

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ГИМАНТАНА НА МОДЕЛИ РАННЕЙ (“ДОМОТОРНОЙ”) СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС

А. В. Непоклонов, И. Г. Капица, Е. А. Иванова, Т. А. Воронина, Е. А. Вальдман¹

На модели “домоторной” (“досимптомной”) стадии болезни Паркинсона, вызванной билатеральным интранигральным введением нейротоксина МФТП крысам, через 3 недели после операции установлены нарушения когнитивных функций и депрессивноподобное поведение при отсутствии изменений в двигательной активности. Гимантан (10 мг/кг) или амантадин (20 мг/кг) при предварительном (5 дней до введения МФТП) и последующем (ежедневно в течение 3-х недель после МФТП) введении препятствовали развитию когнитивных нарушений и депрессивноподобного поведения у крыс. Гимантан оказывал достоверно более выраженный антидепрессивный эффект в сравнении с амантадином на использованной модели. Полученные результаты в совокупности с имеющимися данными о механизме действия гимантана указывают на перспективу использования препарата в качестве средства, затормаживающего развитие заболевания на “досимптомных” стадиях болезни Паркинсона.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; гимантан; амантадин; МФТП; крысы

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона классически рассматривается как болезнь движения и диагностируется по основным двигательным расстройствам, причиной которых является прогрессирующая дегенерация дофаминергической системы в базальных ганглиях. Вместе с тем известно, что двигательные нарушения при болезни Паркинсона проявляются, когда 60–70% дофаминергических нейронов уже погибло, и фармакотерапия может быть преимущественно симптоматической. В исследованиях последних лет с применением методов нейровизуализации получены подтверждения того, что патологический процесс начинается за 4–6 лет до появления нарушений движения [10]. Охарактеризованы так называемые “домоторные” проявления болезни Паркинсона, развивающиеся при начальных формах нейродегенерации на самых ранних стадиях заболевания. Наиболее значимыми являются нарушения обоняния, сна, когнитивные расстройства, тревога и депрессия [8, 14].

Поиск средств, способных замедлить прогрессирование заболевания, является весьма актуальным для совершенствования фармакотерапии болезни Паркинсона. Развитие исследований в этом направлении невозможно без внедрения адекватных моделей. Экспериментальные модели паркинсонизма у грызунов, применяемые для оценки потенциальных противопаркинсонических препаратов, в большинстве своем основаны на воспроизведении двигательных нарушений,

развивающихся вследствие дегенерации нейронов дофаминергической системы, поврежденных нейротоксинами. В исследованиях последних лет разработаны модели “досимптомной” (“домоторной”) стадии болезни Паркинсона у грызунов, позволяющие воспроизводить изменения поведения, предшествующие двигательным [12]. Одной из них является модель с использованием низких доз нейротоксина 1-метил 4-фенил 1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) у крыс [6, 7, 12, 13], позволяющая получить низкий уровень нейродегенерации, при котором у животных отсутствуют явные двигательные нарушения. Показано, что билатеральное введение МФТП непосредственно в черную субстанцию вызывает частичную дегенерацию дофаминергических нейронов и умеренное снижение уровня дофамина в стриатуме, что приводит к развитию когнитивного и сенсорного дефицита и депрессии [6, 7, 12]. На новой модели изучается механизм развития недвигательных нарушений на начальной стадии болезни Паркинсона и возможности их коррекции препаратами с нейропротекторным потенциалом. Имеются данные, что в формировании нарушений обучения, памяти и аффективных расстройств на ранней стадии заболевания вовлечены глутаматные рецепторы NMDA подтипа [15].

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН разработан новый противопаркинсонический препарат гимантан (N-(2-адамантил)-гексаметиленимина гидрохлорид), являющийся неконкурентным низкоаффинным блокатором ионного канала NMDA-рецепторов. В эксперименте гимантан вызывает снижение каталепсии, тремора и олигокинезии [1, 5]. Получены данные клинического исследования, свидетельствующие

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

щие об эффективности препарата на ранних стадиях болезни Паркинсона [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов гимантана и препарата сравнения амантадина на модели ранней стадии болезни Паркинсона у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г в начале эксперимента. Крыс наркотизировали этиминал-натрием (45 мг/кг, внутривенно). МФТП (100 мкг в 2 мкл р-ра Рингера) вводили билатерально в компактную часть черной субстанции по стереотаксическим координатам согласно атласу мозга крыс: AP — 4,0 мм, ML ± 2,0 мм, DV — 8,0 мм. Ложнооперированные крысы подверглись такой же процедуре с билатеральным введением раствора Рингера (по 1 мкл). Животные были разделены на 4 группы: 1 — ложнооперированные, 2 — МФТП, 3 — амантадин + МФТП; 4 — гимантан + МФТП. Гимантан (10 мг/кг) и амантадин (1-аминоадамантина гидрохлорид) 20 мг/кг вводили внутривенно ежедневно в течение 5 дней до операции и затем в течение трех недель. Амантадин и гимантан вводили в минимальных дозах, в которых была установлена их активность на моделях паркинсонического синдрома [1].

Двигательные нарушения оценивали через 21 день после операции в тесте “вращающийся стержень” (Ugo Basile, Италия). Установка представляет собой стержень диаметром 6 см, разделенный 5 дисками (диаметром 49 см) на 4 одинаковые части. Предварительно за день до тестирования проводили процедуру “ознакомления” животных с установкой. Тестирование проводили при постоянном ускорении вращения стержня, равном 1,5 оборота в мин, начальная скорость соответствовала 10 оборотам в мин, конечная — 30. Максимальное время тестирования составляло 3 мин.

Оценку депрессивноподобного состояния животных проводили в тесте вынужденного плавания по Porsolt [12]. Крыс помещали в цилиндр размером 18 × 45 см, наполненный водой ($t = 27 \pm 1^\circ \text{C}$) на 30 см. В первый день проводили обучение в течение 15 мин. Во второй день фиксировали продолжитель-

Таблица 1. Влияние интранигрального введения МФТП, гимантана и амантадина на двигательную активность крыс в методике “вращающийся стержень”

Группа	Время удержания на стержне, с
Ложно оперированные	44,6 ± 22,5
МФТП	37,3 ± 9,9
Амантадин + МФТП	35,0 ± 12,5
Гимантан + МФТП	34,0 ± 21,8

Примечание. Результаты представлены в виде Mean±SEM.

ность пассивного (иммобилизация, неподвижность) и активного поведения животных в течение первых 6 мин после погружения.

Когнитивные нарушения оценивали в методике условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [2]. Выработку УРПИ у крыс проводили на приборе “Lafayette Instrument Co” (США). Крысу сажали на ярко освещенную платформу (250 × 70 мм) хвостом к квадратному отверстию (60 × 60 мм), снабженному гильотинной дверью и ведущему в темную камеру с электродным полом. Регистрировали латентный период первого захода в затемненное отделение. После захода в темный отсек отверстие закрывали специальной гильотинной дверью и наносили животному неизбежное электрошоковое раздражение через пол (8–10 ударов, сила обучающего тока 0,4 мА, длительность каждого импульса составляла 1 с, интервал между последовательными импульсами — 2 с). Через 24 ч после обучения УРПИ проводили тест воспроизведения навыка — крысу сажали на платформу хвостом к отверстию и регистрировали латентный период захода животного в темное отделение. Максимальное время наблюдения составляло 180 с.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica v. 6.0 с использованием критериев Манна-Уитни и χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании двигательной активности животных в условиях методики “вращающийся стержень” не было выявлено достоверных различий между группами, что согласуется с литературными данными [6, 7] и подтверждает, что была смоделирована именно ранняя стадия паркинсонического синдрома, на которой отсутствуют моторные нарушения (табл. 1).

При анализе результатов, полученных в тесте вынужденного плавания, выявлено, что в группе крыс, которым вводили МФТП, сократилась продолжительность активного плавания и увеличилось время неподвижности по сравнению с ложно оперированными жи-

Таблица 2. Изучение антидепрессивного эффекта гимантана и амантадина в тесте вынужденного плавания у крыс с паркинсоническим синдромом, вызванным интранигральным введением МФТП

Группа	Продолжительность активного плавания, с	Продолжительность иммобилизации, с
Ложно оперированные	183,7 ± 17,1	19,1 ± 8,8
МФТП	114,0 ± 19,9 [#]	199,2 ± 26,9 [#]
Амантадин + МФТП	151,1 ± 11,27	35,7 ± 7,9*
Гимантан + МФТП	189,3 ± 20,9*	11,6 ± 1,7* ^{&}

Примечание. Результаты представлены в виде Mean±SEM. Различия достоверны по сравнению: [#] — $p < 0,05$ с ложно оперированными животными (по критерию Манна-Уитни); * — $p < 0,05$ с МФТП (по критерию Манна-Уитни); [&] — $p < 0,05$ с группой “Амантадин + МФТП” (по критерию Манна-Уитни).

вотными, что свидетельствует о развитии у них депрессивного состояния. Введение амантадина и гимантана приводило к снижению выраженности проявлений депрессивного состояния у животных после введения МФТП. Так, у крыс, получавших амантадин, обнаружено достоверное уменьшение периодов неподвижности в 5,6 раза и тенденция к росту времени активного плавания по сравнению с группой МФТП. В группе животных, которым вводили гимантан, зарегистрировано значительное увеличение продолжительности активного плавания на 66 % и снижение периода иммобилизации в 17,2 раза по сравнению с группой, которой была проведена только инъекция МФТП. При этом антидепрессивный эффект гимантана был более выражен: на его фоне отмечалось снижение времени неподвижности крыс в 3,1 раза по сравнению с амантадином (табл. 2).

У крыс, получавших только МФТП, в тесте УРПИ было зарегистрировано нарушение норкового поведения, что выражалось в отказе 50 % животных от захода в темную камеру во время процедуры обучения. У обучившихся животных из группы “МФТП” через 24 ч было отмечено значительное снижение уровня воспроизведения навыка относительно ложно оперированных крыс. На фоне введения амантадина и гимантана не было зарегистрировано нарушений норкового рефлекса в ходе обучения УРПИ. При воспроизведении памятного следа в обеих группах латентный период захода в темный отсек не отличался от значений, полученных в группе ложно оперированных крыс, и был достоверно выше, чем в группе животных, которым вводили только МФТП. Гимантан оказывал более выраженный защитный эффект на обучение и память, однако различия с группой крыс, получавших амантадин, оставались только на уровне тенденции (табл. 3).

В описанных в литературе исследованиях поведения крыс на модели “досимптомной” стадии болезни Паркинсона, вызванной билатеральным интранигральным введением нейротоксина МФТП, показано, что у животных не происходит изменений в исследо-

вательском поведении, скорости плавания в водном лабиринте и чувствительности к электроболевному воздействию. Отсутствие двигательных нарушений объясняется частичным повреждением черной субстанции, компенсаторными процессами нейрональной пластичности и билатеральным повреждением [6, 7]. В нашем исследовании в тесте “вращающийся стержень” не было выявлено отклонений поведения крыс всех групп, которым интранигральным введением МФТП, по сравнению с ложно оперированными животными, что свидетельствует о сохранении их двигательной активности на уровне нормы.

В экспериментах и клинике показано, что ранняя стадия болезни Паркинсона характеризуется когнитивными и эмоциональными нарушениями, а также депрессивными расстройствами, которые в последующем входят в симптомокомплекс развернутых стадий заболевания [4, 8]. В проведенном исследовании обнаружено усиление депрессивного компонента, нарушение обучения и памяти у крыс после билатеральной интранигральной инъекции МФТП, что характеризует использованную модель как адекватную поставленной задаче [6, 7]. В группах животных, которым до операции и в последующие три недели после нее вводили противопаркинсонические препараты производные адамантана — гимантан и амантадин, не было зарегистрировано нарушений обучения и памяти в тесте УРПИ. При оценке депрессивноподобного поведения в тесте вынужденного плавания в группах крыс, получавших амантадин и гимантан, также не было выявлено различий с ложно оперированными животными. При этом антидепрессивный эффект гимантана был достоверно более выражен, чем амантадина. Полученный результат согласуется с данными клинического исследования эффективности гимантана у пациентов с ранними стадиями болезни Паркинсона, при проведении которого помимо положительного эффекта в отношении двигательных расстройств был установлен антидепрессивный компонент спектра фармакологической активности изучаемого препарата [3].

В настоящее время интенсивно разрабатываются подходы к диагностике самых ранних стадий болезни Паркинсона, а также ведется поиск нейропротекторных препаратов для предупреждения и замедления развития основной клинической симптоматики заболевания. Полученные в нашем исследовании результаты в совокупности с имеющимися данными о механизме действия гимантана, включающем антагонизм с глутаматными NMDA-рецепторами, свойства ингибитора MAO-B и антирадикальную активность [1], указывают на перспективу использования гимантана в качестве средства, затормаживающего развитие заболевания на “досимптомных” стадиях болезни Паркинсона.

ВЫВОДЫ

1. Модель “домоторной” стадии болезни Паркинсона, вызванной билатеральным интранигральным вве-

Таблица 3. Показатели обучения и памяти у крыс в тесте УРПИ после интранигрального билатерального введения МФТП и эффекты гимантана и амантадина

Группа	Обучение		% крыс, не зашедших в темный отсек при воспроизведении
	ЛП1, с	ЛП2, с	
Ложнооперированные	21,0 ± 4,9	126,7 ± 33,3	66 [#]
МФТП	8,3 ± 4,9	67,3 ± 56,4*	33
Амантадин + МФТП	30,0 ± 8,2	133,5 ± 29,6	66 [#]
Гимантан + МФТП	29,9 ± 7,2	154,9 ± 23,5	71,5 [#]

Примечание. Результаты представлены в виде Mean±SEM; ЛП — латентный период захода в темный отсек. Различия достоверны: * — $p < 0,05$ — относительно ложно оперированных животных (по критерию Манна-Уитни); [#] — $p < 0,05$ — относительно МФТП (по критерию χ^2).

дением нейротоксина МФТП крысам, характеризуется нарушением когнитивных функций и наличием депрессивноподобного поведения при отсутствии изменений в двигательной активности, регистрируемыми через 3 недели после операции.

2. Гимантан (10 мг/кг) или амантадин (20 мг/кг) при предварительном (5 дней до введения МФТП) и последующем (ежедневно в течение 3-х недель после МФТП) введении препятствуют развитию когнитивных нарушений и депрессивноподобного поведения у крыс.

3. Гимантан (10 мг/кг) оказывает достоверно более выраженный антидепрессивный эффект в сравнении с амантадином (20 мг/кг) на модели депрессивноподобного поведения, индуцированного МФТП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Вальдман, *Автореф. дисс. д-ра мед.наук*, Москва (2001).
2. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005), 308 – 320.
3. Е. А. Катунина, А. В. Петрухова, Г. Н. Авакян, и др., *Журн. неврол. и психиатр.*, **108**(6), 24 – 27 (2008).
4. И. В. Литвиненко, *Успехи геронтол.*, выпуск 13, 94 – 101 (2004).
5. Л. Н. Неробкова, Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, и др., *Экспер. и клин фармакол.*, **63**(3), 3 – 6 (2000).
6. C. Da Cunha, M. S. Gevaerd, M. A. Vital, et al., *Behav Brain Res.*, **124**, 9 – 18 (2001).
7. C. Da Cunha, M. E. Angelucci, N. S. Canteras, et al., *Cell Mol Neurobiol.*, **22**, 227 – 237 (2002).
8. A. Lieberman, *Acta Neurol Scand.*, **113**, 1 – 8 (2006).
9. L. C. S. Tan, *Parkinsonism and Related Disorders*, **18**(S1), 74 – 76 (2012).
10. K. Marek, R. Innis, C. van Dyck, et al., *Neurology*, **57**, 2089 – 2094. (2001).
11. R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, et al., *Europ. J. Pharmacol.*, **47**, 379 – 391 (1978).
12. R. M. Santiago, J. Barbicero, M. Lima, et al. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **34**, 1104 – 1114 (2010).
13. M. T. Tadaiesky, P. A. Dombrowski, C. P. Figueiredo, et al., *Neuroscienc*, **156**, 830 – 840 (2008).
14. E. Tolosa, C. Gaig, J. Santamaria, et al. *Neurology*, **72**(7), Suppl. 2, 12 – 20 (2009).
15. A. L. Wang, Y. M. Liou, C. R. Pawlak, Y. J. Ho, *Behavioural Brain Research*, **208**, 38 – 46 (2010).

Поступила 02.04.12

STUDY OF HEMANTANE EFFECTS IN RATS ON A MODEL OF EARLY (PREMOTOR) STAGE OF PARKINSON'S DISEASE

A. V. Nepoklonov, I. G. Kapitsa, E. A. Ivanova, T. A. Voronina, and E. A. Val'dman

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

Presymptomatic (premotor) stage of Parkinson's disease has been modeled in rats by intranigral bilateral injections of neurotoxin MPTP. Three weeks after surgery, rats demonstrated cognitive deficit and depressive-like behavior without definite motor impairment. Pretreatment with hemantane (10 mg/kg) and the reference drug amantadine (20 mg/kg) 5 days before MPTP and further administration during 3 weeks after MPTP preserve cognitive function and prevented depressive disturbances in rats. The antidepressive effect of hemantane was more pronounced than that of amantadine. Results obtained, together with data on hemantane mechanism of action, allow hemantane to be considered as a promising drug for the treatment of Parkinson's disease with potential to decrease the rate of disease progression when administered on early stages.

Key words: Hemantane; Parkinson's disease; MPTP; amantadine; rats