

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ОСОБЕННОСТИ ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМАНТИНА ПРИ ОТРАВЛЕНИИ МОДЕЛЬНЫМ ОРГАНОФОСФАТОМ

М. А. Юдин, С. В. Чепур, В. Н. Быков, А. Ф. Курпякова, С. Н. Субботина,
А. С. Никифоров, И. М. Иванов¹

Изучено действие мемантина на модели отравления мышей антихолинэстеразным соединением (АХЭС). Показано, что эффекты препарата при отравлениях АХЭС, помимо NMDA-блокирующего действия, определяются его способностью влиять на активность холинэстеразы (ХЭ) головного мозга, эритроцитов и плазмы крови. Мемантин ускоряет оксим-индуцированную реактивацию ХЭ эритроцитов при отравлении АХЭС в дозе 0,8 ЛД₅₀.

Ключевые слова: мемантин; холинэстераза; НИ-6; судороги

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени мемантин (1-амино-3,5-диметиладамантан гидрохлорид) рассматривается в качестве перспективного средства лечения отравлений АХЭС [1]. Выступая в качестве NMDA-антагониста, препарат проявляет противосудорожное действие на моделях интоксикации органофосфатами и карбаматами. В то же время при отравлениях этими ядами эффект мемантина может быть реализован также посредством влияния на ХЭ [2]. Данные о влиянии мемантина на активность ХЭ противоречивы и, по-видимому, зависят от особенностей угнетения фермента конкретным ингибитором.

В частности, мемантин в комбинации с атропином уменьшает выраженность судорог у крыс, отравленных зоманом и дихлофосом, и частично защищает ХЭ головного мозга [10, 12]. Эти данные, а также наличие противосудорожной активности при введении за 1 ч до отравления свидетельствуют о возможности препарата влиять на процессы фосфорилирования ХЭ под действием органофосфатов [9]. Вместе с тем известно, что реализация первичных и вторичных токсических проконвульсантных эффектов рассматриваемых ядов может сопрягаться с реализацией ВАК-зависимых реакций.

Препарат не защищает ХЭ головного мозга от карбамилрования ривастигмином и донепезилом [4]. В то же время введение мемантина (20–30 мг/кг) и донепезила (2,5–10 мг/кг) крысам вызывает усиление их нейротоксического действия [5]. Очевидно, что появление нейротоксического действия препаратов опосредовано другими нехолинэстеразными механизмами. Несмотря на защиту фермента при отравлении органофосфатами мемантин не оказывает влияние на процессы взаимодействия обратимых ингибиторов (эдрофоний, декаметоний) с анионным и периферическим сайтами фермента [9]. Эти обстоятельства позволяют предполагать наличие у препарата свойств аллостерического модулятора активности ХЭ.

Попытки исследования строения и биологических свойств ХЭ с определением подходов к аллостерической регуляции ее активности определили интерес к анализу возможности использования мемантина для модуляции каталитических свойств фермента и его чувствительности к различным ингибиторам. Учитывая противоречивые данные об эффективности препарата и его влиянии на активность ХЭ, цель настоящего исследования состояла в изучении механизмов реализации эффектов мемантина на судорожную готовность при отравлении модельным органофосфатом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах исследовали влияние мемантина при его профилактическом (за 30 мин) введении на поведение (тест “открытое поле” и “Rota-Rod”) и судорожную готовность белых нелинейных мышей-самцов при отравлении АХЭС (диизопропилфторфосфат) в дозе 0,8 ЛД₅₀. Препарат животным вводили внутримышечно в диапазоне доз 1–22 мг/кг, что соответствовало 0,01–0,2 ЛД₅₀ (ЛД₅₀ = 109,7 ± 8,84 мг/кг). Состояние животных оценивали визуально. Тяжесть интоксикации анализировали по 5-балльной шкале [7, 11] в нашей модификации. Для анализа использовали частотные характеристики и временные интервалы развития эквивалентных по тяжести проявлений судорожной активности. Рассчитывали латентный период возникновения судорог, частоту (%) и среднее время продолжительности судорог (ЕТ₅₀). Качественной характеристикой, отражающей влияние препарата на проявления токсических гиперкинезов, считали прекращение судорог не позднее 2 ч после отравления, что соответствует минимальному времени окончания судорог в контрольной группе. Рассчитывали среднюю эффективную дозу мемантина (ЕД_{50суд}) по предуготовленному развитию судорожного синдрома. При оценке эффективности препарат применяли изолированно и в комбинации с введением реактиватора ХЭ НИ-6 (1-[[[4-(аминокарбонил)-пиридино]метокси]метил]-2[(гидрокси-имино)метил]пиридин дихлорид) в действующей дозе 5 мг/кг.

В опытах *in vivo* исследовали влияние мемантина в дозе 1 ЕД_{50суд} на динамику изменения активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эритроцитов и головного мозга и

¹ Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4.

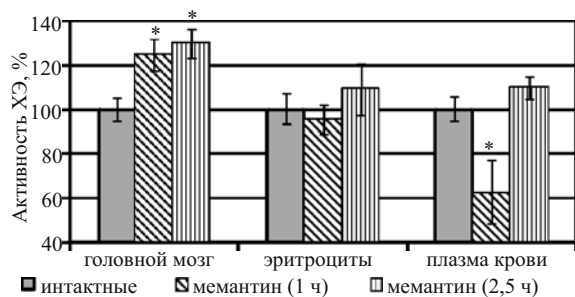


Рис. 1. Изменение активности холинэстеразы (ХЭ) при введении мемантина ($M \pm m_M$, $n = 6$). * — отличия по отношению к контролю достоверны при $p \leq 0,05$.

бутирилхолинэстеразы (БХЭ) плазмы крови при профилактическом введении препарата. Скорость ферментативного гидролиза ацетил- и бутирилтиохолин йодида определяли при температуре $37,4^\circ\text{C}$ в среде $0,04\text{ M}$ фосфатного буфера при $\text{pH } 7,5$ в условиях постоянства концентрации субстрата (метод Элмана) [6]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Hitachi U-2900 при длине волны 412 nm .

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента и теста Манна-Уитни. Среднюю ошибку частоты животных с купированными судорогами определяли с помощью таблицы Генеса [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах установлено, что мемантин в дозах $1 - 8\text{ mg/kg}$ не вызывает изменений со стороны ориентировочно-исследовательской реакции и других показателей теста “открытое поле” у мышей. При его введении животным в дозах 11 mg/kg и более отмечали нарушение координации движений по результатам теста “Rota-Rod” и достоверные изменения всех показателей “открытого поля”. Очевидно, что доза препарата 11 mg/kg является предельной для фармакологического анализа специфических эффектов препарата, а ее превышение может определять развитие дополнительных вариантов фармакологической активности мемантина.

Показано, что профилактическое введение мемантина мышам в дозах $1 - 11\text{ mg/kg}$ не влияло на развитие судорожного синдрома при отравлении модельным АХЭС (таблица).

Влияние препарата на проявление судорожной активности отмечали при его профилактическом введении в

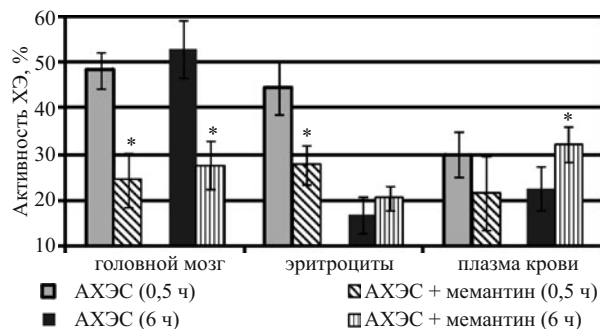


Рис. 2. Влияние профилактического введения мемантина на активность холинэстеразы (ХЭ) при отравлении антихолинэстеразным соединением (АХЭС) в дозе $0,8\text{ LD}_{50}$ ($M \pm m_M$, $n = 6$). * — отличия от контрольной группы достоверны при $p \leq 0,05$.

дозе 22 mg/kg (ED_{99} по эффекту атаксии). В этой серии экспериментов у мышей отмечали увеличение латентного периода судорог и уменьшение ET_{50} в $1,8$ раза ($p \leq 0,05$). Препарат достоверно увеличивал количество животных, у которых судороги купировались в течение 2 ч после отравления ядом. Расчетная средняя эффективная доза ($\text{ED}_{50\text{суд}}$) мемантина по противосудорожному действию составила $13,6 \pm 2,95\text{ mg/kg}$.

При введении в высоких дозах мемантин уменьшал проявления интоксикации, однако через 6 ч после отравления тяжесть общего состояния животных не отличалась от показателей контрольной группы. Через 1 сут показатель тяжести интоксикации в этой экспериментальной группе превышал значения контрольных животных и составил $2,8 \pm 0,2$ баллов (при $2 \pm 0,53$ баллов в контрольной группе).

Эффективность мемантина помимо NMDA-блокирующего действия, по всей видимости, могла быть связана с влиянием препарата на ХЭ. Для выявления дополнительной фармакологической активности в отдельной серии опытов исследовали активность ХЭ головного мозга, эритроцитов и плазмы крови через 1 ч и $2,5\text{ ч}$ после введения препарата в дозе $1\text{ ED}_{50\text{суд}}$ ($13,6\text{ mg/kg}$) интактным животным (рис. 1).

Через 1 ч после введения мемантина при постоянной активности АХЭС в эритроцитах отмечали достоверное уменьшение скорости ферментативного гидролиза бутирилхолина в плазме крови. Через $2,5\text{ ч}$ от начала эксперимента регистрировали восстановление этого показателя.

Противосудорожная активность мемантина при введении мышам за 30 мин до отравления модельным антихолинэстеразным соединением в дозе $0,8\text{ LD}_{50}$ ($M \pm m_M$)

Группы / препарат	Доза, мг/кг	Латентный период судорог, мин	ET_{50} , мин	Тяжесть судорожного синдрома, балл			Частота животных с купированными судорогами, %
				2 ч	6 ч	1 сут	
Контроль	—	$9,6 \pm 3,46$	$304 \pm 34,1$	$4,1 \pm 0,22$	$3,1 \pm 0,13$	$2,0 \pm 0,53$	$0 + 12$ (0/12)
Мемантин	1	$8,8 \pm 2,16$	$298 \pm 29,7$	$4,2 \pm 0,16$	$2,9 \pm 0,30$	$2,0 \pm 0,19$	$0 + 12$ (0/8)
	4	$9,6 \pm 3,12$	$316 \pm 30,4$	$4,1 \pm 0,22$	$3,2 \pm 0,25$	$2,1 \pm 0,23$	$0 + 10$ (0/10)
	8	$9,2 \pm 3,21$	$341 \pm 25,9$	$4,0 \pm 0,19$	$3,1 \pm 0,23$	$1,8 \pm 0,16$	$17 + 17$ (1/6)
	11	$12,4 \pm 2,29$	$371 \pm 29,1$	$3,7 \pm 0,16$	$2,9 \pm 0,23$	$2,1 \pm 0,23$	$38 + 18$ (3/8)
	22	$17,4 \pm 1,94^*$	$168 \pm 41,9^*$	$2,9 \pm 0,30$	$3,1 \pm 0,13$	$2,8 \pm 0,20$	$100 - 12$ (8/8)

Примечание. * — отличия по отношению к контролю достоверны при $p \leq 0,05$.

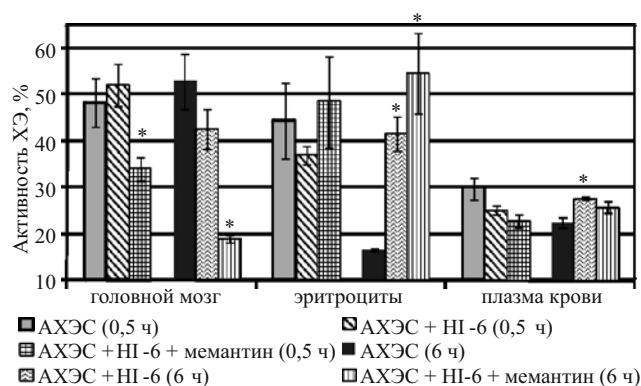


Рис. 3. Влияние профилактического введения мемантина на реактивацию холинэстеразы (ХЭ) при отравлении антихолинэстеразным соединением (АХЭС) в дозе 0,8 ЛД₅₀ ($M \pm m$, $n = 6$). * — отличия от контрольной группы достоверны при $p \leq 0,05$.

Разнонаправленное влияние мемантина на интенсивность гидролиза ацетил- и бутирилтиохолина, очевидно, обусловлено его способностью аллостерически модулировать активность ХЭ. Угнетение фермента в плазме крови могло быть связано со способностью препарата в дозе ЕД₅₀суд обратимо ингибировать БХЭ.

Влияние мемантина в дозе ЕД₅₀суд на ХЭ уточнено на модели отравления мышей АХЭС. Через 0,5 ч после отравления ядом в группах животных, получавших мемантин, регистрировали снижение ферментативной активности АХЭ в головном мозге и эритроцитах (рис. 2), сохранявшееся на протяжении всего периода наблюдения. Способность препарата обратимо ингибировать и экранировать БХЭ косвенно подтверждали данные о восстановлении активности части фермента в плазме крови мышей через 6 ч после отравления АХЭС.

Мемантин практически не оказывал противосудорожного действия при введении в комбинации с реактиватором ХЭ HI-6. При применении HI-6 через 0,5 ч после отравления модельным АХЭС на фоне профилактического введения мемантина в дозе ЕД₅₀суд активность АХЭ головного мозга и БХЭ плазмы крови была достоверно ниже показателей других экспериментальных групп (рис. 3).

Через 6 ч после интоксикации в головном мозге регистрировали почти полное угнетение фермента, остаточная активность не превышала 20 % от значений показателя интактных животных. Очевидно, именно выраженное угнетение фермента в головном мозге у животных, леченных мемантином, явилось следствием увеличения продолжительности периода холиноэстеразного проявления по отношению к контрольной группе.

У животных, получавших HI-6, в тот же срок наблюдали частичное восстановление каталитических свойств фермента в эритроцитах, а через 6 ч активность фермента достоверно превосходила таковую в контрольной группе. Отсутствие восстановления АХЭ головного мозга под влиянием HI-6 могло быть связано с его низкими пенетрантными свойствами по отношению к гематоэнцефалическому барьеру, а недостаточная эффективность в плазме крови — с низкой тропностью к БХЭ [8]. Повышение активности АХЭ эритроцитов при профилактическом введении мемантина по отношению к группе с монотерапией HI-6, позволило предположить увеличение скорости оксим-индуцированной реактивации фермента в красных кровяных тельцах.

Активность БХЭ в плазме крови существенно не изменялась при применении реактиватора ХЭ как на фоне введения мемантина, так и без него.

ВЫВОДЫ

1. Профилактическое применение мемантина в высоких дозах снижает судорожную готовность при отравлении мышей антихолинэстеразным соединением.
2. Введение мемантина приводит к обратимому ингибированию бутирилхолинэстеразы плазмы крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Генес, *Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований*, М., Наука (1967).
2. С. Н. Голиков, В. И. Розенгарт, *Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества*, Медицина, Ленинград (1964).
3. C. Gupta, *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*, Elsevier, London (2009).
4. C. Ramesh, N. Gupta, A. Dekundy, *Drug Development Research*, **64**, 71 – 81 (2005).
5. C. E. Creeley, D. F. Wozniak, A. Nardi, et al., *Neurobiol Aging*, **29**(2), 153 – 167 (2008).
6. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, et al., *Biochem. pharmacol.*, **7**, 88 – 95 (1961).
7. J. R. Mikler, *Defence against the Effects of Chemical Hazards: Toxicology, Diagnosis and Medical Countermeasures* (2007).
8. M. J. Joosen, M. J. van der Schans, C. G. van Dijk, *Toxicol Lett.*, **206**(1), 67 – 71 (2011).
9. M. J. McLean, R. C. Gupta, W. D. Dettbarn, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**(1), 95 – 103 (1992).
10. T. M. Shih, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **188**, 69 – 80 (2003).
11. V. C. Moser, S. M. Chanda, S. R. Mortensen, et al., *Toxic. sci.*, **46**, 211 – 222 (1998).
12. Z. Zhou, X. Dai, X. Gu, et al., *J. Occup Health*, **47**(2), 96 – 101 (2005).

Поступила 12.07.12

SPECIFIC FEATURES OF THE ANTICONVULSANT EFFECT OF MEMANTINE IN RATS INTOXICATED WITH A MODEL ORGANIC PHOSPHATE

M. A. Yudin, S. V. Chepur, V. N. Bykov, A. F. Kurpyakova, S. N. Subbotina, A. S. Nikiforov, and I. M. Ivanov

Scientific Research Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of Russian Federation, ul. Lesoparkovaya 4, St. Petersburg, 194045, Russia

The effect of memantine administration has been studied on the model of mice poisoning with an anticholinesterase compound. It is established that the memantine action is due to its influence on the cholinesterase activity in the brain, blood plasma, and erythrocytes in addition to its NMDA-blocking action. Memantine promotes oxime-induced erythrocyte enzyme reactivation on the model of mice poisoning with anticholinesterase compound (0.8 LD₅₀).

Keywords: memantine; cholinesterase; HI-6; convulsions