

## ВНЕКЛЕТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В НЕОСТРИАТУМЕ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ПСИХОСТИМУЛЯТОРОВ (МИКРОДИАЛИЗНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Э. А. Андриянова<sup>1</sup>, Р. Сарансаари<sup>2</sup>, Э. Риитамаа<sup>2</sup>, С. С. Ойя<sup>2</sup>, К. С. Раевский<sup>1</sup>

Исследовали влияние однократного и субхронического (четырежды, с двухчасовым интервалом) внутрибрюшинного введения d-амфетамина и сиднокарба в эквивалентных дозах (5 и 23,8 мг/кг соответственно) на внеклеточное содержание глутамата, аспартата, таурина и аланина в неостриатуме крыс линии Спрег-Доули. Показано, что при повторяющемся введении психостимуляторы вызывают значительное увеличение содержания четырех нейроактивных аминокислот в диализатах неостриатума, причем эффекты сиднокарба были выражены в меньшей степени, что отражает меньший нейротоксический потенциал последнего по сравнению с d-амфетамином и подтверждает предположение о существенных различиях в нейробиохимических механизмах их действия. Массивное увеличение внеклеточного содержания таурина является, по-видимому, отражением гиперактивации глутаматергической передачи в неостриатуме и может служить маркером нейротоксического повреждения нейронов.

**Ключевые слова:** амфетамин, сиднокарб, нейроактивные аминокислоты, нейротоксичность, неостриатум, микродиализ

### ВВЕДЕНИЕ

Психомоторные стимуляторы применяют в медицине для лечения астенических состояний, нарколепсии, гиперактивного синдрома с нарушением внимания у детей, а также для повышения умственной и физической работоспособности человека [1–3].

В связи с высоким риском развития лекарственной зависимости, выраженностью периферических симпатомиметических эффектов, нейротоксическим потенциалом, применение препаратов этой группы в лечебных целях в настоящее время ограничено.

Механизм действия амфетаминов принято связывать с активацией дофаминергической передачи в nigrostriatalных и мезолимбических путях, обусловленной повышением внеклеточной концентрации дофамина в соответствующих структурах мозга [8, 9, 14]. В последнее время появляются сообщения о вовлечении системы возбуждающих нейромедиаторных аминокислот – прежде всего глутамата, в механизмы психостимулирующего и нейротоксического действия амфетамина и его аналогов [11].

Интерес к сиднокарбу обусловлен положительным опытом его применения в медицинской практике, высокой эффективностью, хорошей переносимостью, меньшими побочными эффектами [2–4]. В наших предыдущих исследованиях показано, что сиднокарб отличается от амфетамина по ряду нейробиохимических параметров [13].

Целью данной работы явилось изучение влияния сиднокарба и d-амфетамина на динамику внеклеточного содержания нейроактивных аминокислот (глутамата, аспартата, аланина, таурина) в неостриатуме крыс с использованием методики внутримозгового микродиализа.

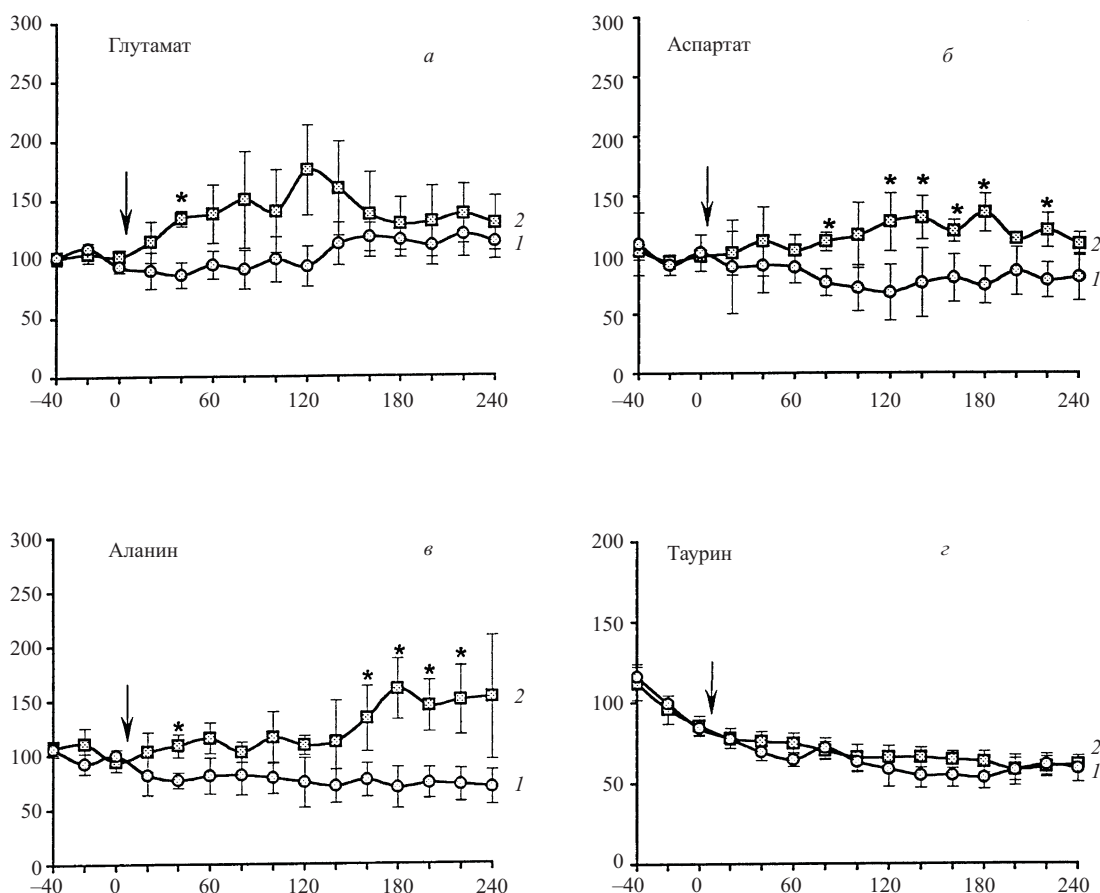
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на крысах-самцах линии Спрег-Доули массой 200–250 г (Orion, Espoo, Финляндия). Все процедуры выполняли в соответствии с принятыми этическими правилами работы с экспериментальными животными.

Крыс анестезировали галотаном (1об. %, скорость ингаляции 1,2 л/мин). Животным стереотаксически билатерально имплантировали в дорзальный стриатум микродиализные зонды по координатам: AP = 0,5, ML = ± 0,3, DV = –6,5, относительно брегмы [22]. d-Амфетамин (“Sigma”) растворяли в 0,85 % NaCl, сиднокарб (ЦХЛС – ВНИХФИ, Москва) — в смеси равных объемов 0,85 % NaCl и пропиленгликоля. Вещества вводили внутрибрюшинно (в/б). В отдельных сериях экспериментов оценивали эффекты растворителей. Использовали концентрические микродиализаторы с внешним диаметром 0,5 мм, длиной активной зоны мембраны 2 мм (“СМА/Microdialysis AB”, Швеция). Перфузию проводили искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей, в мМ: Na<sup>+</sup> 150; K<sup>+</sup> 3; Ca<sup>2+</sup> 1,2; Mg<sup>2+</sup> 0,8; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 31; Cl<sup>-</sup> 155; pH 7,4 при скорости 2 мкл/мин. Определение аминокислот в пробах проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической детекцией (градиентная хроматографическая система LC-10AD, детектор RF-10, Shimadzu Scientific Instru-

<sup>1</sup> Лаборатория нейробиохимической фармакологии (зав. — член-корр. РАН К. С. Раевский) НИИ фармакологии РАН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

<sup>2</sup> Brain Research Center (директор — проф. С. С. Ойя), University of Tampere, Medical School, 33520, Medisiininkatu, 3, Tampere, Finland.



**Рис. 1.** Эффект однократного введения d-амфетамина на внеклеточное содержание нейроактивных аминокислот в неостриатуме крыс.

Здесь и на рис. 2; 1 — 0,85 % NaCl, в/б; 2 — d-амфетамин, 5 мг/кг, в/б. Звездочка — значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ . Стрелками показаны моменты введения исследуемых веществ. Здесь и на рис. 2 — 4; по осям абсцисс — время, мин; по осям ординат — % от базального значения.

ments). Реакция с о-фталевым альдегидом (2 мин при 4°C) осуществлялась автоматически (автоинжектор SIL-10AD, Shimadzu), после чего реакционная смесь наносилась на аналитическую колонку C18-HC (ODS, 5 мкм, 4,6 мм × 25 мм, Waters), оборудованную предколонкой (C18, 4 мм × 20 мм). Мобильная фаза: фосфатный буфер 0,075 M (pH 6,5); метанол и ацетонитрил с концентрационными градиентами 14 – 25 % и 0 – 10 % соответственно. Данные анализировали с помощью программы VPclass5, Shimadzu Scientific Instruments. Базальные значения определяли как среднее трех образцов, собранных до введения веществ. Относительные величины эффектов исследованных веществ выражали в процентах от базального значения. Статистическую обработку проводили с помощью программы Excel 2000. Сравнение эффектов по группам проводили методом ANOVA. Уровень значимости определяли как  $p < 0,05$ .

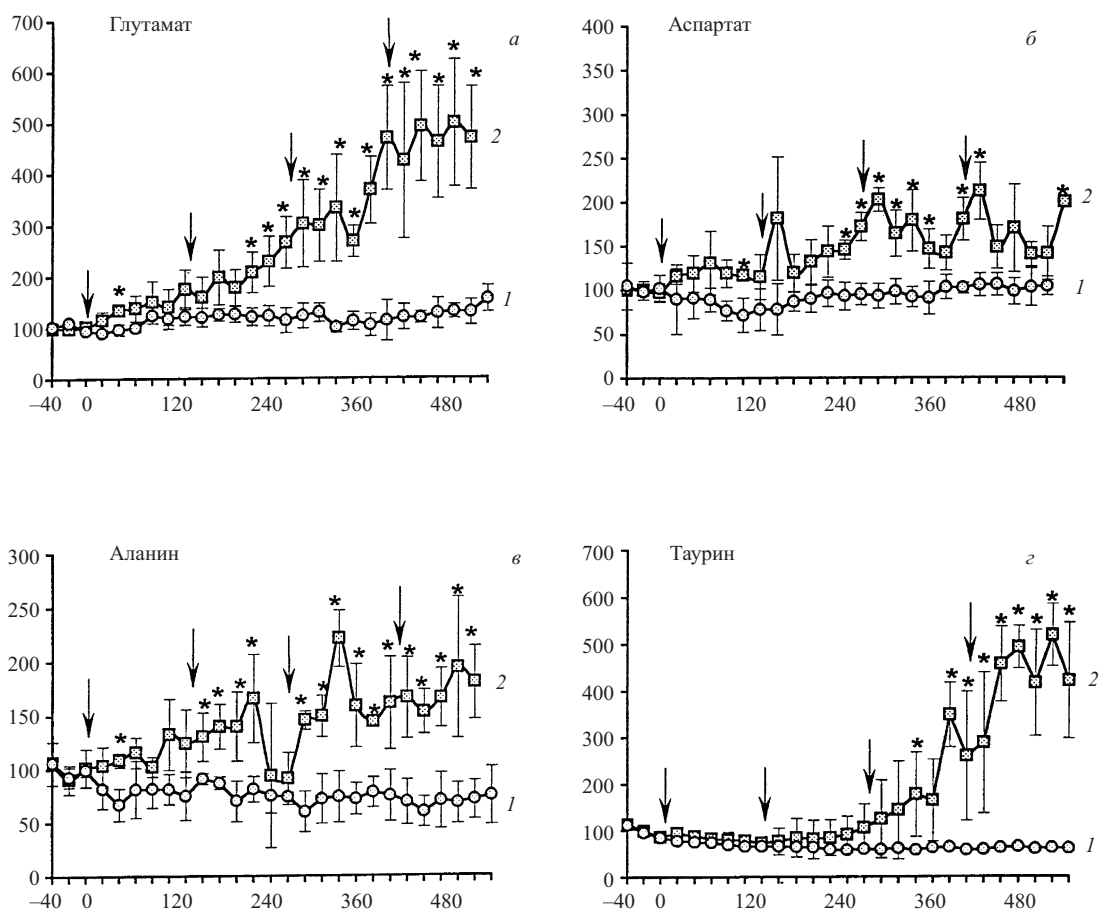
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базальное содержание аминокислот в диализатах неостриатума, измеренное у 69 крыс, составило  $0,384 \pm 0,142$  мкМ для глутамата,  $0,241 \pm 0,094$  мкМ

для аспартата,  $0,221 \pm 0,027$  мкМ для аланина и  $1,214 \pm 0,218$  мкМ для таурина.

Однократное введение d-амфетамина (5,0 мг/кг,  $n = 7$ ) сопровождалось значимым увеличением (на 50 – 80 %) внеклеточного содержания глутамата в неостриатуме (рис. 1, а) на 40 и 120 мин после инъекции. В тех же условиях содержание аспартата увеличивалось на 70 – 80 % (рис. 1, б). Это увеличение сохранялось до конца эксперимента (4 ч). Начиная с 60 мин, наблюдалось постепенное увеличение внеклеточного содержания аланина (рис. 1, в). Содержание таурина в тех же условиях не изменялось (рис. 1, з).

Субхроническое введение d-амфетамина (5,0 мг/кг × 4,  $n = 8$ ) сопровождалось градуальным накоплением внеклеточного содержания глутамата и таурина (до 400 – 550 % и 480 – 580 % по отношению к контролю соответственно) (рис. 2, а и з) и умеренным увеличением внеклеточного уровня аспартата и аланина (до 170 – 200 % и 140 – 210 % соответственно) (рис. 2, б и в). После периода увеличения внеклеточного содержания аланина наблюдалось кратковременное падение его уровня с последующим быстрым восстановлением (рис. 2, в).



**Рис. 2.** Эффект субхронического введения d-амфетамина (четырежды, с интервалом 2 ч) на внеклеточное содержание нейроактивных аминокислот в неостриате крыс.

Обозначения те же, что на рис. 1.  $n = 8$ .

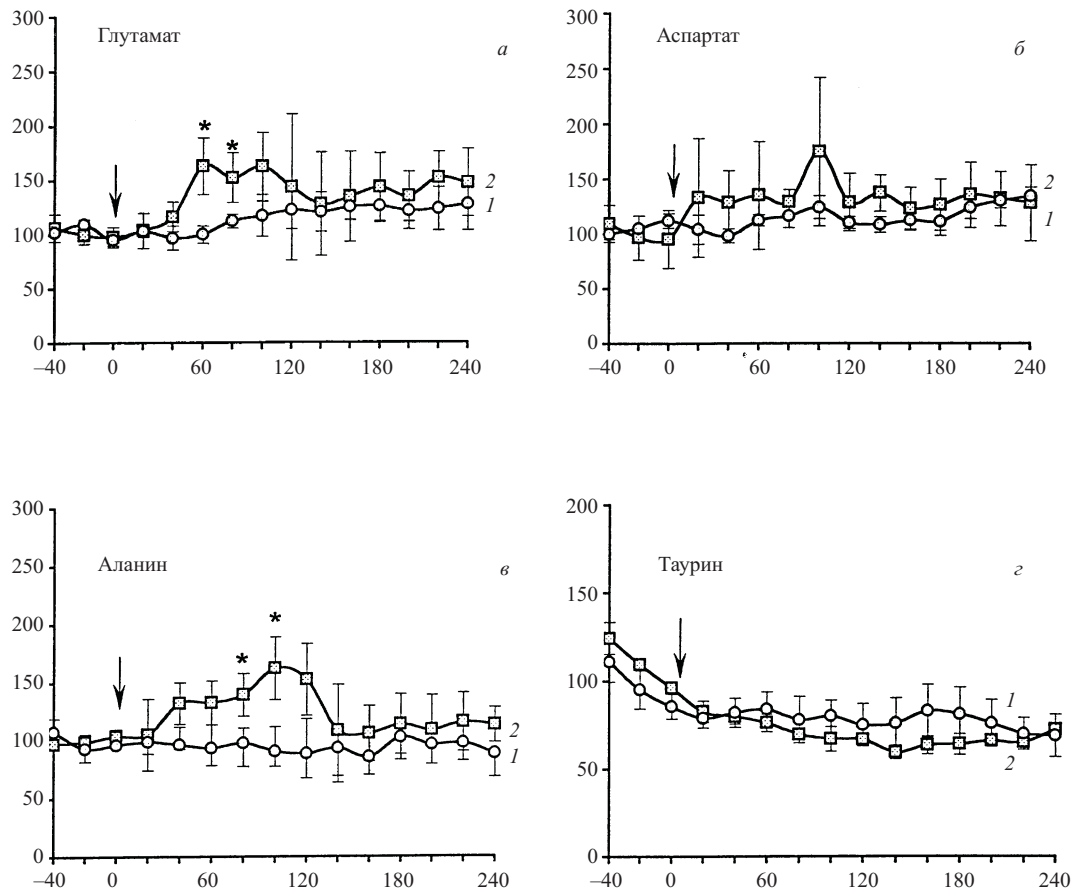
Однократное введение сиднокарба (23,8 мг/кг,  $n = 6$ ) приводило к кратковременному увеличению внеклеточного содержания глутамата (рис. 3, *a*); содержание аспартата и таурина на протяжении 4 ч опыта не изменялось (рис. 3, *б* и *г*). Краткосрочное, но значимое повышение уровня аланина отмечено в течение 2-го часа после введения сиднокарба (максимальное повышение на 100-й минуте составило  $160 \pm 42\%$  по отношению к контролю). Введение смеси пропиленгликоль/0,85 % NaCl (растворитель сиднокарба) вызвало двукратное увеличение содержания глутамата по сравнению с базальным уровнем (рис. 3, *a*).

В условиях субхронического введения сиднокарба (23,8 мг/кг  $\times$  4,  $n = 6$ ) уровень глутамата практически не изменялся по сравнению с контролем (растворитель); вместе с тем по сравнению с базальным уровнем он увеличился в два раза (рис. 4, *a*). Повторяющиеся введения сиднокарба сопровождалось существенным увеличением внеклеточного уровня аспартата после 2-й и 4-й инъекций (в обоих случаях до 250–350 %) (рис. 4, *б*). Внеклеточное содержание аланина кратковременно повышалось после каждого введения сиднокарба (рис. 4, *в*). Уровень таурина не изменялся на протяжении первых четырех часов, но

значительно повысился на фоне последней — 4-й — инъекции (150–200 % по отношению к базальным значениям) (рис. 4, *г*).

d-Амфетамин и его производные в диапазоне доз 2,5–5 мг/кг стимулируют психомоторную активность, что опосредуется повышением внеклеточного содержания дофамина в стриатуме, прилежащем ядре, коре мозга [1]. Показано также, что однократное введение амфетамина облегчает глутаматергическую передачу в стриатуме [11], однако, роль возбуждающих аминокислот в проявлении стимулирующих свойств амфетаминов остается не выясной. Изменение параметров глутаматергической передачи при применении нетоксических доз амфетамина или его производных, вероятнее всего, вносит вклад в развитие поведенческой сенситизации [10].

Механизмы, лежащие в основе вызываемого амфетамином повышения внеклеточного содержания глутамата, практически не обсуждаются в литературе. Процессы высвобождения и обратного захвата возбуждающих аминокислот могут модулироваться за счет изменения дофаминергической передачи. Дофамин, высвобождающийся в ответ на введение амфетамина, воздействует на дофаминовые рецепторы, что



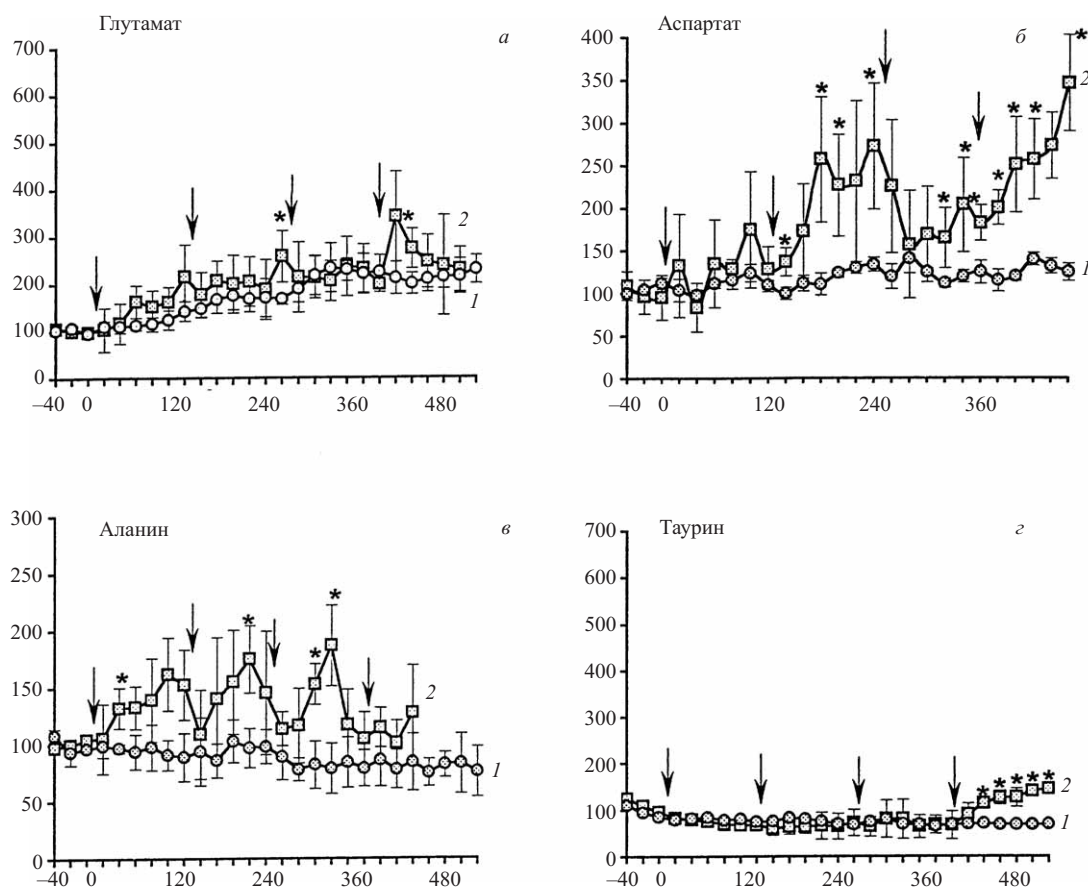
**Рис. 3.** Эффект однократного введения сиднокарба на внеклеточное содержание нейроактивных аминокислот в неостриатуме крыс. 1 – 0,85 % NaCl, в/б; 2 — d-амфетамин, 23,8 мг/кг, в/б. Здесь и на рис. 4. Звездочка — значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ . Стрелками показаны моменты введения исследуемых веществ.

облегчает индуцированное высвобождение глутамата в стриатуме крыс [12].

В наших опытах увеличение внеклеточного содержания глутамата и аспартата после однократной дозы амфетамина 5 мг/кг было умеренным (рис. 1, а и б). Предполагается, что эффект локального введения амфетамина или системного введения малых доз препарата на внеклеточное содержание глутамата и аспартата целиком определяется непрямими механизмами, а именно, активацией двигательного контура базальных ганглиев [4, 11, 18]. Таким образом, невыраженность изменений внеклеточного содержания возбуждающих аминокислот в наших опытах с однократным введением d-амфетамина может быть обусловлена недостаточным уровнем активации двигательного контура.

Субхроническое системное введение амфетамина или метамфетамина в дозах 5 – 10 мг/кг сопровождается нейротоксическими эффектами, что выражается в истощении тканевого содержания моноаминов, уменьшении числа высокоаффинных мест связывания (дофаминового транспортера) в стриатуме, фронтальной коре, миндалине, а также ингибировании тирозин- и триптофангидроксилазы в стриатуме и гиппокампе крыс [23 – 25]. Согласно одной из гипотез основной

причиной нейротоксического повреждения, вызываемого амфетаминами, является повышение содержания дофамина во внеклеточном пространстве. Известно, что катехоламины проявляют токсическое действие в условиях *in vivo* и *in vitro* [15, 30]. Однако *in vivo* реализация токсического потенциала дофамина находится в зависимости от нескольких факторов. Так, в условиях понижения температуры окружающей среды (5°C) проявления амфетаминовой нейротоксичности ослабевают, но уменьшения высвобождения дофамина при этом не наблюдается [15]. Локальное (внутриголовное) и системное введение амфетамина сопровождается увеличением внеклеточного содержания дофамина, но только в случае системного введения развиваются нейротоксические изменения, наблюдается повышение температуры тела животного, а также существенное увеличение внеклеточного уровня глутамата [6, 11, 17, 19, 29, 35]. Степень проявления амфетамин-индуцированной нейротоксичности снижается при введении конкурентных и неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов [28]. Тем не менее, эти препараты не влияют на уровень вызванного амфетамином высвобождения дофамина [16], а степень их нейропротекторного эффекта не коррелирует со сте-



**Рис. 4.** Эффект субхронического введения сиднокарба (четырежды, с интервалом 2 ч) на внеклеточное содержание нейроактивных аминокислот в неостриатуме крыс.

1 – 0,85 % NaCl, в/б; 2 — сиднокарб, 23,8 мг/кг, в/б. Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

пению подавления теплопродукции [7]. Таким образом, наряду с изменениями во внеклеточном содержании дофамина, развитием гипертермии, повышение внеклеточного содержания глутамата является одним из критических факторов в развитии нейротоксичности.

Градуальный характер увеличения внеклеточного содержания глутамата при субхроническом введении амфетамина в наших опытах указывает, по-видимому, на вовлечение в этот процесс дополнительных механизмов, что требует специального изучения. Согласно современным представлениям, массивное высвобождение дофамина из нервных окончаний приводит к накоплению высокореактивных метаболитов дофамина, что является пусковым элементом в цепи окислительных реакций, сопровождающихся формированием высокореактивных продуктов. Нами показано ранее, что субхроническое введение высоких доз амфетамина сопровождается повышением внеклеточного содержания дофамина и увеличением продукции гидроксильных радикалов в стриатуме [8]. Известно, что система обратного транспорта глутамата высоко чувствительна к повреждающему действию активных форм кислорода [31, 36]. Кумулятивный характер их повреждающего действия на уровне стриатума может

определять отсроченное и постепенное увеличение внеклеточного содержания глутамата, наблюдаемое в наших опытах (рис. 2, а).

Обнаруженное нами градуальное увеличение внеклеточного содержания глутамата коррелировало с постепенным возрастанием уровня таурина (рис. 2, б), который рассматривается как универсальный модулятор нейрональной возбудимости и регулятор клеточного объема [20]. Известно, что высвобождение таурина *in vitro* и *in vivo* существенно облегчается в присутствии глутамата или агонистов глутаматных рецепторов [21]. Показано, что высвобождающийся таурин выполняет нейропротективные функции, противодействуя повреждению нейронов, вызываемому избыточным содержанием глутамата. Таким образом, уровень внеклеточного таурина может быть адекватным маркером нейротоксического потенциала и/или степени нейронального повреждения при действии различных токсических агентов [26].

При субхроническом введении амфетамина нами обнаружено существенное увеличение внеклеточного содержания аланина в стриатуме. По мнению [33], аланин обеспечивает транспорт аминокислотной группы между глутаматергическими нейронами и глиальными клетками, которая отщепляется при глутаминовой дегра-



дации глутамата [32]. Поэтому обнаруженное нами изменение содержания аланина может быть расценено как отражение усиления “потребления” глутамата.

Нейрохимические аспекты механизма действия сиднокарба изучены фрагментарно. Так, показано, что психостимулирующий эффект сиднокарба в дозах 4,4–23,8 мг/кг опосредуется, по всей вероятности, облегчением дофаминергической нейротрансмиссии [13], однако, эффективность сиднокарба в отношении увеличения внеклеточного содержания дофамина меньше по сравнению с таковой d-амфетамина [8, 13] или метамфетамина [34]. В противоположность амфетамину, сиднокарб активирует Ca<sup>2+</sup>-зависимые механизмы высвобождения дофамина [13]. В представленном исследовании сиднокарб продемонстрировал меньшую способность увеличивать внеклеточное содержание нейротрансмиссивных аминокислот по сравнению с эквивалентной дозой d-амфетамина. Выраженным было только увеличение внеклеточного содержания аспартата при субхроническом введении сиднокарба, тогда как в случае введения d-амфетамина эффекты были противоположны. Известно, что аспартат является одним из критических факторов в развитии судорожных состояний. По некоторым данным, сиднокарб, в отличие от метамфетамина, может усиливать судорожный эффект кокаина [34].

## ВЫВОДЫ

1. Градуальное увеличение внеклеточного содержания глутамата в неостриатуме крыс, вызываемое d-амфетаминем при субхроническом введении, свидетельствует о высоком нейротоксическом потенциале психостимулятора.

2. Массивное увеличение внеклеточного содержания таурина при той же схеме введения d-амфетамина является показателем гиперактивации глутаматергической нейротрансмиссии. В связи с этим уровень внеклеточного таурина может служить адекватным маркером нейротоксического действия.

3. Полученные данные свидетельствуют о меньшем нейротоксическом потенциале сиднокарба в сравнении с d-амфетаминем и подтверждают предположение о различиях в механизме действия двух психостимуляторов.

Исследование поддержано грантом РФФИ 01-04-48410 и грантом СИМО (Center for International Mobility), Финляндия. Авторы признательны Ирме Рантамаа за помощь при проведении экспериментов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Б. Арушанян, *Психостимулирующие вещества*, Чита, 101–105 (1980).
2. В. А. Красов, *Журн. невропатол. и психиатр.*, **88**, 97–101, (1988).
3. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Медицина, Москва (1993), сс. 148–150.

4. М. Д. Машковский, Р. А. Альтшулер, Г. Я. Авруцкий и др., *Журн. невропатол. и психиатр.*, **71**, 1704–1709 (1971).
5. J. Abarca and G. Bustos, *Neurochem. Int.*, **35**, 19–33 (1999).
6. T. Abekawa, T. Ohmori, and T. Koyama, *Brain Res.*, **643**, 276–281 (1994).
7. D. S. Albers and P. K. Sonsalla, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1104–1114 (1995).
8. E. A. Anderzhanova, I. I. Afanas'ev, V. S. Kudrin, et al., *Ann. NY Acad. Sci. USA*, **914**, 137–145 (2000).
9. I. I. Afanas'ev, E. A. Anderzhanova, V. S. Kudrin, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **69**, 653–658 (2001).
10. M. J. Bickerdike and E. D. Abercrombie, *Neuroreport*, **10**, 77–80 (1999).
11. K. B. Burrows, W. L. Nixdorf, and B. K. Yamamoto, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 853–860 (2000).
12. C. Cepeda and M. S. Levine, *Dev. Neurosci.*, **20**, 1–18 (1998).
13. R. R. Gainetdinov, T. D. Sotnikova, T. V. Grekhova, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **340**, 53–58, (1997).
14. S. R. Jones, R. R. Gainetdinov, R. M. Wightman, et al., *J. Neuroscience.*, **18**, 1979–1986 (1998).
15. M. J. LaVoie and T. G. Hastings, *J. Neurosci.*, **19**, 1484–1491 (1999).
16. D. M. Miller and E. D. Abercrombie, *Brain Res. Bull.*, **40**, 57–62 (1996).
17. J. F. Nash and B. K. Yamamoto, *Brain Res.*, **581**, 237–243 (1992).
18. S. J. O'Dell, F. B. Weihmuller, R. J. McPherson, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**, 1319–1325 (1994).
19. T. Ohmori, T. Abekawa and T. Koyama, *Neurochem. Int.*, **29**, 301–307 (1996).
20. S. S. Oja, and P. Saransaari, *Metab. Brain Dis.*, **11**, 153–164 (1996).
21. S. S. Oja and P. Saransaari, *Prog. Neurobiol.*, **62**, 407–425 (2000).
22. G. Paxinos and C. Watson, *The rat brain stereotaxic coordinates*, 2nd edn. Academic Press, Sydney (1996).
23. G. A. Ricaurte, C. R. Schuster, L. S. Seiden, et al., *Brain Res.*, **193**, 153–163 (1980).
24. G. A. Ricaurte, R. W. Guillery, L. S. Seiden, et al., *Brain Res.*, **235**, 93–103 (1982).
25. G. M. Rudenko and R. A. Altshuler, *Hung. Pharmacother.*, **124**, 150–154 (1978).
26. P. Saransaari and S. S. Oja, *Amino Acids*, **19**, 509–526 (2000).
27. P. K. Sonsalla, *Drug Alcohol Depend.*, **37**, 101–105 (1995).
28. P. K. Sonsalla, D. E. Riordan and R. E. Heikkila, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 506–512 (1991).
29. S. Stephans and B. K. Yamamoto, *Synapse*, **17**, 203–209 (1994).
30. A. H. Stokes, T. G. Hastings and K. E. Vrana, *J. Neurosci. Res.*, **55**, 659–665 (1998).
31. D. Trotti, N. C. Danbolt and A. Volterra, A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 328–334 (1998).
32. A. Volterra, D. Trotti and G. Racagni, *Mol. Pharmacol.*, **46**, 986–992 (1994).
33. H. S. Waagepetersen, U. Sonnewald, O. M. Larsson, et al., *J. Neurochem.*, **75**, 471–479 (2000).
34. G. C. Wagner, G. A. Ricaurte, C. R. Schuster, et al., *Brain Res.*, **181**, 1151–1160 (1980).
35. J. M. Witkin, N. Savtchenko, M. Mashkovsky, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 1298–1310 (1999).
36. M. E. Wolf and C.-J. Xue, *J. Neurochem.*, **70**, 198–209 (1998).
37. M. E. Wolf, C.-J. Xue, Y. Li, et al., *J. Neurochem.*, **75**, 1634–1644 (2000).

**VARIATION OF THE EXTRACELLULAR LEVEL OF NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN RAT NEOSTRIATUM UNDER THE ACTION OF PSYCHOSTIMULANTS STUDIED BY MICRODIALYSIS****E. A. Andyarzhanova<sup>1,2</sup>, R Saransaari<sup>2</sup>, E. Riitamaa<sup>2</sup>, S. S. Oja<sup>2</sup>, and K. S. Raevsky<sup>1</sup>,**<sup>1</sup> Laboratory of Neurochemical Pharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia<sup>2</sup> Brain Research Center, University of Tampere Medical School, Tampere, Finland

The effects of acute and subchronic (four times with a 2-h interval) intraperitoneal administration of d-amphetamine and sydnocarb in equimolar doses (5 and 23.8 mg/kg, respectively) on the intracellular level of glutamate, aspartate, taurine, and alanine in neostriatum of male Sprague – Dawley rats anesthetized with halothane was studied. It was shown that repeated introduction of the psychostimulants leads to a significant increase in the content of all four neuroactive amino acids in neostriatum dialysates. However, the effects of sydnocarb were less pronounced as compared to those of d-amphetamine, which is indicative of a lower neurotoxic potential of the former drug and confirms a significant difference in the neurochemical mechanisms of action of the two drugs studied. The massive increase in the extracellular content of taurine probably reflects hyperactivation of the glutamatergic transmission in the neostriatum and may serve as a marker of neurotoxicity.