

Влияние гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге при экспериментальном паркинсоническом синдроме

Иванова Е.А., Капица И.Г., Золотов Н.Н., Вальдман Е.А., Непоклонов А.В.,
Колясникова К.Н., Воронина Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. На двух моделях паркинсонического синдрома (ПС), индуцированного 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) у мышей C57Bl/6 и 6-гидроксидофамином (6-ГОДА) у крыс, показана способность нового противопаркинсонического препарата гимантана в эффективной дозе 10 мг/кг при двух режимах введения (5 дней до нейротоксина МФТП и совместно с ним в течение 5 дней, а также при введении в течение 21 дня на фоне развивающегося 6-ГОДА индуцированного ПС) ослаблять вызываемую нейротоксинами активацию перекисного окисления липидов. Введение гимантана приводило к снижению уровней малонового альдегида и диеновых конъюгатов во фронтальной коре и стриатуме. Полученные данные согласуются с ранее установленными антиоксидантными свойствами гимантана.

Ключевые слова: гимантан, модели паркинсонического синдрома, МФТП, 6-ГОДА, перекисное окисление липидов, малоновый альдегид, диеновые конъюгаты

Effects of Hemantane upon the level of lipid peroxidation in brain in experimental parkinsonian syndrome

Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Zolotov N.N., Valdman E.A., Nepoklonov A.V.,
Kolyasnikova K.N., Voronina T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. In two animal models of parkinsonian syndrome – induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in C57BL/6 mice and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats novel antiparkinsonian drug hemantane was shown to reduce the increase of brain level of lipid peroxidation caused by both neurotoxins. In prefrontal cortex and striatum of mice which were treated with hemantane 10 mg/kg 5 days before MPTP and 5 days together with MPTP and in rats which received hemantane during 21 days after 6-OHDA injection in medial forebrain bundle the levels of malondialdehyde and conjugated dienes were significantly lower than in untreated animals. The data obtained is consistent with antioxidant properties of hemantane.

Keywords: hemantane, experimental parkinsonian syndrome, MPTP, 6-OHDA, lipid peroxidation, malondialdehyde, conjugated dienes

Автор, ответственный за переписку:

Вальдман Елена Артуровна — д.м.н., профессор, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, Балтийская ул. 8; evaldman@mail.ru

Введение

Болезнь Паркинсона — распространённое нейродегенеративное заболевание, поиск средств патогенетической терапии которого остаётся крайне актуальным.

Гимантан — новый оригинальный препарат, созданный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, обладает выраженной противопаркинсонической активностью, доказанной на экспериментальных моделях [1–3], и подтверждённой в клинике у больных с начальными стадиями болезни Паркинсона [4].

Установлен комплексный механизм действия гимантана. Препарат оказывает влияние на несколько известных звеньев патогенеза болезни Паркинсона. Гимантан модулирует дофаминергическую нейротрансмиссию [5], является блокатором ионных каналов глутаматных рецепторов NMDA подтипа [6], ингибирует MAO-B

[7], обладает противовоспалительной активностью [8].

Одной из установленных причин прогрессирующей гибели дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона являются повреждения, вызванные оксидативным стрессом. Подтверждение роли свободных радикалов в развитии нигральная дегенерации при БП получено в экспериментальных исследованиях и при изучении чёрной субстанции умерших от болезни Паркинсона, где установлено наличие как оксидативного стресса (снижение уровня глутатиона), так и оксидативных повреждений (увеличение перекисного окисления липидов и повреждений ДНК) [9].

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилась оценка эффектов гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в структурах головного мозга

на двух моделях паркинсонического синдрома — у мышей C57BL/6 с МФТП-индуцированным ПС и крыс с 6-ГОДА индуцированным ПС.

Методы

Моделирование паркинсонического синдрома у мышей линии C57BL/6 проводили путём системного введения МФТП. Эксперименты проводили на мышцах-самцах линии C57BL/6 массой 20–22 г. МФТП вводили в дозе 20 мг/кг один раз в сутки 5 дней. Гимантан 10 мг/кг вводили внутрибрюшинно 5 дней до начала введения МФТП, затем вместе с МФТП. Животным контрольных групп вводили по этой схеме только физиологический раствор, МФТП и физиологический раствор или физиологический раствор и гимантан. Животных декапитировали через 24 ч после последней инъекции и извлекали стриатум и фронтальную кору.

Паркинсонический синдром у крыс вызывали введением нейротоксина 6-ГОДА (12 мкг) в средний переднемозговой пучок (МФВ) левого полушария головного мозга по стереотаксическим координатам. Контрольную группу животных (ложно оперированные животные) подвергали такой же операции с введением физиологического раствора. Через 15 дней после введения 6-ГОДА отбирались животные со сформировавшимся паркинсоническим синдромом по результатам тестирования в тесте «цилиндр», позволяющем выявить нарушения двигательной функции на контралатеральной стороне введения нейротоксина конечности [10]. Отобранные животные были разделены на 2 группы, которым на протяжении 21 дня ежедневно внутрь вводили гимантан в дозе 10 мг/кг или физиологический раствор. На 21-й день животных декапитировали, извлекали структуры мозга — фронтальную кору и стриатум.

Определение продуктов перекисидации липидов в гомогенатах структур мозга мыши. Гомогенат (5% масса/объём) готовили из точных навесок ткани соответствующей структуры мозга и 19 объёмов забуференного фосфатом физиологического раствора, содержащего 0,1 ммоль/л ионола (Fluka, Швейцария)

при помощи ультразвукового дезинтегратора УЗДГН-1 при 22 кГц в течение 5 с при температуре 0 °С.

Определение диеновых конъюгатов (ДК). К 50 мкл гомогената добавляли 1 000 мкл смеси для экстракции (н-гептан-пропанол-2 = 1:1, по объёму). Образцы интенсивно встряхивали 2 раза по 10 сек на встряхивателе типа Вортекс. Образцы центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. К 900 мкл супернатанта добавляли 100 мкл воды для разделения фаз и интенсивно встряхивали 2 раза по 10 с и центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. Отбирали по 300 мкл верхней гептановой фазы и добавляли по 1 200 мкл 95% этанола. Оптическую плотность образцов определяли на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США) в полумикрокувете при 233 нм. Расчёт количества ДК проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $2,2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Все измерения проводили в 3 параллелях.

Определение малонового диальдегида (МДА). К 50 мкл гомогената добавляли 20 мкл 0,485 М соли Мора и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем к образцам добавляли 1 030 мкл 0,9% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (Serva, Германия) в 50% уксусной кислоте, интенсивно встряхивали и инкубировали при 80 °С в течение 60 мин. После охлаждения измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США) в полумикрокувете при 532 нм. Расчёт количества МДА проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Все измерения проводили в 3 параллелях

Результаты

Введение МФТП в дозе 20 мг/кг один раз в сутки в течение 5 дней вызывало достоверное повышение уровня МДА и ДК в стриатуме и ДК в коре мышей линии C57BL/6 по сравнению с группой, которой вводился физиологический раствор.

Предварительное до МФТП (5 дней) и затем на фоне МФТП (5 дней) введение гимантана в дозе 10 мг/кг в сутки предотвращало повышение уровня продуктов

Таблица 1

Влияние МФТП и гимантана на уровень продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в коре и стриатуме мышей C57BL/6

Группы	ДК (мкмоль/мг)		МДА (мкмоль/мг)	
	Кора	Стриатум	Кора	Стриатум
Физ. раствор	2,25±0,4	2,14±0,66	13,23±3,47	12,25±2,37
Физ. раствор + гимантан	2,1±0,44	2,31±0,57	8,92±0,99*	10,72±1,31
МФТП + физ. р-р.	4,4±0,78**	5,37±1,05**	14,39±2,16	16,16±1,96**
Гимантан + МФТП	3,54±1,19	3,66±0,73##	10,67±1,42##	12,47±2,66#

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ в сравнении с группой «физ. р-р»; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$ в сравнении группой «МФТП».

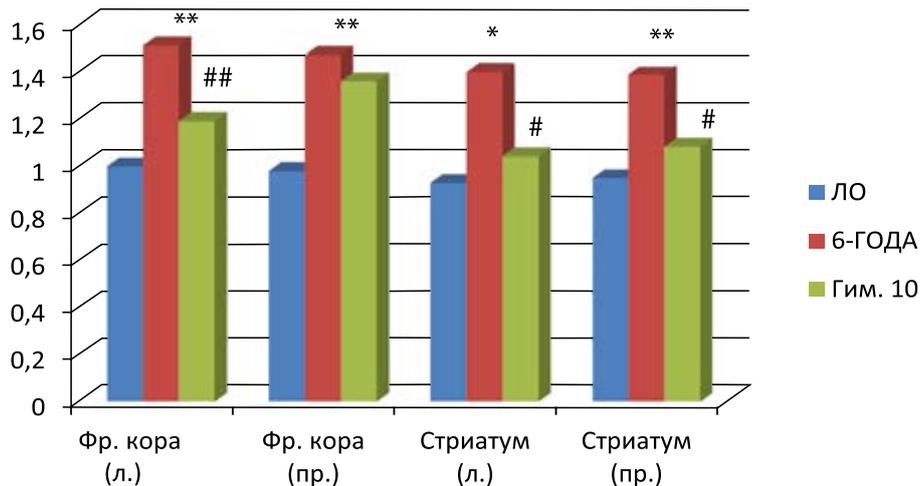


Рис. 1. Влияние гинмантана на содержание малонового диальдегида (МДА) во фронтальной коре и стриатуме крыс с 6-ГОДА индуцированным паркинсоническим синдромом.

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой ложно оперированных крыс; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$ по сравнению с группой крыс с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом без применения препаратов; ЛО — группа ложно оперированных животных; 6-ГОДА — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом; Гим 10 — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом, получавших внутрь гинмантан в дозе 10 мг/кг

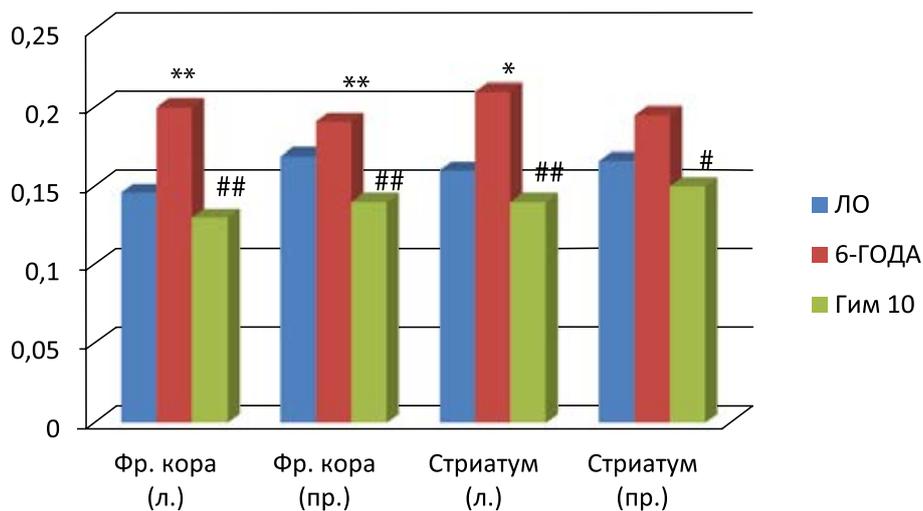


Рис. 2. Влияние гинмантана на содержание диеновых конъюгатов (ДК) во фронтальной коре и стриатуме крыс с 6-ГОДА индуцированным паркинсоническим синдромом.

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой ложно оперированных крыс; ## — $p < 0,01$ по сравнению с группой крыс с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом без применения препаратов; ЛО — группа ложно оперированных животных; 6-ГОДА — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом; Гим 10 — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом, получавших внутрь гинмантан в дозе 10 мг/кг

ПОЛ в исследованных структурах. Уровни МДА и ДК в стриатуме и МДА в коре были достоверно ниже по сравнению с группой животных, которым вводился только нейротоксин МФТП (табл. 1).

На модели индуцированного 6-ГОДА ПС было зарегистрировано достоверное увеличение уровня МДА в обеих изученных структурах головного мозга крыс как на стороне введения 6-ГОДА, так и на контралатеральной стороне (рис. 1). Содержание ДК было достоверно выше во фронтальной коре и левом стриатуме по сравнению с группой ложно оперированных крыс (рис. 2).

У животных, которым вводили гинмантан 10 мг/кг в течение 21 дня, уровень МДА в стриатуме и фронтальной левой коре был достоверно ниже, чем у нелеченных (см. рис. 1), а содержание ДК ниже во всех изученных структурах по сравнению с группой крыс, у которых развивался 6-ГОДА индуцированный ПС без лечения гинмантаном (см. рис.2).

Механизмы нейротоксического действия 6-ГОДА и МФТП включают образование активных форм кислорода (АФК), вызывающих каскад процессов, приводящих к развитию апоптоза [11, 12].

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о том, что гимантан в эффективной дозе 10 мг/кг при двух режимах введения (5 дней до нейротоксина МФТП и совместно с ним в течение 5 дней, а также при введении в течение 21 дня) на фоне развивающегося 6-ГОДА индуцированного ПС способен ослаблять вызываемую нейротоксинами активацию ПОЛ. Полученные данные согласуются с ранее установленными антиоксидантными свойствами гимантана в бесклеточной среде [3].

К настоящему времени накоплен большой объём научных данных, подтверждающих, что воспаление, митохондриальная дисфункция, образование свободных радикалов и оксидативный стресс, нарушение защиты нейротрофическими факторами вносят вклад

в развитие дегенерации нигростриатных нейронов. Роль каждого из факторов доказана, однако первостепенность какого-либо из них не определена до сих пор. Поэтому наиболее адекватным подходом к разработке средств предупреждения или замедления развития заболевания, т. е. нейропротекторных препаратов, является поиск препаратов с поликомпонентным механизмом действия или подбор комбинаций препаратов, влияющих на ключевые звенья процесса нейродегенерации. Наличие антиоксидантной активности в спектре эффектов гимантана подтверждает перспективность его дальнейшего изучения в качестве средства патогенетической терапии болезни Паркинсона.

Литература

1. Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Противопаркинсоническая активность нового производного адамантана. Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999; 4: 3–7.
2. Капица И.Г., Кокишенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2012; 2: 10–17.
3. Вальдман Е.А. Разработка фармакологического средства патогенетической терапии паркинсонизма на основе анализа механизмов действия производных аминадамантана. Автореф. дисс. мед.наук. М.: 2001; 44.
4. Катунина Е.А., Петрухова А.В., Вальдман Е.А., Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Саядян Х.С. Возможность применения гимантана при лечении болезни Паркинсона. Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2008; 108: 6: 24–27.
5. Абаимов Д.А., Зимин И.А., Ковалёв Г.И. Влияние гимантана на основные подсистемы дофаминовых рецепторов стриатума крыс *ex vivo*. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008; 71: 1: 18–21.
6. Елианская М.В., Вальдман Е.А., Соболевский А.И., Ходоров Б.И. Взаимодействие потенциального противопаркинсонического средства производного адамантана с ионными каналами глутаматных рецепторов MNDA подтипа. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001; 64: 1: 18–21.

7. Вальдман Е.А., Капица И.Г., Неробкова Л.Н., Аксенова Л.Н., Бунеева О.А., Медведев А.Е. Влияние длительного введения мышам изатина и гимантана на чувствительность моноаминоксидазы Б мозга к ингибированию депренилом *in vivo* и *in vitro*. Биомедицинская химия. 2004; 50: 5: 509–514.
8. Иванова Е.А., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Кокишенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом. Химико-фармацевтический журнал. 2013; 47: 10: 12–15.
9. Zhang J., Perry G., Smith M.A., Robertson D., Olson S.J., Graham D.G., Montine T.J. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. Neuroscience. 1999; 94: 1238–1299.
10. Schallert T. and Jones T.A. «Exuberant» neuronal growth after brain damage in adult rats: The essential role of behavioral experience. Journal of Neural Transplantation & Plasticity. 1993; 4: 193–198.
11. Latchoumycandane C., Anantharam V., Jin H., Kanthasamy A. Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKC δ in cell culture and animal models of Parkinson's disease. Toxicology and applied Pharmacology. 2011; 256 (3): 314–323.
12. Kanthasamy A., Jin H., Mehrotra S., Mishra R., Kanthasamy A., Rana A. Novel Cell Death Signaling Pathways in Neurotoxicity Models of Dopaminergic Degeneration: Relevance to Oxidative Stress and Neuroinflammation in Parkinson's Disease. Neurotoxicology. 2010; 31 (5): 555–561.