

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ГИМАНТАНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ

Е. А. Вальдман¹, Т. А. Воронина¹, Л. Н. Аксенова², О. А. Бунеева², А. Е. Медведев²

Гимантан — новый потенциальный противопаркинсонический препарат, “мишенями” для которого являются несколько нейрхимических систем. Гимантан обладает свойствами низкоаффинного неконкурентного блокатора ионных каналов глутаматных NMDA-рецепторов. Кроме того, препарат повышает содержание дофамина в стриатуме, снижая при этом уровень его метаболита ДОФУК. В настоящей работе исследовали взаимодействие гимантана с моноаминоксидазами (МАО) А и В — ключевыми ферментами обмена медиаторных моноаминов. *In vitro* гимантан проявлял свойства селективного конкурентного ингибитора МАО-В (K_i 470 ± 70 мкМ), практически не влияя на активность МАО-А. Гимантан также защищал МАО-В от необратимого ингибирования селегилином. Введение гимантана мышам линии C57BL/6 (20–100 мг/кг) не влияло на активность МАО-В, измеренной в изолированных митохондриях головного мозга. Однако комбинированное введение гимантана и селегилина приводило к значительному снижению эффекта последнего. Полученные данные позволяют предположить, что торможение МАО-В является одной из составляющих поликомпонентного спектра нейрхимической активности гимантана.

Ключевые слова: противопаркинсонические средства, гимантан, моноаминоксидазы, МАО-А, МАО-В, селегилин

ВВЕДЕНИЕ

Новые подходы к лечению паркинсонизма, направленные на снижение последствий окислительного стресса, включают ингибирование переносчика дофамина, снижение активности МАО-В, блокаду NMDA-рецепторов, увеличение выживаемости нейронов за счет нейротрофических факторов [8, 11]. Решить эти задачи можно применением комплексной терапии. При этом следует иметь в виду, что препараты, используемые для комплексной терапии, помимо различных механизмов действия имеют и характерные побочные эффекты, которые могут усиливаться при взаимодействии нескольких лекарственных средств. Поэтому более перспективным в последнее время становится поиск лекарственных средств с многокомпонентным механизмом действия, включающим воздействие на известные звенья патогенеза паркинсонизма.

Спектр нейрхимической активности нового производного аминоадамантиана — гимантана (гидрохлорид N-2-адамантил-гексаметиленмина), обладающего противопаркинсонической активностью [2], был изучен с учетом известных патогенетически значимых изменений в балансе нейромедиаторных систем, обу-

словливающих двигательные нарушения при паркинсонизме. К числу таких изменений относят дефицит дофамина в стриатуме, активацию холинергических процессов, нарушение соотношения дофамин-серотонин и дофамин-глутамат, нейротоксичность глутамата, повреждающие эффекты свободнорадикальных процессов [5].

Ранее было показано, что гимантан (соединение А-7) обладает свойствами низкоаффинного неконкурентного канального блокатора NMDA-рецепторов [3]. Микродиализное исследование на свободноподвижных крысах показало, что гимантан влияет на обмен дофамина [1]. Препарат повышает содержание дофамина в стриатуме, снижая при этом уровень его кислого метаболита — диоксифенилуксусной кислоты ДОФУК, а также метаболита серотонина — 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) [1]. Это свидетельствовало в пользу торможения моноаминоксидазы (МАО; КФ 1.4,3,4) — ключевого фермента катаболизма медиаторных моноаминов. Настоящее исследование посвящено проверке этой гипотезы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах *in vitro* источником МАО-А и МАО-В служили митохондрии печени крыс, которые выделяли традиционным методом дифференциального центрифугирования [10]. Выделенные митохондрии промывали и суспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) и хранили при температуре –20 °С. Ак-

¹ Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина), ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Лаборатория биохимии аминов и циклических нуклеотидов (зав. — проф. А. Е. Медведев) ГУ НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН, Москва.

Таблица 1. Эффект гимантана на MAO-A и MAO-B митохондрией печени крыс

Гимантан, моль	Ингибирование MAO-A		Ингибирование MAO-B	
	без преинкубации	преинкубация 60 мин	без преинкубации	преинкубация 60 мин
10 ⁻³	17 ± 8	27 ± 9	57 ± 9*	71 ± 5*
10 ⁻⁴	19 ± 6	18 ± 6	30 ± 5*	37 ± 9*
10 ⁻⁵	10 ± 4	6 ± 3	4 ± 2	30 ± 5*
10 ⁻⁶	7 ± 2	6 ± 3	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0

Примечание. Результаты представлены в виде % ингибирования по отношению к контролю, * — $p < 0,05$; В каждой серии по 3–5 независимых экспериментов.

тивность MAO определяли радиометрическим методом по накоплению [¹⁴C]альдегидов, образующихся в ходе ферментативного окисления моноаминов. В качестве субстратов для MAO-A и MAO-B использовали 0,1 мМ [¹⁴C]5-гидрокситриптамина креатинсульфат и 0,01 мМ [¹⁴C]фенилэтиламина гидрохлорида (“Amersham”, Англия), соответственно [10, 12]. Гимантан преинкубировали с митохондриями (60 мин при 37 °C) или добавлялся непосредственно перед измерением активности вместе с субстратами. Для оценки защиты фермента от необратимого торможения специфическим ингибитором MAO-B селегилином митохондрии печени крыс преинкубировали с 0,1 мМ гимантана в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 25 мин при 37 °C, затем добавляли селегилин и после 45 мин инкубации с селегилином при 37 °C инкубационную смесь разводили в 5 раз холодным фосфатным буфером, pH 7,4. Митохондрии осаждали центрифугированием, ресуспендировали в фосфатном буфере и определяли остаточную активность MAO. Контрольные митохондрии подвергали тем же воздействиям, но в отсутствие ингибиторов.

В экспериментах *in vivo* гимантан вводили в дозах 20–100 мг/кг за 50 мин до введения селегилина (внутрибрюшинно). Контрольным животным вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Митохондрии головного мозга изолировали как описано ранее [10, 12], в них определяли активность MAO радиометрическим методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным опытов *in vitro*, гимантан обладает свойствами обратимого ингибитора MAO-B, который практически не влияет на активность MAO-A. Гимантан вызывал селективное конкурентное ингибирование MAO-B митохондрий печени крыс (K_i — 0,47 ± 0,07 мМ). Преинкубация митохондрий печени крыс в течение 60 мин при температуре 37 °C несколько увеличивала ингибирующий эффект: значение IC₅₀ (концентрация, вызывающая 50 % торможение ферментативной активности) снижалось с 0,4 до 0,16 мМ, при

Таблица 2. Влияние гимантана (0,1 мМ) на выраженность необратимого ингибирования MAO-B митохондрий печени крыс селегилином

Концентрация селегилина, М	Остаточная MAO B активность (%) в митохондриях инкубированных		p
	без гимантана	с гимантаном 0,1 мМ	
10 ⁻⁶	5,0 ± 0,1	7,8 ± 0,5	< 0,001
5 · 10 ⁻⁷	7,3 ± 0,3	36,7 ± 1,2	< 0,001
10 ⁻⁷	32,8 ± 2,8	84,2 ± 7,1	< 0,001

Примечание. Представлены результаты 6 независимых экспериментов.

этом ингибирование MAO-A не достигало 50 % даже при концентрации 1 мМ (табл. 1).

Следует отметить, что, будучи слабым ингибитором MAO-B, гимантан эффективно защищал фермент от необратимого торможения специфическим ингибитором селегилином, что свидетельствует о конкуренции двух соединений за активный центр MAO-B (табл. 2).

Введение гимантана в дозах 20–100 мг/кг мышам линии C57BL/6 не приводило к изменению активности MAO-B и MAO-A в изолированных митохондриях головного мозга. Селегилин (1–2 мг/кг) вызывал сильное торможение активности MAO-B, практически не влияя на MAO-A. Сочетанное введение селегилина (2 мг/кг) с гимантаном незначительно (и статистически незначимо) ослабляло эффект селегилина на MAO-B. Однако при снижении дозы селегилина до 1 мг/кг гимантан достоверно снижал необратимое торможение MAO-B селегилином (табл. 3). Последнее свидетельствует о том, что и *in vivo* селегилин и гимантан конкурируют за активный центр MAO-B и именно конкуренция обратимого (гимантан) ингибитора с необратимым (селегилин) ослабляет обратимую инактивацию MAO-B последним.

Известно, что активность моноаминоксидаз, особенно MAO-B, в структурах головного мозга увеличивается с возрастом, что в совокупности со снижающимся числом дофаминергических нейронов усиливает предрасположенность к развитию болезни Паркинсона [9]. Имеются экспериментальные данные о том, что селективный ингибитор MAO-B селегилин оказывает защитный эффект при паркинсонизме [4]. Фармакологическая активность селегилина включает дофамин-сберегающий, нейропротекторный и “нейро-респасающий” (neuronal rescue) эффекты. Хотя эти эффекты не могут быть объяснены одним лишь ингибированием MAO-B, именно этот механизм считается пусковым в осуществлении других эффектов селегилина [4]. Генетический или обусловленный влиянием факторов окружающей среды дефект митохондрий, усиленный процессами метаболического кругооборота дофамина, может способствовать повышению чувствительности нейронов к активации NMDA рецепторов. Снижение активности MAO, как и блок

Таблица 3. Эффект сочетанного введения гимантана и селегилина на активность MAO-B митохондрий головного мозга крыс

Селегилин, мг/кг	Гимантан, мг/кг	Активность MAO-B, % от контроля
2	–	18,1 ± 1,5
2	20	14,3 ± 2
2	40	15,1 ± 3
2	100	24,2 ± 6,1
1	–	21,3 ± 1,5
1	100	33 ± 2,2*

Примечание. * — различия между ингибирующим эффектом селегилина и его комбинации с гимантаном достоверны ($p < 0,05$).

NMDA-рецепторов могут защитить нейрон от гибели [7]. Ингибиторы MAO-B могут предупреждать эффекты нейротоксинов эндо- или экзогенного происхождения за счет торможения обратного захвата [6].

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что *in vivo* и *in vitro* гимантан проявляет свойства селективного ингибитора MAO-B, которые, по-видимому, могут объяснить снижение биологической деградации дофамина, выявленные ранее в ходе микродиализного исследования [1]. Возможно, гимантану свойственна нейропротекторная активность.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* гимантан проявляет свойства селективного конкурентного обратимого ингибитора MAO-B.

2. Гимантан защищает MAO-B от необратимой инактивации селективным ингибитором селегилином.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 01-04-49819 и № 03-04-49228 и гранта Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. А. Андриянова, Е. А. Вальдман, В. С. Кудрин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(4), 3 – 6 (1999).
2. Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(6), 13 – 17 (2001).
3. М. В. Елшанская, А. И. Соболевский, Е. А. Вальдман, Б. И. Ходоров, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(1), 18 – 21 (2001).
4. Дж. Кнолл, *Вопр. мед. хим.*, **43**(6), 482 – 493 (1997).
5. Г. Н. Крыжановский, И. Н. Карабань, С. В. Магаева, Н. В. Карабань, *Компенсаторные и восстановительные процессы при паркинсонизме*, Киев (1995).
6. К. Мадьяр, *Вопр. мед. хим.*, **43**(6), 504 – 515 (1997).
7. W. Danysz, C. G. Parsons, J. Kornhuber, et al., *Neurosci Biobehav. Rev.*, **21**, 455 – 468 (1997).
8. M. Ebadi, S. K. Srinivasan, and M. D. Baxi, *Prog. Neurobiol.*, **48**(1), 1 – 19 (1996).
9. K. Jellinger, In: Caline D. B. (ed), *Handbook of experimental pharmacology*, 88, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1994).
10. A. E. Medvedev, A. Z. Kinkel, N. S. Kamyshanskaya, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 303 – 308 (1994).
11. M. Nomoto, *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.*, **16**(4), 113 – 122 (1996).
12. N. G. Panova, M. A. Zemskova, L. N. Axenova, and A. E. Medvedev, *Neurosci. Lett.*, **233**, 58 – 60 (1997).

Поступила 02.12.02

THE EFFECT OF THE NEW ANTIPARKINSONIAN DRUG HEMANTANE ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY

E. A. Val'dman¹, T. A. Voronina¹, L. N. Aksenova², O. A. Buneeva², and A. E. Medvedev²

¹ Laboratory of Psychopharmacology, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

² Laboratory of Biochemistry of Amines and Cyclic Nucleotides, Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

N-2(adamantyl)hexamethyleneimine hydrochloride (hemantane) is a new potential antiparkinsonian drug targeted at several neurochemical systems. The drug exhibits the properties of a low-affinity noncompetitive blocker of the ion channels of glutamate NMDA receptors. Hemantane increases the content of dopamine in the striatum, while decreasing the level of dopamine metabolite dioxyphenylacetic acid (DOPAC). Investigation of the drug interaction with monoamine oxidases (MAOs) of the A and B types *in vitro* showed that hemantane acts as a weak competitive inhibitor of MAO-B ($K_i = 470 \pm 70 \mu\text{M}$) and partly protected MAO-B from irreversible inhibition by selegiline (deprenyl), while virtually not influencing the activity of MAO-A. Administered to C57BL6 mice (20 – 100 mg/kg), hemantane did not influence the activity of MAO-B measured in isolated cerebral mitochondria. At the same time, hemantane administered in combination with deprenyl significantly reduced activity of the latter drug and caused pronounced irreversible inhibition of mitochondrial MAO-B (comparable with the effect of deprenyl introduced alone). Therefore, inhibition of MAO-B may contribute to the spectrum of neurochemical activity of hemantane.