Oxime Derivative GIZH-298

S. A. Litvinova<sup>a</sup>, E. V. Kondrakhin<sup>a</sup>, T. A. Voronina<sup>a</sup>, E. V. Vasilyeva<sup>a</sup>, and G. I. Kovalev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow Russia

The aim of the work was to study the involvement of glutamate, dopamine and serotonin receptors in the mechanism of the anticonvulsant action of the 4-benzoylpyridine oxime derivative (GIZh-298). After a single exposure to the cornea with maximum electric shock (MES) and subsequent tonic-clonic seizures, an increase in the density (B<sub>max</sub>) of NMDA receptors in the hippocampus by 27% and a decrease in the number of mGluII receptors (mGluR2/3) by 25% in the prefrontal cortex of the brain of rats are noted. At the same time, the number of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the prefrontal cortex did not change. GIZh-298 (60 mg/kg) with a single application inhibits convulsive reactions, but does not affect the quantitative changes induced by MES in glutamate receptors and does not affect them under normal conditions, without MES. In tests on mice, subchronic (5 days) corneal exposure to MES reduced the density (B<sub>max</sub>) of D<sub>2</sub> receptors in the striatum by 17% and did not change this parameter in the prefrontal cortex. GIZh-298 (60 mg/kg/5 days) eliminates clonic-tonic convulsions in mice and prevents a decrease in the number of D<sub>2</sub> receptors from striatal membranes, and also increases their number by 13% in mice without MES in the same structure. The data obtained indicate significant changes in the functional activity of NMDA, mGluII and D<sub>2</sub> receptors in the brains of animals that suffered seizures. The anticonvulsant effects of GIZH-298 are accompanied by the restoration of the number of D<sub>2</sub> receptors in the striatum.

**Keywords:** epilepsy, GIZh-298, 4-benzoylpyridine oxime derivatives, maximum electroshock, D<sub>2</sub> receptors, radioligand method, receptor binding