

## ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ВПЛИВУ ПОХІДНИХ АДАМАНТАНУ СПОЛУК ЮК-1 ТА ЮК-4 НА АКТИВНІСТЬ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ

О.А.Ходаківський

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова

*Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу; глутаматна ексайтотоксичність; NMDA-рецептори; похідні адамантану*

*При дослідженні фармакологічних характеристик аспартат-активованих струмів та модуляції їх похідними адамантану (сполуками ЮК-1 та ЮК-4) на окремих пірамідних нейронах гіпокампу 14-15-денних білих щурів лінії Вістар WAG\GSto встановлено, що сполука ЮК-4 (50 мкМ) є низькоафінним неконкурентним антагоністом NMDA-рецепторів, а сполука ЮК-1 (50 мкМ) проявляє властивості активатора NMDA-рецепторно-іонофорного комплексу пірамідних нейронів гіпокампу із дуже швидкою блокадою/деблокадою NMDA-рецепторів. Ця властивість є провідним механізмом церебропротекторної дії обох похідних адамантану в умовах гострої церебральної ішемії. Причому сполука ЮК-1 на відміну від ЮК-4 за рахунок селективного зниження надлишкової активації NMDA-рецепторів може забезпечувати нормальне функціонування нейронів зони пенумбри при ішемії головного мозку внаслідок зростання середньої тривалості імпульсів повторних переходів активованого NMDA-каналу в блоковану форму і назад.*

Заданими літератури [1, 9, 13] в умовах гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) в нейронах порушується високоселективна система транспорту глутамату та аспартату з синаптичної щілини до астроглії за рахунок дисфункції каналів активного іонного транспорту та астроцитозу, порушується система шляхів перетворення медіаторів [4, 5]. Це призводить до того, що абсолютна концентрація та час перебування глутамату та аспартату в синаптичній щілині перевершує допустимі параметри і процес деполяризації мембрани нейронів набуває незворотного характеру. Результатом цього є надмірне збудження глутаматних рецепторів [11].

За останнє десятиріччя з'явилися нові дані, які свідчать про провідну роль глутаматергічних синапсів мозку в процесах нейродегенерації, навчання і пам'яті [10, 12, 14]. Так, фенциклідин і

дизоцилпін — високоафінні неконкурентні блокатори NMDA підтипу глутаматних рецепторів (NMDA-Rs), які протидіють ішемічним пошкодженням мозку, однак мають високий нарकोгенний потенціал і викликають нейродегенеративні зміни в ЦНС. Ведеться інтенсивний пошук високо-ефективних та безпечних блокаторів NMDA-рецепторів [1, 11, 12]. При цьому слід враховувати, що повна інактивація вказаних рецепторів *in vivo* призводить до поширеного апоптозу в ЦНС, що посилює нейродегенеративні процеси та блокує здатність клітин до виживання в умовах ішемії. Зниження активності NMDA-рецепторів попереджає розвиток некрозу нервових клітин та пов'язану з апоптозом ексайтотоксичність. Враховуючи, що фізіологічна активність NMDA-рецепторів необхідна для нормального функціонування нервової тканини, клінічний успіх може бути

досягнутий лише за умов використання антагоністів NMDA-рецепторів, які селективно знижують їх надлишкову активацію. Подібні властивості певним чином притаманні декстрометорфану та мемантину (похідне адамантану), оскільки в дозах, що протидіють ексайтотоксичним пошкодженням мозку, ці речовини, які мають властивості "швидких" блокаторів іонних каналів NMDA-Rs, нарकोгенної активності не виявляють. Однак при системному введенні в ефективних дозах (5-20 мг/кг) мемантин та інші блокатори NMDA-Rs можуть викликати гіперкінез, гіперлокомоцію, атаксію та інші ускладнення, які є наслідком невеликої різниці між терапевтичними і токсичними дозами [10, 12]. Серед адамантиловмісних бісамонієвих сполук знайдені речовини з виразною протиішемічною та антигіпоксичною дією, що мають властивості "дуже швидких" неконкурентних блокаторів NMDA і AMPA підтипу глутаматних рецепторів (NMDA/AMPA-Rs) [1, 2, 3]. Наведені дані свідчать про

Таблиця

**Вплив сполук ЮК-1 та ЮК-4 на активовані струми NMDA-рецепторів  
ізолюваних клітин гіпокампу щурів**

Сполука	Концентрація, мкМ	Ефект	Клітини					I/I <sub>0</sub> ±Se (%)
			1	2	3	4	5	
ЮК-1	50,0	потенціювання (%)	126	147	143	142	140	139,6±3,58
ЮК-4	50,0	пригнічення (%)	44	32	34	51	41	40,4±7,70

перспективу пошуку серед нових похідних адамантану сполук із церебропротекторною дією, які б володіли властивостями швидких блокторів/деблокаторів NMDA-рецепторів. У цьому аспекті нашу увагу привернули два похідних адамантану (сполуки ЮК-1 та ЮК-4), синтезовані під керівництвом акад. НАН України, проф. М.О.Лозинського. За нашими попередніми дослідженнями обидві речовини володіють виразною церебропротекторною дією в умовах ГПМК, що й стало підставою для вивчення їх впливу на NMDA рецептори.

#### Матеріали та методи

В експериментах використовувалися білі щури лінії Вістар WAG\GSto віком 14-15 днів. Для дослідження фармакологічних характеристик аспартат-активованих струмів та модуляції їх досліджуваними сполуками використовувалися такі методичні підходи:

а) приготування зрізів гіпокампу щурів;

б) виділення окремих клітин із зрізів гіпокампу з використанням методу вібродисоціації нервових клітин [15];

в) метод “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” для реєстрації аспартат-активованого струму [8];

г) реєстрація збуджувальних постсинаптичних потенціалів (ЗПСП) із ділянки *stratum radiatum* CA1 зони гіпокампу із використанням біполярної стимуляції колатералей Шафера [13].

Для отримання окремих пірамідних нейронів гіпокампу, придатних для дослідження методом фіксації потенціалу, використовувався метод м'якої ферментативної обробки зрізів гіпокампу. Після

декапітації тварини гіпокампу переносили у штучний спинномозковий розчин (А) наступного складу (у мМ): 150 NaCl; 5 KCl; 0,9 CaCl<sub>2</sub>; 1,1 MgCl<sub>2</sub>; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 10 глюкоза; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH=7,4; далі у цьому розчині гіпокампу нарізали на зрізи 200-400 мкм, які витримували протягом 30 хв при кімнатній температурі (24°C) у розчині (В) наступного складу (у мМ): 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 глюкоза, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4. Розчин постійно насичувався газовою сумішшю (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), pH 7,4. Для ферментативної обробки використовували протеазу (в розчині А) (Sigma, P-5147, *Aspergillus oryzae*) у концентрації 0,4 мг/мл (при t=32°C, 10 хвилин). Для виділення окремих ізолюваних нервових клітин із зрізів гіпокампу застосовувалась модифікована методика вібродисоціації клітин із тканини.

Реєстрація іонних струмів через мембрану нейронів проводилася методом внутрішньоклітинної перфузії із використанням скляних мікропіпеток, які мали опір 2-5 МОм. Для отримання NMDA-активованого струму використовували метод швидкої заміни (30 мсек) нормального фізіологічного розчину на розчин, який містив агоніст. Для збудження NMDA-активованого струму в якості агоніста застосовували аспартат у насичувальній концентрації 300 мкМ з додаванням 10 мкМ гліцину. Час між отриманими відповідями складав 1-2 хв, що було достатньо для виходу рецепторів із стану десенситизації. Вінборон (10 мкМ) прикладали на 1-2 хв, що було достатньо для отримання ефекту насичення.

Всі реактиви, які використовувалися в роботі, були вироб-

ництва фірми “Sigma Chemical Co.” (St. Louis, США)

#### Результати та їх обговорення

Обидві сполуки чинять неоднороззначну дію на активність NMDA-рецепторів. Вивчення впливу сполуки ЮК-4 (50 мкМ) на активовані струми NMDA-рецепторно-іонофорного комплексу ізолюваних клітин пірамідних нейронів гіпокампу показало її спроможність блокувати іонний струм через NMDA-рецептор в середньому на 36,0±11,0% (межі коливань складала 32-52%). На тлі сполуки ЮК-1 (50 мкМ) виявлено потенціювання активованих струмів у вказаних рецепторах — відсоток потенціювання сполукою ЮК-1 активності NMDA-рецепторів ізолюваних клітин гіпокампу сягав у середньому 139,6±3,58%, межі коливань складала 126-140% (див. табл. та рис.). У результаті повторюваних переходів активованого NMDA каналу в блоковану форму і назад середня тривалість пачок імпульсів, а отже й кількість перенесених каналом зарядів зростає. Це дозволяє розглядати сполуку ЮК-1 швидше як потенціатор, ніж блоктор NMDA-рецепторно-каналних ансамблів.

Таким чином, сполука ЮК-4 є типовим низькоафінним неконкурентним антагоністом NMDA-рецептора. На відміну від цього сполуку ЮК-1 можна віднести до активаторів NMDA-рецепторно-іонофорного комплексу пірамідних нейронів гіпокампу із дуже швидкою блокадою/деблокадою NMDA-рецепторів.

Аналізуючи наведені результати, можна зробити припущення, що досліджувані похідні адамантану, особливо сполука ЮК-1,

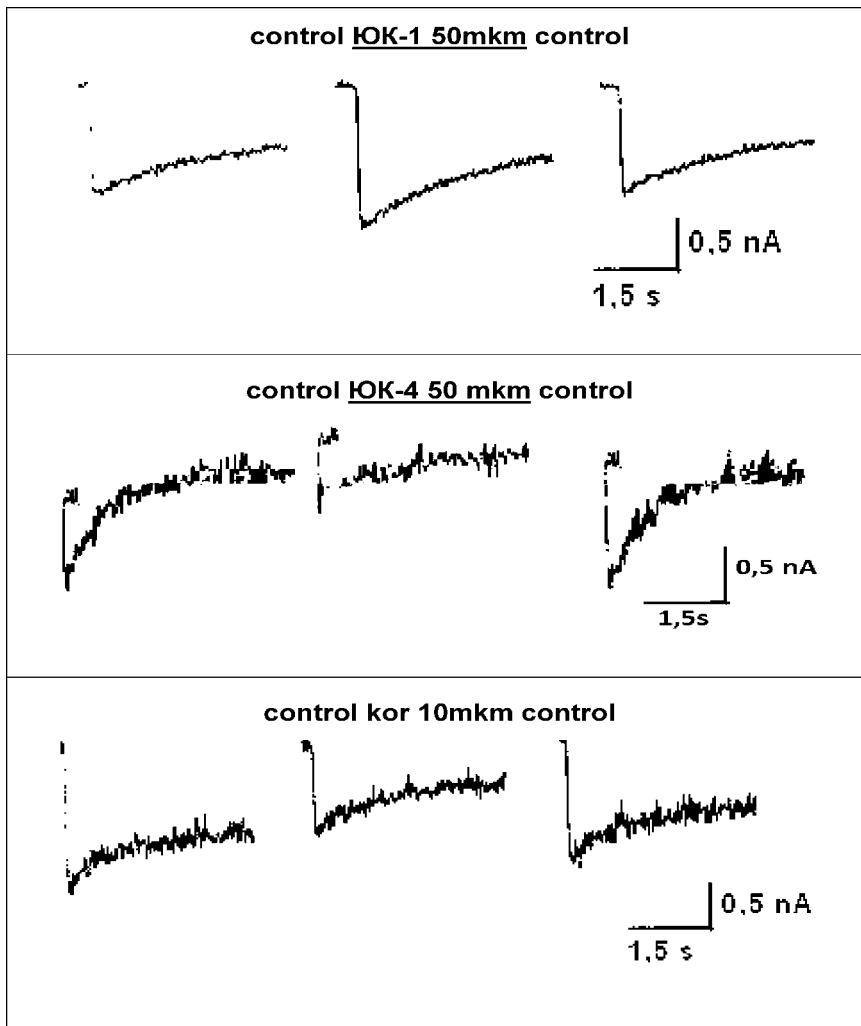


Рис. NMDA-відповіді в контролі, під дією ЮК-1, ЮК-4 та при відмиванні

в умовах патологічної активації глутаматних рецепторів можуть виявляти церебропротекторні ефекти, що робить перспективним їх використання для профілактики і лікування ішемічних уражень головного мозку. Експериментальна перевірка цих припущень довела ефективність обох сполук в умовах гострої церебральної ішемії [6, 7]. Головним підтвердженням їх ефективності в цих умовах стало зменшення летальності тварин з ГПМК (модель однієї неозворотної оклюзії загальної сон-

ної артерії). Так, на 4-ту добу спостереження на тлі курсової терапії піщанок (гербел) з ішемічним інсультом сполукою ЮК-1 (2 мг/кг в/о) та ЮК-4 (5 мг/кг в/о) показник летальності становив 50% та 60%. У групі контрольних тварин (ГПМК + 0,9% NaCl) та тих гербел, які отримували мексидол (100 мг/кг в/о), смертність досягла 80 та 60% відповідно. Впродовж перших 72 год ГПМК лікувальне введення ЮК-1 за своєю ефективністю вірогідно переважало терапію монгольсь-

ких піщанок з ГПМК пірацетамом (400 мг/кг в/о). Поряд із цим лікувальне курсове введення тваринам з ГПМК сполуки ЮК-1 та ЮК-4 супроводжувалось менш інтенсивним зростанням активності нейрон-специфічної енолази (раннього маркера пошкодження нервової тканини): через чотири доби активність ферменту зменшилась відносно контрольної групи у 2,2 та 1,8 рази відповідно ( $p \leq 0,05$ ). Подібні зміни супроводжувались гальмуванням процесів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, активацією системи антиоксидантного захисту головного мозку. Причому за своєю ефективністю сполука ЮК-1 за всіма перерахованими показниками перевершувала сполуку ЮК-4. На нашу думку, це певним чином може бути пов'язано з їх різним впливом на NMDA-рецептори. Так, швидка блокада/деблокада NMDA-рецепторів забезпечує нормальне функціонування неушкодженої нервової тканини та нейронів зони пенумбри, селективно знижуючи надлишкову активацію NMDA-рецепторів.

#### ВИСНОВКИ

1. Сполука ЮК-1 є активатором NMDA-рецепторно-іонофорного комплексу пірамідних нейронів гіпокампу з дуже швидкою блокадою/деблокадою, а ЮК-4 виявляє властивості неконкурентного антагоніста NMDA-рецепторів.

2. Спроможність сполуки ЮК-1 виявляти властивості низькоафінного блокатора/деблокатора NMDA-рецепторів є одним із механізмів її церебропротекторної дії в умовах гострої ішемії головного мозку.

3. Обидва похідних адамантану становлять інтерес для подальшого поглибленого вивчення їх церебропротекторних властивостей.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Гмиро В.Е., Сердюк С.Е. // *Експерим. и клин. фармакол.* — 2002. — Т. 63, №1. — С. 7-13.
2. Гмиро В.Е., Журавский А.В., Комиссаров И.В. // *Експерим. и клин. фармакол.* — 2002. — Т. 65, №1. — С. 11-14.
3. Журавский А.В. // *Архив клин. и эксперим. медицины.* — 2005. — Т. 14, №1. — С. 13-16.

4. Комиссаров И.В., Журавский А.В., Гмиро В.Е. //Журн. АМН України. — 2003. — Т. 9, №2. — С. 238-249.
5. Мошарова И.В. //Нейрохимия. — 2002. — Т. 18, №1. — С. 3-18.
6. Пат. 51684 Україна, МПК С 07 D 295 / 084. Застосування 1-(адаманти-1-алкокси)-3-діалкіламіно-2-пропанолів як засобів, які мають церебропротекторну активність / Ю.В.Короткий, Г.І.Степанюк, О.А.Ходаківський та ін. Заявник та патентовласник Інститут органічної хімії НАН України. — № и 201001439. Заявл.: 12.02.2010. Опубл.: 26.07.2010. — Бюл. №14. — 6 с.
7. Ходаківський О.А. //Вісник морфол. — 2010. — №4 (16). — С. 787-790.
8. Шкриль В.М., Лук'янець О.О. //Нейрофизиол. — 1998. — Т. 30, №4/5. — С. 279-283.
9. Allan S.M., Parker L.C., Collins B. //Proc. Natl. Sci. USA. — 2001. — Vol. 97. — P. 5580-5585.
10. Arlander M., Misane I., Schott P.A. //Neuropsychopharmacol. — 2007. — №21. — P. 414-426.
11. Cho Y., Ueda I., Mori A. //Jap. J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. — 2010. — Vol. 51, №10. — P. 500-505.
12. Jenner P. //Path. Biol. — 2009. — №44. — P. 57-64.
13. Lukyanetz E.A., Shkryl V.M., Konovalov A.A. //Physiol. Res. (Prague). — 1999. — Vol. 48. — P. S 92.
14. Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. //Prog. Neurobiol. — 2010. — Vol. 54. — P. 581-618.
15. Vorobyov V.S., Sharonova I.N., Haas H.L. //J. Neurosci. Methods. — 1996. — Vol. 68. — P. 303-307.

Адреса для листування: 21014, м. Вінниця,  
вул. Пирогова, 56. Тел. (98) 791-05-33.  
Вінницький національний медичний університет  
ім. М.І. Пирогова

Надійшла до редакції 25.06.2011 р.