

ВЛИЯНИЕ ГИМАНТАНА НА ОСНОВНЫЕ ПОДСИСТЕМЫ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ СТРИАТУМА КРЫС *ex vivo*

Д. А. Абаимов, И. А. Зимин, Г. И. Ковалев¹

Изучали влияние нового противопаркинсонического средства гимантана на основные подсистемы дофаминовых рецепторов стриатума крыс Вистар в условиях *ex vivo* после субхронического режима введения препарата (7 дней, 20 мг/кг в день, внутривнутрибрюшинно). Изучение радиорецепторного связывания с рецепторами дофамина проводили на мембранах стриатума крыс, декапитированных после 7-го введения препарата. Обнаружено модулирующее действие гимантана на подсистемы дофаминовых рецепторов D1, D2 и D3, проявляющееся в изменении плотности рецепторов (B_{max}) без изменения их аффинности (K_d) к селективным лигандам. Данные результаты свидетельствуют о том, что субхроническое введение гимантана способно приводить к функциональной перестройке основных подсистем дофаминовых рецепторов стриатума.

Ключевые слова: паркинсонизм, противопаркинсонические препараты, дофамин, дофаминовые рецепторы, производные адамантана, гимантан

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) связана с дефицитом дофаминергической передачи в стриатуме, который, в свою очередь, обусловлен дегенерацией нейронов компактной части черной субстанции [11, 19]. Ввиду наличия большого числа патогенетических звеньев БП, наиболее перспективными представляются средства с комплексным механизмом действия, обладающие дофаминопозитивными и нейропротекторными свойствами. Такими препаратами являются производные адамантана (мидантан, амантадин) [2, 20], которые воздействуют сразу на несколько нейрохимических систем и обладают выраженными нейропротекторными свойствами [7, 8]. В НИИ фармакологии РАМН синтезирован новый потенциальный противопаркинсонический препарат гимантан (N-адамант-2-ил гексаметиленмина гидрохлорид), который превосходит амантадин по эффективности.

Известно, что гимантан оказывает дозозависимое модулирующее влияние на активность дофамин- и серотонинергической нейромедиаторных систем в стриатуме [1], обладает свойствами низкоаффинного блокатора ионных каналов глутаматных рецепторов NMDA-подтипа, избирательно ингибирует фермент MAO-B, имеет слабовыраженную антирадикальную и иммуномодулирующую активность [3].

Сведения о влиянии гимантана на основные подсистемы дофаминовых рецепторов стриатума отсутствуют. Поэтому данная работа имела целью изучение влияния субхронического введения гимантана на кинетические характеристики связывания селективных лигандов с дофаминовыми рецепторами D1-, D2-, D3-подтипов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования по радиолигандному связыванию проводили на самцах крыс линии Вистар массой 180 – 220 г, которых содержали в виварии ГУ НИИ фармакологии РАМН в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum*, по 6 особей в клетке, в течение двух недель до начала эксперимента, на стандартной диете при 12-часовом световом режиме. При проведении экспериментов *ex vivo* физиологический раствор (контрольная группа — NaCl, 0,9 % раствор), либо препарат (опытная группа — гимантан, 20 мг/кг) вводили животным посредством внутривнутрибрюшинных инъекций в течение 7 дней, один раз в сутки. Животных забивали через 24 ч после последней инъекции. Для умерщвления крыс применяли декапитацию, головной мозг извлекали при температуре тающего льда и выделяли стриатум, гиппокамп и фронтальную кору по схеме [10].

Изучение радиолигандного связывания с дофаминовыми D1-, D2- и D3-рецепторами дофамина (*ex vivo*). Изучение радиорецепторного связывания с рецепторами дофамина проводили по методу [21] с модификациями. Самцов крыс массой 200 – 250 г декапитировали, извлекали стриатумы, которые гомогенизировали в 10 мл ледяного (0 – 4 °C) 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,4 при 4 °C), используя гомогенизатор “тефлон-стекло”. Полученную суспензию центрифугировали при 40 000 г в течение 20 мин в ультрацентрифуге Optima L-70К (“Beckman Coulter”). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 10 мл 50 мМ трис-НСl инкубационного буфера (рН 7,4 при 37 °C) с добавлением солей (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂ – 2H₂O, 1 мМ MgCl₂ – 6H₂O) [21] и использовали по 250 мкл в процедуре связывания [³H]-лигандов рецепторов.

Полученную мембранную фракцию инкубировали с [³H] SCH23390 (удельная активность 60 Ки/ммоль), [³H] спироперидол (95 Ки/ммоль), [³H] (+)-7-ОН DPAT (120 Ки/ммоль). [³H]-лиганды добавляли в инкубационную смесь в объеме 50 мкл в конечной концентрации 0,1 нМ и инкубировали в течение 20 мин при температуре 37 °C [21] с использованием твердотельного термостата Термит (НПО “ДНК-технология”). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда (20 мкМ), которое составляло 12 – 14 % от общего. С целью увеличения селективности лиганда к D3-рецепторам реакцию связывания [³H] (+)-7-ОН DPAT проводили в инкубационном буфере, содержащем 50 мМ Na Hepes, 0,05 % аскорбат, 0,1 % бычий сывороточный альбумин и 1 мМ EDTA [12, 13].

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

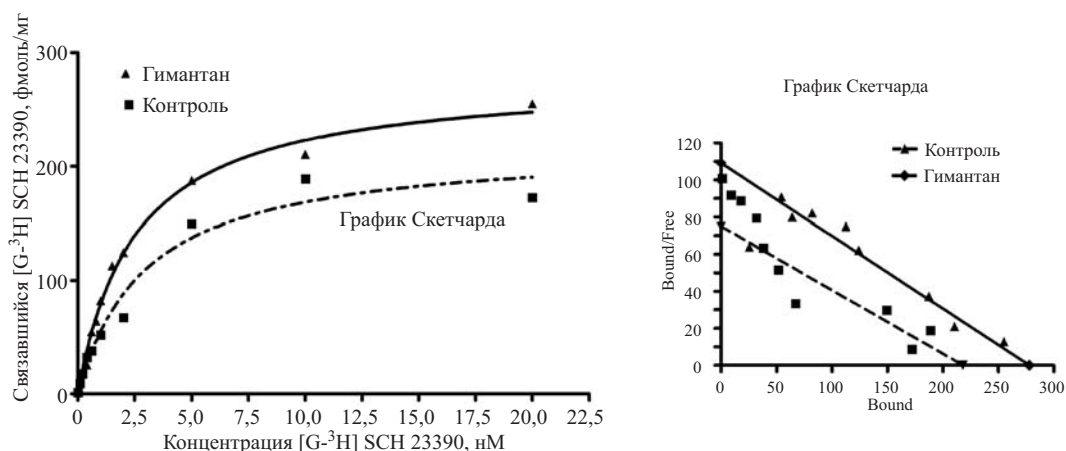


Рис. 1. Влияние субхронического введения гимантана на характеристики радиорецепторного связывания $[G-^3H]$ SCH23390 с D1-рецепторами дофамина стриатума крыс *ex vivo*.

Здесь и на рис. 2 и 3 * — статистически достоверное отличие от контроля, F-критерий Фишера, $p < 0,05$, $n = 12$. Величины B_{max} и K_d представлены в виде $m \pm SEM$.

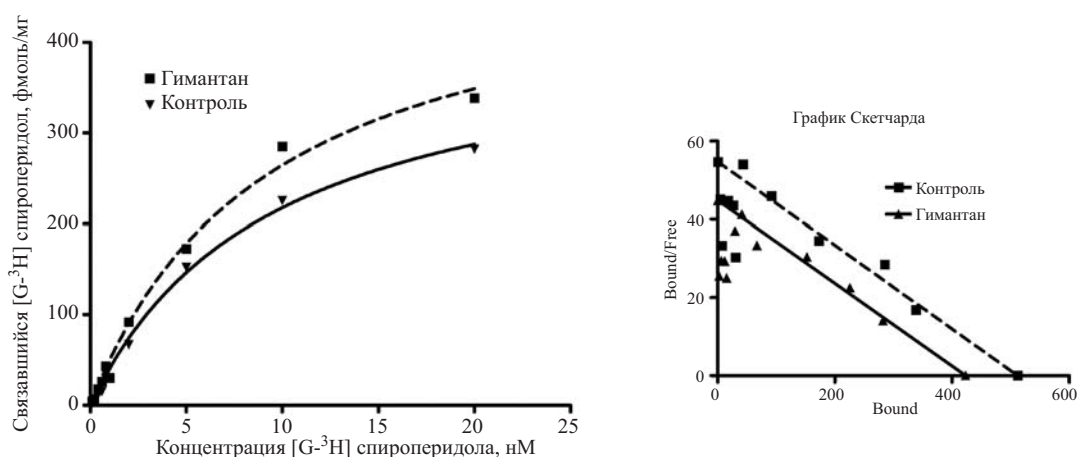


Рис. 2. Влияние субхронического введения гимантана на характеристики радиорецепторного связывания $[G-^3H]$ спироперидола с D2-рецепторами дофамина стриатума крыс *ex vivo*.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Для анализа насыщения и получения характеристик связывания B_{max} и K_d измеряли специфическое связывание в диапазоне концентраций от 0,01 до 20 нМ. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием.

IC_{50} по отношению к связыванию $[G-^3H]$ -лигандов определяли при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемых соединений в конечных концентрациях в диапазоне $10^{-3} - 10^{-8}$ М. Объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Процесс связывания останавливали путем добавления 2 мл ледяного 50 мМ трис-НСl буфера и быстрой фильтрации через стекловолоконные фильтры типа GF/B (Whatman) с последующей промывкой ледяным буфером общим объемом 14 мл. Фильтры предварительно смачивали перед экспериментом в ледяном 50 мМ трис-НСl буфере в течение 3 ч.

Фильтры высушивали в течение 12 ч при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объемом 4 мл и использовали для сцинтилляционного счета. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счетчике Wallac 1411. Эффективность счета составляла 40 – 45 %.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistika 6.0. При обработке полученных результатов использовали методы параметрической и непараметрической статистики (t-тест Стьюдента, Хи-квадрат, F-критерий Фишера, U-тест Манна-Уитни) согласно «Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2000). На рисунках звездочками обозначены достоверные различия ($p < 0,05$).

Для обработки результатов радиOLIгандного связывания использовали программу Graphpad Prism 4 Demo. Результаты представлены в виде « $m \pm S.E.M$ ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

D1-дофаминовые рецепторы.

Графики насыщения рецепторов данного типа в контрольной (пунктир) и опытной (сплошная линия) группах крыс представлены на рис. 1, рассчитанные величины K_d и B_{max} представлены в таблице.

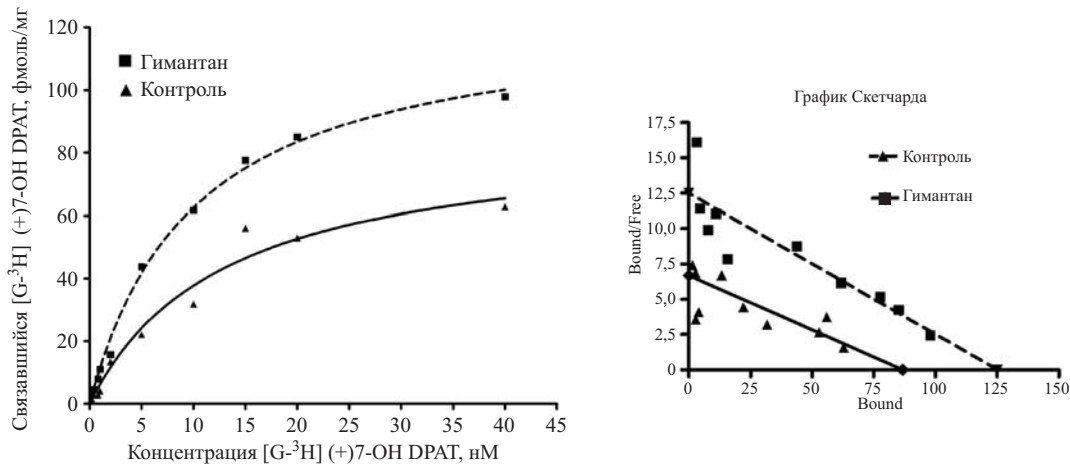


Рис. 3. Влияние субхронического введения гимантана на характеристики связывания $[G-^3H]$ (+)-7-ОН DPAT с D3-рецепторами дофамина стриатума крысы *ex vivo*.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Обнаружено, что величины K_d в мембранах стриатума обеих групп крыс не различаются статистически значимо, тогда как B_{max} в результате 7-дневного введения препарата увеличивается до $279,1 \pm 7,7$ фмоль/мг белка против $218,4 \pm 16,8$ фмоль/мг белка в контроле при $p < 0,05$ (F-критерий Фишера).

Таким образом, в результате субхронического введения гимантана крысам аффинитет (K_d) данного типа рецептора к радиоактивному лиганду не изменяется, тогда как число мест связывания лиганда (B_{max}) достоверно увеличивается более чем на 20 %. Подобные эффекты гимантана сближают его по характеру действия с мемантином и являются важным отличием от амантадина, который вызывает изменение аффинности D1-рецепторов, не меняя их содержание в стриатуме [17, 18].

На основании полученных данных можно выдвигать предположение, что обнаруженная способность гимантана увеличивать плотность постсинаптических D1 рецепторов может вносить определенный вклад в улучшение эффективности дофаминергической передачи под действием препарата. Известно, что дофаминергическая денервация неостриатума при болезни Паркинсона ведет к повышению активности структур, находящихся под контролем D2 рецепторов, и к снижению — регулируемых D1 рецепторами [9, 14]. В результате происходит серия функциональных измене-

ний в базальных ганглиях [5]. Обнаруженные в эксперименте эффекты гимантана, вероятно, могут предотвращать подобные патологические изменения в балансе подгрупп дофаминовых рецепторов дофамина при паркинсонизме.

D2-дофаминовые рецепторы.

Графики насыщения рецепторов данного типа контрольной (пунктир) и опытной (сплошная линия) групп крыс представлены на рис. 2, рассчитанные величины K_d и B_{max} представлены в таблице.

Установлено, что величина K_d для селективного лиганда к D2-подтипу рецепторов $[G-^3H]$ спироперидола не изменяется в контроле и опыте, а величина B_{max} (количество активных рецепторов) после 7-дневного введения гимантана достоверно снижается на 17 %. Можно предположить, что обнаруженное уменьшение количества мест связывания для $[G-^3H]$ спироперидола произошло в результате систематических воздействий высоких концентраций дофамина, находящегося в синаптической щели [17], поскольку известно, что гимантан увеличивает экстраклеточную концентрацию дофамина [1].

D3-дофаминовые рецепторы.

Графики насыщения рецепторов данного типа контрольной (пунктир) и опытной (сплошная линия) групп крыс представлены на рис. 3, рассчитанные величины K_d и B_{max} представлены в таблице.

Кинетические параметры радиорецепторного связывания селективных лигандов с дофаминовыми рецепторами стриатума крыс. Величины B_{max} и K_d представлены в виде $m \pm S.E.M.$; * — статистически значимое отличие, $p < 0,05$, $n = 10 - 12$, F-критерий Фишера

Подтип дофаминовых рецепторов	B_{max} (фмоль/мг)		K_d (нМ)	
	Контроль (физ. р-р, в/б)	Гимантан (7×20 мг/кг/день, в/б)	Контроль (физ. р-р, в/б)	Гимантан (7×20 мг/кг/день, в/б)
D1	$218,4 \pm 16,8$	$279,1 \pm 7,7^*$	$3,0 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,2$
D2	$511,9 \pm 35,0$	$423,1 \pm 20,5^*$	$9,4 \pm 1,4$	$9,4 \pm 1,0$
D3	$125,2 \pm 4,5$	$86,7 \pm 9,8^*$	$10,0 \pm 0,9$	$12,9 \pm 3,4$

Изменения характеристик радиорецепторного связывания селективного лиганда D3 рецепторов [$G\text{-}^3\text{H}$] (+)7-ОН DPAT в мембранах стриатума крыс соответствуют таковым, выявленным у D2: величины K_d обеих групп крыс не различаются статистически значимо, число мест связывания B_{\max} после 7-дневного введения гимантана достоверно снижается на 31 %. Известно, что подгруппы рецепторов D2 и D3 входят в одно семейство — D2-подобных дофаминовых рецепторов [15]. Это может в известной степени объяснить тот факт, что на эти подгруппы дофаминовых рецепторов гимантан оказывал однонаправленный эффект.

Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о том, что прямое взаимодействие гимантана с D3-рецепторами дофамина, обнаруженное нами в эксперименте *in vitro* [4], может вызывать функциональную инактивацию указанных рецепторов, и тем самым снижать их плотность в стриатуме. Поскольку известно, что D3-рецепторы имеют преимущественно пресинаптическую локализацию и оказывают регулирующее влияние на уровень внеклеточного дофамина [6, 16], можно предположить, что изменения их содержания под действием гимантана положительно влияют на экстрацеллюлярную концентрацию медиатора, тем самым, повышая эффективность дофаминергической передачи.

Таким образом, продемонстрировано, что гимантан оказывает многостороннее модулирующее влияние на основные подсистемы дофаминовых рецепторов стриатума, которое проявляется увеличением плотности рецепторов подгруппы D1 при одновременном снижении плотности дофаминовых рецепторов подгрупп D2 и D3.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено модулирующее воздействие субхронического введения гимантана на подсистемы дофаминовых рецепторов D1, D2 и D3, проявляющееся в изменении плотности рецепторов B_{\max} без изменения их аффинности к селективным лигандам (K_d).

2. В результате субхронического введения гимантана (7 дней, 20 мг/кг в день, внутривенно) крысам

число мест связывания (B_{\max}) к [$G\text{-}^3\text{H}$] SCH23390 увеличивается более чем на 20 %, к [$G\text{-}^3\text{H}$] спироперидолу — уменьшается на 17 %, к [$G\text{-}^3\text{H}$] (+)7-ОН DPAT — уменьшается на 31 %. Аффинитет (K_d) к селективным лигандам не изменяется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. А. Андрияшова, Е. А. Вальдман, В. С. Кудрин и др., *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, Л. Н. Неробкова, Т. А. Воронина, *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(1), 7 – 10 (2004).
4. Г. И. Ковалев, Д. А. Абаимов, М. В. Воронин, Ю. Ю. Фирстова, *Нейрохимия*, **24**(2), 150 – 156 (2007).
5. R. L. Albin and R. L. Makowicz, *Neurosci.*, **46**(1), 35 – 48 (1992).
6. S. Barik and R. de Beaulieu, *Brain Res.*, **737**(1–2), 347 – 350 (1996).
7. W. Danysz and C. G. Parsons, *Neurosci Biobehav Rev.*, **21**(4), 455 – 468 (1997).
8. M. Ebadi, S. K. Srinivasan, and M. D. Baxi, *Prog. Neurobiol.*, **48**(1), 1 – 19 (1996).
9. C. R. Gerfen, *Annu Rev. Neurosci.*, **15**, 285 – 320 (1992).
10. J. Glowinski and L. L. Iversen, *J. Neurochem.*, **13**(8), 655 – 669 (1966).
11. C. Hamani and A. M. Lozano, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **991**, 15 – 21 (2003).
12. M. Hillefors and G. Euler, *Neurochem. Inter.*, **38**, 31 – 42 (2001).
13. D. Levesque, *Neurobiol.*, **89**, 8155 – 8159, (1992).
14. Miller W. C., DeLong M. R. (eds), *The basal ganglia II*, Plenum Press, New York, 415 – 427 (1987).
15. C. Missale and S. Nash, *Physiol. Rev.*, **78**(1), 193 (1998).
16. M. Narita and K. Mizuo, *J. Neurosci.*, **23**(3), 1006 – 1012 (2003).
17. M. Peeters, G. Page, J.-M. Maloteaux, and E. Hermans, *Brain Res.*, **949**, 32 – 41 (2002).
18. M. Peeters, J. M. Maloteaux, and E. Hermans, *Neurosci Lett.*, **343**(3), 205 – 209 (2003).
19. M. Piccirilli, G. L. Piccinin, and L. Agostini, *Neurology.*, **34**(2), 265 – 266 (1984).
20. R. S. Schwab and D. C. Poskanzer, *Jama.*, **222**(7), 792 – 795 (1972).
21. W. Sun, N. Ginovart, and F. Ko, *Mol. Pharmacol.*, **63**(2), 456 – 462 (2003).

Поступила 23.11.07

SUBCHRONIC EFFECTS OF HEMANTANE ON THE MAIN SUBTYPES OF DOPAMINE RECEPTORS IN RAT STRIATUM *ex vivo*

D. A. Abaimov, I. A. Zimin, and G. I. Kovalev

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, 125315, Moscow, Russia
e-mail: g.kovalev@relcom.ru

The effect of the antiparkinsonian drug hemantane on various subtypes of dopamine receptors in the striatum of Wistar rats have been studied after subchronic administration of the drug in a single daily dose of 20 mg/kg (i.p.) over seven days. The receptor binding was studied using the striatum membranes isolated from the test rats decapitated after the last injection of the drug. A modulatory influence of hemantane on the D1, D2 and D3 type receptors was revealed. It was found that hemantane increased the density of the binding sites of D1 receptors and decreased the density of the binding sites of D2 and D3 receptors without changing their affinity to the selective ligands. These results indicate that the subchronic administration of hemantane can lead to the functional rearrangement of the main subtypes of dopamine receptors in the rat striatum.