

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-4-28-31

МЕМБРАНОТРОПНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГИМАНТАНА

А. И. Матюшкин, Е. А. Иванова, Н. Н. Золотов, Т. А. Воронина¹

На мембранах эритроцитов крыс с помощью флуоресцентного зонда 1-анилинонафта-лен-8-сульфоната установлена способность производного 2-аминоадамантина гимантана проявлять мембранотропные свойства, повышая заряд мембран эритроцитов. На моделях гликогенового перитонита у мышей и уксусного перитонита у крыс показано, что гимантан при однократном внутрибрюшинном введении животным в дозе 20 мг/кг достоверно снижает концентрацию продуктов свободно-радикального окисления (СРО) липидов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в перитонеальном выпоте грызунов. Препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг значительно уменьшает уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов только в перитонеальном экссудате мышей с гликогеновым перитонитом. При этом снижение концентрации изучаемых продуктов СРО липидов на фоне диклофенака натрия у мышей с гликогеновым перитонитом было достоверно менее выражено, чем в группе животных, которым внутрибрюшинно вводили гимантан, на 18 % ($p < 0,05$). Установлено, что гимантан, обладающий противовоспалительной активностью, способен оказывать антиоксидантное действие за счет мембранотропной активности, характеризующееся снижением образования ТБК-активных продуктов СРО липидов при воспалении.

Ключевые слова: гимантан; амантадин; диклофенак; гликогеновый перитонит; уксусный перитонит; крысы; мыши; мембранотропные свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление — процесс, при котором происходит повышение проницаемости мембран клеток, интенсифицируются реакции свободно-радикального окисления (СРО) липидов. В норме активные формы кислорода (АФК) образуются в небольшом количестве и оказывают защитное действие, так как способствуют разрушению патогенных микроорганизмов и старых, отживших клеток [1, 11]. Однако избыток АФК приводит к деструкции клеточных мембран и повреждению макромолекул — белков, липидов, ДНК [6]. При воспалении растёт уровень вторичного продукта СРО липидов малонового диальдегида (МДА) в тканях как следствие интенсификации окислительного стресса и ускорения метаболизма арахидоновой кислоты [14].

Поэтому разработка противовоспалительных средств, способных снизить деструктивное действие продуктов СРО липидов на мембраны, патогенетически обоснована. Потенциальными препаратами, предположительно обладающими такими свойствами, являются соединения, содержащие в своей структуре адамантильный фрагмент, вследствие его мембранотропности [16]. Так, производные 1- и 2-аминоадамантина амантадин и гимантан проявляют противовоспалительную активность на моделях острого экссудативного воспаления у грызунов, при этом гимантан оказывает более выраженное действие на воспаление, чем амантадин [14].

Цель данного исследования — оценка влияния производного 2-аминоадамантина гимантана на уровень реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) продуктов

СРО липидов, к которым относится МДА, при экссудативном воспалении у грызунов в сравнении с широко применяемым нестероидным противовоспалительным препаратом (НПВП) диклофенаком натрия. Экспериментальная работа включала 2 этапа. Первый этап посвящён изучению мембранотропных свойств гимантана в сравнении с близким по химической структуре препаратом амантадином. На втором этапе регистрировали уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов в перитонеальном выпоте мышей и крыс с экспериментальными моделями перитонита и оценивали влияние на него гимантана и диклофенака натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы половозрелые аутбредные белые мыши-самцы массой 24 – 28 г и аутбредные белые крысы-самцы массой 270 – 320 г. Животных получали из питомника лабораторных животных “Столбовая” (Московская область). Организацию и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Животные содержались в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”, утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” (протокол № 1 от 14 февраля 2018 г.).

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

В работе использовались производные аминокислот — гимантана гидрохлорид и амантадина гидрохлорид, предоставленные химико-технологической лабораторией ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, и диклофенак натрия производства фирмы Nemofarm, Сербия.

Оценка мембранотропных свойств гимантана и амантадина *in vitro*. Кровь для получения мембран эритроцитов собирали из воротной вены наркотизированных крыс.

Получение суспензии мембран эритроцитов. Кровь животных собирали через стеклянную воронку, смоченную раствором гепарина натрия, в вакутейнер, содержащий K_3EDTA . Отмытые эритроциты гемолизировали в 10-кратном объеме дистиллированной воды, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин, после чего гемолизат сливали, а осадок несколько раз промывали дистиллированной водой и снова центрифугировали. К полученным эритроцитарным мембранам добавляли 5 мл физиологического раствора, суспендировали и развели в 8 раз.

Приготовление растворов препаратов. В исследовании использовали гимантана гидрохлорид и амантадина гидрохлорид, разведенные в физиологическом растворе в концентрации 62,5 – 625 мкмоль/л. Конечный объем растворов препаратов составлял 500 мкл. Время инкубации при температуре 20 °С составляло 15 мин.

Измерение флуоресценции. После инкубации в пробирку добавляли 8 мкл раствора флуоресцентного зонда 1-анилинафтален-8-сульфоната (АНС) в концентрации 10 мкмоль/мл. Интенсивность флуоресценции измеряли при длинах волн возбуждения 370 нм и эмиссии 480 нм. Об изменении заряда мембран эритроцитов судили по отношению интенсивности флуоресценции зонда АНС в мембранах эритроцитов, содержащих гимантан и амантадин, к интенсивности флуоресценции в пробах без препаратов, которое рассчитывали по формуле: $K_m = P_2/P_1$, где P_1 — флуоресценция зонда АНС в пробе без препаратов, а P_2 — флуоресценция зонда АНС в пробе с препаратом [4].

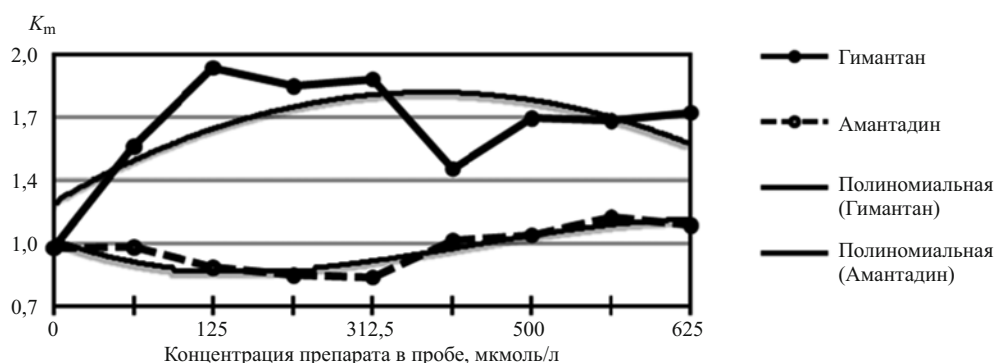
Гликогеновый перитонит у мышей. Животные были распределены на следующие группы: 1. Пассивный контроль — мыши без экспериментальной патологии, $n = 10$; 2. Активный контроль — мыши с гликогеновым перитонитом, $n = 10$; 3. Мыши с гликогеновым перитонитом, которым внутрибрюшинно вводили гимантан в дозе 20 мг/кг, $n = 10$; 4. Мыши с гликогеновым перитонитом, которым внутрибрюшинно вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг, $n = 10$. Изучаемые препараты или физиологический раствор в эквивалентном объеме (группы активного и пассивного контроля) животным вводили внутрибрюшинно за 40 мин до индукции воспаления. Гликогеновый перитонит моделировали внутрибрюшинным введением животным 500 мкл 5 % раствора гликогена (Glycogen from oyster, type II, Sigma-Aldrich), растворенного в физиологическом растворе [15]. Мышам группы пассивного контроля внутрибрюшинно вводили 500 мкл физиологического раствора. Через 4 ч после индукции воспаления животные были подвергнуты эвтаназии цервикальной дислокацией, после чего им в брюшную по-

лость вводили 3 мл холодного натрий-фосфатного буфера (pH = 7,4), делали лёгкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости получали центрифугированием и до проведения биохимического исследования хранили при температуре – 40 °С.

Укусный перитонит у крыс. Животные были распределены на следующие группы: 1. Пассивный контроль — крысы без экспериментальной патологии, $n = 10$; 2. Активный контроль — крысы с укусным перитонитом, $n = 10$; 3. Крысы с укусным перитонитом, которым внутрибрюшинно вводили гимантан в дозе 20 мг/кг, $n = 10$; 4. Крысы с укусным перитонитом, которым внутрибрюшинно вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг, $n = 10$. Все изучаемые препараты или физиологический раствор в эквивалентном объеме (группы активного и пассивного контроля) животным вводили внутрибрюшинно за 40 мин до индукции воспаления. Перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 1 % раствора уксусной кислоты (в физиологическом растворе) из расчёта 1 мл раствора на 100 г массы тела [9]. Животным группы пассивного контроля внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Через 3 ч после индукции воспаления крыс подвергали эвтаназии методом декапитации и собирали кровь. В брюшную полость животных вводили по 5 мл холодного натрий-фосфатного буфера (pH = 7,4), делали лёгкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости и сыворотку крови получали центрифугированием и до проведения биохимического исследования хранили при температуре – 40 °С.

Определение концентрации ТБК-активных продуктов СРО липидов в перитонеальной жидкости животных. К 100 мкл перитонеальной жидкости добавляли 40 мкл 0,495 М соли Мора и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем к образцам добавляли 1000 мкл 0,9 % раствора ТБК (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 длине волны 532 нм. Расчёт количества ТБК-активных продуктов СРО липидов проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$. Все измерения проводили в 2 параллелях [5, 6].

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро — Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальных группах распределение было нормальным и соблюдалось межгрупповое равенство дисперсий, дальнейшую обработку проводили с помощью метода параметрической статистики критерия Даннета. Результаты в таблицах представлены как среднее \pm ошибка среднего (стандартное отклонение): $Mean \pm SEM (SD)$. Различия между группами считали достоверными при $p \leq 0,05$.



Отношение интенсивности флуоресценции зонда АНС в мембранах эритроцитов, содержащих гимантан и амантадин, к интенсивности флуоресценции в пробах без препаратов (K_m). K_m рассчитывали по формуле: $K_m = P_2/P_1$, где P_1 — флуоресценция зонда АНС в пробе без препаратов, а P_2 — флуоресценция зонда АНС в пробе с препаратом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе оценивали мембранотропные свойства гимантана в сравнении с близким по химической структуре препаратом амантадином на мембранах эритроцитов крыс флуоресцентным зондом АНС. В суспензии мембран эритроцитов флуоресценция зонда обусловлена в основном связанной с мембранами его частью [4]. А так как АНС имеет отрицательный заряд, то с ростом положительного заряда мембран связывание зонда с мембраной растёт, что и наблюдалось в образцах, содержащих гимантан. Интенсивность флуоресценции в них была выше, чем в контрольной суспензии мембран эритроцитов (табл. 1). Это свидетельствует о том, что гимантан обладает способностью повышать заряд мембран эритроцитов. Интенсивность флуоресценции в образцах, содержащих амантадин, сначала снижалась до концентрации около 300 мкмоль/л, а затем повышалась (табл. 1). Для наглядности табличные данные продублированы на рисунке.

Таким образом, результаты проведённого эксперимента подтвердили наличие у гимантана мембранотропных свойств, которые отличаются от мембранотропных свойств амантадина, что требует дальнейшего изучения.

Таблица 1. Отношение интенсивности флуоресценции зонда АНС в мембранах эритроцитов на фоне гимантана и амантадина к интенсивности флуоресценции в пробах без препаратов

Концентрация препарата, мкмоль/л	Коэффициент K_m *, свидетельствующий об изменении заряда мембран, на фоне:	
	гимантана	амантадина
0	1,00	1,00
62,5	1,52	1,00
125	1,93	0,90
250	1,83	0,86
312,5	1,87	0,85
375	1,40	1,04
500	1,67	1,07
562,5	1,65	1,16
625	1,70	1,12

* $K_m = P_2/P_1$, где P_1 — флуоресценция зонда АНС в пробе без препаратов, а P_2 — флуоресценция зонда АНС в пробе с препаратом.

На втором этапе работы проводили оценку влияния гимантана на уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов на моделях острого экссудативного воспаления у грызунов — гликогенового перитонита у мышей и укусного перитонита у крыс, являющихся экспериментальными моделями воспаления с выраженным нейтрофильным компонентом [2, 15]. Известно, что стимуляция нейтрофилов приводит к кислородному взрыву, в результате которого образуются АФК [10], и нами ранее было показано, что в экссудате мышей с гликогеновым перитонитом и крыс с укусным перитонитом усиливается СРО липидов [7].

Влияние производного 2-аминоадамтана гимантана на уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов при воспалении оценено в сравнении с широко применяемым НПВП диклофенаком натрия, для которого экспериментально установлена способность снижать повышенную концентрацию МДА в плазме крови крыс с отёком лапы,

Таблица 2. Влияние гимантана и диклофенака натрия (внутрибрюшинно, однократно) на концентрацию реагирующих с ТБК продуктов СРО липидов в перитонеальном экссудате мышей с гликогеновым перитонитом и крыс с укусным перитонитом (мкмоль/л), $Mean \pm SEM (SD)$

Группа	Концентрация ТБК-активных продуктов в экссудате	
	мышей с гликогеновым перитонитом	крыс с укусным перитонитом
Пассив	0,062 ± 0,005 (0,013)*	0,044 ± 0,001 (0,005)*
Актив	0,077 ± 0,004 (0,012)	0,060 ± 0,004 (0,011)
Гимантан 20 мг/кг	0,047 ± 0,004 (0,012)*/**	0,052 ± 0,002 (0,005)*
Диклофенак 10 мг/кг	0,061 ± 0,004 (0,013)*	0,057 ± 0,001 (0,004)

Примечание. “Пассив” — группа мышей без экспериментальной патологии; “Актив” — контрольная группа животных с экспериментальной патологией: мыши с гликогеновым перитонитом или крысы с укусным перитонитом;

* $p < 0,05$ по сравнению с группой активного контроля, критерий Даннета;

** $p < 0,05$ по сравнению с группой “Диклофенак, 10 мг/кг”, критерий Даннета.

вызванным подкожным введением 1 % раствора каррагенина [12].

В экссудате мышей с гликогеновым перитонитом наблюдалось достоверное увеличение концентрации ТБК-активных продуктов на 24,2 % по сравнению с группой пассивного контроля. Гимантан достоверно снижал концентрацию изучаемых продуктов СРО липидов в воспалительном выпоте мышей на 39,0 % по сравнению с группой активного контроля. Полученные результаты согласуются с ранее зарегистрированными данными о способности гимантана снижать уровень МДА в системе аскорбат-зависимого СРО липидов в гомогенате печени интактных крыс [3]. В группе мышей с гликогеновым перитонитом, получавших препарат сравнения диклофенак натрия, снижение концентрации ТБК-активных продуктов СРО липидов составило 20,8 % ($p < 0,05$). При этом гимантан достоверно более выражено (на 18 %, критерий Даннета) уменьшал их уровень в экссудате мышей с экспериментальным перитонитом в сравнении с диклофенаком натрия (табл. 2).

В экссудате крыс с укусным перитонитом концентрация ТБК-активных продуктов СРО липидов повышалась на 36,4 % по сравнению с группой животных без патологии. Гимантан достоверно снижал повышенный уровень ТБК-активных продуктов СРО липидов на 13,3 %. Диклофенак натрия значимого влияния на их концентрацию в перитонеальном выпоте крыс с укусным перитонитом не оказывал (табл. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии антиоксидантного механизма в реализации противовоспалительного действия гимантана и диклофенака натрия. При этом гимантан проявляет более выраженные антиоксидантные свойства по сравнению с диклофенаком натрия.

ВЫВОДЫ

1. На мембранах эритроцитов крыс с помощью флуоресцентного зонда АНС установлена способность гимантана проявлять мембранотропные свойства, характеризующиеся повышением заряда мембран эритроцитов.

2. Гимантан в дозе 20 мг/кг снижает повышенный при гликогеновом перитоните у мышей и укусном перитони-

те у крыс уровень продуктов СРО липидов, реагирующих с ТБК, в перитонеальном выпоте. На модели гликогенового перитонита у мышей гимантан в дозе 20 мг/кг на 18 % ($p < 0,05$) превосходит препарат сравнения диклофенак натрия дозе 10 мг/кг по способности уменьшать повышенную концентрацию продуктов СРО липидов.

Работа выполнена в рамках Госзадания по теме № 0521-2019-0007.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина, *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма*, Фолиант, Санкт-Петербург (2000).
2. З. В. Бакаева, Г. Е. Самонина, Б. А. Умарова и др., *Цитокины и воспаление*, № 2, 28 – 32 (2008).
3. Е. А. Вальдман, *Автореф. дис. докт. мед. наук*, Москва (2001).
4. Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов, *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*, Наука, Москва (1980).
5. Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*, Наука, Москва (1972).
6. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль, *Вопросы мед. химии*, № 1, 118 – 122 (1987).
7. Е. А. Иванова, А. И. Матюшкин, Н. Н. Золотов, Т. А. Воронина, *Патогенез*, **15**(3), 58 – 62 (2017).
8. В. З. Ланкин, *Кардиология*, № 7, 48 – 57 (2000).
9. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К, Москва (2012).
10. Б. В. Пинегин, А. Н. Маянский, *Иммунология*, **28**(6), 374 – 382 (2007).
11. Н. Д. Сидоренко, *Международный ж. приклад. и фундам. исслед.*, № 2 (часть 1), 59 – 61 (2015).
12. S. S. Abbas, M. F. Schaalan, A. K. Bahgat, and E. S. El-Denshary, *Sci. World J.*, **2014**, 731462 (2014).
13. M. Hecker, M. Ullrich, *J. Biol. Chem.*, **264**(1), 141 – 150 (1989).
14. E. A. Ivanova, I. G. Kapitsa, E. A. Valdman, T. A. Voronina, *Advances in Parkinson's Disease*, № 3, 50 – 60 (2016).
15. R. L. Pagano, M. Mariano, R. Giorgi, *Mediat. Inflammat.*, **2006**(4), 36765 (2006).
16. L. Wanka, K. Iqbal, P. R. Schreiner, *Chem. Rev.*, **113**(5), 3516 – 3604 (2013).

Поступила 16.11.18

MEMBRANOTROPIC AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF HEMANTANE

A. I. Matyushkin, E. A. Ivanova, N. N. Zolotov, and T. A. Voronina

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

1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate fluorescent probe was used to demonstrate that hemantane, a 2-aminoadamantane derivative, exhibits membranotropic activity in red blood cell membranes of rats by increasing the membrane charge. Hemantane at a single dose of 20 mg/kg (i.p.) significantly reduces the concentration of 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), products of free-radical oxidation of lipids, in the peritoneal exudate of mice with glycogen-induced peritonitis and in rats with acetic acid-induced peritonitis. The antioxidant properties of hemantane are superior by 18% ($p < 0.05$) to the effect of diclofenac sodium at a single dose of 10 mg/kg which significantly decreases the level of TBARS only in peritoneal exudate in mice with glycogen-induced peritonitis. At the same time, the reduction of TBARS concentration was significantly less pronounced in mice that received diclofenac sodium than in the group of animals treated with hemantane. The obtained results demonstrated that the anti-inflammatory 2-aminoadamantane derivative hemantane exhibits membranotropic properties and produces an antioxidant effect by decreasing TBARS levels in rodents with experimental inflammation.

Keywords: hemantane; amantadine; diclofenac; glycogen-induced peritonitis; acetic acid-induced peritonitis; rats; mice; membranotropic properties.