

## ПОДАВЛЕНИЕ ГАМК-ЭРГИЧЕСКОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ АЗИДИНОМ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ЕГО ПОБОЧНОГО СУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ

Поступила 25.06.14

Азидин (беренил, интервет) – протистицидный препарат на основе диминазена ацетурата – широко используется в ветеринарной практике для лечения и профилактики пироплазмоза, бабезиозов и тейлериоза. Азидин не применяют для лечения людей из-за серьезных побочных эффектов, в частности возможности инициации судорожной активности. Мы исследовали влияние азидина на вызванные ГАМК-эргические постсинаптические токи (ПСТ) в культуре нейронов гиппокампа с использованием методики пэтч-клэмп. Было обнаружено, что азидин в концентрации, эквивалентной 40 мкМ диминазена ацетурата, уменьшает амплитуду вызванных ГАМК-эргических ПСТ более чем в два раза в течение 3–4 мин после приложения. Поскольку концентрация диминазена в сыворотке крови после его инъекций в лечебных целях может достигать 45 мкМ, представляется весьма вероятным, что побочный судорожный эффект азидина в основном обусловлен угнетением ГАМК-эргической передачи. Одновременное введение азидина с положительными модуляторами ГАМК-рецепторов может рассматриваться как прием, позволяющий минимизировать этот побочный эффект.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** диминазена ацетурат (азидин, беренил), побочные эффекты, судорожная активность, ГАМК-эргическая синаптическая передача.

### ВВЕДЕНИЕ

Азидин (беренил, интервет) – препарат на основе диминазена ацетурата, который широко используется в ветеринарной практике для лечения и профилактики опасных протозойных инфекций (пироплазмоза, бабезиозов и тейлериоза). Азидин не применяют для лечения людей из-за возможности серьезных побочных эффектов, в частности индукции судорожной активности. Мы предположили, что подобный побочный эффект связан с подавлением тормозной ГАМК-эргической синаптической передачи под воздействием данного препарата. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние азидина на вызванные ГАМК-эргические постсинаптические токи (ПСТ) в культуре нейронов гиппокампа крысы.

### МЕТОДИКА

Исследование проводили на культивируемых нейронах гиппокампа крысы. Методика приготовления и поддержания культуры была описана ранее [1]. Примененная методика позволяет регистрировать ПСТ, вызываемые в исследуемом нейроне электрической стимуляцией единичной пресинаптической клетки. Для отведения трансмембранных токов в постсинаптическом нейроне использовали метод фиксации потенциала в режиме «целая клетка». Возбуждение визуально наблюдаемого пресинаптического нейрона осуществляли с помощью внеклеточного электрода, подведенного к соме или аксону этой клетки. В большинстве экспериментов внутриклеточный раствор содержал в себе (в миллимолях на 1 л): цезия глюконат – 100, CsCl – 30, MgCl<sub>2</sub> – 4, Na<sub>2</sub>ATP – 4, EGTA – 10, HEPES – 3, а внеклеточный – NaCl – 140, KCl – 4, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10. У обоих растворов pH равнялся 7.4. Электрофизиологические измерения проводились в присутствии во внеклеточном растворе 20 мкМ APV и

<sup>1</sup> Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

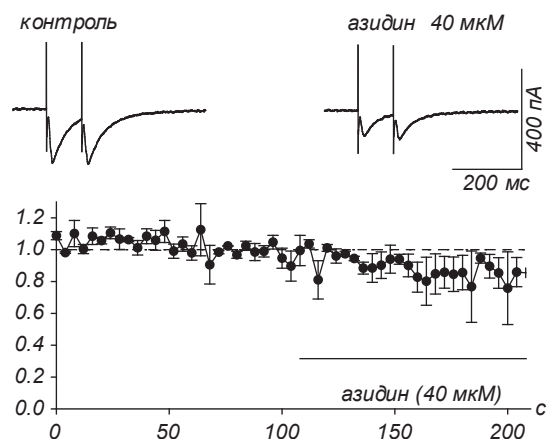
Эл. почта: siva@biph.kiev.ua (С. Ю. Иванова).

10 мкМ CNQX, что обеспечивало блокирование си-наптических токов, опосредуемых ионотропными глутаматными рецепторами. В работе использовали препарат Азидин-вет («Бровафарма», Украина). Эксперименты проводили при комнатной температуре (20–22 °С). Числовые результаты представлены как средние ± ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах использовался протокол стимуляции, подобный описанному ранее [2]. Раздражение пресинаптического нейрона осуществлялось парами стимулов, что позволяло не только оценить параметры ПСТ как таковых, но и определить коэффициент парной стимуляции (КПС – отношение амплитуд второго и первого тормозящего ПСТ (ТПСТ) в паре), т. е. параметр, позволяющий получить дополнительную информацию о механизмах модулирующего действия активных веществ [2]. Оказалось, что азидин в концентрации, эквивалентной 40 мкМ диминазена ацетурата, уменьшал амплитуду вызванных ГАМК-эргических ТПСТ в среднем более чем в два раза в течение 3–4 мин после аппликации (количество тестируемых клеток  $n = 9$ ). Как видно из рисунка, аппликация азидина приводила к значительному уменьшению амплитуд и первого, и второго ГАМК-эргических ТПСТ в паре. Это, однако, не сопровождалось существенными изменениями КПС.

Какие-либо сведения о том, что диминазена ацетурат способен оказывать прямое блокирующее действие на ГАМК-управляющие каналы, отсутствуют. Учитывая то, что влияние азидина на ГАМК-эргические ПСТ проявлялось сравнительно быстро, маловероятно, что данный эффект связан с действием диминазена на репликацию ДНК [3]. В связи с этим следует упомянуть, что, как было обнаружено, диминазена ацетурат эффективно блокирует не ГАМК-, а протонактивируемые каналы [4], причем такие изменения проявляются достаточно быстро [5]. Возможно, что в нашем случае воздействие диминазена ацетурата на ГАМК-эргическую передачу обусловлено его действием на упомянутые протонактивируемые каналы. В пользу этого предположения можно привести данные о действии амилорида – другого блокатора протонактивируемых каналов – на ответы, вызванные приложением экзогенной ГАМК [6, 7], и на ГАМК-опосредуемые ПСТ [8]. Недавно были получены указания на то,



Подавление ГАМК-эргических тормозных постсинаптических токов (ТПСТ) в культуре нейронов гиппокампа под влиянием азидина.

А – примеры регистраций ТПСТ до и после приложения азидина; Б – временное течение изменений коэффициента парной стимуляции в условиях аппликации азидина. По оси абсцисс – время, с; по оси ординат – значения отношения амплитуд второго и первого ТПСТ в паре при межстимульном интервале 100 мс.

Пригнічення ГАМК-ергічних гальмівних постсинаптичних струмів у культурі нейронів гіпокампа під впливом азидину.

что функциональное взаимодействие ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов и каналов ASIC1a вполне возможно; был идентифицирован белковый комплекс, включающий в себя упомянутые рецепторы [9].

Известно, что бикуккуллин, подавляя ГАМК-эргическую синаптическую передачу, вызывает эпилептиформную активность *in vitro* и существенно влияет на фоновую и вызванную импульсную активность нейронов коры *in vivo* у бодрствующих животных [9]. Очевидно, в физиологических условиях система ГАМК-эргических нейронов оказывает постоянное тормозное влияние на пирамидные нейроны, а подавление этого торможения под действием того или иного фактора может приводить к индукции судорожной активности. Таким образом, подавление ГАМК-эргической передачи под влиянием азидина, наблюдавшееся в нашей работе в культуре нейронов, на уровне организма вполне может вызывать появление судорог. Во многих случаях начальная концентрация диминазена ацетурата в сыворотке крови животных после его инъекции в лечебных целях достигает 45 мкМ [10], хотя обычно соответствующие значения ниже. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что основной причиной побочного судорожного эффекта азидина может оказаться угнетение ГАМК-эргической синаптической передачи. По-

этому совместное введение азидина с модуляторами указанной передачи, усиливающими тормозное влияние ГАМК-системы на нейроны ЦНС, может рассматриваться как возможный терапевтический прием, способный минимизировать конвульсивное побочное действие рассматриваемого препарата.

Исследования были выполнены согласно положениям Международной конвенции по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1985), а также в соответствии с положениями Комитета по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

Авторы настоящей работы – С. Ю. Иванова, Л. М. Николаенко и М. В. Сторожук – подтверждают, что при выполнении исследования и публикации его результатов отсутствовали какие-либо конфликты, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями и/или лицами, которые могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

С. Ю. Иванова<sup>1</sup>, Л. М. Николаенко<sup>1</sup>, М. В. Сторожук<sup>1</sup>

#### ПРИГНІЧЕННЯ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ АЗИДИНОМ ЯК МОЖЛИВИЙ МЕХАНІЗМ ЙОГО ПОБІЧНОЇ СУДОМНОЇ ДІЇ

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Азидин (беренил, интервет) – протистицидний препарат на основі диміназени ацетурату – широко використовується у ветеринарній практиці для лікування і профілактики піроплазмозу, бабезіозу та тейлеріозу. Азидин не застосовують для лікування людей через серйозні побічні ефекти, зокрема можливість ініціації судомної активності. Ми досліджували вплив азидину на викликані ГАМК-ергічні постсинаптичні струми (ПСС) у культурі нейронів гіпокампа з використанням методики петч-клемп. Було виявлено, що азидин в концентрації, еквівалентній 40 мкМ диміназени ацетурату, зменшує амплітуду викликаних ГАМК-ергічних ПСС більш ніж у два рази протягом 3–4 хв після аплікації. Оскільки концентрація диміназени в сироватці крові після його ін'єкцій у лікувальних цілях може досягати 45 мкМ, е

досить вірогідним, що побічний судомний ефект азидину в основному є зумовлений пригніченням ГАМК-ергічної передачі. Одночасне введення азидину з позитивними модуляторами ГАМК-рецепторів може розглядатись як спосіб, що дозволяє мінімізувати цей побічний ефект.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. Y. Ivanova, I. V. Lushnikova, T. A. Pivneva, et al., "Differential properties of GABAergic synaptic connections in rat hippocampal cell cultures," *Synapse*, **53**, No. 2, 122-130 (2004).
2. S. Y. Ivanova, M. V. Storozhuk, and P. G. Kostyuk, "Changes in paired pulse depression as an indicator for the involvement of presynaptic mechanism(s) in modulation of GABA-ergic synaptic transmission in rat hippocampal cell cultures," *Neurophysiology*, **34**, Nos. 2/3, 144-146 (2002).
3. T. E. Snowden, Y. M. Pan, and M. S. Valenzuela, "Inhibition of DNA replication by berenil of bacterial plasmids containing poly(dA)-poly(dT) sequences. 2D gel analysis of replicative intermediates," *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)*, **48 Online Pub.**, OL279-OL288 (2002).
4. X. Chen, L. Qiu, M. Li, et al., "Diarylaminides: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels," *Neuropharmacology*, **58**, No. 7, 1045-1053 (2010).
5. X. Chen, P. Whissell, B. A. Orser, and J. F. MacDonald, "Functional modifications of acid-sensing ion channels by ligand-gated chloride channels," *PLoS One*, **6**, No. 7, e21970 (2011).
6. F. Liu, M. Zhang, Z. Q. Tang, et al., "Inhibitory effects of amiloride on the current mediated by native GABA(A) receptors in cultured neurons of rat inferior colliculus," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **37**, No. 4, 435-440 (2010).
7. J. L. Fisher, "Amiloride inhibition of gamma-aminobutyric acid(A) receptors depends upon the alpha subunit subtype," *Mol. Pharmacol.*, **61**, No. 6, 1322-1328 (2002).
8. C. J. Dietrich and M. Morad, "Synaptic acidification enhances GABA<sub>A</sub> signaling," *J. Neurosci.*, **30**, No. 47, 16044-16052 (2010).
9. D. Zhao, N. Ning, Z. Lei, et al., "Identification of a novel protein complex containing ASIC1a and GABA<sub>A</sub> receptors and their interregulation," *PLoS One*, **9**, No. 6, e99735 (2014).
10. V. M. Storozhuk, "Dopaminergic modulation of the neuron activity in the cerebral cortex of the wakeful animal," *Crit. Rev. Neurobiol.*, **20**, 1-141 (2008).
11. D. M. Millera, G. E. Swanb, R. G. Lobettia, and L. S. Jacobsona, "The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs," *J. South Afr. Veterin. Ass.*, **76**, No. 3, 146-150 (2005).