

УДК 612.57

**ВЛИЯНИЕ ДИАЗЕПАМА И ГЕПАРИНА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»**

© 2014 г.

*А.Е. Хомутов,<sup>1</sup> К.А. Пурсанов,<sup>2</sup> О.В. Лушникова,<sup>2</sup>  
Ю.А. Романова<sup>1</sup>*<sup>1</sup>Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия

kfg@bio.unn.ru

*Поступила в редакцию 11.02.2014*

В опытах на крысах изучено действие диазепама, гепарина и протамина сульфата на поведение животных в тесте «открытое поле». Показано, что диазепам значительно снижает показатели таких поведенческих актов, как локомоция, вертикальные стойки, замирание, обнюхивание и груминг. Экзогенный гепарин блокирует эффекты диазепама, а протамина сульфат их потенцирует. Высказано предположение, что гепарин является антагонистом бензодиазепиновых рецепторов.

*Ключевые слова:* диазепам, гепарин, протамин сульфат, тест «открытое поле».

**Введение**

Диазепам – один из основных транквилизаторов, являющийся агонистом бензодиазепиновых рецепторов. Препарат снимает эмоциональное напряжение, уменьшает чувство тревоги, страха, беспокойства; оказывает миорелаксантное, противосудорожное и умеренное снотворное действие; усиливает действие снотворных, наркотических, нейролептических, анальгетических препаратов, алкоголя [1].

Среди производных бензодиазепаина до настоящего времени не найдено соединения, которое бы блокировало действие агонистов на уровне бензодиазепиновых рецепторов. Однако в ряду имидодиазепинов было обнаружено вещество Ro15-1788, которое сильно ингибирует связывание <sup>3</sup>H-диазепама с мембранами синапсом головного мозга, но само по себе не обладает бензодиазепиноподобными поведенческими и нейрофизиологическими эффектами. Детальный анализ показал, что Ro15-1788 селективно ингибирует все центральные эффекты бензодиазепинов за счет конкурентного взаимодействия с ними за связывание с бензодиазепиновыми рецепторами. Важно отметить, что Ro15-1788 является антагонистом только бензодиазепинов, но не других веществ, угнетающе действующих на ЦНС: этанола, фенобарбитала, галоперидола и др. [2].

Учитывая феномен полифункционального действия гепарина, его участие в эндогенной регуляции функций [3–9], определенный интерес представляет исследование двигательной и эмоциональной активности животных при композиционном введении диазепама и гепарина.

**Материал и методы**

Работа выполнена на 60 белых лабораторных крысах-самцах массой 200±10 г, находящихся на общем рационе вивария.

Установка для тестирования поведенческих реакций крыс в «открытом поле» представляет собой прямоугольную камеру 100×100 см с пластмассовыми стенками высотой 40 см. Пол изготовлен из белого пластика, на нем черной краской нанесена решетка, делящая его на 25 равных квадратов 20×20 см. Освещенность площадки во время опыта 200 Лк.

Животное помещается в центральный квадрат, и за ним ведется наблюдение. Визуально подсчитывается количество отдельных поведенческих актов. Запись осуществляется вручную с последующей обработкой на компьютере, каждому поведенческому акту соответствует собственный код: локомоция, замирание, вертикальная стойка, обнюхивание и груминг [10–12].

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена с помощью программы «Биостат». Для сравнения нескольких групп использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Стьюдента для множественных сравнений.

**Результаты и их обсуждение**

При внутрибрюшинном введении диазепама в дозе 1.0 мг/кг в течение 1 часа локомоторная активность крыс резко падает с 44.6±4.8 актов/5 мин в контроле до 4.0±0.6 актов/5 мин. Через 6 часов после введения отмечается тенденция к восстановлению локомоторной активности, а

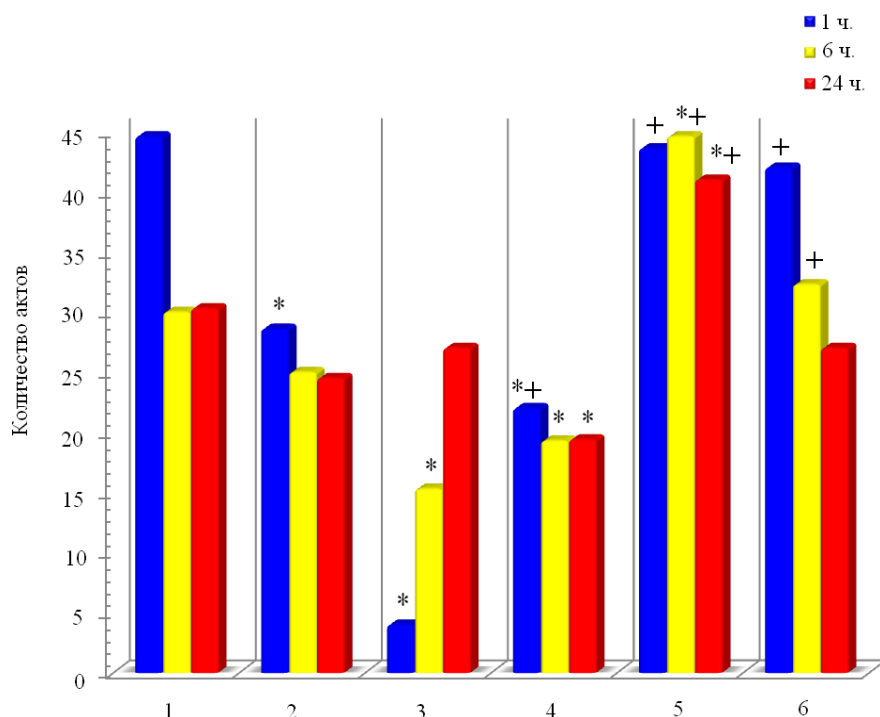


Рис. 1. Локомоция крыс в тесте «открытое поле» при введении диазепама и гепарина: 1 – физиологический раствор (контроль); 2 – гепарин (500 МЕ/кг); 3 – диазепам (1.0 мг/кг); 4 – диазепам (1.0 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг); 5 – гепарин (500 МЕ/кг) → диазепам (1.0 мг/кг); 6 – гепарин (500 МЕ/мл)+диазепам (2 мг/мл).

\* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ( $p \leq 0.05$ ); + различия между группами диазепам и диазепам – гепарин статистически значимы ( $p \leq 0.05$ )

Таблица 1

Локомоция крыс в тесте «открытое поле» при введении диазепама и протамина сульфата

Условия эксперимента	Время от введения, ч		
	1	6	24
Интактные крысы	44.0±5.6	43.0±4.4	42.3±5.1
Физиологический раствор (контроль)	44.6±4.2	30.0±3.8	30.3±4.2
Протамина сульфат (10 мг/кг)	38.6±3.1	28.6±1.9	26.9±5.4
Диазепам (1.0 мг/кг)	4.0±0.6*	15.3±1.7*	27.0±4.7
Диазепам (1.0 мг/кг) → протамин (10 мг/кг)	5.5±0.7*	4.0±0.5*+	9.7±0.9*+

\* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ( $p \leq 0.05$ );

+ различия между группами диазепам и диазепам → протамин сульфат статистически значимы ( $p \leq 0.05$ ).

через 24 часа показатели двигательной активности не отличаются от контрольных величин (рис. 1).

Введение диазепама в различных комбинациях с гепарином снижает его гиподинамический эффект. Так, при введении транквилизатора на фоне предварительной инъекции гепарина в дозе 500 МЕ/кг или введение исследуемых веществ в виде смеси, предварительно инкубированной в течение 15 мин при температуре 37°C, показатели локомоции достоверно не отличаются от контрольных величин (рис. 1).

При введении гепарина (500 МЕ/кг) на фоне действия тестовой дозы диазепама показатели локомоции в течение 24 часов не достигают контрольных величин, однако через 1 час после введения исследуемых веществ величина локо-

моции достоверно ( $p \leq 0.05$ ) равна таковой при введении диазепама (рис. 1).

Иная картина наблюдается при введении протамина сульфата на фоне действия диазепама. В этом случае показатели локомоторной активности в течение 24 часов достоверно ниже и контрольных величин, и показателей группы животных, которым инъецировали только диазепам (табл. 1).

Оценка таких поведенческих актов, как замирание, обнюхивание, вертикальные стойки и груминг показала, что как экзогенный, так и эндогенный гепарин модифицируют поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле». Так, количество вертикальных стоек как при раздельном, так и при совместном введении диазепама с гепарином в большинстве случаев

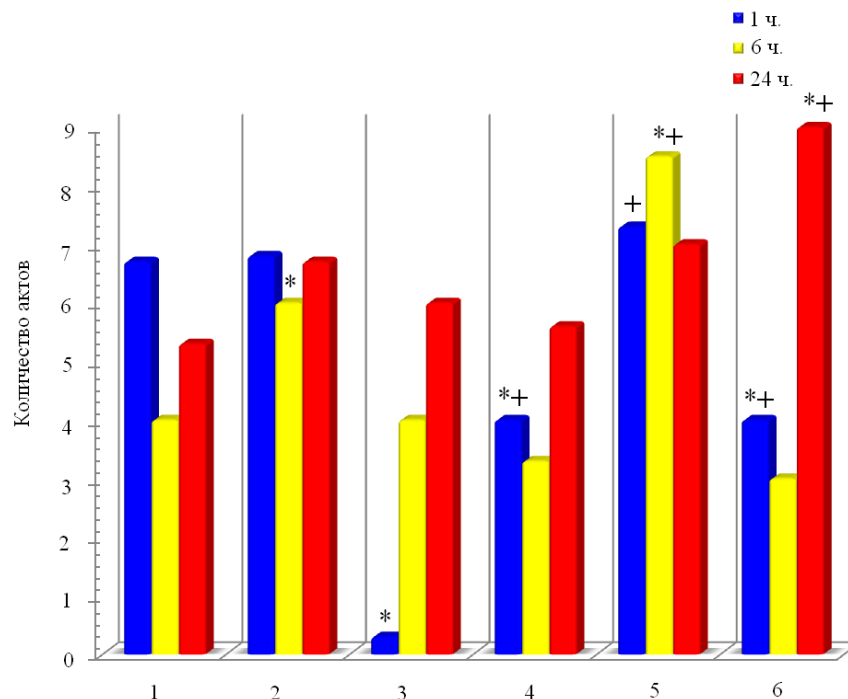


Рис. 2. Вертикальные стойки крыс в тесте «открытое поле» при введении диазепама и гепарина: 1 – физиологический раствор (контроль); 2 – гепарин (500 МЕ/кг); 3 – диазепам (1.0 мг/кг); 4 – диазепам (1.0 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг); 5 – гепарин (500 МЕ/кг) → диазепам (1.0 мг/кг); 6 – гепарин (500 МЕ/мл)+диазепам (2 мг/мл).

\* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ( $p \leq 0.05$ );

+ различия между группами диазепам и диазепам – гепарин статистически значимы ( $p \leq 0.05$ )

достоверно ( $p \leq 0.05$ ) отличается от контроля (рис. 2).

Блокада эндогенного гепарина протамина сульфатом, являющимся классическим антагонистом гепарина, сопровождается резким снижением количества вертикальных стоек. В течение 6 часов наблюдается полное отсутствие данного показателя, и только через 24 часа показатель вертикальных стоек составляет  $1.0 \pm 0.07$  актов/5 мин против  $6.0 \pm 0.5$  актов/5 мин при введении диазепама.

Диазепам в дозе 1 мг/кг снижает показатели таких поведенческих актов как замирание, обнюхивание, груминг в течение 1 часа после введения, а через 6 и 24 ч достоверные отличия от контрольных величин отсутствуют (табл. 2).

Необходимо отметить, что гепарин в дозе 500 МЕ/кг через 6 часов после введения достоверно снижает количество таких поведенческих актов, как замирание, обнюхивание, груминг, однако через сутки происходит полное восстановление исходных показателей (табл. 2). В отличие от гепарина, протамина сульфат в дозе 10 мг/кг не изменяет эффективность поведенческих актов относительно контрольных величин.

Гепарин как при предварительном, так и при совместном в виде смеси введении снижает седативные свойства диазепама, особенно ярко

этот эффект выражен при предварительной инъекции мукополисахарида. В этом случае через 1 час после введения диазепама количество поведенческих актов замирания, обнюхивания и груминга составляет  $2.0 \pm 0.3$ ,  $2.3 \pm 0.3$ ,  $0.3 \pm 0.04$  актов/5 мин соответственно, а при действии диазепама на фоне введения гепарина –  $6.3 \pm 1.5$ ,  $5.0 \pm 0.8$ ,  $1.3 \pm 0.1$  актов/5 мин (табл. 2).

Введение диазепама с последующей инъекцией протамина сульфата (через 10 мин) сопровождается снижением показателей поведенческих реакций через 6 и 24 ч после воздействия. Так, количество актов замирания, обнюхивания и груминга при введении диазепама через 6 часов воздействия составляет  $4.0 \pm 0.8$ ,  $5.0 \pm 0.8$ ,  $2.7 \pm 0.3$  актов/5 мин соответственно, а при композиционном воздействии по схеме диазепам (1.0 мг/кг) → протамина сульфат (10 мг/кг) количество исследуемых поведенческих актов соответствует  $1.3 \pm 0.2$ ,  $1.0 \pm 0.1$ ,  $0.3 \pm 0.01$  актов/5 мин (табл. 2).

Таким образом, экзогенный и эндогенный гепарин снижают эффективность седативного действия диазепама на лабораторных крыс, изменяя параметры двигательной активности, эмоционального напряжения, агрессии и исследовательского поведения, связанных с бензодиазепиновыми рецепторами.

Таблица 2

## Влияние диазепама, гепарина и протамина сульфата на поведение крыс в тесте «открытое поле»

Условия эксперимента	Время от введения, ч	Поведенческие акты		
		замирание	обнюхивание	груминг
Физиологический раствор (контроль)	1	5.4±1.0	5.4±0.6	4.2±0.6
	6	5.8±1.1	4.7±0.6	2.0±0.2
	24	3.7±0.4	5.0±0.5	3.8±0.6
Гепарин (500 МЕ/кг)	1	5.0±0.8	6.0±1.0	2.8±0.3*
	6	3.8±0.5*	2.0±0.2*	1.0±0.1*
	24	2.3±0.3	4.7±0.7	3.0±0.4
Диазепам (1 мг/кг)	1	2.0±0.3*	2.3±0.3*	0.3±0.04*
	6	4.0±0.8	5.0±0.8	2.7±0.3
	24	4.3±0.5	5.0±0.3	2.3±0.3
Диазепам (1.0 мг/кг) → гепарин (500МЕ/кг)	1	3.3±0.6*	3.0±0.5*	0.7±0.02* <sup>+</sup>
	6	3.0±0.6*	2.0±0.3* <sup>+</sup>	1.3±0.2* <sup>+</sup>
	24	5.7±0.7*	6.0±0.9	1.3±0.1* <sup>+</sup>
Гепарин (500 МЕ/кг) → диазепам (1.0 мг/кг)	1	6.3±1.5 <sup>+</sup>	5.0±0.8 <sup>+</sup>	1.3±0.1* <sup>+</sup>
	6	5.0±0.5	7.7±1.8* <sup>+</sup>	1.6±0.4 <sup>+</sup>
	24	7.4±1.2* <sup>+</sup>	8.0±1.3* <sup>+</sup>	1.6±0.8*
Гепарин (500 МЕ/мл) + диазепам (2 мг/мл)	1	3.0±0.8* <sup>+</sup>	1.7±0.2*	0.3±0.01*
	6	4.3±0.5	3.6±0.3	0.3±0.05* <sup>+</sup>
	24	4.0±0.4	8.7±1.4* <sup>+</sup>	1.0±0.09* <sup>+</sup>
Диазепам (1.0 мг/кг) → протамина сульфат (10 мг/кг)	1	2.3±0.7*	0.5±0.1* <sup>+</sup>	0.2±0.01*
	6	1.3±0.2* <sup>+</sup>	1.0±0.1* <sup>+</sup>	0.3±0.01* <sup>+</sup>
	24	2.8±0.5 <sup>+</sup>	2.3±0.4* <sup>+</sup>	1.3±0.1* <sup>+</sup>

\* Различия между контрольными и экспериментальными группами статистически значимы ( $p \leq 0.05$ );

+ различия между группами диазепама и экспериментальными группами статистически значимы ( $p \leq 0.05$ ).

Как уже указывалось выше, диазепам является агонистом бензодиазепиновых рецепторов. Основным антагонистом бензодиазепиновых рецепторов является Ro15-1788, который селективно ингибирует все центральные эффекты бензодиазепинов за счет конкурентного взаимодействия с ними за связывание с бензодиазепиновыми рецепторами. Возможно, что гепарин обладает сходными с Ro15-1788 свойствами, то есть является антагонистом бензодиазепиновых рецепторов, за счет чего происходит снижение, а иногда и полное блокирование эффектов диазепама.

## Список литературы

1. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы. Волгоград: Изд-во «Семь ветров», 1999. 680 с.
2. Cusack B., Nelson A., Richelson E. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds // *Psychopharmacology*. 1994. V. 114. P. 559–565.
3. Кудряшов Б.А. Проблемы регуляции жидкого состояния крови и взаимоотношение свертывающей и противосвертывающей систем // *Успехи физиологических наук*. 1970. Т. 1. № 4. С. 17–20.
4. Ляпина Л.А. Физиологические функции гепарина // *Успехи современной биологии*. 1987. Т. 103. № 1. С. 66–80.
5. Кондашевская М.В., Макарова О.В. Воздействие курсового введения гепарина на ангиоархитектонику, процессы репарации и цитофизиологическое состояние тучных клеток крыс Вистар // *В сб. науч.*

трудов II Съезда Российского общества патологоанат. М.: Медицина, 2006. С. 321–323.

6. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Перепелюк З.В. Влияние гепарина на нейротропную активность далагина // *Materialy VIII Mezinarodni Vedecko-Prakticka conference «Moderni Vymozenosti Vedy – 2012»*. Praga: Education and Science, 2012. P. 34–39.

7. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Перепелюк З.В. Модификация гепарином кардиотропных эффектов тиролиберина на модели изолированного сердца крысы после тотальной ишемии // *Materialy VIII Mezinarodni Vedecko-Prakticka conference «Moderni Vymozenosti Vedy – 2012»*. Praha: Education and Science, 2012. P. 11–18.

8. Хомутов А.Е., Звонкова М.Б., Малиновский Д.С. Гепарин – антигипотензивное средство при отравлении пчелиным ядом // *Пчеловодство*. 2012. № 6. С. 58–59.

9. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Лушникова О.В., Слободянюк В.С., Перепелюк З.В., Романова Ю.А. Влияние гепарина на продолжительность наркотического сна и гиподинамию крыс // *Матер. XIV Международной заочной науч.-практ. конф. «Инновации в науке»*. Новосибирск: СибАК. 2012. С. 44–55.

10. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 399 с.

11. Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г. Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 155. № 3. С. 268–270.

12. Середенин С.Б., Надорова А.В., Колик Л.Г., Яркова М.А. Анализ эффектов феназепам у мышей C57B1/6 и BALB/c в тесте «открытое поле» при совместном введении с налоксоном // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 3. С. 323–326.

### DIAZEPAM AND HEPARIN INFLUENCE ON BEHAVIORAL REACTIONS OF RATS IN THE OPEN FIELD TEST

*A.E. Khomutov, K.A. Pursanov, O.V. Lushnikova, Yu.A. Romanova*

The effects of diazepam, heparin and protamine sulfate on the behavior of rats in the open field test have been studied. Diazepam has been shown to significantly reduce indicators of such behavioral acts as locomotion, vertical position, stupor, sniffing and grooming. Exogenous heparin blocks the diazepam effects, while protamine sulfate potentiates them. The authors suggest that heparin is an antagonist of benzodiazepine receptors.

*Keywords:* diazepam, heparin, protamine sulfate, open field test.

#### References

1. Sergeev P.V., Shimanovskij N.L., Petrov V.I. Receptory. Volgograd: Izd-vo «Sem' vetrov», 1999. 680 s.
2. Cusack B., Nelson A., Richelson E. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds // *Psychopharmacology*. 1994. V. 114. P. 559–565.
3. Kudryashov B.A. Problemy regulyatsii zhidkogo sostoyaniya krovi i vzaimootnoshenie svertyvayushchej i protivosvertyvayushchej sistem // *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 1970. T. 1. № 4. S. 17–20.
4. Lyapina L.A. Fiziologicheskie funktsii geparina // *Uspekhi sovremennoj biologii*. 1987. T. 103. № 1. S. 66–80.
5. Kondashevskaya M.V., Makarova O.V. Vozdejstvie kursovogo vvedeniya geparina na angioarhitektoniku, processy reparatsii i citofiziologicheskoe sostoyanie tuchnykh kletok krysv Vistar // *V sb. nauch. trudov II S'ezda Rossijskogo obshchestva patologoanatomov*. M.: Medicina, 2006. S. 321–323.
6. Homutov A.E., Pursanov K.A., Perepelyuk Z.V. Vliyanie geparina na nejrotropnyuyu aktivnost' dalarginina // *Materialy VIII Mezinarodni Vedecko-Praktika sonferentsy «Moderni Vymozhenosti Vedy – 2012»*. Praha: Education and Science, 2012. R. 34–39.
7. Homutov A.E., Pursanov K.A., Perepelyuk Z.V. Modifikatsiya geparinom kardiotropnykh ehffektov tiroli-berina na modeli izolirovannogo serdca krysy posle total'noj ishemii // *Materialy VIII Mezinarodni Vedecko-Praktika sonferentsy «Moderni Vymozhenosti Vedy – 2012»*. Praha: Education and Science, 2012. P. 11–18.
8. Homutov A.E., Zvonkova M.B., Malinovskij D.S. Geparin – antigipotenzivnoe sredstvo pri otravlenii pchelinyim yadom // *Pchelovodstvo*. 2012. № 6. S. 58–59.
9. Homutov A.E., Pursanov K.A., Lushnikova O.V., Slobodyanyuk V.S., Perepelyuk Z.V., Romanova Yu.A. Vliyanie geparina na prodolzhitel'nost' narkoticheskogo sna i gipodinamiyu krysv // *Mater. XIV Mezhdunar. zaochnoj nauch.-prakt. konf. «Innovatsii v nauke»*. Novosibirsk: SibAK. 2012. S. 44–55.
10. Buresh Ya., Bureshova O., H'yuston D.P. Metodiki i osnovnye ehksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya. M.: Vysshaya shkola, 1991. 399 s.
11. Sudakov S.K., Nazarova G.A., Alekseeva E.V., Bashkatova V.G. Opredelenie urovnya trevozhnosti u krysv: raskhozhdenie rezul'tatov v testah «otkrytoe pole», «krestoobraznyj pripodnyatyj labirint» i teste Fogelya // *Byul. ehksperimental'noj biologii i mediciny*. 2013. T. 155. № 3. S. 268–270.
12. Seredenin S.B., Nadorova A.V., Kolik L.G., Yarkova M.A. Analiz ehffektov fenzepama u myshej S57V1/6 i VALV/s v teste «otkrytoe pole» pri sovmestnom vvedenii s naloksonom // *Byul. ehksperimental'noj biologii i mediciny*. 2013. T. 155. № 3. S. 323–326.