

# КАЛЬЦИЕВАЯ СОЛЬ N-(5-ГИДРОКСИ-НИКОТИНОИЛ)-L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ОСЛАБЛЯЕТ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ПАРКИНСОНИЧЕСКИЙ СИНДРОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ГРЫЗУНАХ

©А.В. КИСЕЛЕВ<sup>1</sup>, А.С. ВЕДЕНКИН<sup>1</sup>, И.С. СТОВБУН<sup>3</sup>, В.И. СЕРГИЕНКО<sup>2</sup>, Т.С. КАЛИНИНА<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, РФ;

<sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва;

<sup>3</sup>ФБГНУ НИИ фармакологии им. В.В.Закусова, Москва, РФ

Адрес для корреспонденции: alexey\_k@panavir.ru. Киселев А.В.

**Изучены антидепрессантные и антипаркинсонические свойства кальциевой соли N-(5-гидрокси-никотиноил)-L-глутаминовой кислоты (ампасе) на грызунах. Установлено, что ампасе в дозе 30 мг/кг проявляет антидепрессантную активность в тесте вынужденного плавания на мышах, а в дозе 0.1 мг/кг — максимально ослабляет симптомы паркинсонического синдрома, индуцируемого системным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6- тетрагидропиридина у мышей C57BL/6, и индуцированную галоперидолом катаlepsию у крыс.**

*Ключевые слова:* нейродегенерация, антидепрессант, паркинсонический синдром, глиоцит, грызуны

Немоторные симптомы, в частности депрессия, в 30-58% предшествуют двигательным нарушениям у пациентов с болезнью Паркинсона [9]. Расстройства настроения влияют на многие другие клинические аспекты заболевания, усугубляя функциональную инвалидность, что определяет актуальность разработки эффективных и безопасных лекарственных средств для этих пациентов [11].

Депрессию и болезнь Паркинсона относят к нейродегенеративным заболеваниям, которым сопутствуют нарушения нейропластичности [7,8,10]. Экспериментальные данные указывают на роль глиальных клеток в процессах синаптической пластичности. Современные модели динамического взаимодействия глиоцитов с нейронами объясняют значение нейроглиальных взаимодействий для реализации нормальной синаптической функции и обосновывают роль глиальных клеток в патогенезе депрессий и паркинсонического синдрома [6,12-14].

Возбуждающий нейромедиатор ЦНС глутамат вовлечен в регуляцию нейропластичности, взаимодействие между нейронами и глиальными клетками и патогенез депрессивных расстройств [14]. Ранее для разработки лекарственного средства, сочетающего свойства стимулятора когнитивных процессов с нейропротективным действием, была синтезирована кальциевая соль N-(5-гидрокси-никотиноил)-L-глутаминовой кислоты (соединение ампасе, АМП) [3]. В эксперименте АМП (5-20 мг/кг) обнаруживает антиамнестические свойства в моделях амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванной максимальным электрошоком или скополамином у крыс, оказывает положительный эффект на выживаемость, способность к обучению и неврологические функции после экспериментальной интрацеребральной гематомы у крыс, оказывает влияние на реакцию пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа при ортодромной стимуляции у грызунов [2,5]. Данные о способности АМП нормализовать состав глиальных клеток в III и V слое сенсомоторной коры головного мозга крыс при моделировании нейродегенерации [1] позволили предположить наличие потенциальных антидепрессантных и антипаркинсонических свойств.

Целью данного исследования являлось изучение антидепрессантных и антипаркинсонических свойств АМП в эксперименте на грызунах.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование антидепрессантных свойств проводили на аутбредных мышах-самцах (n=50) массой 20-22 г. Антипаркинсонические эффекты изучали на мышах-самцах инбредной линии C57BL/6 (n=60) массой 24-26 г, самцах аутбредных белых крыс (n=50) массой 250-280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму. Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики, утверждённой приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.

Изучали фармакологические свойства АМП (0.1, 1, 10, 20, 30 мг/кг) (субстанция ООО "БИОН"). При исследовании антидепрессантных свойств в качестве препарата сравнения применяли трициклический антидепрессант amitriptилин (10 мг/кг). Пронейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП, 30 мг/кг) использовали для моделирования симптоматической триады паркинсонического синдрома, галоперидол (1 мг/кг) — для моделирования катаlepsии, ареколина гидробромид (25 мг/кг) — для получения тремора, имеющего холинергическую природу. Амантидин сульфат (АмС) (20 мг/кг, "ПК-Мерц"; раствор для инфузий) применяли в качестве препарата сравнения при анализе антипаркинсонических эффектов АМП. Животные контрольных групп получали эквивалентный объем (0.1 мл на 10 г массы тела животного) 0.9% раствора NaCl. Вещества вводили однократно внутривнутрибрюшинно в 0.9% растворе NaCl, из расчета 0.1 мл на 10 г массы мыши и 0.2 мл на 100 г массы крысы.

Эксперименты выполнены по стандартным методикам, изложенным в руководстве по доклиническому изучению лекарственных средств [4]. При исследовании антидепрессантных свойств использован тест вынужденного плавания при помещении мышей в сосуд (диаметр 40 см, глубина 60 см) с водой (25°C). Через 40 мин после инъекции физиологического раствора или АМП (10, 20 или 30 мг/кг) регистрировали длительность (с) иммобилизации с 2-й по 6-ю минуту наблюдения.

При моделировании паркинсонического синдрома мыши линии C57BL/6 были разделены на 6 групп по 10 особей в каждой: 1-я (интактный контроль) — введение физиологического раствора дважды с интервалом между инъекциями 40 мин; 2-я (контрольная) — введение физиологического раствора и МФТП; 3-я — АмС и МФТП; 4-я — АМП (0.1 мг/кг) и МФТП; 5-я — АМП (10 мг/кг) и МФТП; 6-я — АМП (30 мг/кг) и МФТП. АМП, АмС или физиологический раствор вводили за 40 мин до введения МФТП. Оценку влияния веществ на тремор и ригидность проводили сразу после введения МФТП, олигокинезию оценивали через 1.5 ч после введения нейротоксина. Тремор оценивали по латентному времени и по продолжительности (мин), ригидность — по изменению длины шага у мышей (см). Олигокинезию определяли по изменению двигательной активности в установке Opto Varimex (Columbus Instruments), вычисляя среднюю величину перемещений за 3 мин.

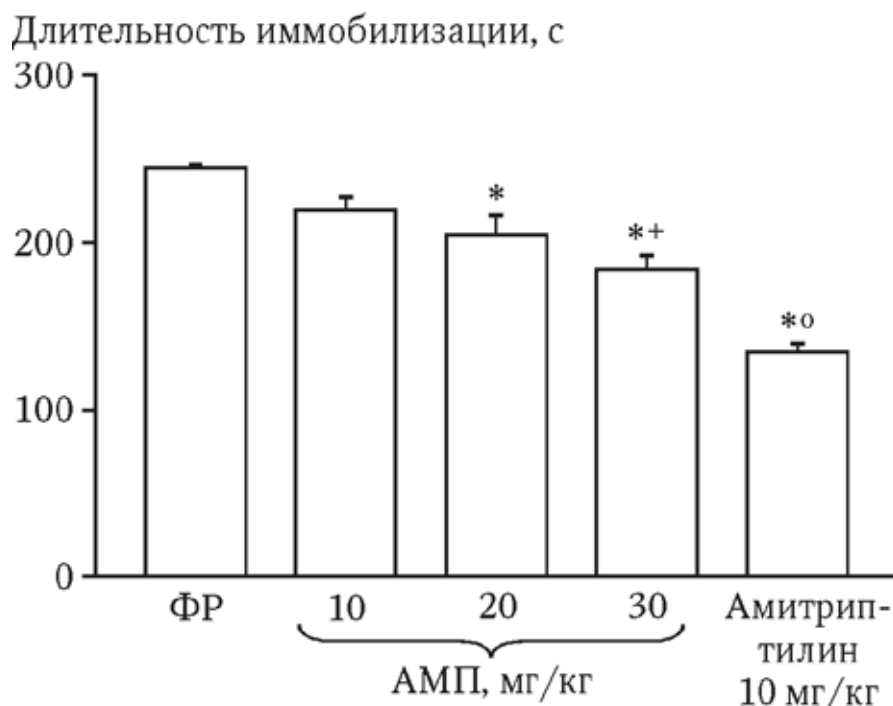
Каталепсию вызывали введением галоперидола крысам за 60 мин до начала наблюдения. АМП (0.1, 10 и 30 мг/кг) или АмС вводили непосредственно перед галоперидолом. Каталепсию оценивали через 60, 120 и 180 мин после введения галоперидола по длительности демонстрации “позы лектора” с опорой на горизонтальную перекладину. При моделировании холинергического тремора АМП (0.1, 10 и 30 мг/кг) или АмС вводили за 40 мин до ареколина. Сразу после введения ареколина в течение 60 мин регистрировали латентный период и длительность эпизодов тремора (мин).

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.). Проверку результатов на нормальность распределения проводили по критерию Шапиро–Уилка, после чего данные представляли в виде средних значений по группе с указанием стандартной ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ). Различия между группами определяли по методу однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими множественными сравнениями по t критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте вынужденного плавания период иммобилизации в группе контрольных мышей составлял  $244.3 \pm 2.4$  с. АМП в дозах 20 и 30 мг/кг оказывало антидепрессантный эффект, уменьшая периоды иммобилизации на 15 и 25% соответственно по сравнению с контрольной группой (рисунок). Амитриптилин уменьшал время иммобилизации мышей на 45% по сравнению с контролем (физиологический раствор). Таким образом, для АМП было характерно дозозависимое антидепрессантное действие, несколько уступающее амитриптилину.

У мышей контрольной группы после введения МФТП тремор головы и тела появлялся через  $1.4 \pm 0.2$  мин и продолжался в течение  $18.3 \pm 4.2$  мин. АМП и АмС не влияли на продолжительность тремора, но увеличивали латентное время его появления. В дозе 0.1 мг/кг АМП увеличивало латентное время наступления тремора на 75%, что было сопоставимо с эффектом препарата сравнения (табл. 1). МФТП вызывал уменьшение длины шага мышей в среднем на 44% по сравнению с интактными животными. АмС и АМП (0.1 и 10 мг/кг) ослабляли ригидность на 18-30% по сравнению с физиологическим раствором (табл. 1). Через 90 мин после введения МФТП у контрольных животных развивалась олигокинезия, что проявлялось в подавлении двигательной активности до 2% по сравнению с группой интактного контроля. АМП (0.1 мг/кг) восстанавливало двигательную активность мышей, получавших МФТП, до 20% от уровня интактного



Эффекты АМП и амитриптилина в тесте вынужденного плавания у мышей. ФР — физиологический раствор.  $p < 0.05$  по сравнению с \*ФР, +АМП 10 мг/кг, °АМП 20 и 30 мг/кг.

контроля и превосходило по этому параметру препарат сравнения и другие изученные дозы АМП (табл. 1).

Ослабление экстрапирамидных нарушений под влиянием АмС и всех изученных доз АМП наблюдали через 60 мин после введения галоперидола. Антагонистический эффект на каталепсию сохранялся через 120 и 180 мин после инъекции галоперидола при использовании АмС и АМП в дозе 0.1 мг/кг (табл. 1). Через 120 мин эффект от больших доз АМП в отношении галоперидоловой ката- лепсии не наблюдался, а через 180 мин АмС пре- восходил по выраженности антикаталептического эффекта АМП во всех изученных дозах (табл. 2). В среднем через  $0.36 \pm 0.15$  мин после инъекции ареколина у мышей наблюдали возникновение тремора, продолжительность которого составила  $14.2 \pm 1.1$  мин. Ни АМП, ни АмС не ослабляли тремор, вызванный ареколином.

Таким образом, соединение АМП в исследуемых дозах проявляет и антидепрессантные, и антипаркинсонические свойства. Однако первые проявляются в большей дозе (30 мг/кг), а последние — в меньшей (0.1 мг/кг). На модели паркинсонического синдрома, вызванного системным введением МФТП, приводящим к дегенерации дофаминергических нейронов и проявлению признаков болезни Паркинсона, соединение АМП в малой дозе 0.1 мг/кг оказывает эффект, который превосходит эффект АмС в дозе 20 мг/кг по параметру олигокинезии и сопоставим с ним в отношении ригидности и тремора.

**Таблица 1.** Влияние АМП на проявления паркинсонического синдрома, обусловленного применением МФТП (30 мг/кг) у мышей линии C57BL/6 ( $M \pm SEM$ )

| Условие опыта                         | Тремор                          | Ригидность                                      | Олигокинезия  |
|---------------------------------------|---------------------------------|---|---|
|                                       | латентное время тремора, мин    | длина шага, см                                  | количество горизонтальных перемещений в группе за 1 мин |
| Интактный контроль                    | —                               | $6.8 \pm 0.2$                                   | $597 \pm 89$  |
| МФТП 30 мг/кг+физиологический раствор | $1.4 \pm 0.2$                   | $3.8 \pm 0.2^*$<br>$t=42.426$                   | $13 \pm 2^*$<br>$t=34.865$                              |
| АмС 20 мг/кг+МФТП                     | $2.1 \pm 0.3^+$<br>$t=6.673$    | $4.9 \pm 0.1^{*+}$<br>$t=15.556,$<br>$t=26.870$ | $40 \pm 3^*$<br>$t=33.253$                              |
| АМП 0.1 мг/кг+МФТП                    | $2.4 \pm 0.2^+$<br>$t=8.839$    | $4.8 \pm 0.2^{*+}$<br>$t=28.284,$<br>$t=14.142$ | $124 \pm 19^{*+o}$<br>$t=28.239,$<br>$t=6.627, t=5.015$ |
| АМП 10 мг/кг+МФТП                     | $1.5 \pm 0.4^{ox}$<br>$t=7.626$ | $4.5 \pm 0.1^{*+}$<br>$t=32.527, t=9.899$       | $57 \pm 11^*$<br>$t=34.598$                             |
| АМП 30 мг/кг+МФТП                     | $1.6 \pm 0.1^{ox}$<br>$t=6.933$ | $4.0 \pm 0.1^*$<br>$t=39.598$                   | $7 \pm 1^*$<br>$t=35.224$                               |

Примечание.  $p < 0.05$  по сравнению с \*интактным контролем, +МФТП, °АмС+МФТП, xАМП (0.1 мг/кг)+МФТП.  $t$  критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони.

**Таблица 2.** Влияние АМП на длительность пребывания в “позе лектора” у крыс ( $M \pm SEM; c$ )

| Условие опыта   | Период наблюдения после введения галоперидола, мин |   |   |
|---|--|---|---|
|   | 60   | 120   | 180   |
| Физиологический раствор+галоперидол<br>АмС 20 мг/кг+галоперидол | $87.9 \pm 10.1$<br>$48.8 \pm 17.7^*$<br>$t=6.004$  | $96.4 \pm 11.3$<br>$75.8 \pm 14.6^*$<br>$t=3.853$ | $120$<br>$83.3 \pm 16.7^*$<br>$t=8.025$     |
| АМП 0.1 мг/кг+галоперидол                                       | $33.0 \pm 4.8^*$<br>$t=8.430$                      | $63.3 \pm 13.3^*$<br>$t=6.191$                    | $100.0 \pm 10.4^{*+}$<br>$t=4.271, t=3.754$ |
| АМП 10 мг/кг+галоперидол  | $44.2 \pm 14.9^*$<br>$t=6.710$                     | $97.5 \pm 12.1$                                   | $105.0 \pm 10.3^{*+}$<br>$t=3.147, t=4.878$ |
| АМП 30 мг/кг+галоперидол  | $45.0 \pm 20.0^*$<br>$t=6.587$                     | $105.0 \pm 7.1$                                   | $119.2 \pm 0.8^{+o}$<br>$t=8.070, t=4.316$  |

Примечание.  $p < 0.05$  по сравнению с \*галоперидолом, +АмС+галоперидол, °АМП 0.1 мг/кг+галоперидол.  $t$  критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflicts of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Макаренко А., Ковтун А., Петров Ф., Васильева И. Сравнительный анализ влияния лекарственных средств "Ампассе", "М2" и "Церебрала" на системную глиальную клеточную реакцию сенсомоторного цереброкортекса белых крыс при моделировании острого геморрагического инсульта // *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2017. Т. 17, № 1. С. 244-248.
2. Мотин В.Г., Киселев А.В., Стовбун И.С., Сергиенко В.И., Калинина Т.С. Кальциевая соль N-(5-гидроксинокотиноил)-L-глутаминовой кислоты изменяет реакцию пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа при ортодромной стимуляции у крыс // *Бюл. экспер. биол.* 2018. Т. 165, № 1. С. 34-37.
3. Патент РФ № 2314293. Одно- и двухвалентные соли N-(5-гидроксинокотиноил)-L-глутаминовой кислоты, обладающие психотропным (антидепрессивным и анксиолитическим), нейропротекторным, геропротекторным и противоинсультным действием / А.А. Литвин, С.В. Стовбун, П.В. Якимук // *Бюл.* № 1. Опубликовано 10.01.2008.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2005.
5. Стовбун С.В., Киселев А.В., Сергиенко В.И. Экспериментальное изучение ноотропных и нейропротективных свойств кальциевой соли N-(5-гидроксинокотиноил)-L-глутаминовой кислоты // *Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки*. 2011. № 2. С. 83-93.
6. Booth H.D.E., Hirst W.D., Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis // *Trends Neurosci.* 2017. Vol. 40, N 6. P. 358-370.
7. Calabresi P., Mercuri N.B., Di Filippo M. Synaptic plasticity, dopamine and Parkinson's disease: one step ahead // *Brain*. 2009. Vol. 132, Pt 2. P. 285-287.
8. Dallé E., Mabandla M.V. Early life stress, depression and Parkinson's disease: a new approach // *Mol. Brain*. 2018. Vol. 11, N 1. ID 18. doi: 10.1186/s13041-018-0356-9
9. Goldman J.G., Postuma R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease // *Curr. Opin. Neurol.* 2014. Vol. 27, N 4. P. 434-441.
10. Liu W., Ge T., Leng Y., Pan Z., Fan J., Yang W., Cui R. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex // *Neural Plast.* 2017. Vol. 2017. ID 6871089. doi:10.1155/2017/6871089
11. Marsh L. Depression and Parkinson's disease: current knowledge // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013. Vol. 13, N 12. ID 409. doi: 10.1007/s11910-013-0409-5
12. Mena M.A., García de Yébenes J. Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia // *Neuroscientist*. 2008. Vol. 14, N 6. P. 544-560.
13. Rial D., Lemos C., Pinheiro H., Duarte J.M., Gonçalves F.Q., Real J.I., Prediger R.D., Gonçalves N., Gomes C.A., Canas P.M., Agostinho P., Cunha R.A. Depression as a glialbased synaptic dysfunction // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. Vol. 9. ID 521. doi: 10.3389/fncel.2015.00521
14. Schafer D.P., Lehrman E.K., Stevens B. The "quadpartite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS // *Glia*. 2013. Vol. 61, N 1. P. 24-36.