

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРОПОКСИНА И ФРАГМЕНТОВ ЕГО МОЛЕКУЛЫ — ТРОПАНА И 3,4,5-ТРИМЕТОКСИБЕНЗОАТА — С СЕРОТОНИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ НЕЙРОНОВ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫСЫ (МИКРОИОНОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

С. Н. Кожечкин, Л. М. Косточка, С. Г. Бежанян, Р. С. Мирзоян, С. Б. Середенин¹

С помощью метода микроионофореза исследовали влияние противомигренового препарата тропоксина и основных компонентов его молекулы тропана и 3,4,5-триметоксибензоата (ТМБ) на чувствительность к серотонину постсинаптической мембраны нейронов сенсорной коры большого мозга крыс. Все три вещества уменьшали возбуждающие ответы нейронов на серотонин, выражающиеся в увеличении частоты спонтанных потенциалов действия. По силе антисеротонинового эффекта они располагаются в последовательности: тропоксин > тропан > ТМБ. Сумма эффектов тропана и ТМБ при их раздельном и одновременном подведении к клеткам была существенно меньше эффекта тропоксина при всех применявшихся микроионофоретических токах (дозах). Сделан вывод, что для проявления выраженного антисеротонинового эффекта тропоксина необходимо сохранение всей конфигурации его молекулы. Тропан и ТМБ, являясь метаболитами тропоксина, могут пролонгировать противомигреновый эффект после распада тропоксина в организме. Обсуждается связь структуры и действия блокаторов серотониновых рецепторов тропанового ряда.

Ключевые слова: тропоксин, тропан, 3,4,5-триметоксибензоат, микроионофорез, неокортекс, крыса

ВВЕДЕНИЕ

Химическая структура нового противомигренового препарата тропоксина (3-имино-3,4,5-триметоксибензоат тропана) включает в качестве основных компонентов тропан и триметоксибензоат (ТМБ), соединенные оксимной группировкой [3]. Основными продуктами метаболизма тропоксина являются оксим тропинона и 3,4,5-триметоксибензойная кислота [1]. Для выяснения механизма действия тропоксина и дальнейшего целенаправленного поиска новых эффективных противомигреновых средств важно выяснить роль различных частей молекулы тропоксина в его фармакологическом действии.

Показано, что тропоксин предупреждает развитие констрикторных реакций сосудов головного мозга, вызванных серотонином, взаимодействуя с рецепторами серотонина 5-НТ₂-типа [1, 3]. Известно, что серотониновые рецепторы этого типа имеются не только на периферии, но и в ЦНС, в частности, на мембранах нейронов коры большого мозга [10]. Следовательно, неокортекс является удобной моделью для электрофизиологического изучения химических соединений, модулирующих 5-НТ₂-рецепцию.

Согласно нейрогенной гипотезе патогенеза мигрени пусковым фактором в возникновении приступа мигрени являются нервные элементы (нейроны) головного мозга, и лишь позже развивается вазоконстрикция [6, 7]. Предполагают, что центральная серотонинергическая регуляция кровотока в церебральных сосудах обусловлена активацией нейронов ядер шва среднего мозга [8, 9].

Целью настоящего исследования явилось микроионофоретическое исследование взаимодействия тропоксина и основных структурных единиц его молекулы: тропана и ТМБ, с серотониновыми рецепторами постсинаптической мембраны нейронов сенсорной коры большого мозга крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 8 беспородных крысах-самцах, массой 180 – 240 г. Под галотановым наркозом производили трепанацию черепа, после чего переводили животное на искусственное дыхание на фоне миорелаксации диплацином (20 мг/кг внутривенно). Места фиксации черепа в стереотаксическом приборе инфильтрировали анестетиком длительного действия пролонкаином. Через центральный ствол 7-канального стеклянного микроэлектрода, заполненный 3М NaCl, отводили внеклеточно спонтанные потенциалы действия (ПД) нейронов сенсорной коры (III – IV

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

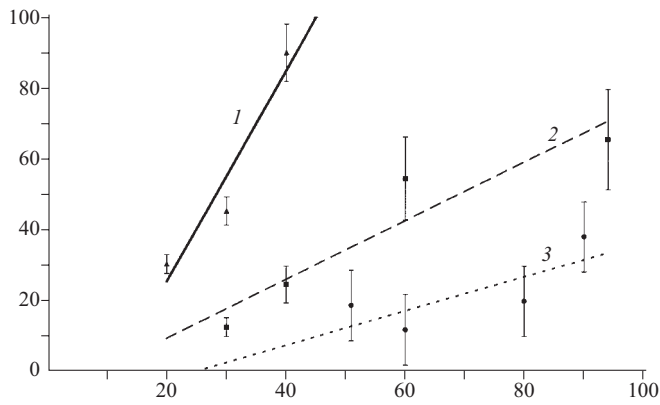


Рис. 1. Уменьшение ответов нейронов сенсомоторной коры крысы на серотонин под влиянием тропоксина, тропана и ТМБ при их микроионофоретическом подведении.

Усредненные данные для 13 нейронов, частота ПД которых увеличивалась при подведении серотонина. По оси абсцисс — сила микроионофоретического тока, нА ($1 \cdot 10^{-9}$ А); по оси ординат — величина угнетения серотониновых ответов, %. 1 — тропоксин; 2 — тропан; 3 — ТМБ.

слоев). Другие стволы использовали для микроионофоретического подведения химических агентов к мембране отдельных клеток и заполняли водными растворами следующих веществ: серотонина (0,03 М, рН 4,5), тропоксина (0,03 М, рН 4,5), тропана (0,03 М, рН 4,5), Na-3,4,5-триметоксибензоата (0,03 М, рН 4,5). Один из стволов использовали для компенсации токовых артефактов. Оценивали изменение частоты ПД нейронов с помощью аналогового частотомера. Достоверность результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано 38 нейронов сенсомоторной коры большого мозга крыс.

Влияние веществ на спонтанную активность нейронов.

При подведении тропоксина к мембране нейронов сенсомоторной коры с помощью микроионофоретического тока силой 1 – 100 нА частота ПД большинства клеток уменьшалась (25 из 38 нейронов). Активность остальных нейронов (13) не изменялась. Тормозящее действие тропоксина было слабым: 25 – 35 % от исходной активности при максимальном токе 100 нА.

Серотонин по-разному влиял на активность нейронов: увеличивал частоту ПД у 14 нейронов, уменьшал у 13 и не изменял у 11. Величина возбуждения и торможения нейронов под влиянием серотонина была значительной. При максимальном микроионофоретическом токе 100 нА увеличение частоты ПД у 10 нейронов из 14 составляло 150 – 300 %; уменьшение частоты ПД у 5 из 13 нейронов было полным (100 %).

Тропан оказывал возбуждающее действие (не более 60 % при токе 100 нА) на активность 15 из 38 нейронов, очень слабое тормозящее действие (не более

30 %) на 13 нейронов и не влиял на активность 10 нейронов. Оба эффекта зависели от дозы вещества.

ТМБ вызывал слабое угнетение активности 20 из 38 нейронов, не превышающее 30 % при максимальном токе. На частоту ПД остальных 18 нейронов вещество не влияло.

Изменение ответов нейронов на серотонин под влиянием тропоксина и его фрагментов: тропана и ТМБ.

В этой серии экспериментов одновременно с серотонином микроионофоретически подводили к нейронам тропоксин, тропан и ТМБ. Тропоксин не изменял достоверно депрессию спонтанных ПД, вызванную серотонином, у всех 13 нейронов, активность которых угнеталась серотонином. В противоположность этому, ответы нейронов на серотонин возбуждающего типа достоверно уменьшались под влиянием тропоксина.

Рис. 1 иллюстрирует степень уменьшения возбуждающих ответов нейронов на серотонин под влиянием тропоксина, тропана и ТМБ. Суммированы данные для всех нейронов, возбуждавшихся серотонином. Эффекты всех веществ зависят от дозы — микроионофоретического тока. Наибольшую депрессию серотониновых ответов вызывал тропоксин. Максимальный эффект — угнетение на 100 %, возникал уже при среднем микроионофоретическом токе 47 нА. Кривая доза — эффект тропана значительно и достоверно сдвинута вправо, и даже при максимальном токе 100 нА не было полного подавления ответов на серотонин. Примечательно, что тропан уменьшал серотониновое возбуждение даже в тех случаях, когда он сам активировал спонтанную активность нейронов. Кривая доза — эффект ТМБ еще более сдвинута вправо, и при максимальном токе подавление серотониновых ответов не достигало 50%. Если сложить ординаты точек, соответствующие одинаковым токам (дозам), то сумма ординат тропана и ТМБ меньше соответствующих ординат тропоксина.

На рис. 2 приведена типичная оригинальная запись влияния агентов на частоту ПД одного из исследованных нейронов. Видно, что тропоксин оказывает едва заметное депримирующее действие на частоту спонтанной активности нейрона. Серотонин вызывает выраженное возбуждающее действие — увеличение частоты ПД. При подведении тропоксина одновременно с серотонином возбуждающий эффект последнего полностью блокирован. ТМБ и тропан вызывают существенно меньшее угнетение серотониновых ответов, нежели тропоксин. Даже при совместном подведении к мембране нейронов обоих фрагментов тропоксина суммарная депрессия серотониновых ответов в два раза меньше депримирующего эффекта тропоксина, и даже меньше суммы антисеротониновых эффектов раздельно приложенных агентов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что как сам тропоксин, так и основные структурные компоненты его молекулы тропан и ТМБ являются блокаторами рецепторов постсинаптической мембраны ней-

ронов коры большого мозга, чувствительных к серотонину. Все три вещества в зависимости от дозы уменьшают лишь возбуждающие ответы клеток на микроионофоретически подводимый серотонин, выражающиеся в увеличении частоты ПД нейронов. Тормозящий эффект серотонина не изменяется при их подведении.

Наибольшей антисеротониновой активностью обладает тропоксин. Тропан проявляет значительный антагонизм с серотонином; ТМБ — весьма малый. По-видимому, антисеротониновая активность тропоксина обусловлена преимущественно тропановой частью его молекулы. Известно, что тропан включен в структуру многих веществ, обладающих значительной нейро- и психотропной активностью. К таковым следует в первую очередь отнести кокаин, экгонин, атропин и др. Еще в 1954 г. J. H. Gaddum и K. A. Nameed обнаружили антисеротониновую активность кокаина на кишке морской свинки [5]. Позже такой же эффект кокаина был обнаружен на других тканях, в частности, на клетках нервной системы [4, 13]. Исходя из этого позднее был синтезирован ряд блокаторов серотониновых рецепторов, содержащих бицикл тропана с различными заместителями в 3-м положении: трописетрон, MDL72222, BRL43694 и др. У этих веществ найдена или предполагается многообразная нейротропная активность: антипсихотическая, анксиолитическая, анальгетическая, противорвотная и др. [11, 14]. Места радиолигандного связывания указанных веществ обнаружены в коре большого мозга [12].

ТМБ — другой фрагмент молекулы тропоксина, также входит в состав многих известных нейро- и психотропных веществ, таких как мескалин, резерпин, френолон, триметоксин (триоксазин) и др. Об антисеротониновых свойствах ТМБ и упомянутых соединений литературных данных нет.

Маловероятна значительная роль иминового фрагмента молекулы тропоксина в его антисеротониновом эффекте. Подтверждением этого, а также важной роли тропана в антисеротониновом эффекте тропоксина может служить тропafen — блокатор серотониновых рецепторов, содержащий в своей структуре тропан. Несмотря на отсутствие в его молекуле ТМБ и иминофрагмента, он эффективно блокирует сосудодилататорное и бронхосуживающее действие серотонина [2]. ТМБ и иминогруппа также отсутствуют в молекулах упомянутых блокаторов серотониновых рецепторов тропанового ряда: трописетрона и др.

Таким образом, для проявления выраженного антагонизма с серотонином необходимо сохранение конформации всей молекулы тропоксина. Только в этом случае может быть обеспечена ее наибольшая комплементарность серотониновым рецепторам. Можно предположить, что большое значение имеет внутримолекулярное расположение атома азота тропана относительно метоксиароматического цикла, однако, этот вопрос требует специального изучения. Оксим тропино-

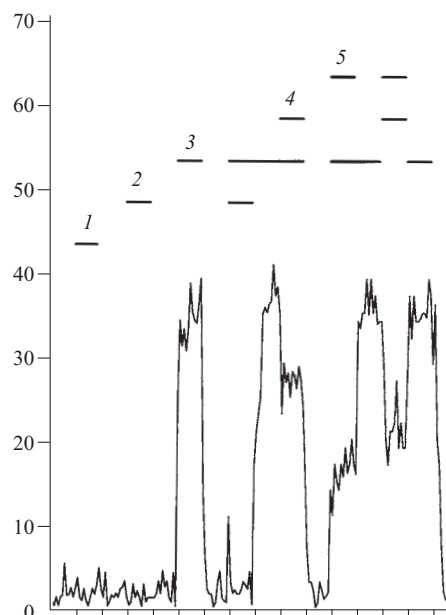


Рис. 2. Типичный пример влияния микроионофоретически подводимых серотонина, тропоксина, тропана и ТМБ, а также их сочетаний на частоту спонтанной активности одного из нейронов сенсомоторной коры.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — частота спонтанной спайковой активности, Гц. 1 — Na^+ — контроль токовых артефактов при максимальном микроионофоретическом токе +100 нА; 2 — тропоксин (40 нА); 3 — серотонин (40 нА); 4 — ТМБ (70 нА); 5 — тропан (70 нА). Остальные объяснения в тексте.

на и 3,4,5-триметоксибензойная кислота — основные метаболиты тропоксина, возможно, пролонгируют его антисеротониновый и противомигреновый эффекты.

ВЫВОДЫ

1. Тропоксин при микроионофоретическом подведении к нейронам сенсомоторной коры большого мозга крысы уменьшает в зависимости от дозы их возбуждающие ответы на серотонин.
2. Структурные компоненты тропоксина, тропана и 3,4,5-триметоксибензоата (ТМБ) также обладают антисеротониновым эффектом, но меньшим, чем тропоксин. Активность тропана существенно выше ТМБ.
3. Метаболиты тропоксина — оксим тропинона и 3,4,5-триметоксибензойная кислота — могут пролонгировать противомигреновый эффект тропоксина после его распада в организме.
4. Для максимального проявления антисеротониновой и противомигреновой активности тропоксина необходимо сохранение всей конформации его молекулы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. С. Ганьшина, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Москва (2004).
2. М. Д. Машковский, Г. Я. Шварц, *Фармакол. и токсикол.*, **42**(1), 3 – 7 (1979).
3. Р. С. Мирзоян, С. Б. Середенин, Т. С. Ганьшина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **61**(3), 28 – 31 (1999).

4. J. R. Fozard, Ali, A. T. M. Mobarok, *Eur. J. Pharmacol.*, **49**, 109 – 11 (1978).
5. J. H. Gaddum and K. A. Hameed, *Br. J. Pharmacol.*, **9**, 240 – 248 (1954).
6. J. W. Lance, *Aust. NZJ. Med.*, **18**, 311 – 317 (1988).
7. M. Lauritzen, W. Trojaborg, and J. Olesen. *Advances in Migraine Research and Therapy*, F. Clifford (ed.), Rose, New York (1982), pp. 79 – 84.
8. G. R. Martin, *J. Pharmacol. Ther.*, **62**, 283 – 324 (1994).
9. G. R. Martin, *Blue Books of Practical Neurology*, V. 17, Headache, P. J. Goatsby, S. D. Silberstein (eds.), Butterworth-Heinemann, Boston (1997), pp. 25 – 38.
10. A. Paros, R. Cortes, and J. M. Paiacios, *Brain Res.*, **346**, 231 – 249 (1985).
11. S. J. Peroutka, *Trends in Neurosciences*, **11**, 496 – 500 (1988).
12. S. J. Peroutka and A. Hamik, *Eur. J. Pharmacol.*, **148**, 297 – 299 (1988).
13. B. P. Richardson and G. Engel, *Trends Neurosci*, **7**, 424 – 428 (1986).
14. K. J. Waiting, *Neurotransmissions*, **5**, 1 – 5 (1989).

Поступила 16.11.04.

INTERACTION OF TROPOXIN AND ITS MOLECULAR FRAGMENTS TROPAN AND 3,4,5-TRIMETHOXYBENZOATE WITH SEROTONIN RECEPTORS OF CORTICAL NEURONS IN THE RAT BRAIN (A MICROIONOPHORETIC STUDY)

S. N. Kozhechkin, L. M. Kostochka, S. G. Bezhanyan, R. S. Mirzoyan, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

The effects of the antimigraine drug tropoxin and its main molecular fragments – tropan and 3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB) – on the serotonin sensitivity of postsynaptic neuronal membrane in rat brain sensorimotor area has been studied using a microionophoretic (MIP) technique. All the three substances significantly reduce the excitatory neuronal response to serotonin, which is manifested by an increase in the rate of the spontaneous action potentials. With respect to the antiserotonin effect, the substances can be arranged in the following order: tropoxin > tropan > TMB. The sum of the effects of tropan and TMB (for both simultaneous and separate action upon the target cells) was significantly lower than the effect of tropoxin in all doses (MIP currents). It is concluded that a pronounced antiserotonin effect of tropoxin is produced only provided that the entire molecular configuration is retained. Tropan and TMB, being tropoxin metabolites, are probably capable of prolonging the antimigraine action upon the decay of tropoxin in the organism. A relationship between the structure and action of serotonin receptor blockers of the tropan series is discussed.