

ДЕЙСТВИЕ СВЕРХМАЛЫХ ДОЗ АНТИТЕЛ К S-100 ПРИ НАРУШЕНИИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ, ЭМОЦИОНАЛЬНОГО И НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Т.А.Воронина, М.В.Белопольская, И.А.Хейфец,
Ю.Л.Дугина, С.А.Сергеева, О.И.Эпштейн

ООО НПФ “Материа Медика Холдинг”, Москва

Сверхмалые дозы антител к белку S-100 восстанавливают когнитивные функции, неврологический статус, эмоциональное состояние и снижают тревожность у крыс с холинергическим дефицитом (экспериментальная модель болезни Альцгеймера).

Ключевые слова: белок S-100, сверхмалые дозы, болезнь Альцгеймера, скополамин

Болезнь Альцгеймера (БА) является медленно прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется выраженным нарушением когнитивных функций с потерей памяти и способности к обучению. Кроме того, у больных БА изменяется эмоциональный статус, появляется тревога, беспокойство, возбуждение и депрессия.

Дефицит холинергической системы является одним из основных патогенетических механизмов развития БА. Именно недостаточностью холинергической системы определяется дефицит когнитивных и поведенческих функций при БА. Поэтому для лечения БА широко используются холиномиметические средства, среди которых наиболее широко применяются ингибиторы ацетилхолинэстеразы [3,8]. Для коррекции мнестических нарушений при деменциях применяются также ноотропные препараты [5,6,9].

Антагонисты холинергической системы, в частности скополамин, вызывают в эксперименте нарушения памяти, сходные с теми, которые наблюдаются при БА [4,9]. Поэтому наиболее часто в качестве экспериментальной модели БА используется повторное введение скополамина [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния сверхмалых доз антител к белку S-100 (СМД анти-S100) на нарушения когнитивных функций, эмоционального и неврологического статусов в условиях экспериментальной модели БА.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 90 белых беспородных крысах-самцах. Животные содержались в пластиковых клетках в освещенной комнате и имели свободный доступ к воде и корму. С целью получения нарушений когнитивных функций ежедневно крысам длительно в течение 20 сут вводили М-холиноблокатор скополамин, а затем, через 10 сут, тестировали поведение и состояние животных [1].

Крыс случайным образом разделили поровну на 3 группы. Животным 1-й группы в течение 20 сут внутривентрикулярно ежедневно вводили дистиллированную воду, крысам 2-й и 3-й групп — скополамин в дозе 1 мг/кг в сутки. С 21-х по 30-е сутки крысам 1-й и 2-й групп перорально вводили дистиллированную воду, а крысам 3-й группы — СМД анти-S100 в объеме 0.25 мл на 100 г массы крысы 2 раза в сутки.

Для выработки условного рефлекса активно-го избегания (УРАИ) использовали челночную камеру, состоящую из 2 одинаковых отделений с электродным полом [1]. Силу электроболевого раздражения подбирали для каждого животного. Избавлением (безусловный рефлекс) считалась перебежка животного в соседний отсек в ответ на удар током, избеганием (условный рефлекс) — перебежка животного в соседний отсек после включения условного сигнала до подачи электро-

болевого раздражителя. Обучение продолжалось в течение 7 сут по 10 сочетаний в день. Критерием обученности считались 7 последовательных избеганий из 10 предъявлений.

Для оценки уровня тревожности крыс был использован приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) [7] — перекрещенные полоски размером 50×10 см, поднятые от пола на 50 см. Два противоположных отсека имели вертикальные стенки высотой 40 см. Регистрировалось время, проведенное животными в открытых рукавах, число заходов в светлые и темные рукава. Число пересечений центральной платформы (общее число заходов в темный и светлый рукава лабиринта) и количество стоек использовали для оценки влияния соединений на двигательную активность крыс. Регистрировали также латентное время первого захода в рукав, время, проведенное на центральной площадке, а также эпизоды груминга и количество болюсов. Общее время наблюдения для каждого животного составляло 5 мин.

Ориентировочно-исследовательское поведение животных оценивали в условиях методики “открытое поле” в камере размером 60×60 см с прозрачной крышкой. Пол камеры был разделен равномерно линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 4 см. Регистрировали число вставаний на задние лапки (вертикальная двигательная активность), число переходов из квадрата в квадрат (горизонтальная двигательная активность), число заглядываний в отверстия, эпизоды груминга и количество болюсов.

Неврологический статус животных определяли по шкале Stroke-index McGrow в модификации И.В.Ганнушкиной [2]. Отмечали количество крыс с легкой (0.5–2.5 балла) и тяжелой (3–10 баллов) неврологической симптоматикой.

Для анализа нарушений координации движений у крыс использовали тест вращающегося стержня. На горизонтальный стержень диаметром 4 см, вращающийся со скоростью 3 об/мин, помещали крыс. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2 мин рассматривали как проявление нарушения координации движений [1].

Мышечный тонус определяли в тесте подтягивания на горизонтальной перекладине. Крысы должны были подтянуться на проволоке, натянутой на высоте 20–30 см от пола. Неспособность подтянуться свидетельствовала о миорелаксантном действии [1].

Для статистической обработки результатов использовали ранговый однофакторный анализ Краскела—Уоллеса. Если различия были достоверны ($p \leq 0.05$), проводилось попарное сравнение по непараметрическому U критерию Манна—Уитни, t критерию Стьюдента, а при анализе альтернативной формы учета — по методу χ^2 .

Для статистической обработки результатов использовали ранговый однофакторный анализ Краскела—Уоллеса. Если различия были достоверны ($p \leq 0.05$), проводилось попарное сравнение по непараметрическому U критерию Манна—Уитни, t критерию Стьюдента, а при анализе альтернативной формы учета — по методу χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В I серии экспериментов изучали влияние СМД анти-S100 на нарушенные когнитивные функции крыс. В 1-й группе крыс количество условных избеганий в 1-е сутки обучения составило 3.3%, затем постепенно возрастало и к 7-м суткам достигло 67.8% (табл. 1).

Обучение УРАИ животных 2-й группы проходило значительно медленнее. Так, если в первые 3 сут динамика формирования рефлекса у этих животных не отличалась от динамики крыс 1-й группы, то с 5-х по 7-е сутки у них число условных избеганий не нарастало. В результате к 7-м суткам только 20% крыс достигли критерия обученности.

Динамика формирования УРАИ у крыс 3-й группы не отличалась от таковой 1-й группы. К 7-м суткам количество животных, достигших критерия обученности, в 3-й группе составило 55.5%.

Субхроническое введение скополамина, приводящее к дефициту холинергической системы, повышало у крыс уровень тревожности, что выражалось в уменьшении в 10 раз ($p < 0.05$) времени, проведенного крысами в открытых рукавах,

Таблица 1. Влияние СМД анти-S100 на обучение крыс УРАИ (количество условных реакций, % от числа предъявлений; $M \pm m$)

Срок обучения, сутки	1-я группа	2-я группа	3-я группа
1-е	3.3±2.4	2.0±1.3	2.2±1.5
2-е	12.2±4.7	4.0±3.1	3.3±2.4
3-и	14.5±3.8	16.0±4.5	14.5±4.8
4-е	22.2±6.0	14.0±6.9	32.2±12.1
5-е	46.7±12.9	25.0±9.9	46.7±15.3
6-е	55.6±10.7	18.0±8.0*	52.2±13.6*
7-е	67.8±12.3	20.0±10.3*	48.9±15.1*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: $p < 0.05$ по сравнению с *1-й группой, *2-й группой.

Таблица 2. Влияние СМД анти-S100 на поведение крыс в ПКЛ ($M \pm m$)

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Латентный период до начала движения	17.8±5.1	11.1±1.5	10.4±2.0
Время на центральной площадке	31.6±9.0	13.3±3.6*	28.3±7.6*
Время в темном отсеке	244.5±9.8	273.9±5.3*	258.2±9.3
Время в светлом отсеке	6.1±3.4	0.6±0.6*	3.1±0.2*
Общее число переходов	5.9±1.3	2.6±0.8*	6.4±0.9
Стойки	6.5±1.3	3.3±0.8*	4.5±1.1
Груминг	2.1±0.6	3.0±0.9	2.8±0.7
Болюсы	2.3±0.8	1.4±0.6	1.6±0.4

Таблица 3. Влияние СМД анти-S100 на ориентировочно-исследовательское поведение крыс с холинэргическим дефицитом в тесте “открытое поле” (баллы, $M \pm m$)

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Горизонтальные перемещения	15.2±4.0	15.6±5.6	18.3±4.0
Вертикальные перемещения	6.7±1.9	3.1±1.1	5.4±0.8
Обследование отверстий	11.3±2.4	4.7±0.8*	10.5±3.1*
Эпизоды умываний	2.0±0.3	2.2±0.4	1.6±0.3
Дефекация	1.7±0.2	1.5±0.2	1.2±0.2

при увеличении времени нахождения в закрытых рукавах ПКЛ. Также наблюдалось уменьшение двигательной активности, регистрируемое по числу переходов и стоек (табл. 2).

Комплекс этих изменений свидетельствует о повышенной тревожности крыс с холинэргическим дефицитом. Введение СМД анти-S100 увеличивало в 5 раз время, проведенное в открытых рукавах ($p < 0.05$), и в 2 раза — время на центральной площадке ($p < 0.05$).

При тестировании животных в условиях методики “открытое поле” у крыс с холинэргическим дефицитом отмечалось уменьшение в 2.2 раза ($p < 0.05$) числа обследований отверстий (табл. 3). Введение СМД анти-S100 предупреждало развитие этих нарушений, увеличивая число обследований отверстий до уровня показателей 1-й группы.

У крыс, получавших скополамин, при оценке неврологического статуса по шкале McGrow отмечены отклонения, свидетельствующие о неврологическом дефиците: у 50% крыс регистрировались слабость и вялость движений, односторонний полуптоз, односторонний птоз. В 3-й группе подобные нарушения наблюдались лишь у 2 животных.

В тесте вращающегося стержня у крыс, получавших скополамин, наблюдалась тенденция к ослаблению мышечного тонуса. Это характеризовалось нарушением координации движений у 30% крыс в тесте вращающегося стержня и неспособностью 30% крыс подтянуть задние конечности

в тесте на горизонтальной перекладине. При введении СМД анти-S100 только 20% крыс не удерживались на вращающемся стержне и 10% животных не могли подтянуть задние конечности.

Таким образом, на модели БА, вызванной субхроническим введением скополамина, СМД анти-S100 при курсовом (10 сут) введении улучшали нарушенные когнитивные функции, ускоряя процесс обучения УРАИ, нормализовали эмоциональное состояние, улучшали показатели неврологического статуса по шкале McGrow и в тесте вращающегося стержня и ослабляли тревожность в тесте ПКЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронина Т.А., Островская Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У.Хабриева. М., 2005. С. 308-320.
2. Ганнушкина И.В. // Журн. невропатол. и психиатр. 1996. № 1. С. 14-18.
3. Barril X., Kalko S.G., Orozco M., Luque F.J. // Mini Rev. Med. Chem. 2002. Vol. 2, N 1. P. 27-36.
4. Camps P., Muñoz-Torrero D. // Ibid. P. 11-25.
5. Claus J.J., Ludwig C., Mohr E. et al. // Neurology. 1991. Vol. 41, N 4. P. 570-574.
6. Gouliayev A.H., Senning A. // Brain Res. Brain Res. Rev. 1994. Vol. 19, N 2. P. 180-222.
7. Pellow S., File S.E. // Pharmacol. Biochem. Behav. 1986. Vol. 24, N 3. P. 525-529.
8. Pomponi M., Giacobini E., Brufani M. // Aging. (Milano). 1990. Vol. 2, N 2. P. 125-153.
9. Voronina T.A. // Alzheimer disease: therapeutic strategies / Eds. E.Giacobini et al. Boston, 1994.

**БЮЛЛЕТЕНЬ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЫ**

8

ПРИЛОЖЕНИЕ

2009