

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ АМФЕТАМИНА И МИДАНТАНА НА ДОФАМИНЕРГИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ В СТРИАТУМЕ СВОБОДНО-ПОДВИЖНЫХ КРЫС

И. И. Афанасьев, М. Л. Дворкина, И. А. Новоселов, К. С. Раевский¹

Изучено совместное действие антагониста NMDA-рецепторов противопаркинсонического средства мидантана и психостимулятора амфетамина на внеклеточное содержание дофамина (ДА) и его метаболитов 3,4-дигидроксифенилуксусной (ДОФУК) и гомованилиновой кислот (ГВК) в стриатуме мозга свободно-подвижных крыс линии Вистар. Амфетамин (10 мг/кг внутривенно) вызывал резкое повышение внеклеточного содержания ДА (до 700% по сравнению с базальным уровнем) в течение 20–40 мин после введения с последующим снижением. Содержание ДОФУК и ГВК снижалось на 60 и 40% соответственно, через 1 ч после введения и сохранялось на этом уровне до конца эксперимента. Мидантан (20 мг/кг) не оказывал заметного влияния на содержание ДА и его метаболитов. Однако при совместном введении с амфетамин препарат предотвращал накопление внеклеточного ДА, не влияя на содержание его метаболитов, уровень которых оставался сниженным. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о возможном блокировании антагонистами глутаматных NMDA-рецепторов вызванного амфетамин высвобождения дофамина из везикулярного пула при отсутствии его влияния на другие компоненты действия последнего: обращение обратного захвата и ингибирование моноаминоксидазы.

Ключевые слова: психостимуляторы, аминоксантаин, NMDA-рецепторы, дофаминергическая нейротрансмиссия, микродиализ

ВВЕДЕНИЕ

Действие амфетамина и других психомоторных стимуляторов связано с активацией дофаминергических систем среднего мозга. Амфетамин и его аналоги увеличивают внеклеточное содержание дофамина (ДА) путем обращения механизма обратного захвата, опустошения везикулярного пула ДА, ингибирования моноаминоксидазы (МАО) [1, 4, 5, 11, 15, 17]. Однако в последнее время показано, что в механизме действия амфетамина принимают участие и глутаматергические системы мозга. Так, установлено, что амфетамин усиливает высвобождение глутамата в области ядер верхней покрышки, причем этот эффект предотвращается антагонистами не только дофаминовых, но и NMDA-рецепторов (МК-801 и аминоксантаин) [8, 19]. Показано также, что введение МК-801 или других антагонистов глутаматных рецепторов предотвращает развитие поведенческих эффектов, вызванных действием амфетамина [7], метамфетамина и кокаина [18]. Установлено, что NMDA-антагонисты обладают нейропротекторными свойствами, особенно выраженными в случае применения 1-аминоксантаина [9, 12]. Так, известно, что антагонисты NMDA-рецепторов

ингибируют генерацию гидроксильных радикалов (ОН^{*}), вызванную действием амфетамина [16]. В ряде работ показано, что введение МК-801 приводило к уменьшению накопления внеклеточного ДА, вызванного действием амфетамина, метамфетамина и некоторых других психостимуляторов [7, 10]. Показано также, что глутамат и NMDA стимулируют высвобождение внеклеточного ДА [18], а амфетамин и метамфетамин в дозах, вызывающих уменьшение тканевого содержания ДА в стриатуме мозга крыс, повышают внеклеточное содержание глутамата [8].

Вместе с тем возможные механизмы дофамин-глутаматергического взаимодействия остаются во многом неизученными. Так, в большинстве исследований использовался неконкурентный антагонист канального NMDA-рецептора МК-801, который в определенных условиях может проявлять как психостимулирующие, так и нейротоксические эффекты, не связанные непосредственно с дофаминергической нейротрансмиссией.

В связи с изложенным, представлялось интересным изучить влияние на дофаминергическую передачу другого антагониста NMDA-рецепторного комплекса мидантана, который наряду с другими производными аминоксантаина оказывает антипаркинсоническое действие [2, 3].

Известно, что указанные соединения ингибируют NMDA-стимулированный ионный ток по потенци-

¹ Лаборатория нейрохимической фармакологии (зав. — член-корр. РАМН К. С. Раевский) ГУ НИИ фармакологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

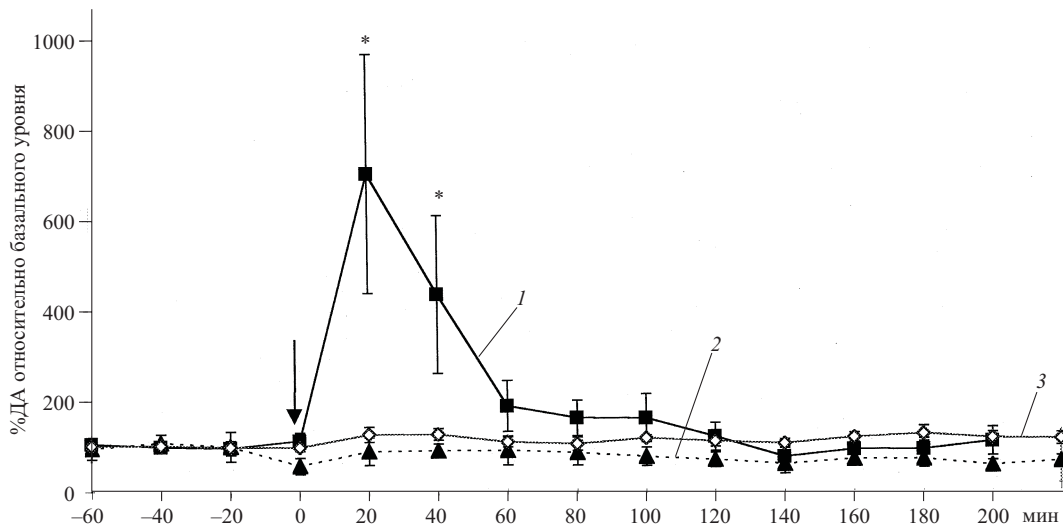


Рис. 1. Влияние амфетамина и мидантана на накопление внеклеточного дофамина в стриатуме свободноподвижных крыс.

Стрелкой показан момент введения амфетамина (1), совместного введения амфетамина и мидантана (2) и 0,85% раствора NaCl (3). Здесь и на рис. 2 и 3: * — отличие от контроля статистически значимо при $p < 0,05$.

ал-зависимому механизму [3, 12]. По мнению ряда авторов [7, 9], этим механизмом обусловлено влияние на дофаминергическую передачу, что послужило предпосылкой для их использования в качестве противопаркинсонических препаратов.

Целью настоящей работы явилось исследование с помощью метода внутримозгового микродиализа на свободноподвижных крысах накопления внеклеточного дофамина в дорзальном стриатуме при остром введении амфетамина в условиях применения антагониста NMDA-рецепторов мидантана.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 220 – 280 г. Для оценки уровня ДА, 3,4-дигидроксифенилуксусной (ДОФУК) и гомованилиновой кислот (ГВК) во внеклеточном пространстве дорзального стриатума использовали метод внутримозгового микродиализа [20]. Под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг внутривенно) концентрические микродиализаторы имплантировали стереотаксически в стриатум по координатам AP + 0,5, L – 3,0, DV – 7,5 [13] и крепили к костям черепа. Через 24 ч после операции проводили перфузию искусственной спинномозговой жидкостью (состав в мМ: Na⁺ 150; K⁺ 3,0; Ca²⁺ 1,4, Mg²⁺ 0,8; PO₄⁻ 31,0; Cl⁻ 155; pH 7,4) со скоростью 2 мкл/мин с помощью шприцевого насоса Braun Perfusor IV. Образцы диализата собирали каждые 20 мин. После сбора 3 базальных образцов животным внутривенно вводили 0,85% раствор NaCl, мидантан (20 мг/кг), амфетамин (“Sigma”, США) в дозе 10 мг/кг или одновременно амфетамин с мидантаном. Образцы диализата анализировали, используя метод ВЭЖХ/ЭД (BAS LC-4B). ДА, ДОФУК и ГВК разделялись на колонке с обратной фазой (ULTRASPHERE

ODS, 5 мкм, 4,6 × 150 мм) с использованием 0,1 М цитратно-фосфатной подвижной фазы, содержащей 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (pH 3,7). В качестве детектора применяли стеклоугольный электрод (+0,8 V) против электрода сравнения Ag/AgCl.

Среднее содержание ДА, ДОФУК и ГВК в базальных образцах принимали за 100%. Эффекты амфетамина оценивали по отношению к базальному уровню.

В отдельных экспериментах оценивали показатели стереотипного поведения животных. Наблюдения проводили в течение 10 с периода каждые 20 мин до и после введения препарата. Оценка стереотипии проводили по модифицированной 6-балльной шкале Nave-mann [6]: 0 — отсутствие стереотипии, 1 — периодическое принюхивание, 2 — постоянное принюхивание, 3 — периодическое лизание, 4 — постоянное лизание, 5 — периодическое грызение, 6 — постоянное грызение.

Все процедуры выполняли в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с животными.

Среднее число животных в группе — 6 – 8. Данные обрабатывали статистически по *t*-критерию Стьюдента. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базальное содержание ДА, ДОФУК, ГВК в диализатах дорзального стриатума мозга крыс в опытах составило $111,2 \pm 5,6$ фмоль/20мин/20мкл, 15 ± 2 нмоль/20мин/20мкл, $10 \pm 3,5$ нмоль/20мин/20мкл соответственно.

Как видно из рис. 1, при использовании амфетамина в дозе 10 мг/кг через 20 мин после первого введения психостимулятора концентрация ДА достигала

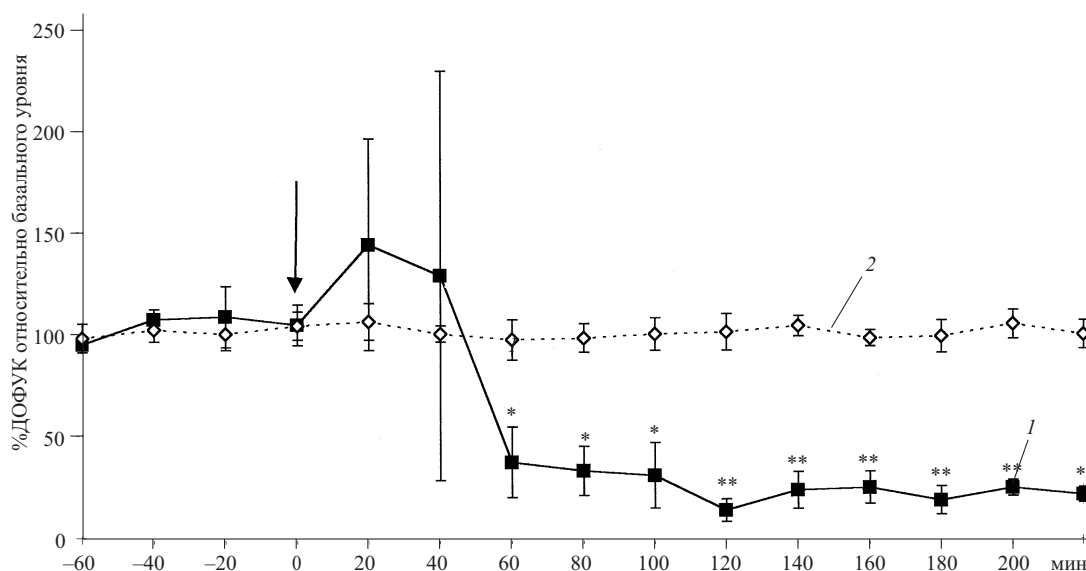


Рис. 2. Влияние амфетамина на накопление внеклеточной ДОФУК в стриатуме свободноподвижных крыс.

Стрелкой показан момент введения амфетамина (1) и 0,85% раствора NaCl (2). ** — отличие от контроля достоверно при $p < 0,01$. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

700 – 750% по отношению к контролю. После этого уровень ДА быстро снижался, уже через час после введения практически достигая исходных величин. Внеклеточное содержание ДОФУК оказалось несколько повышенным после инъекции препарата ($150 \pm 15\%$), однако, затем быстро снижалось, достигая 40% от контроля (рис. 2). Концентрация ГВК в тех же условиях также начинала снижаться приблизительно через 1 ч после инъекции амфетамина, однако, снижение было не столь быстрым (60% от контроля через 1 ч после введения, рис. 3). При введении одного мидантана (20 мг/кг) не отмечалось достоверных изменений в содержании ДА, ДОФУК и ГВК в стриатных диализатах мозга крыс. При одновременном введении амфетамина (10 мг/кг) и мидантана (20 мг/кг), в отличие от опыта с одним амфетамином, не наблюдалось каких-либо достоверных изменений во внеклеточном содержании ДА по сравнению с контрольным уровнем (рис. 1). В то же время внеклеточные концентрации ДОФУК и ГВК в этих условиях оказались сниженными в такой же степени, как при введении одного амфетамина. На вызванное амфетамином стереотипное поведение мидантан также не влиял.

В настоящее время не подлежит сомнению факт тесного взаимодействия глутаматергической и дофаминергической систем мозга [7, 10, 16]. Наиболее хорошо изученным примером такого взаимодействия является влияние антагониста NMDA-подтипа глутаматных рецепторов МК-801 на эффекты амфетаминоподобных веществ, проявляющееся в подавлении вызываемой психостимуляторами поведенческой сенситизации на этапах ее экспрессии и, в меньшей степени, развития [18]. Следует отметить, что, несмотря на большой объем информации, касающейся действия

МК-801, существует ряд факторов, затрудняющих интерпретацию этих данных. Так, известно, что МК-801 способен при однократном введении проявлять психостимулирующие свойства [14]. Наше исследование было предпринято для анализа взаимодействия дофаминергической и глутаматергической систем мозга с использованием антагониста NMDA-рецепторов, не являющегося при этом психостимулятором.

В качестве такого антагониста использовали мидантан. В отдельных экспериментах удалось показать, что сам препарат не влияет на поведенческую стимуляцию животных и накопление внеклеточного ДА. Следует отметить, что в ранее опубликованных работах сообщалось о повышении уровня ДА [8]. Однако при этом использовалась доза мидантана (аминоадамонтана), в 10 раз превышающая примененную в нашей работе. Кроме того, препарат вводили непосредственно в мозг методом инфузии. Наши данные подтверждают тот факт, что антагонисты NMDA-рецепторов могут не проявлять общего психостимулирующего действия (по крайней мере, при их использовании в невысоких дозах — 20 мг/кг), а психостимулирующий эффект МК-801 может объясняться его специфическим действием. Для исследования неспецифического взаимодействия мидантана с дофаминергической системой и было предпринято изучение его влияния на действие амфетамина.

Установлено, что мидантан полностью подавляет эффект амфетамина на накопление внеклеточного ДА в диализатах стриатума, не изменяя при этом его эффектов в отношении внеклеточного содержания метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК.

Как известно, эффект амфетамина на накопление внеклеточного ДА может быть обусловлен несколькими

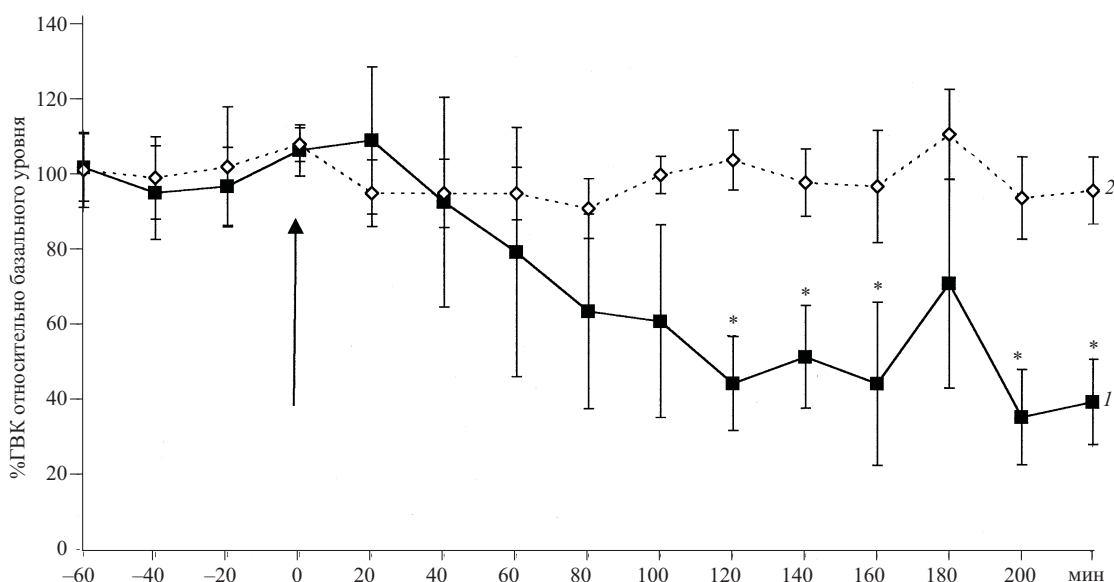


Рис. 3. Влияние амфетамина на накопление внеклеточной ГВК в стриатуме свободноподвижных крыс.

Стрелкой показан момент введения амфетамина (1) и 0,85% раствора NaCl (2). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ми механизмами: опустошением везикулярного внутриклеточного пула ДА, ингибированием моноаминоксидазы, блокированием или обращением обратного захвата нейротрансмиттера. Полученные нами результаты можно объяснить тем, что антагонисты NMDA-рецепторов способны блокировать вызванное действием амфетамина высвобождение ДА из везикулярного пула, не влияя на спонтанное высвобождение, активность MAO и обратный захват нейротрансмиттера. Это предположение в принципе согласуется с тем фактом, что мидантан не изменяет эффект амфетамина на накопление внеклеточных ДОФУК и ГВК.

В ряде работ получены данные о том, что мидантан и некоторые его аналоги способны блокировать открытые NMDA-каналы [3]. По всей вероятности, такая блокада может повлиять на стимулированное амфетамином высвобождение ДА, которое, хотя бы отчасти, происходит по рецепторному механизму. Отсутствие эффекта мидантана на нестимулированное высвобождение ДА, по-видимому, объясняется каким-то дополнительным механизмом действия, не предполагающим участия NMDA-рецепторов. Этот механизм, а также то, что эффект амфетамина блокируется полностью, требует дальнейшего дополнительного исследования.

Из вышесказанного следует вывод о возможности локализации глутаматных рецепторов NMDA-подтипа на дофаминергических терминалях, что пока не получило подтверждения в литературе [10].

Как известно, аминоксидантаны являются нейротрофакторами, используемыми, например, при лечении болезни Паркинсона. Антагонисты глутаматных рецепторов NMDA-подтипа предотвращают развитие и в меньшей степени экспрессию поведенческой сенситизации, вызванной многократным введением психости-

муляторов. В нашем исследовании показано, что, предотвращая избыточное накопление внеклеточного ДА, мидантаноподобные вещества могут оказывать нейротрофакторный эффект, характерный для действия токсических доз амфетаминов.

ВЫВОД

Неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов мидантан, в дозе 20 мг/кг предупреждает накопление внеклеточного дофамина, вызванное действием амфетамина, не оказывая влияния на сниженный последним уровень 3,4-дигидроксифенилуксусной и гомованилиновой кислот.

Работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-49075.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. А. Андержанова, И. И. Афанасьев, В. С. Кудрин, К. С. Раевский, *Бюл. exper. биол.*, **28**(11), 538 – 544 (1999).
2. Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(4), 3 – 6 (2001).
3. М. В. Елшанская, А. И. Соболевский, Е. А. Вальдман, Б. И. Ходоров, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(1), 18 – 21 (2001).
4. E. A. Anderzhanova, I. I. Afanas'ev, V. S. Kudrin, and K. S. Rayevsky, *Ann. N. Y. Acad. of Sci. USA*, 914, 137 – 146 (2000).
5. I. I. Afanas'ev, E. A. Anderzhanova, V. S. Kudrin, and K. S. Rayevsky, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **69**, 653 – 658 (2001).
6. U. Havemann, B. Magnus, H. G. Moller, and K. Kuschinsky, *Psychopharmacol.*, **90**, 40 – 48 (1986).
7. M. Karcz-Kubicha, K. Wedzony, W. Zajaczkowski, and W. J. Danysz., *Neural. Transm.*, **106** (11 – 12), 1189 – 204 (1999).
8. I. Liste, A. Munoz, M. J. Guerra, and J. L. Labandeira-Garcia., *Synapse*, **35** (3), 182 – 91 (2000).
9. M. Marti, S. Sbrenna, K. Fuxe, et al., *Eur. J. Neurosci.*, **12**(5), 1848 – 50 (2000).

10. K. Mizoguchi, H. Yokoo, M. Yoshida, et al., *Brain. Res.*, **662**, 255 – 258 (1994).
11. W. Nakajima, A. Ishida, and G. Takada., *Brain. Res. Protoc.*, **3**(3), 252 – 256 (1999).
12. C. G. Parsons, W. Danysz, and G. Quack., *Drug News Perspect.*, **11**(9), 523 (1998).
13. G. Paxinos and C. Watson., *The rat brain stereotaxic coordinates*, 2nd edn. Academic Press, Sydney (1982).
14. D. S. Segal, R. Kuszynski, and S. M. Florin, *Behav. Neurosci.*, **109**, 532 – 546 (1995).
15. D. Sulzer and S. Rayport., *Neuron*, **5**, 797 – 808 (1990).
16. F. J. Wan, H. C. Lin, Y. S. Lin, and C. J. Tseng., *Neuropharmacology*, **39**(3), 419 – 26 (2000).
17. F. B. Weihmuller, S. J. O'Dell, and S. J. Marshall., *Synapse*, **11**, 155 – 163 (1992).
18. M. E. Wolf., *Prog. Neurobiol.*, **54**(6), 679 – 720 (1998).
19. M. E. Wolf and C. J. Xue., *J. Neurochem.*, **73**(4), 1529 – 38 (1999).
20. T. Zetterstrom, T. Sharp, and U. Ungerstedt., *Eur. J. Pharmacol.*, **106**, 27 (1984).

Поступила 25.03.02

EFFECT OF THE COMBINED ADMINISTRATION OF AMPHETAMINE AND MIDANTANE ON THE DOPAMINERGIC NEUROTRANSMISSION IN THE STRIATUM OF FREELY MOVING RATS

I. I. Afanas'ev, M. L. Dvorkina, I. A. Novoselov, and K. S. Raevsky

Laboratory of Neurochemical Pharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiskaya Str. 8, Moscow, 125315 Russia

The combined action of midantane (amantadine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist used as an antiparkinsonian drug) and amphetamine (a psychostimulant) on the extracellular level of dopamine and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) was studied in the striatum of freely moving Wistar rats. After the administration of amphetamine (AMPH) in a dose of 10 mg/kg (i.p.), the extracellular level of dopamine exhibited a sharp increase in (up to 700% relative to the basal level) within 20 – 40 min and then gradually decreased. One hour after the injection of AMPH, the content of DOPAC and HVA decreased by 60 and 40%, respectively, and then was retained on this level. Midantane (20 mg/kg, i.p.) injected alone did not influence the level of dopamine and its metabolites. Administered together with AMPH, midantane prevented the extracellular accumulation of dopamine, but did not change the extracellular level of its metabolites reduced by AMPH. These results suggest that NMDA receptor antagonists can block the AMPH-stimulated dopamine release from a vesicular pool, while not affecting the other components of dopamine action such as the re-uptake reversal and inhibition of monoamine oxidase.