

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АДЕНИНА

В. В. Яснецов¹, А. А. Озеров², В. Г. Мотин¹, Вик. В. Яснецов¹,
С. К. Карсанова¹, Ю. В. Иванов¹, Н. А. Чельная¹

На модели ишемического инсульта у крыс показано, что новое соединение 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденин (9-ИФЭ-аденин) в дозе 10 мг/кг/сут оказывает нейропротекторное действие, превосходя препарат сравнения мексидол в аналогичной дозе в 1,2 раза ($p < 0,05$) в отношении уменьшения неврологического дефицита, а также не уступает ему в дозе 25 мг/кг/сут по влиянию на данный показатель и летальность. В экспериментах на переживающих срезах гиппокампа крыс установлено, что 9-ИФЭ-аденин (в концентрации 5 мМ) угнетает ортодромные популяционные ответы на $42 \pm 4\%$ в поле CA1. Специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 в отличие от D-AP5 (конкурентный антагонист NMDA-рецепторов) и CNQX (специфический блокатор глутаматных AMPA-рецепторов) усиливает угнетающий эффект соединения более чем в 2 раза. Это свидетельствует о способности 9-ИФЭ-аденина модулировать ионный канал NMDA-рецепторного комплекса.

Ключевые слова: новое производное аденина; нейропротекторное действие; гиппокамп; NMDA-рецепторный комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее установлено, что новое соединение 9-[2-(4-изопропил-фенокси)этил]аденин (9-ИФЭ-аденин), синтезированное и изученное в ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, обладает противовирусной и психотропной активностью (в том числе антидепрессивной и улучшает когнитивные функции), а также по токсичности относится к классу малотоксичных веществ [2 – 4].

В связи с этим целью настоящей работы явилось дальнейшее исследование других фармакологических свойств 9-ИФЭ-аденина, в первую очередь нейропротекторных, на модели ишемического инсульта у крыс. При этом в качестве препарата сравнения был выбран мексидол, широко используемый сегодня в неврологии при лечении ишемического инсульта [1, 6]. Также проводили электрофизиологические исследования на переживающих срезах гиппокампа, играющего важную роль в процессах обучения, памяти и др. [7, 9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ишемию головного мозга (модель ишемического инсульта) у 116 белых нелинейных крыс-самцов мас-

сой 220 – 270 г (питомник “Столбовая” РАМН, Московская область) воспроизводили путем одномоментной перевязки (под общей анестезией диэтиловым эфиром) обеих общих сонных артерий. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”. Исследования выполнены с соблюдением национальных и международных требований по содержанию и гуманному обращению с животными. У ложнопериорированных животных ($n = 10$) операция была ограничена этапом доступа к общим сонным артериям. В контрольной группе ($n = 31$) крысы получали только изотонический раствор натрия хлорида (NaCl; с добавлением твина-80). В подопытных группах ($n = 31$, $n = 25$ и $n = 29$ соответственно) животным вводили внутривентриально 9-ИФЭ-аденин (с добавлением твина-80) и препарат сравнения мексидол (в виде субстанции-порошка действующего вещества в изотоническом растворе NaCl; в двух дозах) 1 раз в сутки в течение 7 сут; в первые сутки — дважды в половинной суточной дозе через 1 и 3 ч после операции. Животных после операции наблюдали в течение 2 недель с учетом выживаемости крыс. Неврологический дефицит у животных определяли (слепым методом) по шкале McGraw, et al. [8] (в баллах) каждый час в течение первых 24 ч, а затем 1 раз в сутки. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов. У

¹ ФГБУН Государственный научный центр РФ — Институт микробиологии проблем Российской академии наук, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А.

² ГБОУ ВПО “Волгоградский государственный медицинский университет” Минздрава России, 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1.

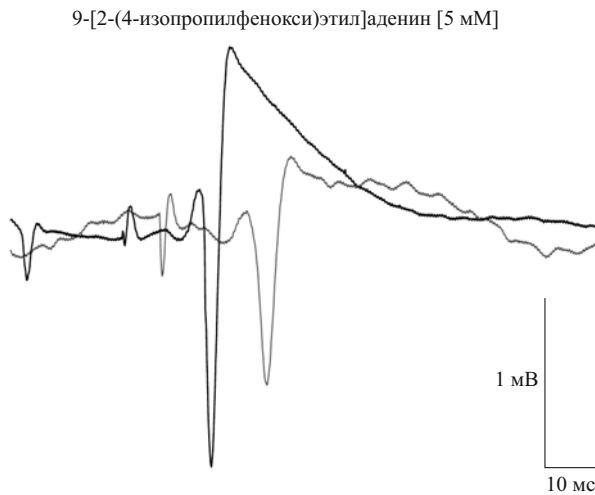


Рис. 1. Влияние 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденина в концентрации 5 мМ на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс.

Калибровка (здесь и на рис. 2–4): по оси абсцисс — время, 10 мс; по оси ординат — амплитуда, 1 мВ.

ложнооперированных животных неврологический дефицит отсутствовал.

Электрофизиологические эксперименты проведены на переживающих срезах гиппокампа белых нелинейных крыс-самцов массой 200–220 г (43 животных). Приготовление и инкубирование срезов проводили так, как описано нами ранее [5]. Состав перфузионной среды (мМ): NaCl — 126, KCl — 3, NaH₂PO₄ — 1,25, MgSO₄ — 1,2, CaCl₂ — 2, NaHCO₃ — 26, глюкоза — 10. Раствор насыщали газовой смесью 95 % O₂ и 5 % CO₂ (рН 7,4 при температуре 35 ± 0,5 °С). Скорость протока составляла 2 мл/мин. Период адаптации среза к указанной солевой среде продолжался не менее 1 ч, после чего приступали к регистрации исходных показателей.

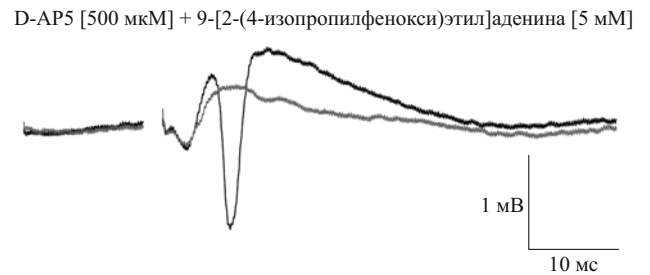


Рис. 2. Влияние 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденина в концентрации 5 мМ на фоне D-AP5 [500 мкМ] на популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс.

Более подробно методика описана нами ранее [5]. В качестве анализаторных веществ использовали конкурентный антагонист NMDA-рецепторов D-AP5, специфический блокатор глутаматных AMPA-рецепторов CNQX, специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 (Sigma-Aldrich, США). Исследовали влияние соединения (с добавлением твина-80) на фоне действия анализаторных веществ на нейроны поля СА1.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программ BioStat 2009 Professional и OriginPro 8 SRO. Когда для выборок вычисляли среднее арифметическое (M) и среднюю квадратическую ошибку (m), тогда данные представлены в виде $M \pm m$. Для оценки значимости различий двух выборок применяли параметрический (t -критерий Стьюдента) и непараметрический (точный метод Фишера) критерии (различия считали значимыми при $p < 0,05$).

Изменение неврологического дефицита (в баллах, $M \pm m$) у крыс после двусторонней перевязки общих сонных артерий под влиянием 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденина и препарата сравнения мексидола

Вещество (доза, мг/кг/сут)	Срок после операции									
	12 ч	24 ч	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	6 сут	7 сут	10 сут	14 сут
Изотонический раствор NaCl (контроль) /n = 18, погибло 13 из 31/	8,5 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,9 ± 0,1	8,9 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,5 ± 0,1
9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденин (10) /n = 26, погибло 5 из 31/	5,3 ± 0,1*#	5,9 ± 0,1*#	6,3 ± 0,1*#	6,3 ± 0,1*#	6,2 ± 0,1*#	6,1 ± 0,1*#	5,9 ± 0,1*#	5,9 ± 0,1*#	5,7 ± 0,1*#	5,6 ± 0,1*#
Мексидол (10) /n = 17, погибло 8 из 25/	6,4 ± 0,1*	7,1 ± 0,1*	7,4 ± 0,1*	7,4 ± 0,1*	7,3 ± 0,1*	7,3 ± 0,1*	7,0 ± 0,1*	7,0 ± 0,1*	6,9 ± 0,1*	6,7 ± 0,1*
Мексидол (25) /n = 24, погибло 5 из 29/	5,4 ± 0,1*	6,0 ± 0,1*	6,5 ± 0,1*	6,5 ± 0,1*	6,4 ± 0,1*	6,3 ± 0,1*	6,1 ± 0,1*	6,1 ± 0,1*	5,9 ± 0,1*	5,8 ± 0,1*

* $p < 0,05$ — значимость различий по сравнению с контролем;

$p < 0,05$ — значимость различий группы 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденина по сравнению с группой мексидола в дозе 10 мг/кг/сут (критерий Стьюдента).

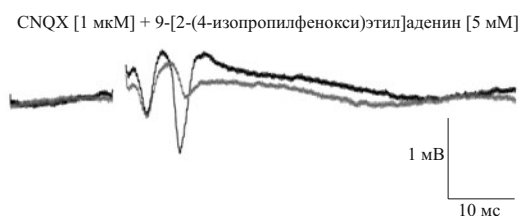


Рис. 3. Влияние 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденина в концентрации 5 мМ на фоне CNQX [1 мкМ] на популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования нейропротекторного действия 9-ИФЭ-аденина и препарата сравнения мексидола на модели ишемического инсульта представлены в таблице.

Видно, что у крыс контрольной группы неврологический дефицит был наиболее выражен ($8,9 \pm 0,1$ балла) через 2 и 3 сут после двусторонней перевязки общих сонных артерий; при этом в контроле погибло 42 % (13 крыс из 31) животных.

9-ИФЭ-аденин в дозе 10 мг/кг/сут значимо ($p < 0,05$) уменьшал летальность крыс до 16 %, а также неврологический дефицит в 1,4 – 1,6 раза в разные сроки наблюдения.

Мексидол уменьшал летальность крыс в дозе 10 мг/кг/сут до 32 % ($p > 0,05$), а в дозе 25 мг/кг/сут — до 17 % ($p < 0,05$). Сходные достоверные изменения происходили под влиянием мексидола (10 и 25 мг/кг/сут) и с неврологическим дефицитом, который уменьшался в 1,2 – 1,3 и 1,4 – 1,6 раза соответственно.

По выраженности действия в отношении уменьшения неврологического дефицита 9-ИФЭ-аденин значимо ($p < 0,05$) превосходил мексидол в дозе 10 мг/кг/сут в 1,2 раза, а также не уступал ему в дозе 25 мг/кг/сут по влиянию на данный показатель и летальность.

Таким образом, 9-ИФЭ-аденин (10 мг/кг/сут) оказывает нейропротекторное действие, превосходя препарат сравнения мексидол в аналогичной дозе в отношении уменьшения неврологического дефицита, а также не уступает ему в дозе 25 мг/кг/сут по влиянию на данный показатель и летальность.

Перфузия переживающих срезов гиппокампа крыс растворами, содержащими от 1 мкМ до 2 мМ 9-ИФЭ-аденина ($n = 10$), существенно не изменяла популяционные ответы – латентный период, амплитуда и их форма существенно не изменялись. Соединение в концентрации 5 мМ значимо ($p < 0,05$) угнетало ортодромные популяционные ответы на 42 ± 4 % ($n = 8$) (рис. 1). Следовательно, оно способно угнетать синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа крыс.

Показано, что конкурентный антагонист NMDA-рецепторов D-AP5 в концентрации 500 мкМ ($n = 6$) су-

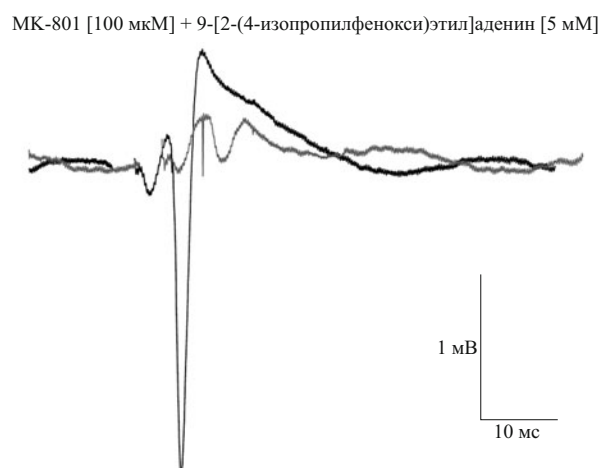


Рис. 4. Влияние 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденина в концентрации 5 мМ на фоне МК-801 [100 мкМ] на популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс.

щественно не влиял на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс. На фоне действия D-AP5 9-ИФЭ-аденин в концентрации 5 мМ значимо ($p < 0,05$) угнетал ортодромные популяционные ответы на 51 ± 6 % ($n = 8$) (рис. 2). Следовательно, D-AP5 существенно не влияет на эффект 9-ИФЭ-аденина.

Специфический блокатор глутаматных AMPA-рецепторов CNQX в концентрации 1 мкМ существенно не изменял ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс. На фоне действия CNQX 9-ИФЭ-аденин в концентрации 5 мМ значимо ($p < 0,05$) угнетал ортодромные популяционные ответы на 46 ± 5 % ($n = 8$) (рис. 3). Следовательно, CNQX практически не влияет на эффект 9-ИФЭ-аденина.

Специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 в концентрации 100 мкМ ($n = 7$) существенно не влиял на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс. Однако на фоне действия МК-801 9-ИФЭ-аденин в концентрации 5 мМ значимо ($p < 0,05$) угнетал ортодромные популяционные ответы на 87 ± 7 % ($n = 8$) (рис. 4). Следовательно, на фоне действия МК-801 эффект 9-ИФЭ-аденина значимо усиливается в 2,1 раза.

Таким образом, в экспериментах на переживающих срезах гиппокампа крыс установлено, что 9-ИФЭ-аденин в концентрации 5 мМ способен влиять на синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа. При этом в реализацию данного эффекта не вовлечены ни NMDA-, ни AMPA-рецепторы. Вместе с тем блокада ионного канала NMDA-рецепторного комплекса МК-801 значимо усиливает эффект 9-ИФЭ-аденина более чем в 2 раза, что свидетельствует о способности модулировать ионный канал NMDA-рецепторного

комплекса. Следовательно, это играет ведущую роль в механизме действия 9-ИФЭ-аденина.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы [2]. Ранее авторы показали, что при совместном однократном введении 9-ИФЭ-аденина с другим антагонистом NMDA-рецепторного комплекса — кетамином — увеличивается содержание норадреналина, дофамина, дигидрооксифенилуксусной кислоты, серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты в стриатуме, норадреналина и серотонина в прилежащем ядре. На основании этого авторы предположили наличие модулирующего влияния 9-ИФЭ-аденина на ионный канал NMDA-рецепторного комплекса.

ВЫВОДЫ

1. На модели ишемического инсульта у крыс соединение 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденин (10 мг/кг/сут) оказывает нейропротекторное действие, превосходя препарат сравнения мексидол в аналогичной дозе в отношении уменьшения неврологического дефицита, а также не уступает ему в дозе 25 мг/кг/сут по влиянию на данный показатель и летальность.

2. На переживающих срезах гиппокампа крыс соединение 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденин (в

концентрации 5 мМ) угнетает ортодромные популяционные ответы на $42 \pm 4\%$ в поле CA1. Специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 в отличие от D-AP5 (конкурентный антагонист NMDA-рецепторов) и CNQX (специфический блокатор глутаматных AMPA-рецепторов) усиливает эффект соединения более чем в 2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, Ж. неврол. и психиатрии им. С. С. Корсакова, **12**, 86 – 90 (2012).
2. Д. Г. Ковалев, И. А. Зимин, Л. А. Смирнова, А. Ф. Рябуха, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(12), 13 – 16 (2010).
3. Д. Г. Ковалев, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(3), 3 – 5 (2011).
4. Д. Г. Ковалев, Н. А. Моххамад Амин, *Биомедицина*, **1**, 139 – 142 (2012).
5. В. Г. Мотин, В. В. Яснецов, С. М. Ковалев, И. Н. Крылова, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **130**(9), 252 – 254 (2000).
6. З. А. Суслина, М. А. Пирадов (ред.), *Инсульт: диагностика, лечение, профилактика*, Медпресс-информ, Москва (2008).
7. A. Jeneson, C. B. Kirwan, R. O. Hopkins, et al., *Learn. Mem.*, **17**(1), 852 – 859 (2010).
8. C. P. McGraw, A. G. Pashayan, O. T. Wendel, *Stroke*, **7**(5), 485 – 488 (1976).
9. W. R. Markesbery, *J. Alzheimers Dis.*, **19**(1), 221 – 228 (2010).

Поступила 13.09.14

STUDY OF SOME PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF A NEW ADENINE DERIVATIVE

V. V. Yasnetsov¹, A. A. Ozerov², V. G. Motin¹, Vic. V. Yasnetsov¹, S. K. Karsanova¹, Yu. V. Ivanov¹, and N. A. Chel'naya¹

¹ State Scientific Center "Institute of Biomedical Problems," Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 46a, Moscow, 123007 Russia;

² Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

It is established that the new compound, 9-[2-(4-isopropylphenoxy)ethyl]adenine (9-IPE-adenine) in a dose of 10 mg/kg per day produces neuroprotective effect in rats with brain ischemia model. 9-IPE-adenine decreased the neurologic deficiency 1.2 times more effectively ($p < 0.05$) than the reference drug mexidol in analogous dose, and had equal effect with this drug at 25 mg/kg per day on the neurologic deficiency and survival of animals. Electrophysiological studies in hippocampal slices in rats showed that 9-IPE-adenine depressed orthodromic population spikes in CA1 area by $42 \pm 4\%$. Non-competitive antagonist of NMDA receptor complex МК-801, in contrast to D-AP5 (competitive NMDA receptor antagonist) and CNQX (competitive AMPA receptor antagonist), enhanced the depressive effect of the new drug more than two times. These results are indicative of the ability of 9-IPE-adenine to modulate the ion channel of NMDA receptor complex.

Keywords: new adenine derivative; neuroprotective effect; hippocampus; NMDA receptor complex