

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ПАНТОГАМА И АТОМОКСЕТИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ВНИМАНИЯ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДОФАМИНОВЫХ $D_2$ И ГАМК<sub>B</sub>-РЕЦЕПТОРОВ У МЫШЕЙ С МОДЕЛЮ ДЕФИЦИТА ВНИМАНИЯ

Г.И. Ковалёв\*, Н.А. Сухорукова, Е.В. Васильева, Е.А. Кондрахин, Р.М. Салимов

Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова,  
125315, Москва, ул. Балтийская, 8; \*эл. почта: kovalev@academpharm.ru

При моделировании дефицита внимания в тесте “закрытый обогащённый крестообразный лабиринт” (ЗОКЛ) была произведена оценка поведенческих и нейрорецепторных эффектов ноотропного средства пантогам (100 мг/кг/день, внутривнутрино, в/бр) и атомоксетина гидрохлорида (3 мг/кг/день, в/бр) при их субхроническом введении аутистическим мышам CD-1. В данном тесте были выявлены две субпопуляции грызунов, спонтанно различающихся по вниманию к обогащённым отсекам (ED-Low и ED-High), которое оценивали по продолжительности пребывания мышей в пустых или обогащённых объектами отсеках. Показатели, связанные с тревожностью, исследовательской и двигательной активностью, в выявленных фенотипах не различались статистически достоверно. Субхроническое введение препаратов в выбранных дозах приводило к сходному избирательному действию на поведение животных — увеличению значений индекса распознавания новых объектов (ED-ratio) в опытных группах ED-Low ( $p < 0,005$ ). В префронтальной коре животных контрольных групп с использованием метода радиолигандного связывания были установлены различия между субпопуляциями мышей ED-Low и ED-High в распределении дофаминовых  $D_2$  и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов ( $B_{max}$ ). При анализе нейрорецепторных эффектов у субпопуляции ED-Low установлено, что атомоксетин вызывал уменьшение значений  $B_{max}$   $D_2$ -рецепторов на 14%, а пантогам вызывал уменьшение значений  $B_{max}$   $D_2$ -рецепторов на 22% ( $p < 0,05$ ) и увеличение на 44% для ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов ( $p < 0,05$ ). Таким образом, пантогам оказывал избирательное корректирующее действие на показатели поведения и плотность изучаемых подтипов рецепторов у животных с выраженным дефицитом внимания.

**Ключевые слова:** пантогам; моделирование дефицита внимания; закрытый обогащённый крестообразный лабиринт; ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы;  $D_2$ -рецепторы; префронтальная кора

**DOI:** 10.18097/PBMC20216705402

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время всё большую клиническую значимость среди когнитивных расстройств приобретает синдром дефицита внимания/гиперактивности (СДВ/Г), характеризующийся социальной дезадаптацией, нарушениями поведения и планирования разнообразных видов деятельности, повышенной отвлекаемостью при выполнении задач [1]. В распространённости СДВ/Г отмечается преобладание частоты встречаемости данной патологии в детском и школьном возрасте среди мальчиков [2]. В подростковом возрасте дефицит внимания может дополняться такими коморбидными расстройствами, как тревожность, депрессии, нарушения развития речи и биполярные расстройства. При отсутствии дифференциального диагноза и поддерживающей терапии проявления СДВ/Г у взрослых пациентов зачастую сохраняются с последующим развитием в психические заболевания, агрессивное поведение и наркомании [3, 4]. Лечение различных форм СДВ/Г требует длительного назначения групп препаратов, обладающих, как правило, выраженными побочными эффектами при продолжительном приёме — психостимуляторов, антидепрессантов, транквилизаторов [5]. В связи с этим существует необходимость поиска лекарственных средств с меньшей выраженностью нежелательного воздействия и изучение реализации

их фармакологических эффектов на уровне молекулярных мишеней.

На сегодняшний день животные модели остаются обязательным компонентом биомедицинских исследований, предвзято клиническое применение лекарственных препаратов. Используемые в современной психофармакологии трансляционные модели СДВ/Г объединяют различное соответствие таким основным критериям, как проявление основных симптомов заболевания (face validity), коррекция при применении эталонных препаратов (predictive validity) и наличие сходной этиологии заболевания, его патогенеза (construct validity) [6]. Однако в большинстве случаев эти модели являются инвазивными, длительными и трудоёмкими в практическом исполнении. Предложенная модель синдрома дефицита внимания (СДВ) на основе теста “закрытый обогащённый крестообразный лабиринт” (ЗОКЛ) и гетерогенной популяции аутистических мышей CD-1, разработанная в лаборатории радиоизотопных методов исследований НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, сочетает в себе простоту выполнения и соответствие вышеуказанным критериям [7]. Кроме того, обнаруженные ранее различия в нейрорецепторном профиле в префронтальной коре мозга у животных с различной устойчивостью внимания могут рассматриваться как молекулярные предикторы патологического дефицита внимания [8].

Цель исследования — оценка поведенческих эффектов ноотропного препарата пантогама (100 мг/кг, внутривбрюшинно, в/бр) и ингибитора обратного захвата норадреналина атомоксетина гидрохлорида (3 мг/кг, в/бр) в экспериментальной модели СДВ и особенности распределения дофаминовых D<sub>2</sub> и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов в префронтальной коре мышей CD-1 при субхроническом введении препаратов в течение 6 дней.

## МЕТОДИКА

### Тест-система

Эксперимент проводили на самцах аутбредных мышей CD-1, полученных из НПП “Питомник лабораторных животных” Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, массой 23-30 г (n=98), которых содержали в виварии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму. Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Экспериментальная установка была поставлена НПК Открытая Наука (Россия).

### Фармакологические препараты и радиолиганды

В экспериментах был использован атомоксетина гидрохлорид ((3R)-N-метил-3-(2-метилфенокси)-3-фенилпропан-1-амин, (R)-N-метил-3-фенил-3-(o-толоксии)пропан-1-амин, торговое название — “Страттера”) и иные необходимые реактивы, произведенные “Sigma-Aldrich” (США). Пантогам (кальцевая соль D-(+)- $\alpha,\gamma$ -диокси- $\beta,\beta$ -димелбутирил-аминоасляной кислоты) был предоставлен ГК “ПИК-ФАРМА” (Россия). Для изучения рецепторного связывания использовали следующие лиганды: [<sup>3</sup>H](-)баклофен (49,7 Кюри/ммоль, “Perkin Elmer”, США) и [<sup>3</sup>H](-)сульпирид (60 Кюри/ммоль), синтезированный профессором, д.х.н. Ю.А. Золотарёвым в Отделе химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН.

### Тест “Закрытый обогащённый крестообразный лабиринт”

Грызунов подвергали поведенческому тестированию в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте (ЗОКЛ), согласно описанной процедуре [7, 8]. Лабиринт был выполнен из плексигласа, имел прозрачную верхнюю крышку и состоял из 4 периферийных рукавов, соединённых с центральной камерой отверстием размером 7×7 см. Все отделения лабиринта имели равный размер 12×12×12 см. В качестве объектов для привлечения и удержания внимания животных использовались стеклянные конические колбы, располагавшиеся в двух противоположных отсеках установки (рис. 1). Мышей помещали в центральный отсек и позволяли обследовать обстановку. Критерием захода в отсек было нахождение всех 4-х лап животного в данном отделении лабиринта.

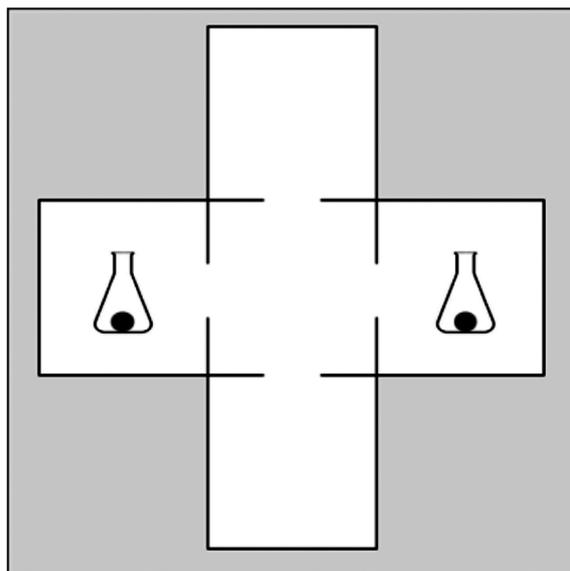


Рисунок 1. Схематическое изображение установки, используемой в тесте “закрытый обогащённый крестообразный лабиринт”.

Тест заканчивался, когда животное совершало 12 визитов в отсеки. Пол лабиринта очищали после каждого животного. Последующий анализ данных позволил выделить следующие показатели поведения:

1. Длина первого цикла патрулирования F\_PtrN и число циклов патрулирования PatrN, совершённых за время эксперимента; исчисляются числом заходов животного в отсеки лабиринта, совершённых им для обследования обстановки. Данные показатели отражают эффективность исследования лабиринта животным и могут быть использованы для оценки ноотропного действия веществ.
2. Общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта T\_ChTm и общее время, проведённое в боковых отсеках T\_GITm. Данные показатели отражают уровень двигательной активности животного, а также характеризуют интенсивность обследования им новой среды и могут быть использованы для оценки стимулирующего/тимолептического или, наоборот, седативного эффекта вещества.
3. Латентный период F\_ChTm и продолжительность первого визита в боковой отсек F\_GITm. Данные показатели отражают уровень тревожности животного в новой обстановке и могут быть использованы для оценки транквилизирующего (анксиолитического) эффекта.
4. Индекс распознавания новых объектов ED-ratio (Obj\_tR). Данный показатель отражает соотношение времени, проведённого животным в обогащённых и пустых отсеках лабиринта. Для вычисления индекса используется формула:

$$ED\text{-ratio} = 100 \times T_{\text{enriched}} / T_{\text{empty}}$$

где  $T_{\text{enriched}}$  является временем, проведённым животным в рукавах установки с объектами, а  $T_{\text{empty}}$  — временем в пустых рукавах соответственно.

Во время 1-го теста производили отбор особей с соответствующими поведенческими фенотипами, различавшимися по уровню внимания к объектам в отсеках установки. Животным посредством в/бр инъекций в течение недели один раз в сутки вводили физиологический раствор (контрольные группы — NaCl, 0,9%), либо изучаемые препараты атомоксетин и пантогам, растворённые в физрастворе (опытные группы), в дозах 3 мг/кг/сутки и 100 мг/кг/сутки соответственно. Выбор доз и продолжительности введения основывались на данных, полученных ранее в лаборатории радиоизотопных методов исследований НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Во время 2-го теста, выполнявшегося в той же обстановке через 1 ч после заключительной инъекции, оценивали влияние изучаемого вещества на внимание к обстановке у мышей с известным типом исследовательской реакции на объекты, имеющиеся в лабиринте. Далее грызунов декапитировали, мозг извлекали на лёду и выделяли его структуры по схеме [9]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при  $-75^{\circ}\text{C}$ .

#### *Радиолигандный анализ $D_2$ -рецепторов*

Выделение плазматических мембран префронтальной коры, содержащих  $D_2$ -рецепторы, проводили по методу [10]. В день эксперимента замороженные образцы гомогенизировали в 10 объёмах ледяного буфера, содержащего 50 мМ NEPES, 118 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 4,8 мМ KCl, 1,2 мМ MgSO<sub>4</sub> (pH=7,4) в гомогенизаторе Potter S ("Sartorius AG", Финляндия). Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге Optima L-70K ("Beckman Coulter", США) в течение 30 мин при 17500 g и температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Последующие этапы центрифугирования проводили также при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Полученный осадок суспендировали в 20 объёмах холодной дистиллированной воды и оставляли для гидролиза на 1 ч при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Взвесь центрифугировали в течение 30 мин при 17500 g. Полученный осадок ресуспендировали в буфере и повторно открывали в том же режиме. Итоговый осадок суспендировали в буфере до конечной концентрации 4-6 мг исходной ткани на 1 мл буфера и хранили при  $-75^{\circ}\text{C}$ .

Для радиолигандного анализа  $D_2$ -рецепторов использовали метод [11]. Процесс инкубации протекал в инкубационной смеси при температуре  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч при постоянном встряхивании. Инкубационная смесь состояла из 250 мкл инкубационного буфера, 50 мкл специфического радиоактивного лиганда  $D_2$ -подтипа дофаминового рецептора [<sup>3</sup>H](-)-сульпирида с удельной активностью 60 Кюри/ммоль, 50 мкл немеченого сульпирида (104 мкМ) и 200 мкл суспензии мембран префронтальной коры. Порядок внесения компонентов был следующим: буфер, радиоактивный лиганд, нерадиоактивный лиганд, нерадиоактивный лиганд. Суспензию мембран вносили непосредственно перед началом инкубации, концентрация белка в пробе составляла 0,15-0,2 мг/мл.

Процесс связывания в инкубационной смеси останавливали путём добавления инкубационного буфера при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  с последующим быстрым фильтрованием через стекловолкнистые фильтры GF/B ("Whatman", Германия). Общий объём инкубационного буфера для фильтрования одной пробы составлял 10 мл. Фильтры предварительно смачивали перед экспериментом в ледяном отмывочном буфере в течение 3 ч. После фильтрации пробы высушивали в течение 12 ч при комнатной температуре.

#### *Радиолигандный анализ ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов*

Для приготовления мембранных препаратов, содержащих ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы коры мозга мышей и последующего радиолигандного связывания, использовали модифицированные методы [12, 13]. В день эксперимента замороженные образцы коры, ранее хранившиеся при  $-75^{\circ}\text{C}$ , размельчали в гомогенизаторе Potter S в 10 объёмах ледяного буфера (0,32 М сахараза; pH 7,4). Образовавшийся гомогенат центрифугировали при 1000 g и температуре  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Все последующие этапы центрифугирования также проводились при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Затем полученный осадок ресуспендировали в дистиллированной воде и вновь центрифугировали 20 мин при 8000 g. Образовавшийся супернатант и верхний надосадочный слой центрифугировали 20 мин при 48000 g, а осадок суспендировали и вновь центрифугировали в 50 мМ трис-цитратном буфере (pH 7,4) 2 раза по 20 мин при 48000 g, после чего замораживали и хранили при  $-75^{\circ}\text{C}$ . В день эксперимента мембраны размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 20 объёмах буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub> (pH 7,4), затем центрифугировали при 8000 g 20 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Полученный осадок суспендировали в 20 объёмах того же буфера (50 мМ Tris-HCl, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) и центрифугировали при 20000 g 20 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ , последнюю процедуру повторяли ещё один раз. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере. В экспериментах по радиолигандному анализу ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов использовали меченый тритием (-)баклофен с удельной активностью 49,7 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь содержала 50 мкл [<sup>3</sup>H](-)баклофена, 250 мкл буфера и 200 мкл суспензии мембран, для выявления неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого лиганда ((-)баклофен, 1 мМ). Порядок внесения компонентов был следующим: буфер, радиоактивный лиганд, нерадиоактивный лиганд. Суспензию мембран вносили непосредственно перед началом инкубации, концентрация белка в пробе составляла 0,15-0,2 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин. По окончании инкубации пробы фильтровали с использованием охлажденного буфера через стекловолкнистые фильтры GF/C ("Whatman"), предварительно смоченные в 0,3% полиэтиленимине

в течение 2 ч при 4°C. Общий объём буфера для фильтрования одной пробы составлял 8 мл. Фильтры просушивали при комнатной температуре.

#### Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия

Предварительно просушенные фильтры GF/B и GF/C переносили во флаконы для сцинтилляционной счёта и заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости (4 г PPO и 0,2 г POPOP на 1 л толуола). Радиоактивность проб определяли на счётчике Tri-Carb 2900TR ("Perkin Elmer") с эффективностью счёта 42-46%.

Результаты экспериментов по радиолигандному связыванию *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. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури [14]. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания  $K_d$  и  $B_{max}$  измеряли специфическое связывание для D<sub>2</sub>-рецепторов — от 1,25 нМ до 40 нМ, для ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов — от 1,25 нМ до 20 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 повторностях.

#### Статистическая обработка

Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad Prism 7 Demo и Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних значений с учётом стандартной ошибки среднего (mean±SEM). Статистическую обработку экспериментальных данных поведенческого теста осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Различия между субпопуляциями и группами по изучаемым показателям считали достоверными при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

При первичном поведенческом тестировании аутбредных мышей CD-1 с использованием ЗОКЛ в общей популяции были выделены подтипы грызунов, различавшиеся исходной устойчивостью внимания к предъявляемым в лабиринте объектам. Подтип ED-Low характеризовался сниженными значениями параметра ED-ratio, отражающего внимание к объектам окружающей среды. Статистически достоверные различия по данному параметру между субпопуляциями мышей ED-Low и ED-High, которым вводили физраствор, регистрировались и при повторном тесте ЗОКЛ ( $p < 0,005$ , табл. 1). По поведенческим показателям использованного теста, коррелирующим с эффективностью

Таблица 1. Влияние субхронического введения пантогама (100 мг/кг/день, в/бр) и атомоксетина (3 мг/кг/день, в/бр) на показатели поведения субпопуляций мышей аутбредной линии CD-1 в тесте "закрытый обогащённый крестообразный лабиринт" (m±SEM)

Показатель <sup>^</sup>	Экспериментальная группа	ED-High (n)	ED-Low (n)
F_PtrN	Физраствор	6,1±0,4 (14)	7,6±0,4 (11)
	<b>Пантогам</b>	7,4±0,8 (19)	7,5±0,6 (20)
	Атомоксетин	6,9±0,2 (17)	7,0±0,6 (13)
PatrlN	Физраствор	1,4±0,1 (14)	1,4±0,2 (11)
	<b>Пантогам</b>	1,3±0,3 (19)	1,3±0,1 (20)
	Атомоксетин	1,1±0,1 (17)	1,2±0,1 (13)
F_ChTm	Физраствор	6,5±0,4 (14)	6,9±0,7 (11)
	<b>Пантогам</b>	7,0±1,5 (19)	7,3±1,4 (20)
	Атомоксетин	6,3±0,3 (17)	5,9±0,2 (13)
F_GITm	Физраствор	7,5±1,1 (14)	12,3±2 (11)
	<b>Пантогам</b>	13,2±6,3 (19)	14,6±3,6 (20)
	Атомоксетин	10,4±1,1 (17)	13,1±2,3 (13)
T_ChTm	Физраствор	55,5±4,0 (14)	76,5±16,6 (11)
	<b>Пантогам</b>	46,7±5,5 (19)	53,0±8,0 (20)
	Атомоксетин	61,8±4,0 (17)	89,2±14,6 (13)
T_GITm	Физраствор	68,4±4,2 (14)	87,0±13,0 (11)
	<b>Пантогам</b>	77,6±20,7 (19)	105,7±14,2 (20)
	Атомоксетин	85,2±7,8 (17)	87,0±9,0 (13)
Obj_tR	Физраствор	<b>377,1±31,9 (14)</b>	<b>43,7±7,9* (11)</b>
	<b>Пантогам</b>	330,2±51,2 (19)	<b>172,5±29,4<sup>#</sup> (20)</b>
	Атомоксетин	353,9±56,9 (17)	<b>192,5±41,7<sup>#</sup> (13)</b>

Примечание: \* — статистически значимое отличие между субпопуляциями, U-test Манна-Уитни,  $p < 0,005$ ; # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, U-test Манна-Уитни,  $p < 0,005$ ; ^ — пояснения в разделе Методика. Представлены средние значения±стандартная ошибка средней. В скобках — количество животных.

## ВЛИЯНИЕ ПАНТОГАМА И АТОМОКСЕТИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ВНИМАНИЯ

исследовательского поведения ( $F_{PtrN}$ ,  $PatrIN$ ), тревожностью ( $F_{ChTm}$ ,  $F_{GI Tm}$ ) и двигательной активностью ( $T_{ChTm}$ ,  $T_{GI Tm}$ ), статистически значимых различий между субпопуляциями мышей выявлено не было.

При субхроническом введении (6 ежедневных инъекций в/бр) оба изучаемых препарата, пантогам и атомоксетина гидрохлорид, в выбранных дозах (100 мг/кг и 3 мг/кг соответственно) показали хорошую переносимость и избирательный характер действия на показатели поведения (табл. 1). Так, атомоксетин увеличивал индекс ED-ratio у дефицитарных по вниманию животных подтипа ED-Low в 4,4 раза по сравнению с контрольной группой ( $192,5 \pm 41,7$ ,  $p < 0,005$ ). Аналогичное выборочное изменение данного индекса было установлено и у грызунов ED-Low, получавших пантогам ( $172,5 \pm 29,4$ ,  $p < 0,005$ ).

Следует отметить отсутствие статистически достоверных различий между контрольными и опытными группами обоих фенотипов в других, указанных выше, показателях теста ЗОКЛ, что позволяет сделать предположение о преимущественном влиянии атомоксетина и пантогама на внимание как компонент когнитивной функции.

Анализ данных экспериментов по радиолигандному связыванию показал соответствие обнаруженных результатов предыдущим проведённым исследованиям [8]. В префронтальной коре животных контрольных групп субпопуляции ED-Low с нативным дефицитом внимания показатель плотности ( $B_{max}$ , фмоль/мг белка) для  $D_2$ -рецепторов был на 24 и 36% выше в сравнении с контролем ED-High (табл. 2,  $p < 0,05$ ). Для ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов, напротив, значения  $B_{max}$  были снижены на 32% и 35% относительно контроля ED-High, принятого за норму (табл. 2,  $p < 0,05$ ).

Субхроническое введение атомоксетина гидрохлорида приводило к снижению плотности рецепторов дофамина в префронтальной коре у подтипа ED-Low на 14% в опытной группе по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Влияние субхронического введения атомоксетина (3 мг/кг/день, в/бр) и пантогама (100 мг/кг/день, в/бр) на показатели радиолигандного связывания с рецепторами в префронтальной коре субпопуляций мышей CD-1 (m+SEM)

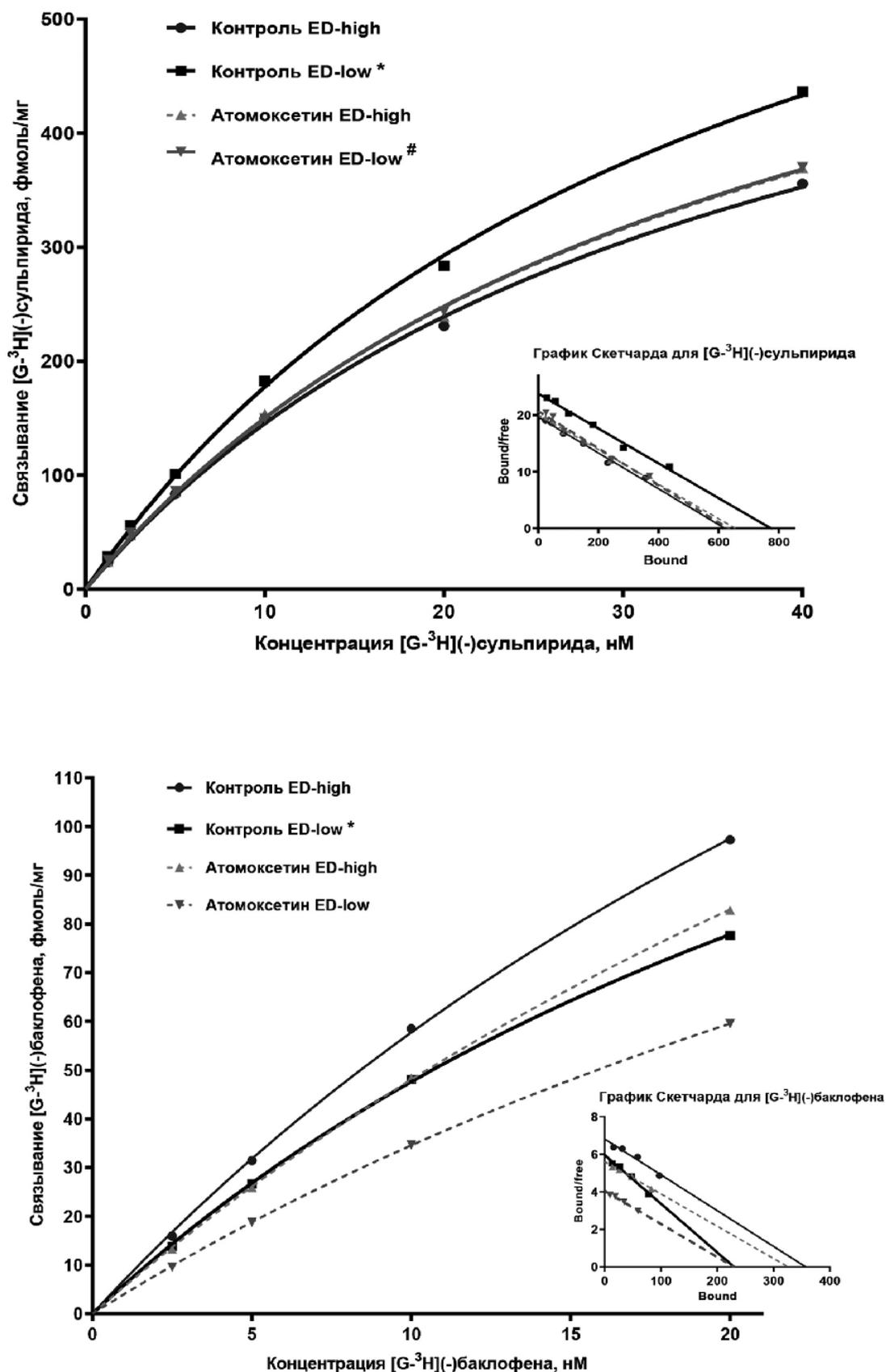
Субпопуляции мышей CD-1 / Экспериментальная группа	Радиолиганд			
	[G- <sup>3</sup> H](-)сульпирид		[G- <sup>3</sup> H](-)баклофен	
	Параметры связывания			
	$B_{max}$ , фмоль/мг белка	$K_d$ , нМ	$B_{max}$ , фмоль/мг белка	$K_d$ , нМ
Контроль ED-High	673,2±35,4	36,3±3,3	312,9±21,9	24,8±0,9
Атомоксетин ED-High	710,8±35,7	37,6±3,2	302,9±12,5	24,6±0,4
Контроль ED-Low	<b>832,9±40,2*</b>	36,9±3	212,7±8,9	25,9±1,1
Атомоксетин ED-Low	<b>714,8±27,2#</b>	37,6±2,4	215,0±6,8	26,9±0,3
Контроль ED-High	665,1±37,2	41,0±3,8	148±4,2	24,8±0,9
Пантогам ED-High	710,7±42,0	43,1±4,1	<b>123±1,3#</b>	24,6±0,4
Контроль ED-Low	<b>901,4±44,5*</b>	43,3±3,5	<b>96,5±2,3*</b>	25,9±1,1
Пантогам ED-Low	<b>700,2±34,7#</b>	43,2±1	<b>138,6±1,1#</b>	26,9±0,3

Примечание: \* — статистически значимое отличие между субпопуляциями, F-критерий Фишера,  $p < 0,05$ , # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами,  $p < 0,05$ .

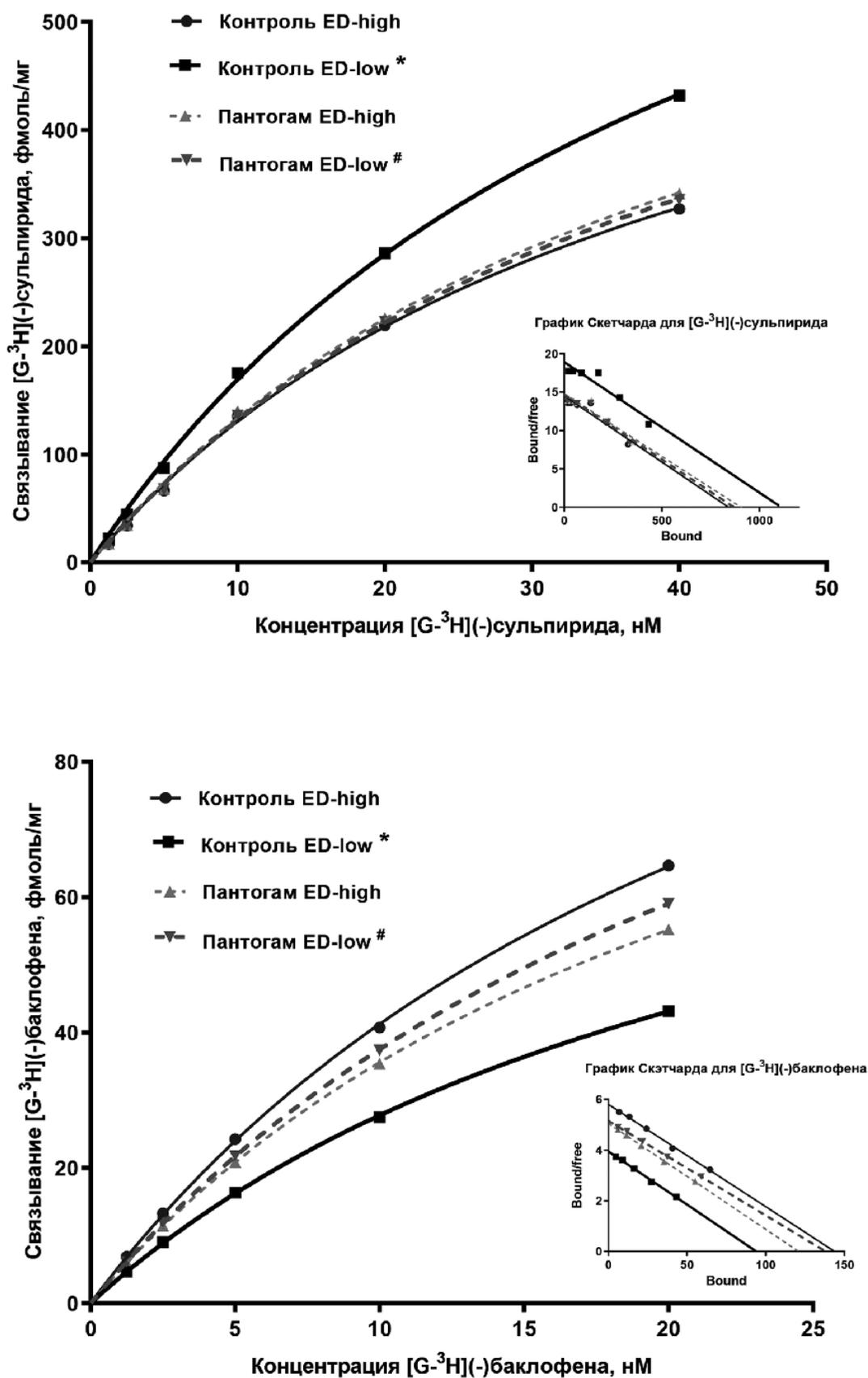
Соответствующий количественный показатель связывания для ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов не претерпевал значимых изменений (табл. 2, рис. 2). Пантогам в дозе 100 мг/кг у животных с дефицитом внимания вызывал уменьшение изначальной плотности  $D_2$ -рецепторов на 22% и увеличение её для ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов на 44% относительно контроля ED-Low. Кроме того, у особей подтипа ED-High обнаружено уменьшение связывания [G-<sup>3</sup>H](-)баклофена с ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами на 17% по отношению к контролю (табл. 2, рис. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

О дофаминовых рецепторах как действенных мишенях для отбора эффективных средств лечения СДВ было известно из прежних публикаций. Так, у спонтанно-гипертензивных крыс (SHR), являющихся общепризнанной моделью СДВ/Г, обнаружена существенно большая экспрессия  $D_2$ -рецепторов в префронтальной коре, стриатуме и гипоталамусе, чем у линии сравнения крыс WKY [15]. При этом хроническое введение препарата выбора атомоксетина, — блокатора обратного захвата норадреналина и лиганда  $\alpha_2$ - и  $D_1$ -рецепторов [15] — существенно понижало экспрессию этих рецепторов [16]. Представленные нами результаты не только подтверждают вовлечённость катехоламинергической системы, но впервые обосновывают высказанную нами гипотезу о роли ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов в регуляции компонента внимания и в механизме действия препаратов для коррекции его дефицита [8, 17]. Кроме того, ранее на крысах SHR — широкоиспользуемой моделью дефицита внимания — с использованием фармакоЭЭГ-подхода с нашим участием было показано, что баклофен — агонист ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов — существенно стимулировал электрограммы коры и гиппокампа в интервале дельта/тета частот (1,5-5,7 Гц) и уменьшал электрическую активность в диапазоне альфа/бета частот ЭЭГ (8,2-20 Гц) [18], что хорошо соотносится с клиническими данными по больным с СДВ/Г [19].



**Рисунок 2.** Влияние субхронического введения атомоксетина на радиолигандное связывание [G-<sup>3</sup>H](-)сульпирида с D<sub>2</sub>-рецепторами (А) и [G-<sup>3</sup>H](-)баклофена с 5HT<sub>2A</sub>-рецепторами (Б) префронтальной коры субпопуляций мышей линии CD-1. \* — статистически значимое отличие между субпопуляциями, F-критерий Фишера,  $p < 0,05$ , # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами,  $p < 0,05$ .



**Рисунок 3.** Влияние субхронического введения пантогама на радиолигандное связывание [G-<sup>3</sup>H](-)сульпирида с D<sub>2</sub>-рецепторами (А) и [G-<sup>3</sup>H](-)баклофена с ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами (Б) префронтальной коры субпопуляций мышей линии CD-1. \* — статистически значимое отличие между субпопуляциями, F-критерий Фишера, *p*<0,05, # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, *p*<0,05.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, пантогам и препарат сравнения атомоксетин различаются по своим нейрорецепторным эффектам: первый воздействует как на ГАМК<sub>B</sub>, так и на D<sub>2</sub>-рецепторы, тогда как второй — только на катехоламиновые, что может отражаться в профилях их терапевтического эффекта. Кроме того, обнаруженные различия в рецепторном профиле префронтальной коры у животных с исходно различающейся устойчивостью внимания предположительно могут рассматриваться как компоненты молекулярной основы предлагаемой модели СДВ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0521-2019-0009 “Анализ рецепторных механизмов и поиск средств фармакологической протекции ЦНС при нарушениях мозгового кровообращения и когнитивных расстройств”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург; “Правила надлежащей лабораторной практики”, утверждённые приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Am. Psychiatric Assoc.* (2013) Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders. 5th edition. DOI: 10.1176/appi.books.9780890425596
2. *Visser S.N., Danielson M.L., Bitsko R.H. et al.* (2014) J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry, **53** (1), 34-46.

3. *Быков Ю.В., Беккер Р.А.* (2018) Consilium Medicum, **20**(2), 112-123. [*Bykov Yu.V., Bekker R.A.* (2018) Consilium Medicum, **20**(2), 112-123.]
4. *Суворинова Н.Ю.* (2018) Педиатрия. Приложение Consilium Medicum, **3**, 99-106. [*Souvorinova N.Yu.* (2018) Pediatrics. Suppl. Consilium Medicum, **3**, 99-106.]
5. *Заваденко Н.Н.* (2019) Гиперактивность и дефицит внимания в детском возрасте. Москва, Юрайт, 274 с. [*Zavadenko N.N.* (2019) Giperaktivnost' i defitsit vnimaniya v detskom vozraste. Moskva, Urait, 274 p.]
6. *Wickens J.R., Hyland B.I., Tripp G.* (2011) Br. J. Pharmacol., **164**(4), 1107-1128.
7. *Salimov R.M., Kovalev G.I.* (2013) J. Behav. Brain Sci., **3**(2), 210-216.
8. *Ковалев Г.И., Салимов Р.М., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В.* (2020) Нейрохимия, **37**(1), 1-9. [*Kovalev G.I., Salimov R.M., Sukhorukova N.A., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V.* (2020) Neurochemical J., **37**(1), 1-9.]
9. *Iversen L.L., Glowinski J.* (1966) J. Neurochemistry, **13**(8), 655-669.
10. *Breese C.R., Marks M.J., Logel J.* (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther., **282**(1), 7-13.
11. *Sun W., Ginovart N., Ko F.* (2003) Mol. Pharmacol., **63**(2), 456-462.
12. *Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L.* (1985) Neuropharmacology, **24**(3), 207-210.
13. *Szekely A.M., Barbaccia M.L., Costa E.* (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther., **243**(1), 155-159.
14. *Waterborg J.H., Matthews H.R.* (1984) Methods Mol. Biol., **1**, 1-3.
15. *Gamo N.J., Wang M., Arnsten A.F.T.* (2010) J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry, **49**(10), 1011-1023.
16. *Moon S.J., Kim Ch.J., Lee Y.J.* (2014) PLoS One, **9**(10), e108918. DOI: 10.1371/journal.pone.0108918
17. *Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А., Старикова Н.А.* (2012) Журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова, **112**(3), 39-43. [*Kovalev G.I., Firstova Yu.Yu., Abaimov D.A., Starikova N.A.* (2012) Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S.S. Korsakova., **112**(3 Pt 1), 39-43.]
18. *Vorobyov V., Schibaev N., Kaptsov V.* (2011) Brain Res., **1383**, 154-168.
19. *Barry R., Clarke A.R., Johnstone S.J.* (2003) Clin. Neurophysiol., **114**(2), 171-183.

Поступила в редакцию: 27. 05. 2021.  
После доработки: 23. 09. 2021.  
Принята к печати: 28. 09. 2021.

INFLUENCE OF PANTOGAM AND ATOMOXETINE ON ATTENTION STABILITY  
AND DISTRIBUTION OF DOPAMINE D<sub>2</sub> AND GABA<sub>B</sub> RECEPTORS  
IN THE ATTENTION DEFICIT MOUSE MODEL

*GI. Kovalev\*, N.A. Sukhorukova, E.V. Vasileva, E.A. Kondrakhin, R.M. Salimov*

Zakusov Research Institute of Pharmacology,  
8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia; \*e-mail: kovalev@academpharm.ru

The closed enriched cross maze test was employed as a new experimental model of the attention deficit disorder (ADD) for evaluation of the behavioral and neurochemical effects of the nootropic drug pantogam (100 mg/kg, intraperitoneally) and atomoxetine hydrochloride (3 mg/kg, intraperitoneally) administered subchronically to CD-1 outbred mice. Two subpopulations of rodents differed spontaneously in attention to enriched compartments (ED-Low and ED-High), were estimated on the basis of time spent by the mice in the empty or enriched compartments. The ED-Low and ED-High mice insignificantly differed in parameters associated with anxiety, exploratory efficacy and motor activity. Subchronic administration of both drugs in selected doses produced corrective effect on animal behavior seen as a selective increase in the ED-ratio values in the ED-Low subpopulation. Differences in the distribution of dopamine D<sub>2</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors ( $B_{max}$ ) between placebo-treated ED-Low and ED-High mice were found in the prefrontal cortex using the radioligand binding method. The neuroreceptor effects of atomoxetine were seen in prefrontal cortex of ED-Low mice as decrease in the  $B_{max}$  values of D<sub>2</sub> receptors by 14%. Pantogam in the prefrontal cortex of ED-Low subpopulation showed a decrease in the  $B_{max}$  values of D<sub>2</sub> receptors by 22% and an increase for GABA<sub>B</sub> receptors by 44%. Therefore, subchronic administration of pantogam had a positive corrective effect on the behavior parameters and the density of the studied receptor subtypes in animals with severe attention deficit.

**Key words:** pantogam; attention deficit; “closed enriched cross maze”; GABA<sub>B</sub>-receptor; D<sub>2</sub>-receptor; prefrontal cortex

**Funding.** The study was performed as a part of State Assignment no. 0521-2019-009 “Analysis of receptor mechanisms and search for pharmacological protection of the central nervous system in the case of cerebrovascular and cognitive disorders”.

Received: 27.05.2021, revised: 23.09.2021, accepted: 28.09.2021.