

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ГИМАНТАНА НА СОДЕРЖАНИЕ И МЕТАБОЛИЗМ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ МОНОАМИНОВ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Д. А. Абаимов, И. А. Зимин, В. С. Кудрин, Г. И. Ковалев¹

Гимантан (N-адамантил-2-ил гексаметиленмина гидрохлорид) — новый противопаркинсонический препарат, обладающий широким спектром активности и по ряду тестов превосходящий препарат сравнения амантадин (мидантан). Изучали влияние гимантана на уровень содержания моноаминов и их метаболитов в стриатуме, фронтальной коре и гиппокампе мышей линии C57BL/6. Обнаружено, что при однократном системном введении гимантан (20 мг/кг внутривентриально) вызывает уменьшение уровней ДОФА, серотонина и его метаболита 5-ГИУК в стриатуме мышей, оказывает умеренное ингибирующее действие на синтез дофамина в стриатуме, а также влияет на соотношение ГВК/ДА в гомогенатах фронтальной коры.

Ключевые слова: паркинсонизм, противопаркинсонические средства, производные адамантана, гимантан, моноамины, медиаторные аминокислоты, дофамин, серотонин, стриатум, фронтальная кора, гиппокамп

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона вызывается дефицитом дофаминергической передачи в стриатуме, который, в свою очередь, обуславливается дегенерацией нейронов компактной части черной субстанции [14]. Из-за большого числа патогенетических звеньев болезни Паркинсона наиболее перспективными являются препараты, сочетающие несколько механизмов действия. Такими препаратами являются производные адамантана (амантадин, мидантан) [2, 16], воздействующие сразу на несколько нейрохимических систем и обладающие выраженными нейропротекторными свойствами [10, 11]. В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН синтезирован и изучен новый противопаркинсонический препарат гимантан (N-адамантил-2-ил гексаметиленмина гидрохлорид), превосходящий амантадин по противопаркинсонической эффективности.

Гимантан оказывает дозозависимое модулирующее влияние на активность дофамин- и серотонинергической нейромедиаторных систем в стриатуме [1], обладает свойствами низкоаффинного блокатора ионных каналов глутаматных NMDA-рецепторов, избирательно ингибирует MAO-B, имеет слабовыраженную антирадикальную активность и иммуномодулирующее действие [3]. В экспериментах определен спектр противопаркинсонической активности гимантана, доказаны его преимущества перед амантадином (мидантаном), показана перспективность применения гимантана для лечения ригидных и дрожательных форм паркинсонизма [4, 8]. В настоящее время препарат проходит стадию клинических испытаний. Тем не менее, изучение нейрохимических и молекулярно-биоло-

гических механизмов действия гимантана не завершено. Влияние гимантана на содержание, синтез и катаболизм нейромедиаторов, вовлеченных в этиопатогенез болезни Паркинсона, остается не вполне выясненным. В представленном исследовании изучено влияние гимантана на содержание 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), норадреналина (НА), гомованилиновой кислоты (ГВК), 5-гидрокситриптофана (5-ГТП), серотонина (СТ) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) во фронтальной коре, стриатуме и гиппокампе мышей линии C57BL/6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования по определению содержания моноаминов и их метаболитов в ткани мозга проводили на самцах мышей линии C57BL/6 массой 22 – 25 г, которых содержали в виварии НИИ фармакологии в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum*, по 10 особей в клетке в течение 7 суток до начала эксперимента, на стандартной диете при 12-часовом световом режиме.

Животные контрольной группы (I группа) получали физиологический раствор (0,9 % NaCl внутривентриально). Животные II группы получали гимантан (20 мг/кг внутривентриально). Препарат вводили за 30 мин до декапитации. Животным III группы вводили NSD1015, ингибитор декарбоксилазы-L-ароматических аминокислот, в дозе 50 мг/кг внутривентриально за 2 ч до декапитации. Животные IV группы получали гимантан (20 мг/кг) на фоне введенного NSD1015 (50 мг/кг).

Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией с последующей декапитацией, головной мозг извлекали на леду и выделяли стриатум, гиппокамп и фронтальную кору [12], размельчали в гомогенизаторе “стекло

¹ Лаборатория радиоизотопных методов исследований (зав. — проф. Г. И. Ковалев), лаборатория нейрохимической фармакологии (зав. — В. С. Кудрин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

— тефлон” (0,2 мм) при 10 °С при скорости вращения пестика 3000 об/мин. В качестве среды выделения использовали 0,1 Н HClO₄ с добавлением внутреннего стандарта ДГБА (3,4-дигидроксипензиламин) в концентрации — 0,5 нмоль/мл. Структуры мозга гомогенизировали в 20 объемах среды выделения. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Супернатант использовали в дальнейшем для определения моноаминов и их метаболитов. Содержание моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, “West Lafayette”, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4 × 100 мм, диаметр пор 3 мкм (Dr. Majsch GMBH, “Элсико”, Москва). Насос PM-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы 1 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9 % ацетонитрила (рН 3,0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4В (BAS, США) на стеклоугольном электроде (+ 0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрацию образцов проводили с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1,5 (АМПЕРСЕНД). Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о.с.ч., х.ч. или analytical grade. Для калибровки хроматографа использовали смеси рабочих стандартов определяемых веществ в концентрации 500 пмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площади пиков в стандартной смеси и в образце [7].

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с применением программы Statistika 6.0, используя метод непараметрической статистики U-критерий Манна-Уитни. На рисунках звездочками обозначены достоверные различия ($p < 0,05$). Результаты представлены в виде $m \pm S.E.M.$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гимантан был исследован в его предполагаемой активности относительно биосинтеза ДА и СТ, что оценивали по накоплению их предшественников L-ДОФА и 5-ГТП в условиях *in vivo* блокады декарбоксилазы L-ароматических аминокислот (ДААК) с помощью стандартного ингибитора 3-оксибензилгидразина (3-ОБГ или NSD1015). Необходимость использования NSD1015 для оценки биосинтеза обусловлена высокой интенсивностью процессов биосинтеза моноаминов, следствием чего является низкое содержание их предшественников в интактном мозге. Блокада ДААК посредством NSD1015 приводила к накоплению ДОФА ($0,74 \pm 0,15$ до $4,45 \pm 0,34$) и 5-ГТП (0 ± 0 до $1,59 \pm 0,14$) в ткани стриатума, что говорит о действенности выбранной модели. Аналогичные изменения под влиянием NSD1015 происходили и в других исследуемых структурах головного мозга.

Стриатум. Гимантан в дозе 20 мг/кг вызывал снижение количества ДОФА на 18 % от контрольного значения (табл. 1).

Уровень СТ уменьшался на 13 %, а его метаболита 5-ГИУК — на 17 % (рисунок, а). Поскольку изменения в отношении 5-ГИУК/СТ обнаружено не было, можно допустить, что произошедшие изменения не имеют прямой связи с процессами синтеза серотонина. В пользу данного предположения свидетельствует также то, что введение гимантана на фоне NSD1015 не оказывало влияния на тканевое содержание 5-ГТП, СТ

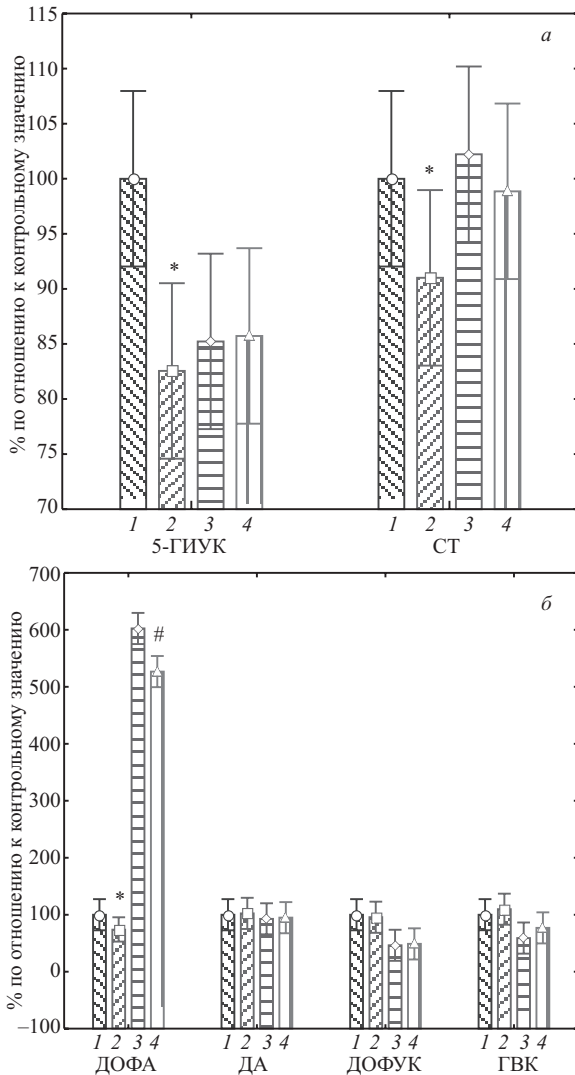
Таблица 1. Влияние гимантана на содержание биогенных аминов в стриатуме мышей C57BL/6 (нмоль/г ткани, $m \pm S.E.M.$)

Показатель	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ГВК/ДА
Контроль, физ. р-р. в/б	$0,74 \pm 0,15^*$	$3,00 \pm 0,10$	$3,22 \pm 0,33$	$0,00 \pm 0,00$	$57,64 \pm 7,37$	$2,08 \pm 0,20^*$	$5,54 \pm 0,65$	$5,15 \pm 0,23^*$	$0,10 \pm 0,00$
Гимантан, 20 мг/кг в/б	$0,61 \pm 0,02^*$	$2,82 \pm 0,10$	$3,08 \pm 0,15$	$0,00 \pm 0,00$	$59,00 \pm 2,51$	$1,72 \pm 0,08^*$	$6,08 \pm 0,28$	$4,54 \pm 0,17^*$	$0,10 \pm 0,00$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 * — статистически значимое отличие, критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$. в/б — внутрибрюшинно.

Таблица 2. Влияние гимантана на содержание биогенных аминов в коре мышей C57BL/6 (нмоль/г ткани, $m \pm S.E.M.$)

Показатель	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ГВК/ДА
Контроль, физ. р-р. в/б	$0,32 \pm 0,06$	$3,53 \pm 0,32$	$0,29 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,17$	$1,56 \pm 0,18$	$0,75 \pm 0,11$	$5,90 \pm 0,09$	$1,28 \pm 0,31^*$
Гимантан, 20 мг/кг в/б	$0,22 \pm 0,03$	$2,98 \pm 0,10$	$0,38 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,10$	$1,54 \pm 0,18$	$0,65 \pm 0,10$	$6,22 \pm 0,36$	$0,69 \pm 0,13^*$



Влияние гинсана на процессы синтеза и обмена серотонина (а) и дофамина (б) в норме и на фоне введения ингибитора ДААК NSD1015 в стриатуме мышей линии C57BL/6.

* статистически значимое отличие, критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$, # — тенденция к снижению относительно значения на фоне NSD1015, $p = 0,07$.

1 — физиологический раствор; 2 — гинсан, 20 мг/кг; 3 — NSD1015, 50 мг/кг; 4 — гинсан + NSD 1015.

и 5-ГИУК (на рисунках не представлено). По-видимому, серотонинергические эффекты гинсана могут осуществляться опосредованно, например, через влияние на обратный пресинаптический захват СТ.

Введение NSD1015 приводило к накоплению ДОФА ($0,74 \pm 0,15$ до $4,45 \pm 0,34$) и 5-ГТП (0 ± 0 до $1,59 \pm 0,14$), тогда как гинсан на фоне NSD1015 проявлял тенденцию к снижению ДОФА (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,073$), (рисунок, б). Последнее согласуется с результатами, полученными при введении препарата intactным крысам (не получавшим NSD1015), согласно которым гинсан статистически значимо уменьшал концентрацию ДОФА в стриатуме (табл. 1). Полученные данные, свидетельствуют, по-видимому, о том, что гинсан оказывает умеренное ингибирующее действие на синтез ДА. Данное ингибирующее влияние, вероятно, связано с ранее обнаруженным нами эффектом препарата на пресинаптические дофаминовые ауторецепторы D3 [5], которые способны одновременно влиять на синтез ДА и его высвобождение [9, 13, 15].

Фронтальная кора. В данной ткани были обнаружены значимые изменения в соотношении ГВК/ДА, отражающем интенсивность катаболизма внеклеточного дофамина: во II группе животных величина ГВК/ДА уменьшилась на 54 % по отношению к I группе (табл. 2). Напротив, в IV группе (NSD1015 + гинсан) этот показатель возрос на 51 % по отношению к III группе, которой вводили только NSD1015 (табл. 3).

Увеличение соотношения ГВК/ДА в IV группе произошло преимущественно за счет повышения концентрации ГВК (есть тенденция увеличения ГВК в группе IV по отношению к группе III по U-критерию Манна-Уитни, $p = 0,063$). Поскольку гинсан способен увеличивать экстраклеточную концентрацию ДА в стриатуме [1], возрастание концентрации ГВК, образующейся при участии экстраклеточного фермента КОМТ, может быть связано с ингибированием обратного захвата ДА гинсаном [5]. В группе I, напротив, обнаружено статистически достоверное уменьшение соотношения ГВК/ДА, обусловленное увеличением концентрации ДА. Увеличение содержания дофамина может быть связано с эффектами гинсана на процессы депонирования и катаболизма данного нейромедиатора и, видимо, не связано с изменениями скорости синтеза. Введение гинсана на фоне NSD1015 не обнаружилось влияния на уровни ДОФА и 5-ГТП, что также указывает на отсутствие эффекта препарата на биосинтез ДА и СТ во фронтальной коре.

Таблица 3. Влияние гинсана на содержание биогенных аминов в коре мышей C57BL/6 на фоне эффекта NSD1015 (нмоль/г ткани, $m \pm S.E.M$)

Показатель	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ГВК/ДА
NSD1015, 50 мг/кг в/б	$0,72 \pm 0,06$	$3,46 \pm 0,34$	$0,24 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,09$	$0,34 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,16$	$7,15 \pm 0,21$	$2,41 \pm 0,41^*$
Гинсан + NSD 1015, в/б	$0,72 \pm 0,08$	$3,24 \pm 0,19$	$0,20 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,13$	$1,41 \pm 0,38$	$7,41 \pm 0,46$	$4,71 \pm 1,94^*$

Гиппокамп. Значимых изменений в уровне биогенных аминов после введения гимантана выявлено не было. По-видимому, препарат не вмешивается в процесс биосинтеза ДА и СТ в гиппокампе мышей.

Таким образом, выявленное влияние гимантана на серотонинергические системы стриатума свидетельствует о важности роли серотонинергического компонента в механизме противопаркинсонического действия гимантана. Известно, что серотонин усиливает активность ключевых нейрхимических и нейропатологических механизмов расстройства движения при паркинсонизме: снижение серотонинергической передачи в системе базальных ганглиев оказывает выраженный противопаркинсонический эффект [6]. Следовательно, установленное влияние гимантана на серотонинергическую функцию может вносить определенный вклад в устранение проявлений паркинсонизма, включая дрожательную симптоматику.

Полученные данные об уменьшении содержания внеклеточного метаболита серотонина 5-ГИУК в гомогенатах стриатума согласуются с результатами, полученными для микродиализатов стриатума [1], и позволяют предположить, что гимантан оказывает влияние и на систему ферментативной деградации биогенных аминов. В пользу этого предположения свидетельствует также обнаруженный эффект препарата на соотношение ГВК/ДА в гомогенатах фронтальной коры.

ВЫВОДЫ

1. Гимантан при однократном системном введении (20 мг/кг внутривенно) вызывает уменьшение содержания ДОФА, серотонина и его метаболита 5-ГИУК в стриатуме мышей.

2. Гимантан оказывает умеренное ингибирующее влияние на синтез дофамина в стриатуме, что, по-ви-

димому, связано с действием на пресинаптические дофаминовые D3-ауторецепторы.

3. Гимантан оказывает влияние на соотношение ГВК/ДА в гомогенатах фронтальной коры, что свидетельствует о действии препарата на катаболизм моноаминов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. А. Андриянова, Е. А. Вальдман, В. С. Кудрин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(6), 13 – 16 (2001).
2. О. Б. Вайншток, Л. И. Олейник, *Дифференциальная диагностика и современные методы лекарственного лечения паркинсонизма*, Киев (1978).
3. Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, Л. Н. Аксенова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(5), 3 – 5 (2003).
4. Е. А. Вальдман, Л. Н. Неробкова, Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(1), 7 – 10 (2004).
5. Г. И. Ковалев, Д. А. Абаимов, М. В. Воронин, Ю. Ю. Фирстова, *Нейрохимия*, **24**(2), 150 – 156 (2007).
6. Г. Г. Крыжановский, С. В. Магаева, Н. А. Трекова, *Бюл. экпер. биол.*, **5**, 466 – 469 (1993).
7. В. С. Кудрин, И. И. Мирошниченко, К. С. Раевский, *Нейрохимия*, **7**(1), 3 – 8, (1988).
8. Л. Н. Неробкова, Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(3), 3 – 6 (2000).
9. C. W. Aretha and A. Sinha, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**(2) 609 – 13 (1995).
10. W. Danysz and C. G. Parsons, *Neurosci Biobehav Rev.*, **21**(4), 455 – 468 (1997).
11. M. Ebadi, S. K. Srinivasan, and M. D. Baxi, *Prog. Neurobiol.*, **48**(1), 1 – 19 (1996).
12. J. Glowinski and L. L. Iversen., *J. Neurochem.*, **13**(8), 655 – 669 (1966).
13. A. Gobert, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**(2), 899 – 913 (1995).
14. C. Hamani and A. M. Lozano, *Ann. NY Acad. Sci.*, **991**, 15 – 21 (2003).
15. T. E. Koeltzow., *J. Neurosci.*, **18**(6), 2231 – 2238 (1998).
16. R. S. Schwab and D. C. Poskanzer, *Jama.*, **222**(7), 792 – 795 (1972).

Поступила 24.09.08

EFFECTS OF ANTIPARKINSONIAN DRUG HEMANTANE ON THE LEVEL AND METABOLISM OF BIOGENIC MONOAMINES IN BRAIN STRUCTURES OF C57BL/6 MICE

D. A. Abaimov, I. A. Zimin, V. S. Kudrin, and G. I. Kovalev

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

Hemantane (N-adamant-2-yl-hexamethyleneimine hydrochloride) is a new antiparkinsonian drug showing a broad activity spectrum, being superior to the reference drug amantadine in some tests. The effects of hemantane on the levels of biogenic amines and their metabolites in the striatum, frontal cortex, and hippocampus have been studied in C57BL/6 mice. It was found that a single administration of hemantane (20 mg/kg, i.p.) decreased the concentration of DOPA, serotonin, and its metabolite in mice striatum, gently inhibited the synthesis of dopamine in mice striatum, and influenced the HVA/DA balance in frontal cortex homogenates.

Key words: Hemantane, parkinsonism, antiparkinsonian drugs, adamantane derivatives, monoamines, neurotransmitter amino acids, dopamine, serotonin, striatum, frontal cortex, hippocampus