

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

Капица И.Г., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.

## Влияние афобазола на изменения в раннем постнатальном периоде у мышей линии BALB/c с фетальным вальпроатным синдромом

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»,  
Россия, 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

**Введение.** Воздействие вальпроевой кислоты во время беременности у грызунов широко используется для моделирования расстройств аутистического спектра (РАС).

**Цель исследования** – изучение ранних поведенческих изменений у мышей BALB/c, пренатально подвергшихся однократному воздействию натриевой соли вальпроевой кислоты (400 мг/кг), и возможности их коррекции афобазолом.

**Методика.** Объект исследования – мыши линии BALB/c с фетальным вальпроат-синдромом (ФВС), которым с 7-х по 14-е сут постнатального развития перорально ежедневно вводили афобазол (10 мг/кг) или 0,9% раствор хлорида натрия. Контрольная группа получала 0,9% раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г массы). Состояние мышат изучали с 6-х по 14-е сут постнатального развития, оценивали их физическое развитие, скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов, эмоционально-двигательное поведение и точную координацию движений при помощи батареи «развитийных» тестов.

**Результаты.** Введение самкам мышей на 13-й день беременности вальпроевой кислоты приводило к отставанию созревания у потомства сенсорно-двигательных рефлексов, нарушению эмоционально-двигательного поведения и координации движений в гнездовом периоде. Афобазол, при введении 10 мг/кг перорально ежедневно, начиная с 7-х сут постнатального развития мышам с ФВС, корригировал отмеченные нарушения в тестах, отражающих нарушения развития нервной системы.

**Заключение.** Установлены корригирующие свойства афобазола в отношении нарушений, вызванных пренатальным введением ВПК, что определяет целесообразность дальнейшего изучения афобазола на моделях РАС.

**Ключевые слова:** расстройства аутистического спектра (РАС); фетальный вальпроатный синдром (ФВС); мыши линии BALB/c; раннее постнатальное развитие; афобазол

**Для цитирования:** Капица И.Г., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Влияние афобазола на изменения в раннем постнатальном периоде у мышей линии BALB/c с фетальным вальпроатным синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 12-21.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.12-21

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Капица И.Г., Воронина Т.А., Середенин С.Б.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка, написание текста – Алымов А.А., Капица И.Г.; редактирование – Капица И.Г., Воронина Т.А., Середенин С.Б.

**Для корреспонденции:** Капица Инга Геннадиевна, e-mail: ingakap73@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме № 0521-2019-0007.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.08.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

Kapitsa I.G., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B.

### Effect of afobazole on early postnatal changes in BALB/c mice with fetal valproate syndrome

V.V. Zakusov Institute of Pharmacology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

**Introduction.** Exposure of rodents to valproic acid during pregnancy is associated with increased incidence of autism spectrum disorders, and has been extensively used as an appropriate model of autism.

**Aim.** To study early behavioral changes in BALB/c mice prenatally exposed to a single dose of valproic acid sodium salt (400 mg/kg) and a possibility of correcting these changes with afobazole.

**Methods.** The study was performed on BALB/c mice with fetal valproate syndrome (FVS). The mice were daily injected orally afobazole 10 mg/kg or 0.9% sodium chloride from day 7 to day 14 of the postnatal development. The control group was injected

with an equivalent volume (0.1 ml per 10 g body weight) of 0.9% sodium chloride. The condition of mice was studied from day 6 to day 14 of the postnatal development with evaluation of their physical development, maturation rate of sensory-motor reflexes, emotional-motor behavior, and precise coordination using a battery of «developmental» tests.

**Results.** Administration of valproic acid to female mice on the 13th day of pregnancy led to delayed maturation of the offspring's sensory-motor reflexes, impaired emotional-motor behavior and coordination of movements during the nesting period. Afobazole administered to mice with fetal valproate syndrome from day 7 to day 14 of the postnatal development at a dose of 10 mg/kg (daily, orally), corrected the disorders in the tests used for assessing retardation or disruption of nervous system development.

**Keywords:** autism spectrum disorders; ASD; fetal valproate syndrome; FVS; BALB/c mice; early postnatal phase; afobazole

**For citation:** Kapitsa I.G., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Effect of afobazole on early postnatal changes in BALB/c mice with fetal valproate syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(1): 12-21. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.12-21

**Contribution of authors:** the concept and design of the study – Kapitsa I.G., Voronina T.A., Seredenin S.B.; collection and processing of material, preparing illustrative material, statistical processing, writing a text – Alymov A.A., Kapitsa I.G.; editing – Kapitsa I.G., Voronina T.A., Seredenin S.B.

**For correspondence:** Inga G. Kapitsa, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Zakusov institute of pharmacology», e-mail: ingakap73@mail.ru

**Acknowledgment.** The study was carried out within the framework of the State Assignment on topic No. 0521-2019-0007

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

#### Information about the authors:

Kapitsa I.G., <https://orcid.org/0000-0003-4487-0991>

Alymov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7298-5791>

Voronina T.A., <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Seredenin S.B., <https://orcid.org/0000-0003-4482-9331>

Received 18.08.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

## Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) – группа нарушений развития, характеризующаяся дефицитом социального взаимодействия, вербальной и невербальной коммуникаций, стереотипным поведением и ограничением интересов. Проявления заболевания у пациентов с РАС в основном регистрируют начиная с 16-18 месяцев жизни [1], однако уже на ранних стадиях жизни наблюдаются колебания массы тела [2], аномальное развитие мозга [3], нарушения синаптической передачи, гиперактивность нейрональных связей, что приводит к характерным для заболевания поведенческим паттернам [1].

Вальпроевая кислота (ВПК) – противоэпилептическое средство, прием которого при беременности увеличивает риск врожденных пороков развития, задержки когнитивных функций и РАС [4], объединенных в понятие «фетальный вальпроат-синдром» (ФВС) [5]. В настоящее время модель ФВС у грызунов хорошо валидирована и широко используется в патофизиологических и фармакологических исследованиях [6-10]. В качестве объекта исследования при моделировании ФВС используются крысы и мыши разных линий, однако наиболее целесоо-

бразным нам представляется применение отобранных по фенотипу инбредных линий, в особенности мышей, которые демонстрируют социальные дефициты и стереотипное поведение, а также ряд сопряженных с РАС симптомов, относящиеся к моделям идиопатического РАС [11], что позволяет совместить в рамках одной экспериментальной модели факторы, влияющие на развитие РАС: генетические особенности животных и повреждающие факторы окружающей среды. Одним из подобных объектов является линия мышей BALB/c, обладающая фенотипическими поведенческими и нейроанатомическими особенностями, имеющих сходство с проявлениями при РАС у человека [12-14]. Разработанный в «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» анксиолитик афобазол [15], обладающий антиоксидантными, нейропротекторными, цитопротекторными свойствами [16], как было показано нами ранее, является перспективным средством для фармакотерапии РАС [17, 18]. Цель исследования – изучение особенностей нарушений в раннем гнездовом периоде жизни у мышей линии BALB/c с ФВС и возможности их коррекции афобазолом.

### Методика

Исследование проведено на 100 мышах линии BALB/c возрастом 6-14 сут, массой 2,0-3,0 г в начале исследования, родительское поколение которых было получено из филиала «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ ФМБА». Мышей содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме 12ч/12ч (свет/темнота) и постоянной температуре (21-23 °С) со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) в полипропиленовых клетках с решеткой из цинкохромовой стали, с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки в соответствии с приказом МЗ РФ №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные 29.08.2014 г. N 51. Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

Для получения «датированной беременности» к 2-3-ем самкам мышей BALB/c, находящимся на стадии проэструса или эструса, определяемым по цитологической картине влагалищного мазка, с 17-и часов вечера до 9-и утра следующего дня, который впоследствии принимали за «0» (E0) день развития плода, подсаживали 1 самца. Оплодотворенных самок содержали по 4-5 особей в одной клетке до появления видимых признаков беременности, после чего размещали в индивидуальные клетки. РАС моделировали путем подкожного введения ВПК в дозе 400 мг/кг самкам мышей BALB/c на 13-й день беременности (E13) [9, 19]. Самкам, из потомства которых формировали группы «пассивного» контроля, в эти же сроки (E13) подкожно вводили 0,9% раствор хлорида натрия в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г веса). День появления мышат принимали за «0» сутки постнатального развития (P0). Полученное потомство было разделено на 6 групп: две группы «Контроль» – самцы ( $n=12$ ) и самки ( $n=15$ ); две группы «ВПК» – самцы ( $n=15$ ) и самки ( $n=24$ ) с фетальным вальпроат-синдромом (ФВС), рожденные от мышей, которым в период беременности вводили ВПК; и две опытные группы «ВПК+Афобазол» – самцы ( $n=14$ ) и самки ( $n=20$ ) с ФВС, которым начиная с P7 ежедневно вводили афобазол перорально (10 мг/кг). Животные контрольных групп с P7 перорально получали дистиллированную воду в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г веса).

Состояние мышат в гнездовом периоде изучали с P6 по P14, оценивая их физическое развитие, скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов, эмоционально-двигательное поведение и точную координацию движений при помощи батареи «развитийных» тестов [19, 20]. Для оценки физического развития мышат ежедневно взвешивали, а с P10 отслеживали их прозревание [7].

Способность поддерживать позу изучали при помощи тестов «переворачивание на плоскости», «избегание наклонной плоскости» и «избегание обрыва». Рефлекс переворачивания на плоскости оценивали в период с P6 по P10 – мышонка клали на спину и отмечали время, за которое он перевернется на лапы [19]. Максимальное время наблюдения составляло 30 с.

Тест «избегания обрыва» проводили с P7 по P10 [20]. Мышь располагали на краю коробки с гладкой поверхностью таким образом, чтобы пальцы передних лап и голова свисали над её краем и в течение 30 с фиксировали латентное время поворота или отползания от края коробки и число животных, выполнивших задачу.

Врожденная постуральная реакция грызунов на поворот на 180° из положения «головой вниз» в положение «головой вверх» на наклонной плоскости появляется у здоровых мышат уже на второй неделе жизни и считается тестом золотого стандарта для оценки рефлекторного развития, моторики, вестибулярного лабиринта и целостности мозжечка [21]. Тест «отрицательный геотаксис» проводили с P7 по P12 [19]. Мышь помещали на наклонную под 45° сетку длиной 30 см, головой по направлению со склона, и в течение 30 с фиксировали время поворота животного в направлении вверх по склону.

Тест «переворот в воздухе», отражающий степень созревания подкорковых структур, проводили с P10 по P14 [22]. Мышь удерживали за голову и таз, головой вверх, на расстоянии 30 см над мягкой поверхностью, после чего отпускали. Попытка считалась успешной, если мышь приземлялась на все четыре лапы. Фиксировали количество успешных попыток и число мышат, успешно выполнивших 3 попытки.

Тест «горизонтальная веревочка» проводили с P10 по P13 [20]. Мышь подвешивали за передние лапы на горизонтально натянутой веревочке диаметром 1 мм, расположенной на расстоянии 30 см над мягкой поверхностью, и в течение 30 с фиксировали время удержания на ней.

Тест «вздрагивание на хлопок» проводили с P10 по P14 [20]. На расстоянии 15 см от мыши осуществляли одиночный хлопок в ладоши и фиксировали наличие или отсутствие вздрагивания. Ушной рефлекс тестировали с P10 по P14 [20] проводя по внутренней по-

верхности уха нитью и фиксируя ответную реакции – одергивание уха.

Тест «предпочтение материнского запаха» позволяет оценить способность мышат распознавать запах гнезда, который является для них социально-значимым фактором. Тестирование проводили на P14 [21]. Мышат помещали в тестовую клетку Т/ЗС, одна треть которой была заполнена на глубину 3 см опилками из «домашней» клетки, центральная – чистыми опилками, а другая – опилками из «чужой» клетки. Каждой мышке предъявляли три 1-минутных посадки с интервалом 10 с. При каждой посадке мышат помещали в центральную часть клетки с чистыми опилками, причем при первой посадке их помещали головой к боковой стенке клетки, при второй – головой к опилкам с запахом гнезда и при третьей – головой по направлению к опилкам из «чужой» клетки. Фиксировали продолжительность нахождения мышат в секциях клетки во время каждой попытки.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica V. 10.0.». Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальных группах либо отсутствовало нормальное распределение, либо межгрупповое равенство дисперсий не соблюдалось, дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна-Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Для обработки данных, выраженных в %, использовали точный критерий Фишера. Результаты в таблицах представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего (Mean  $\pm$  SEM), или в виде данных, выраженных в %. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Масса тела самцов и самок мышат контрольной группы на P6 и P7 превышала соответствующие показатели групп животных, пренатально получавших ВПК (табл. 1). При изучении прироста массы тела с P7 по

P14 относительно P6 (фоновый показатель) как у самцов, так и у самок мышат группы «ВПК» отмечалось ее увеличение в сравнении с показателями контрольной группы. Афобазол нормализовал прирост массы тела у мышат с фетальным вальпроат-синдромом (ФВС), что выразилось как в значимом снижении скорости набора массы в сравнении с группой «ВПК», так и в отсутствии различий по данному показателю относительно контроля (рис. 1).

Влияние афобазола на прирост массы тела у мышат VALB/c с ФВС (Mean  $\pm$  SEM).

Анализ сроков созревания у самцов мышат группы «ВПК» на P13 и P14 выявил их отставание по сравнению с показателями контрольной группы, что выразилось в уменьшении на 23,7% ( $p = 0,09$ ) и 13,5% ( $p < 0,05$ ) числа открытых глаз, а также в незначимом снижении на 30,0% и 26,7% числа животных, открывших оба глаза, соответственно (табл. 2). Афобазол не предотвратил задержку открывания глаз у самцов мышат с ФВС.

ВПК, введенный пренатально, не влиял на сроки созревания у самок мышат. Отмечалось лишь незначимое снижение на 24,7 и 21,7% числа самок мышат с полностью открытыми глазами на P13 в группах «ВПК» и «ВПК+Афобазол», соответственно, по сравнению с контрольной группой самок (табл. 2).

Таким образом, ВПК, введенная пренатально в дозе 400 мг/кг, отрицательно влияла на физическое развитие мышат линии VALB/c, что согласуется с литературными данными [20;23].

В тесте «переворачивания на поверхности» самцы мышат, получавшие ВПК, на P6 статистически значительно дольше выполняли переворот со спины с упором на все четыре конечности по сравнению с контрольными мышатами (9,64  $\pm$  2,55 или 10,79  $\pm$  2,61 vs 6,58  $\pm$  0,67 в контроле), однако в последующие дни отличий по данному параметру не наблюдали (данные не представлены). У самок с ФВС отличий относительно контрольной группы не зарегистрировано (данные не представлены).

В тесте «избегание обрыва» поведение мышат VALB/c контрольных и опытных групп, как самцов, так и самок, оказалось схожим (данные не представлены).

Таблица 1

Масса тела мышат VALB/c с ФВС на P6 - P7 (Mean  $\pm$  SEM)

Самцы	P6	P7	Самки	P6	P7
Контроль, n=12	3,9 $\pm$ 0,1*	4,5 $\pm$ 0,2*	Контроль, n=15	4,1 $\pm$ 0,2#	4,6 $\pm$ 0,3*
ВПК, n=15	3,5 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,1	ВПК, VPA, n=24	3,6 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,1
ВПК+Афобазол, n=14	3,4 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,2	ВПК+Афобазол, n=20	3,5 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,2

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ВПК», # –  $p < 0,09$  по сравнению с группой «ВПК».

В тесте «отрицательный геотаксис» статистически значимые различия у самцов группы «ВПК» по сравнению с контрольной группой по времени поворота тела на наклонной плоскости головой в направлении подъема наблюдались только на P12 (табл. 3). Афобазол, в эти же сроки, увеличил в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) скорость выполнения рефлекса у самцов с ФВС относительно самцов группы «ВПК» (табл. 3)

У самок мышей с ФВС значимых различий во времени, необходимом для принятия правильного положения тела в тесте «отрицательный геотаксис», относительно контрольной группы не обнаружено. При этом, на фоне введения афобазола самкам мышей с ФВС, от-

мечалась тенденция к превышению скорости поворота тела на P7 и P12 в 1,3 и 1,4 раз, соответственно, относительно группы «ВПК» (табл. 3). Межполовые различия в данном тесте наблюдались только на P12 в группах «ВПК+Афобазол», где самцы в 1,5 раза быстрее, чем самки, справлялись с задачей теста (табл. 3).

В тесте «переворачивание в воздухе» у самцов мышей группы «ВПК» значимое ухудшение координации движений по сравнению с контрольной группой отмечалось на P14, что выразилось в уменьшении на 27,0% ( $p < 0,05$ ) числа животных в группе, успешно выполнивших все 3 попытки (табл. 4). Показатели самцов мышей с ФВС, получавших Афобазол, в тесте «пере-

Таблица 2

## Влияние афобазола на скорость прозревания у мышей BALB/c с ФВС (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Число открытых глаз, ед.		Число мышей с 2 открытыми глазами, %	
	P13	P14	P13	P14
Самцы				
Контроль, n=12	1,7±0,2	2,0±0,0	83,3	100,0
ВПК, n=15	1,3±0,2	1,7±0,1*	53,3	73,3
ВПК+Афобазол, n=12	0,8±0,3*	1,7±0,2	25,0#	75,0
Самки				
Контроль, n=15	1,5±0,2	1,8±0,1	66,7	86,7
ВПК, n=24	1,0±0,2	1,8±0,1	42,0	88,0
ВПК+Афобазол, n=20	1,2±0,2	2,0±0,1	45,0	95,0

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль», # –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль».

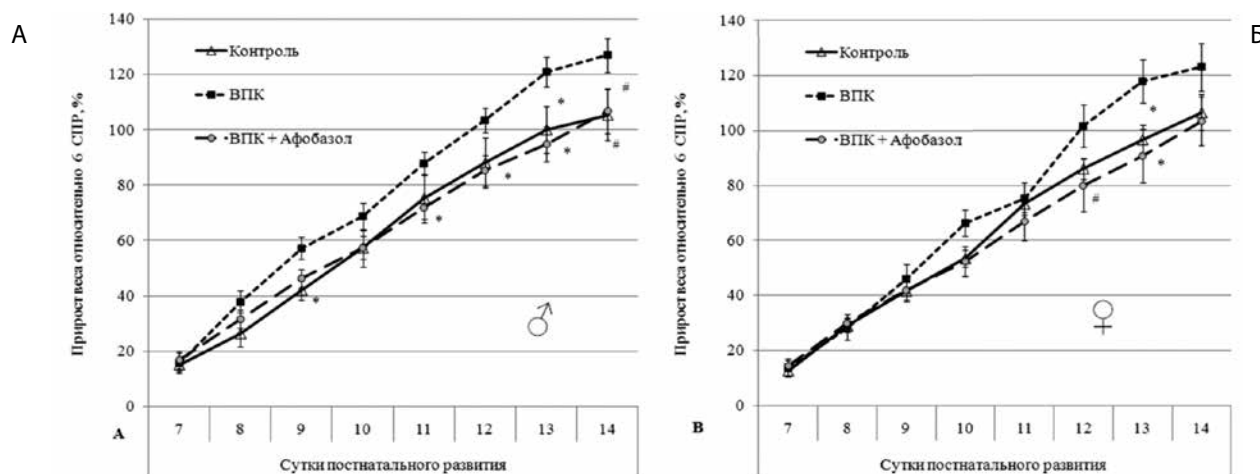


Рис. 1. А – самцы, В – самки; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ВПК», # –  $p < 0,09$  по сравнению с группой «ВПК». СПР – сутки постнатального развития.

ворачивание в воздухе» во все дни тестирования не отличались от контрольных значений (табл. 4).

У самок мышей с ФВС в тесте «переворачивание в воздухе» наблюдалось замедление формирования рефлекса, что выразилось на P13 – P14 в значимом снижении на 38,0 и 32,0%, соответственно, числа животных в группе успешно выполнивших все 3 попытки. При этом самки мышей с ФВС, получавшие афобазол, справлялись с задачей теста значительно лучше во все дни наблюдений, что выразилось в значимом увеличении на 46,0, 37,0 и 31,0% числа мышей, успешно выполнивших перевороты в воздухе, на P12 – P14, соответственно, по сравнению с группой «ВПК» (табл. 4).

Анализ числа животных, успешно выполнивших все 3 попытки в тесте «переворачивание в воздухе», выявил позитивный эффект афобазола, в большей степени для самок с ФВС, что может свидетельствовать о

протективном действии препарата на процессы развития нервной системы.

В тесте «горизонтальная веревочка» у самцов и самок мышей BALB/c, пренатально получавших ВПК, выраженной динамики в увеличении длительности удержания на веревочке передними конечностями не наблюдалось, в отличие от мышей контрольных групп, что выразилось в значимом уменьшении в 1,6 раза времени удержания на веревочке на P10 (табл. 4). Афобазол не улучшил показатели мышей с ФВС в данном тесте.

Анализ результатов теста «вздрагивание на хлопок» у самцов мышей группы «ВПК» свидетельствует о задержке развития, что демонстрирует отсутствие ответной реакции на внезапный раздражитель у всех животных на P11 и в ее значимом снижении на P12, относительно значений контрольной группы (табл. 5). Самки мышей с ФВС на P11 вели себя аналогично самцам с

Таблица 3

**Влияние афобазола на поведение мышей BALB/c с ФВС в тесте «отрицательный геотаксис» (Mean±SEM)**

Группы, число мышей	Скорость поворота тела на наклонной плоскости, с					
	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Самцы						
Контроль, n=12	17,1±2,4	16,3±2,1	13,9±2,1	12,0±1,7	10,3±1,5	6,5±0,9*
ВПК, n=12	21,9±1,8	20,8±2,3	16,5±2,4	13,0±1,7	9,3±1,1	10,3±1,5
ВПК+Афобазол, n=14	20,3±2,9	19,0±2,6	13,1±2,5	11,7±2,8	8,9±1,6	5,3±1,0*
Самки						
Контроль, n=12	17,4±2,3	16,8±2,8	14,0±2,2	12,6±1,6	8,7±0,9	8,0±1,1
ВПК, n=24	21,5±1,8	17,7±1,7	16,6±1,9	12,2±1,4	12,2±1,5	11,3±1,6
ВПК+Афобазол, n=20	16,9±1,9#	14,7±2,0	14,5±1,4	10,8±1,5	10,6±1,1	8,1±0,8#^

**Примечание.** \* – p < 0,05 по сравнению с группой «ВПК»; # – p < 0,09 по сравнению с группой «ВПК», ^ – p < 0,05 по сравнению с самцами группы «ВПК».

Таблица 4

**Влияние афобазола на поведение мышей BALB/c с ФВС в тестах «переворачивание в воздухе» и «горизонтальная веревочка» (Mean±SEM)**

Группы, число мышей	Число мышей, успешно выполнивших 3 попытки, %					Продолжительность удержания на веревочке, с
	P10	P11	P12	P13	P14	
Самцы						
Контроль, n=12	0	0	45	73	91	20,8±3,1
ВПК, n=15	0	20	36	60	64*	12,9±1,5*
ВПК+Афобазол, n=14	0	33	40	67	83	12,8±2,3*
Самки						
Контроль, n=15	7	14	29	71	86	18,3±2,6
ВПК, n=24	0	13	21	33*	54*	12,5±1,3*
ВПК+Афобазол, n=20	20	30	67#	70#	85#	12,7±2,1

**Примечание.** \* – p < 0,05 по сравнению с группой «Контроль», # – p < 0,05 по сравнению с группой «ВПК».

ФВС, однако введение афобазола предотвращало снижение скорости формирования рефлекса (табл. 5).

Подобное изменение процессов развития нервной системы наблюдалось и при оценке формирования ушного рефлекса на фоне пренатального введения ВПК самцам и самкам мышей линии BALB/c, что выразилось в значимом снижении числа ответных реакций животных на раздражитель в сравнении с показателями контрольных групп (табл. 5). Афобазол облегчал формирование рефлекса, как у самцов, так и у самок мышей с ФВС. Число реакций на стимул у самцов группы «ВПК+Афобазол» было значимо больше на P10 – P12, а у самок с ФВС, получавших афобазол – на P10 в сравнении с показателем соответствующей группы «ВПК» (табл. 5).

Дефицит социального взаимодействия является одним из основных симптомов РАС, а наиболее распространенным тестом для его изучения в эксперименте является поведение в трех-камерной установке с предъявлением разных по социальной значимости объектов [23]. Поскольку данный тест применим для более взрослых животных, для определения ранних поведенческих нарушений при социальном распознавании мы использовали его модифицированную версию – тест «предпочтение материнского запаха».

Как следует из полученных результатов, самцы мышей контрольной группы при первоначальной посадке в опытную клетку пребывали примерно равное время в каждой из зон («домашней», «нейтральной» и «чужой»), тогда как мыши с ФВС больше времени проводили в зоне с опилками из домашней клетки ( $p < 0,05$ ). При посадке мышей головой в направлении зоны с «домашним» запахом животные всех групп демонстрировали предпочтение этой части клетки. Однако, при помещении мышей головой в направлении зоны с запахом «чужой» клет-

ки, отмечалось отсутствие предпочтения определенного запаха у животных контрольной группы и группы с ФВС, в то время как под действием афобазола, самцы мышей с ФВС превалирующую часть времени проводили в зоне с опилками из домашней клетки ( $p < 0,05$ ) (табл. 6).

Самки мышей контрольной группы, также как самки группы «ВПК» при первом помещении в опытную клетку вдоль зоны с нейтральными опилками вели себя аналогично самцам, не отдавая предпочтения какой-либо из них. Тогда как самки мышей с ФВС, получавшие афобазол, предпочитали зону с «домашним» запахом (табл. 6). При втором помещении мышей всех групп в экспериментальную клетку головой в направлении зоны с «домашним» запахом мыши всех групп преимущественно выбирали её. Наиболее интересным является анализ третьего размещения животных в клетке с разными по социальной значимости зонами, когда мыши контрольной группы, также как и мыши группы «ВПК + Афобазол», соответственно, в 2,0 ( $p < 0,05$ ) и 3,0 раз ( $p < 0,05$ ) больше времени проводили в зоне с опилками из «домашней» клетки (табл. 6).

Результаты проведенного исследования продемонстрировали наличие у мышей с ФВС, вызванным пренатальным введением ВПК в дозе 400 мг/кг, задержки развития и социального распознавания в гнездовом периоде с P6 по P14, проявляющейся в более позднем открывании глаз, замедлении развития ответных реакций на сенсорные стимулы, увеличении времени переворота на поверхности и ухудшение моторики и координации движений в тестах «отрицательный геотаксис» и «переворот в воздухе», и отсутствии предпочтения материнского запаха. Недавние исследования предполагают, что сниженный при рождении вес может быть фактором риска РАС [8]. В наших опытах мыши с ФВС значимо отставали по массе тела на P6 –

Таблица 5

#### Влияние афобазола на скорость формирования рефлексов у мышей BALB/c с ФВС (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Вздрагивание на хлопок, балл			Реакция на прикосновение к уху, балл		
	P11	P12	P13	P10	P11	P12
Самцы						
Контроль, n=12	0,2±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,6±0,2	0,75±0,13	0,9±0,1
ВПК, n=15	0,0±0,0	0,5±0,1*	0,8±0,1	0,0±0,0*	0,27±0,12*	0,7±0,1
ВПК+Афобазол, n=14	0,0±0,0	0,6±0,2	0,9±0,1	0,5±0,2#	0,67±0,14#	1,0±0,0#
Самки						
Контроль, n=15	0,2±0,1	0,6±0,1	0,9±0,1	0,3±0,1	0,5±0,1	0,9±0,1
ВПК, n=24	0,0±0,0*	0,5±0,1	0,8±0,1	0,1±0,1*	0,4±0,1	0,8±0,1
ВПК+Афобазол, n=20	0,2±0,1	0,5±0,1	0,9±0,1	0,5±0,1#	0,6±0,1	0,9±0,1

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль»; # –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ВПК».

P7 в сравнении с контрольными животными. Однако, в дальнейшем, прирост веса у получивших ВПК мышей превышал показатели контрольных групп, чего не наблюдалось на фоне введения афобазола. Можно отметить, что дети с PAC и деструктивным поведением подвержены повышенному риску ожирения [24].

Мышата групп, пренатально получавших ВПК, а затем с P7 по P14 – афобазол, проводили больше времени в зоне с опилками, взятыми из домашней клетки, в то время как у мышей групп «ВПК», отличий во времени, проведенном в разных по социальной значимости зонах (с чистыми опилками, опилками из домашней или чужой клетки), не было. Эти данные свидетельствуют о том, что у мышей линии BALB/c с ФВС нарушается способность различать социальные и не-социальные, а также знакомые и чужие запахи, что воспроизводит характерную для PAC дисфункцию социального взаимодействия и распознавания [8]. Полученные результаты указывают на способность афобазола ослаблять повреждающее воздействие и даже нормализовать обонятельную функцию. Следует отметить, что гломерулы в обонятельных луковицах мышей развиваются от E13 до E16 [25], т.е. в период введения нами токсической дозы ВПК.

Поведение самцов мышей BALB/c в тесте предпочтения материнского запаха возможно связано со специфичным для линии аутизм-релевантным фенотипом с нарушениями в обонятельной сфере, особенно проявляющимися при предъявлении социальных запахов [26]. Известно, что обонятельная функция у грызунов обеспечивается основной обонятельной системой и

вспомогательной, специализированной для внутривидовой связи. Показано что типичные гломерулы линий мышей BALB/c и CD-1 отличаются по своей внутригломерулярной связности и морфометрии [27], чем можно объяснить различное поведение мышей в ответ на запахи. Половой диморфизм в обонятельной функции был обнаружен в добавочной обонятельной системе, которая в основном связана с информацией о феромонах и репродуктивным поведением [28]. Согласно полученным результатам самки мышей линии BALB/c обладают лучшими обонятельными способностями, связанными с осуществлением видовых коммуникаций, что косвенно подтверждается большим числом нетипичных гломерул у самок [28], и позволяет предполагать половой диморфизм по данному признаку.

Выявленные в нашем исследовании позитивные эффекты афобазола – соединения, обладающего свойствами агониста сигма1-рецепторов, лиганда МТ1- и МТ3-рецепторов, а также регуляторного участка MAO-A [29-31], не противоречат представлениям о стимуляции препаратом шаперонной функции сигма1-рецепторов [32], что вероятно обеспечивает влияние на моноаминергические и глутаматергические системы мозга, на пластические и трофические процессы в ЦНС, изменения которых характерны при PAC [33].

### Заключение

Таким образом, в результате проведенных экспериментов по изучению влияния афобазола на показатели развития нервной системы в периоде раннего постнатального развития мышей линии BALB/c на модели

Таблица 6

Влияние афобазола на поведение мышей BALB/c с ФВС в тесте «предпочтение материнского запаха» (Mean±SEM)

Группы, число мышей	Длительность нахождения в зоне клетки								
	Посадка в экспериментальную клетку, ориентация мыши.								
	головой к боковой стене			головой к «домашним» опилкам			головой к «чужим» опилкам		
Самцы	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч
Контроль, n=11	16,0±6,9#	20,2±6,1	23,8±7,6	33,4±8,1	20,1±6,5	6,6±4,5^	17,2±7,0	22,5±6,3	20,4±7,5
ВПК, n=12	32,8±6,0	11,3±1,3	14,7±6,3^	46,5±4,1	9,1±1,9	3,3±2,6^	24,9±6,9	10,3±1,3	23,6±6,6
ВПК+Афобазол, n=14	36,2±5,3	22,4±4,9	1,8±1,5#^	49,2±2,2	10,8±2,2	0,0±0,0^	39,2±4,9^	16,8±4,3	4,1±2,4*^
Самки	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч	Д	Н	Ч
Контроль, n=12	24,0±6,3	16,4±2,7	19,5±6,3	41,6±3,4	10,2±1,2	8,2±3,3^	31,9±6,0*	12,3±1,6*	15,9±5,6^
ВПК, n=24	17,3±5,0	19,5±3,6	23,2±5,0	35,8±4,9	17,9±3,5	6,2±2,6^	13,1±3,8	31,0±4,4	15,9±4,6
ВПК+Афобазол, n=20	32,4±4,3*	26,4±4,2	1,3±1,3*^	44,0±3,9	12,7±2,9	3,4±2,4^	31,7±4,7*	18,1±3,4*	10,3±3,9^

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ВПК»; # –  $p < 0,09$  по сравнению с группой «ВПК»; ^ –  $p < 0,05$  по сравнению с отсеком, содержащим опилки из «домашней» клетки (внутригрупповое сравнение); Д – опилки из «домашней» клетки, Н – «нейтральные» (чистые опилки), Ч – опилки из «чужой» клетки.



ФВС установлены корригирующие свойства препарата в отношении нарушений, вызванных пренатальным введением ВПК, что определяет целесообразность дальнейшего изучения афобазола на моделях РАС.

### Литература

(п.п. 1-4; 6-13; 19-28 см. References)

5. Паунова С.С., Донин И.М., Бусова Е.С., Семина И.В., Лифшиц М.И., Попов В.Е. и др. Вальпроат-синдром у новорожденного. *Педиатрия*. 2016; 95(1): 140-2.
14. Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Особенности поведенческого фенотипа мышей линии BALB/C. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020; 106(3): 373–83.
15. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Маметова Л.Э. Новый селективный анксиолитик афобазол. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2005; 105(4): 35-40.
16. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенин С.Б. Антимутагенные и антитератогенные свойства афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. 72(1): 46–51.
17. Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Калинина А.П., Середенин С.Б. Коррекция афобазолом тревоги при моделировании аутизма. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019; 82(10): 3–7.
18. Капица И.Г., Калинина А.П., Алымов А.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Афобазол ослабляет когнитивную ригидность в экспериментальной модели расстройств аутистического спектра. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 168(8): 191–4.
29. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 3-11.
30. Середенин С.Б., Воронин М.В., Абрамова Е.В. Сигма-1 рецепторы – новая мишень фармакологической регуляции. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017; 80(9): 9-19.
31. Абрамова Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б. Взаимодействие афобазола с Сигма-1 рецепторами головного мозга мышей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(1): 9-11.
6. Kataoka S., Takuma K., Hara Y., Maeda Y., Ago Y., Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013; 16(1): 91–103.
7. Roulet F.I., Wollaston L., Decatanzaro D., Foster J.A. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*. 2010; 170(2): 514–22.
8. Yang E.-J., Ahn S., Lee K., Mahmood U., Kim H.S. Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice. *PLoS One*. 2016. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153298> (Accessed 08 June 2020)
9. Tartaglione A.M., Schiavi S., Calamandrei G., Trezz V. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 2019. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0028390818309134?via%3Dihub> (Accessed 08 June 2020)
10. Nicolini C., Fahnstock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*. 2018; 299: 217–227.
11. Kazdoba T.M., Leach P.T., Yang M., Silverman J.L., Solomon M., Crawley J.N. Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics. *Curr Top Behav Neurosci*. 2016; 28: 1-52.
12. Brodtkin E.S. BALB/c mice: low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. *Behav. Brain Res*. 2007; 176: 53-65.
13. Moy S.S., Nadler J.J., Young N.B., Perez A., Holloway L.P., Barbaro R.P., et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res*. 2007; 176(1): 4-20.
14. Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of Balb/C Mice. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2020; 106(3); 373–83. (In Russian).
15. Neznamov G.G., Syunyakov S.A., Chumakov D.V., Mаметова L.E. Afobazole – new selective anxiolytic drug. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2005; 105(4): 35-40. (In Russian)
16. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Shreder O.V., Seredenin S.B. Antimutagenic and antiteratogenic properties of afobazole. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 46–51. (In Russian)
17. Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Kalinina A.P., Seredenin S.B. Treatment of Anxiety with Afobazole in Experimental Model of Autism. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019; 82(10): 3–7. (In Russian)
18. Kapitsa I.G., Kalinina A.P., Alymov A.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Afobazole facilitates cognitive rigidity in BALB/c mice with autism-relevant behavioral phenotype. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2019; 168(8): 191–4. (In Russian)
19. Wagner G.C., Reuhl K.R., Cheh M., McRae P., Halladay A.K. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *Journal of autism and developmental disorders*. 2006; 36(6): 779-93.
20. Hill J.M., Lim M.A., Stone M.M. Developmental Milestones in the Newborn Mouse. In: Gozes I, eds. *Neuropeptide Techniques. Neuromethods №39*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2008: 131-9.
21. Kane M.J., Angoa-Perez M., Briggs D.I., Sykes C.E., Francescutti D.M., Rosenberger D.R., et al. Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism. *PLoS One*. 2012.

### References

1. Zwaigenbaum L., Bryson S., Rogers T., Roberts W., Brian J., Szatmari P. Behavioral manifestations of autism in the first year of life. *International journal of developmental neuroscience*. 2005; 23(2–3): 143–52.
2. Pyhala R, Hovi P, Lahti M, Sammallahti S, Lahti J, Heinonen K et al. Very low birth weight, infant growth, and autism-spectrum traits in adulthood. *Pediatrics*. 2014; 134(6): 1075–83.
3. Chen C., Van Horn J.D. Developmental neurogenetics and multimodal neuroimaging of sex differences in autism. *Brain imaging and behavior*. 2017; 11: 38-61.
4. Rasalam A.D., Hailey H., Williams J.H.G., Moore S.J., Turmpenny P.D., Lloyd D.J., et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental medicine and child neurology*. 2005; 47(8): 551-5.
5. Paunova S.S., Donin I.M., Busova E.S., Semina I.V., Lifshits M.I., Popov V.E., et al. Valproate syndrome in a newborn. *Pediatriya*. 2016; 95(1): 140-2. (In Russian)

- Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048975> (Accessed 08 June 2020)
22. Rodríguez-Fanjul J., Fernández-Feijóo C.D., Lopez-Abad M., Ramos M.G.L., Caballé R.B., Alcántara-Horillo S., et al. Neuroprotection With Hypothermia and Allopurinol in an Animal Model of Hypoxic-Ischemic Injury: Is It a Gender Question? *PLoS One*. 2017. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184643> (Accessed 08 June 2020)
  23. Moy S.S., Nadler J.J., Perez A., Barbaro R.P., Johns J.M., Magnuson T.R. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, brain, and behavior*. 2004; 3(5): 287–302.
  24. Healy S., Aigner C.J., Haegle J.A. Prevalence of overweight and obesity among US youth with autism spectrum disorder. *Autism*. 2019; 23(4): 1046–50.
  25. Blanchart A., Romaguera M., García-Verdugo J.M., de Carlos J.A., López-Mascaraque L. Synaptogenesis in the mouse olfactory bulb during glomerulus development. *The European journal of neuroscience*. 2008; 27(11): 2838–46.
  26. Burket J.A., Young C.M., Green T.L., Benson A.D., Deutsch S.I. Characterization of gait and olfactory behaviors in the BALB/c mouse model of autism spectrum disorders. *Brain research bulletin*. 2016; 122: 29–34.
  27. Weruaga E., Briñón J.G., Porteros A., Arévalo R., Aijón J., Alonso J.R. A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chemical senses*. 2001; 26(1): 7–15.
  28. Segovia S., Guillamón A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain research reviews*. 1993; 18(1): 51–74.
  29. Seredenin S.B., Voronin M.V. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009; 72(1): 3–11. (In Russian)
  30. Seredenin S.B., Voronin M.V., Abramova E.V. Sigma-1 receptors: a new pharmacological target. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017; 80(9): 9–19. (In Russian)
  31. Abramova E.V., Voronin M.V., Seredenin S.B. Interaction of afobazole with Sigma-1 receptors in mice brain. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(1): 9–11. (In Russian).
  32. Hayashi T. The Sigma-1 receptor in cellular stress signaling. *Frontiers in neuroscience*. 2019. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00733/full> (Accessed 08 June 2020).
  33. Varghese M., Keshav N., Jacot-Descombes S., Warda T., Wicinski B., Dickstein D. L., et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol*. 2017; 134(4): 537–66.

**Сведения об авторах:**

**Середин Сергей Борисович**, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

**Воронина Татьяна Александровна**, доктор мед. наук, зав. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

**Капица Инга Геннадиевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: [ingakar73@mail.ru](mailto:ingakar73@mail.ru);

**Альмов Александр Александрович**, аспирант, мл. науч. сотр. лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».