

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛИНА АЛЬФОСЦЕРАТА НА МОДЕЛИ КОГНИТИВНО-МНЕСТИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА

П.Ф. Юшкевич, Н.А. Бизунок

Белорусский государственный медицинский университет

Когнитивно-мнестический дефицит является одним из ключевых признаков нарушения высшей нервной деятельности при многих патологических состояниях, включая нейродегенеративные заболевания, нейроинфекции, депрессивные и тревожные расстройства, острый и хронический стресс [4]. Клинически когнитивно-мнестические дефициты проявляются нарушением концентрации внимания, снижением мотивации, нарушением абстрактного и логического мышления, расстройствами памяти. В одних случаях когнитивно-мнестические дефициты неуклонно прогрессируют и ведут к тяжелой инвалидности (болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др.), в других – медленно регрессируют, в этом случае восстановление трудоспособности пациентов растягивается на многие месяцы и годы [7]. Поэтому эффективная коррекция когнитивных и мнестических расстройств является не только медицинской, но и социальной задачей, а создание новых средств восстановления мышления и памяти – актуальным направлением исследований в области психофармакологии.

Современная стратегия разработки средств коррекции когнитивно-мнестических нарушений опирается на знания о молекулярных механизмах функционирования мозга и их нарушениях при отдельных патологических состояниях. При этом когнитивно-мнестические дефициты любого генеза имеют ряд общих патогенетических причин и механизмов развития. Так, среди биохимических нарушений особое место занимают изменения глутаматергической и холинергической нейротрансмиссии [2].

Глутаматергическая дисрегуляция проявляется избыточной активацией NMDA и AMPA-рецепторов с последующей индукцией в нейрон Ca^{2+} -токов, которые инициируют многоступенчатое свободнорадикальное окисление

биоструктур, что в конечном счете ведет к апоптозу нейронов (глутаматергическая эксайтотоксичность). Этот механизм нейронального повреждения признается одним из важнейших при развитии нейро-дегенеративных заболеваний [2, 9] и неразрывно связан с другим – холинергическим дефицитом. Холинергический дефицит может быть обусловлен гибелью холинергических нейронов, нарушением продукции ацетилхолина или его высвобождения, down-регуляцией холинергических рецепторов [5]. Взаимосвязь глутаматергической и холинергической нейротрансмиссии интенсивно изучается современной нейробиологией. Имеющиеся результаты свидетельствуют о полимодальной интеграции двух нейротрансмиттерных систем, избирательное воздействие на каждую из которых модифицирует биологические ответы обеих [7]. С этих позиций одним из возможных фармакотерапевтических подходов к лечению когнитивно-мнестических нарушений является назначение холинергических средств. В клинической практике наиболее широко используются ингибиторы ацетилхолинэстеразы центрального действия (донепезил, ривастигмин, галантамин и др.), а также предшественники ацетилхолина (эферы холина) [2, 9]. Важнейшим преимуществом эфиров холина является их низкая токсичность и хорошая переносимость, однако психотропная активность этих средств требует дополнительного изучения.

Объектом настоящего исследования являлся холина альфосцерат – предшественник ацетилхолина и фосфатидилхолина. В составе готовой лекарственной формы холина альфосцерата содержится 40,5% метаболически защищенного холина [6]. Метаболическая защита способствует повышению биодоступности холина. В организме человека холина альфосцерат расщепляется на холин и глицерофосфат [11, 14]. Холин участвует в биосинтезе ацетилхолина в головном мозге. Усиление холинергической активности происходит за счет увеличения запасов ацетилхолина в нейроне, что создает высокие внутрисинаптические концентрации при его высвобождении. Глицерофосфат является

предшественником фосфатидилхолина – важнейшего фосфолипида нейрональных мембран, который поддерживает их пластичность, обеспечивая функционирование рецепторов и мембранотропных ферментов и, в конечном счете, облегчает синаптическую передачу [3]. По данным ряда авторов холина альфосцерат способен улучшать состояние когнитивных функций у больных с легкой и умеренной деменцией альцгеймеровского типа [8, 9, 10], сведения о его эффективности при когнитивных расстройствах иного генеза малочисленны [11, 12, 13, 14].

Целью настоящего исследования являлось изучение антиамнестической активности холина альфосцерата на модели когнитивно-амнестических нарушений, индуцированных введением скополамина.

Материалы и методы

В работе использовали реагенты и лекарственные средства: холина альфосцерат (ЗАО «Минскинтеркапс», Республика Беларусь), скополамин (Sigma, Германия), эмульгатор твин-80 (Sigma, Германия), 1% крахмальный гель готовили непосредственно перед использованием.

Исследования выполнены на 68 рандомбредных мышках-самцах массой 20-28 г., разделенных на 4 группы (n=17). Методические подходы, использованные в настоящей работе, описаны ранее в научной литературе [1] и являются общепринятыми в психофармакологии.

На протяжении всего эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария, они имели свободный доступ к пище и воде. Каждой группе животных вводили холина альфосцерат внутрижелудочно через зонд в виде суспензии на 1% крахмальном геле в дозах 100, 300 или 1000 мг/кг, контрольным животным назначали плацебо (1% крахмальный гель) в объеме 10 мл/кг. Введение холина альфосцерата и плацебо начинали за 3 дня до моделирования амнезии и продолжали на протяжении всего эксперимента.

Амнезию моделировали внутрибрюшинным введением М-холинергического антагониста скополамина. Антиамнестическое действие

холина альфосцерата оценивали в тесте формирования условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) аверсивного болевого раздражителя. УРПИ вырабатывали в челночной камере, которая представляет собой прямоугольный резервуар размером 60×15 см с металлическими стенками высотой 40 см и электрифицированным решетчатым полом. Камера разделена опускающейся дверцей на 2 отсека – «светлый» и «темный». Светлый отсек освещается при помощи лампы накаливания мощностью 100 Вт, темный отсек освещения не имеет.

Исследование выполнялось в 3 этапа. На этапе тренировки (1-й этап) у животных вырабатывали стойкий навык перехода из светлого отсека в темный. Биологической основой такого поведения является «норковый» рефлекс грызунов, среднее время перехода обычно составляет около 30 с. Во время тренировки последовательно помещали по одному животному из каждой группы в светлый отсек челночной камеры. Время тренировки составляло 180 секунд, в течение которых регистрировали латентный период перехода животного в темный отсек (с), количество посещений темного отсека (n) и общее время пребывания животного в темном отсеке челночной камеры (с). Животных, не зашедших в темный отсек в течение 180 с, из эксперимента исключали. Холина альфосцерат или плацебо вводились сразу после тренировки.

На этапе обучения и моделирования амнезии (2-й этап) животное высаживали в светлый отсек челночной камеры, после его перехода в темный отсек дверцу между отсеками опускали и на решетчатый пол подавали электрический разряд (0,3 мА – 1 с). После неизбежного электроболевого (обучающего) воздействия дверцу поднимали и позволяли животному перейти в светлый отсек челночной камеры. Моделирование амнезии выполнялось сразу после обучения путем однократного введения скополамина в дозе 1,5 мг/кг в брюшную полость. После этого вводили холина альфосцерат или плацебо.

На третьем этапе исследования проводили тестирование антиамнестического действия холина альфосцерата через 24 часа после обучения. Эффективность антиамнестического действия холина альфосцерата оценивали по критериям, указанным выше (этап тренировки).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием ППП «Microsoft Office Excel 2003» и «Statistica 6.1». Анализ полученных данных проводился с помощью методов непараметрической статистики. Межгрупповые различия количественных признаков оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса с последующими сравнениями по критерию Данна и U-критерию Манна-Уитни. Различия качественных (квантовых) показателей оценивали точным методом Фишера. Во всех случаях различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования представлены в таблице. Количественными критериями анализа служили: латентный период перехода животного в темный отсек, количество посещений темного отсека, и общее время пребывания в темном отсеке челночной камеры. При отказе животного посетить темный отсек за время тестирования, латентному периоду присваивалось значение 180 с, число заходов и время пребывания в темном отсеке в этом случае приравнивалось к 0. Таким образом, характер распределения отличался от нормального и для обработки результатов исследования использовались непараметрические критерии анализа.

Результаты тестирования показывают, что в период тренировки (графа «Тренинг») количественные параметры поведенческой активности не различались во всех группах и составляли в среднем: латентное время – 29 с, количество посещений – 4, время пребывания в темном отсеке – 77 с.

Многочисленные предварительные исследования показали, что на действие неизбежного электрошокового раздражителя у животных формируется стойкая память. При тестировании животных через 24 ч частота избегания отсека, в котором произошло аверсивное воздействие (темный

отсек челночной камеры), составляет 80-90%. У животных, посещающих темный отсек ($n=8$), латентный период увеличивается втрое ($78,6\pm 30,3$ с) по сравнению с контролем и в 2 раза сокращается время пребывания в темном отсеке ($38,6\pm 24,8$ с) при однократном посещении¹. Результаты, полученные в настоящем эксперименте, представлены в таблице (группа «Биоконтроль»).

Введение скополамина (контроль) нарушало формирование памяти: 9 из 11 животных (82%) посетило темный отсек. Количественные показатели для животных, посетивших темный отсек, существенно не отличались от показателей, полученных в период тренировки (см. таблицу). Это свидетельствует об эффективном амнестическом действии скополамина.

Холина альфосцерат обладал выраженным антиамнестическим действием во всем изученном диапазоне доз. Наиболее весомый показатель – частота избеганий темного отсека – дозозависимо увеличивался и составлял 56% (100 мг/кг), 60% (300 мг/кг) и 67% (1000 мг/кг). Количественные показатели существенным образом изменялись: достоверно увеличивался латентный период первого захода в темный отсек, уменьшалось число посещений темного отсека и сокращалось общее время пребывания в темноте во всех экспериментальных группах (см. таблицу).

¹ Представлены результаты предварительных испытаний. Указано среднее значение и стандартное отклонение.

Таблица. Корректирующее действие холина альфосцерата при скополаминовой амнезии у мышей в тесте УРПИ

Группа	Показатели	Латентный период, с		Число заходов, n		Время пребывания, с		Частота избегания		
		Тренинг	Тест	Тренинг	Тест	Тренинг	Тест	абс.	%	p
Биоконтроль (Плацебо + Плацебо) n=10	Me	13,5	180,0	3,0	0,0	96,5	0,0	8/10	80,0	
	НК-ВК	4,0-17,0	180,0-180,0	2,0-5,0	0,0-0,0	72,0-125,0	0,0-0,0			
Контроль (Плацебо + Скополамин) n=11	Me	21,7	56,0	4,3	2,0	76,7	37,0	2/11	18,2	
	НК-ВК	19,9-28,3	16,0-65,0	3,3-6,7	1,0-2,0	41,7-118,0	6,0-80,0			
Холина альфосцерат, мг/кг										
100 + Скополамин n=16	Me	46,7	180,0	4,2	0,0	73,3	0,0	9/16	56,3	0,05 ^{XF}
	НК-ВК	19,8-69,2	75,0-180,0 [#]	3,3-6,7	0,0-2,5	54,2-79,5	0,0-58,0			
300 + Скополамин n=15	Me	23,0	180,0	3,7	0,0	89,3	0,0	9/15	60,0	0,05 ^{DF}
	НК-ВК	16,0-64,3	87,0-180,0 [#]	2,7-5,3	0,0-2,0 [#]	54,3-109,3	0,0-32,0 [#]			
1000 + Скополамин n=12	Me	25,3	180,0	3,7	0,0	68,7	0,0	8/12	66,7	0,04 ^{DF}
	НК-ВК	14,3-70,0	111,0-180,0 [#]	3,3-6,0	0,0-2,0 [#]	42,7-97,7	0,0-21,5 [#]			

Примечание к таблице. Me – медиана, НК-ВК – нижний (25%) и верхний (75%) квантили. ^{XF} – по точному методу Фишера (односторонний вариант); ^{DF} – по точному методу Фишера (двусторонний вариант). [#]p<0,05 – по U-критерию Манна-Уитни в сравнении с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном антиамнестическом действии холина альфосцерата на экспериментальной модели скополаминовой амнезии, что позволяет прогнозировать корректирующую эффективность холина альфосцерата при когнитивно-амнестических расстройствах, вызванных нарушением холинергической нейротрансмиссии.

Выводы.

По результатам оценки УРПИ аверсивного раздражителя скополамин, введенный внутривентрикулярно в дозе 1,5 мг/кг, вызывает стойкую амнезию у мышей.

Холина альфосцерат в дозах 100, 300 и 1000 мг/кг (внутрижелудочно), назначаемый профилактически в течение 3-х суток до обучающего электрошокового воздействия и введения скополамина, обладает дозозависимым антиамнестическим действием.

Литература

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
2. Гаврилова С.И. Болезнь Альцгеймера: новые терапевтические возможности // Consilium Medicum. - 2004. –Т.6, N.2. – С.142-149.
3. Aguglia E. et al. Choline alfoscerate in the treatment of mental pathology following acute cerebrovascular accident // Funct. Neurol. – 1993. – Vol.8. – P.5-24.
4. Amenta F., Tayebati S.K. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction // Current Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol.15. – P.488-498.
5. Amenta F. et al. Muscarinic cholinergic receptors in the hippocampus of aged rats: influence of choline alfoscerate treatment // Mech. Ageing. Dev. – 1994. – Vol.76. – P.49.

6. Ban T/A. et al. Choline alfoscerate in elderly patients with cognitive decline due to dementing illness // *New Trends Clin. Neuropharmacol.* – 1991. – Vol.5. – P.87.
7. Bohnen N.I., Kaufer D.I., Ivanco L.S. et al. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission topographic study // *Arch. Neurol.* – 2003. – Vol.60. – P.1745-1748.
8. Canal N. et al. Comparison of the effects of pretreatment with choline alfoscerate, idebenone, aniracetam and placebo on scopolamine-induced amnesia // *Le Basi Raz. Terapia.* – 1993. – Vol.23. – P.102.
9. Moreno De J., Moreno M. Cognitive improvement in mild to moderate Alzheimer's dementia after treatment with the acetylcholine precursor choline alfoscerate: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. // *Clin. Therapeutics.* – 2002. – Vol.25. – P.178–193.
10. Palleschi M. et al. Evaluation of effectiveness and tolerability of alpha-GFC (choline alfoscerate) in patients suffering from slight / moderate cognitive decline. Preliminary results // *Geriatrics.* – 1992. – Vol.4. – P.13.
11. Schettini G. et al. Effect of choline alfoscerate in elderly patients with primary degenerative dementia // *Le Basi Raz. Terapia.* – 1993. – Vol.23, Suppl.3. – P.108-116.
12. Tomasina C., Manzino M., Novello P. and others. Clinical study of the therapeutic effectiveness and tolerability of choline alfoscerate in 15 subjects with compromised cognitive functions subsequent to acute focal cerebral ischemia // *Riv. Neuropsichiatr. Sci. Affini.* – 1996. – Vol.37. – P.21-28.
13. Vega J.A. et al. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in the cerebellar cortex of aged rats: effect of choline alfoscerate treatment // *Mech. Ageing Dev.* – 1993. – Vol.69. – P.119.
14. Vezzetti V., Bettini R. Clinical and instrument evaluation of the effect of choline alfoscerate on cerebral decline // *Presse Medicale.* – 1992. – Vol.5. – P.141.