

## СРАВНЕНИЕ ЗАЩИТНОГО ЭФФЕКТА ГИМАНТАНА И АМАНТАДИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕЙРОТОКСИНА 6-ГИДРОКСИДОФАМИНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

И. О. Логвинов, Т. А. Антипова, А. В. Непоклонов, Е. А. Вальдман<sup>1</sup>

На клеточной модели болезни Паркинсона — цитотоксичности, индуцированной внесением в культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ГОДА), проведено сравнительное исследование защитных свойств нового противопаркинсонического препарата гимантана (N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорид) и амантадина при различных режимах внесения. Установлено, что гимантан в концентрации  $10^{-7}$  М оказывает цитопротекторный эффект при предварительном внесении в культуральную среду до добавления 6-ГОДА и при внесении сразу же после введения нейротоксина в диапазоне концентраций  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  М. Цитопротекторный эффект амантадина в концентрациях  $10^{-7}$  –  $10^{-8}$  М проявился только при внесении его в культуральную среду сразу после воздействия 6-ГОДА. Полученные результаты свидетельствуют о большем нейропротекторном потенциале гимантана, чем амантадина.

**Ключевые слова:** нейропротекция; гимантан; амантадин; болезнь Паркинсона; SH-SY5Y.

Болезнь Паркинсона характеризуется прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов. Поиск новых эффективных средств фармакотерапии этого заболевания направлен на выявление потенциальных нейропротекторных препаратов, которые могут не только устранять проявления заболевания, но и замедлять его развитие.

Гимантан (N-(2-адамантил)гексаметиленмина гидрохлорид) — новый противопаркинсонический препарат, разработанный в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова. В клиническом исследовании показано, что гимантан эффективно устраняет двигательные проявления на ранних стадиях болезни Паркинсона [2]. Установленный комплексный механизм действия позволяет предполагать, что гимантан обладает нейропротекторным эффектом. Это предположение основывается на результатах исследований, в которых был выявлен защитный эффект гимантана на модели нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом [1] и на модели ранней (безсимптомной) стадии болезни Паркинсона, вызванной нейротоксином МФТП [3].

Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y широко используются в качестве модели дофаминовых нейронов для исследования болезни Паркинсона, поскольку обладают многими их свойствами: в них экспрессируются тирозингидроксилаза, дофамин бета-гидроксилаза, дофаминовый транспортер, нейрофиламенты, дофаминовые, опиоидные, мускариновые рецепторы, а также рецепторы для NGF [4]. В связи с этим культура клеток нейробластомы человека SH-SY5Y является объектом для изучения эффективности потенциальных нейропротекторов [10]. Для ин-

дукции гибели клеток SH-SY5Y часто используется нейротоксин 6-гидроксидофамин (6-ГОДА), вызывающий повреждения, аналогичные таковым при болезни Паркинсона [8]. По литературным данным, механизмы нейротоксического действия 6-ГОДА, установленные в исследованиях *in vitro*, включают образование активных форм кислорода при окислении нейротоксина с последующими процессами повреждения мембран митохондрий, белков, развитием стресса эндоплазматического ретикулума и гибели нейронов [6, 7].

Целью настоящего исследования явилось сравнение защитных свойств гимантана и препарата сравнения амантадина на клеточной модели болезни Паркинсона — цитотоксичности, индуцированной внесением в культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y нейротоксина 6-ГОДА.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов клетки линии SH-SY5Y рассевали с плотностью 10 тыс клеток в лунку в 96-луночные планшеты в среде DMEM (HyClone), содержащей 15 % телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) и 2 mM L-глутамин. Все манипуляции с клетками выполнялись в стерильных условиях. Клетки инкубировали при температуре 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> до образования монослоя.

6-ГОДА вносили в культуру клеток в конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C в 5 % CO<sub>2</sub>. После этого заменяли среду и клетки культивировали в течение 24 ч в тех же условиях [9]. Во всех экспериментах гимантан и амантадин вносили в клеточную среду за 24 ч до или сразу после применения 6-ГОДА в диапазоне конечных concentra-

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., 8.

ций от  $10^{-6}$  до  $10^{-8}$  М. Количество наблюдений ( $n$ ) во всех группах — 16.

Для определения жизнеспособности клеток во всех экспериментах использовали тест с бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) (“Sigma”) [5]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Multiscan EX” (“Thermo”) при длине волны 600 нм.

Статистическую обработку данных проводили в One-way ANOVA с применением критерия Краскела – Уоллиса с последующим тестом по Данну в статистической программе GraphPad Prism 3.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что внесение в культуральную среду клеток SH-SY5Y нейротоксина 6-ГОДА вызывало значительное снижение жизнеспособности клеток. Предварительное, до воздействия 6-ГОДА, внесение гимантана в культуральную среду в концентрации  $10^{-7}$  М приводило к достоверному увеличению выживаемости клеток. Внесение амантадина до повреждения 6-ГОДА не оказывало достоверного защитного эффекта (табл. 1).

Оба исследуемых препарата при внесении в культуру клеток сразу после воздействия 6-ГОДА достоверно защищали клетки от гибели. Эффект гимантана был практически одинаковым в диапазоне концентраций  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  М. Эффект амантадина оказался наиболее выраженным в концентрации  $10^{-7}$  М (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу большего нейропротекторного потенциала гимантана в сравнении с амантадином.

В проведенном исследовании установлено, что в условиях *in vitro* при моделировании нейротоксического поражения 6-ГОДА гимантан оказывает достоверный защитный эффект как при внесении в культуральную среду до повреждения, так и сразу после нейротоксина. Эффект амантадина при предварительном внесении не проявился. Полученные результаты свидетельствуют в пользу большего нейропротекторного потенциала гимантана в сравнении с амантадином.

Таблица 1. Влияние гимантана и амантадина на жизнеспособность клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y при воздействии нейротоксином 6-ГОДА (результаты МТТ-теста). Внесение препаратов за 24 ч до введения 6-ГОДА ( $M \pm SE$ )

Экспериментальная группа	Единицы оптической плотности	
	Гимантан	Амантадин
Контроль, $n = 16$	$0,333 \pm 0,038$	$0,321 \pm 0,042$
6-ГОДА 100 мкМ, $n = 16$	$0,254 \pm 0,026^*$	$0,275 \pm 0,024^*$
$10^{-6}$ М + 6-ГОДА, $n = 16$	$0,254 \pm 0,023$	$0,280 \pm 0,030$
$10^{-7}$ М + 6-ГОДА, $n = 16$	$0,283 \pm 0,039^{\wedge}$	$0,291 \pm 0,031$
$10^{-8}$ М + 6-ГОДА, $n = 16$	$0,281 \pm 0,037$	$0,282 \pm 0,036$

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем;

$\wedge$   $p \leq 0,05$  по сравнению с 6-ГОДА.

Механизмы нейротоксического действия 6-ГОДА, установленные в исследованиях *in vitro*, включают образование активных форм кислорода (АФК) при окислении нейротоксина (пероксида, супероксид аниона, гидроксильного радикала) с последующими процессами повреждения мембран митохондрий, увеличения концентрации цитохрома С в цитозоле, активацией каспаз 3 и 9, протеинкиназы С, повреждением белков, развитием стресса эндоплазматического ретикулума и апоптоза [6, 7]. Образование АФК может быть заблокировано или снижено внесением в среду антиоксидантов. Ранее в бесклеточной среде была установлена антирадикальная активность гимантана, у амантадина этой активности не выявлено. В то же время практически равный эффект препаратов при внесении после повреждения не дает возможности сделать окончательно заключение о связи защитного эффекта только с антиоксидантными свойствами. Защитный эффект при предварительном (до 6-ГОДА) введении установлен только для гимантана. Нейропротекторная активность при такой схеме введения может быть связана с активацией клеточных защитных механизмов и повышением устойчивости клеток к повреждению.

Полученные результаты открывают перспективу исследований влияния гимантана на сигнальные пути апоптоза.

## ВЫВОД

В условиях *in vitro* модели повреждения клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y нейротоксином 6-ГОДА гимантан оказывает профилактический и лечебный цитопротекторный эффект в концентрации  $10^{-7}$  М. Эффект амантадина проявился только при внесении в культуральную среду в концентрациях  $10^{-7}$  –  $10^{-8}$  М сразу после введения нейротоксина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Иванова, И. Г. Капица, А. В. Непоклонов и др., *Хим.-фарм. журн.*, 47(10), 12 – 15 (2013); *Pharm. Chem. J.*, 47(10), 517 – 520 (2014).

Таблица 2. Влияние гимантана и амантадина на жизнеспособность клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y при воздействии нейротоксином 6-ГОДА (результаты МТТ-теста). Внесение препаратов сразу после введения 6-ГОДА ( $M \pm SE$ )

Экспериментальная группа	Единицы оптической плотности	
	Гимантан	Амантадин
Контроль, $n = 16$	$0,306 \pm 0,020$	$0,308 \pm 0,018$
6-ГОДА 100 мкМ, $n = 16$	$0,220 \pm 0,028^*$	$0,215 \pm 0,030^*$
$10^{-6}$ М, $n = 16$	$0,253 \pm 0,019^{\wedge}$	$0,239 \pm 0,019$
$10^{-7}$ М, $n = 16$	$0,249 \pm 0,017^{\wedge}$	$0,247 \pm 0,018^{\wedge}$
$10^{-8}$ М, $n = 16$	$0,250 \pm 0,016^{\wedge}$	$0,242 \pm 0,019^{\wedge}$

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем;

$\wedge$   $p \leq 0,05$  по сравнению с 6-OHDA.

2. Е. А. Кагунина, А. В. Петрухова, Г. Н. Авакян и др., *Ж. неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова*, **108**(6), 24–27 (2008).
3. А. В. Непоклонов, И. Г. Капица, Е. А. Иванова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, № 11, 3–6 (2012).
4. V. Ciccarone, B. A. Spengler, M. B. Meyers, et al., *Cancer Res.*, **49**, 219–225 (1989).
5. G. R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E. L. Ezell, et al., *Brain Res.*, **592**(1), 239–248 (1992).
6. A. Kanthasamy, H. Jin, S. Mehrotra, et al., *Neurotoxicology*, **31**(5), 555–561 (2010).
7. C. Latchoumycandane, V. Anantharam, H. Jin, A. Kanthasamy, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **256**(3), 314–323 (2011).
8. F. M. Lopes, R. Schröder, M. L. da Frota, et al., *Brain Res.*, **1337**(14), 85–94 (2010).
9. K. Riveles, L. Z. Huang, M. Quik, *Neurotoxicol.*, **29**(3), 421–427 (2008).
10. L. Xie, C. X. Tiong, J. S. Bian, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, 81–91 (2012).

Поступила 02.07.15

## COMPARISON OF CYTOPROTECTIVE EFFECTS OF HEMANTANE AND AMANTADINE UNDER CONDITIONS OF 6-HYDROXYDOPAMINE NEUROTOXIN ACTION ON CULTURED HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS

I. O. Logvinov, T. A. Antipova, A. V. Nepoklonov, and E. A. Valdman

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

Potential neuroprotective activity of the novel antiparkinsonian drug hemantane (hydrochloride N-2-(adamantyl)-hexamethylenimine) in comparison to amantadine has been studied in various regimes of administration on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line injury induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), which is used as *in vitro* model of dopaminergic neurons for Parkinson's disease. Two regimes of hemantane and amantadine administration in a range of final concentrations  $10^{-6}$ – $10^{-8}$  M were used either prior to or immediately after 6-OHDA introduction. MTT colorimetric assay was used to assess the viability of test cells. Significant decrease in viability of SH-SY5Y cells treated with 6-OHDA was observed. The addition of hemantane to cell medium produced cytoprotective effects in both regimes of administration—before and after 6-OHDA—at concentrations  $10^{-7}$  M and  $10^{-6}$ – $10^{-8}$  M, respectively. Amantadine in concentrations  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  M was effective to increase cell survival only when administered after 6-OHDA. These results show that hemantane has a greater neuroprotective potential in comparison to amantadine.

**Keywords:** neuroprotection; hemantane; amantadine; Parkinson's disease; human neuroblastoma SH-SY5Y.