

Е. А. Иванова, И. Г. Капица, А. В. Непоклонов, И. И. Кокшенев,  
Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина

## ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИМАНТАНА НА МОДЕЛЯХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

ФГБУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова" РАМН, Москва, Россия

Гимантан — новый противопаркинсонический препарат, находящийся на стадии клинических испытаний. Установлено, что гимантан в диапазоне доз 10–40 мг/кг проявляет противовоспалительную активность на модели уксуснокислого перитонита у мышей, достоверно снижая выраженность экссудативной реакции. На модели нейровоспаления, вызванного введением липополисахарида, гимантан (10 мг/кг) препятствует потере массы тела, развитию акинезии передней конечности, контралатеральной стороне повреждения, и нарушению обоняния у крыс.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; гимантан; нейровоспаление; липополисахарид; периферическое воспаление.

Нейровоспаление относится к факторам, усугубляющим тяжесть заболеваний, протекающих с нейродегенерацией, и повышающим риск их развития [1]. У пациентов с болезнью Паркинсона (БП) наблюдается активация микроглии в черной субстанции и стриатуме [2], дисбаланс воспалительных нейромедиаторов — повышение концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  в спинномозговой жидкости и базальных ганглиях [3].

Подтверждением значимости воспалительного компонента в этиологии и патогенезе БП являются результаты эпидемиологических исследований, в которых установлено, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов снижает риск развития этого заболевания [4, 5]. В ряде экспериментальных работ показано, что провоспалительный агент бактериальный эндотоксин липополисахарид (ЛПС) вызывает гибель дофаминергических нейронов как при остром или хроническом внутримозговом введении, так и при остром системном введении подопытным животным [6].

В патогенезе БП важное место занимает глутаматная эксайтотоксичность. Так, хроническая гиперактивация глутаматных рецепторов N-метил-D-аспаратом приводит к увеличению уровней маркеров нейровоспаления во фронтальной коре крыс [7].

Приведенные выше факты свидетельствуют об актуальности поиска противопаркинсонических препаратов, имеющих в спектре своего фармакологического действия противовоспалительные свойства, и о целесообразности изучения в этой связи производных адамантана, являющихся антагонистами NMDA рецепторов.

В НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН разработан новый противопаркинсонический препарат гимантан (N-(2-адамантил)гексаметиленмина гидрохлорид), являющийся неконкурентным низкоаффинным блокатором ионного канала NMDA рецепторов и имеющий ряд дополнительных компонентов в механизме действия и спектре фармакологической ак-

тивности, в частности, проявляющий иммуностропные и антирадикальные свойства [8].

Целью настоящего исследования являлось изучение противовоспалительных свойств гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного введением ЛПС в черную субстанцию мозга крыс.

### Экспериментальная часть

Опыты проводили на белых аутбредных самцах крыс массой 380–420 г и белых аутбредных самцах мышей массой 27–30 г, полученных из питомника Столбовая (РАМН). В экспериментальной работе использовали субстанцию гимантана, степень чистоты которой соответствует нормам проекта фармакопейной статьи предприятия. Количественное определение гимантана проводили методом неводного титрования, определение посторонних примесей — методом тонкослойной хроматографии [9].

Влияние гимантана на периферическое воспаление исследовалось у мышей на модели острой экссудативной реакции — уксуснокислым перитонитом, который вызывали внутрибрюшинным введением 1 % раствора уксусной кислоты из расчета 1 мл на 100 г массы тела животного [10]. Животные были разделены на 5 групп, каждая из которых включала от 8 до 15 особей. За 1 ч до инъекции раствора уксусной кислоты мышам контрольной группы вводили физиологический раствор, мышам группы препарата сравнения — диклофенак натрия (раствор для инъекций фирмы Немофарм) в дозе 10 мг/кг, животным остальных 3 групп вводили гимантан в дозах 10, 20 и 40 мг/кг. Через 3 ч мышей забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и измеряли его массу.

Оценку влияния гимантана на нейровоспаление проводили на модели паркинсонического синдрома (ПС), вызванного внутримозговым введением ЛПС

Таблица 1  
Влияние гимантана и диклофенака на экссудативную стадию воспаления в условиях модели укусноокислого перитонита у мышей (Mean + SEM)

Группа	Масса экссудата, мг
Контроль	849,22 ± 76,16
Диклофенак, 10 мг/кг	350,23 ± 34,38*
Гимантан, 10 мг/кг	575,71 ± 74,67*^
Гимантан, 20 мг/кг	444,86 ± 91,74*
Гимантан, 40 мг/кг	534,50 ± 93,72*^

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни;  
^  $p < 0,05$  по сравнению с группой "Диклофенак", критерий Манна-Уитни.

(*Escherichia coli*, Serotype 0, SIL2630, Sigma) [11]. Наркотизированным нембуталом (45 мг/кг) крысам вводили ЛПС (10 мкг в 2 мкл раствора Рингера) или раствор Рингера (контроль) в черную субстанцию левого полушария по следующим стереотаксическим координатам: AP — 4,0 мм, ML — 2,0 мм, DV — 8,0 мм [12]. Животные были разделены на 3 группы по 6 особей в каждой: 1) пассивный контроль (ложно оперированные, ЛО); 2) активный контроль (ЛПС); 3) гимантан 10 мг/кг + ЛПС. Гимантан вводили внутрибрюшинно предварительно за 1 день до операции, непосредственно перед операцией, а затем ежедневно в течение 14 дней. На протяжении всего эксперимента отслеживалась динамика массы тела крыс.

На седьмые сутки после операции поведение крыс всех 3 групп оценивали в тесте "Цилиндр", описанном Schallert с соавторами [13], который используется для анализа акинезии передних конечностей животных. Крысу помещали в прозрачный цилиндр диаметром 18 см и высотой 45 см (НПК "Открытая Наука", Москва, Россия). Далее при свободном поведении регистрировали касания каждой передней лапой стенок цилиндра в течение 2 мин наблюдения, после чего подсчитывали процент касаний лапы, контралатеральной повреждению стороны, относительно общего количества контактов.

Через 3 недели после операции проводили оценку влияния гимантана на нарушенное введением ЛПС

Таблица 2  
Влияние гимантана на динамику массы тела крыс, которым интранатально введен липополисахарид (Mean + SEM)

Группа	Изменение массы тела крыс, г	
	3-и сут после операции относительно фона	8-е сут после операции относительно 3-х сут
ЛО	5,0 ± 1,1	2,7 ± 1,9
ЛПС	-12,2 ± 2,1*	-11,9 ± 3,6*
Гимантан, 10 мг/кг	-9,6 ± 3,2*	-3,4 ± 2,1

\*  $p < 0,05$  по сравнению с группой ложно оперированных животных, критерий Стьюдента.

обоняние у крыс в условиях модифицированной методики [14]. Крыс помещали на квадратную арену размером 60 × 60 см и высотой стенок 30 см, разделенную на 9 равновеликих квадратов. В один из квадратов (угол арены) наносили каплю эфирного цитрусового масла. Арену делили на 3 зоны в зависимости от убывания интенсивности запаха: зона 1 — непосредственно сам помеченный запахом квадрат; зона 2 — три квадрата, расположенные на расстоянии от 20 до 40 см от источника запаха; зона 3 — квадраты, удаленные на расстояние от 40 до 60 см от источника запаха. В течение 2 мин регистрировали время нахождения животного в каждой зоне и количество заходов в 1-ю зону.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica v. 6.0 с использованием критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

### Результаты и их обсуждение

В условиях модели укусноокислого перитонита у мышей гимантан проявлял выраженную антиэкссудативную активность. Достоверный противовоспалительный эффект гимантан вызывал в диапазоне доз от 10 до 40 мг/кг (табл. 1). Максимально выраженная активность гимантана была зафиксирована при его введении в дозе 20 мг/кг и была сопоставима с эффективностью препарата сравнения диклофенака натрия.

Эти результаты согласуются с данными, подтверждающими наличие противовоспалительной активности у блокаторов NMDA подтипа глутаматных рецепторов, в частности, у декстрометорфана [15]. Кроме того, было показано, что антагонисты NMDA подтипа глутаматных рецепторов улучшают терапевтическое действие дексаметазона на модели экспериментального артрита у крыс [16]. Учитывая данные об участии трансинаптической стимуляции глутаматных рецепторов NMDA подтипа в регуляции экспрессии ЦОГ-2 в нервной ткани [17], можно предположить модулирующее действие гимантана в отношении указанной изоформы ЦОГ.

Индукция нейровоспаления ЛПС в коре, гиппокампе, стриатуме и черной субстанции крыс широко используется в качестве модели БП. Данный бактериальный эндотоксин вызывает быструю активацию микроглии, плотность которой в 4–5 раз больше именно в

Таблица 3  
Влияние гимантана на акинезию передней конечности, контралатеральной стороне введения липополисахарида, в тесте "Цилиндр"

Группа	% касаний правой передней лапой стенок цилиндра относительно общего количества контактов верхних конечностей
ЛО	48,4 ± 1,94
ЛПС	31,2 ± 7,84*
Гимантан, 10 мг/кг	40,4 ± 5,16

\*  $p < 0,05$  по сравнению с группой ложно оперированных животных, критерий Манна-Уитни.

дофаминергических структурах мозга, особенно в черной субстанции, что в последующем приводит к уменьшению концентрации дофамина в стриатуме и гибели дофаминергических нейронов [18, 19].

Унилатеральное интранигральное введение ЛПС в нашем эксперименте приводило к значительной потере массы тела животных уже в первые дни после операции. В группе крыс, получивших ЛПС, снижение массы тела на 3-и сут после операции относительно фоновых значений (накануне операции) составляло 12,2 г. Отрицательная динамика массы тела крыс группы ЛПС сохранялась и в дальнейшем, что отражалось в потере в среднем еще 11,9 г на 8-й день (табл. 2). Этот факт находит подтверждение в результатах, полученных зарубежными авторами в отношении аутобредных животных [22]. В условиях данной модели гимантан вводился в дозе 10 мг/кг, в которой установлен его противопаркинсонический эффект в ряде экспериментальных моделей БП и антидискинетический эффект на модели дискинезий, индуцированных леводопой у крыс [20, 21]. На его фоне уменьшение массы тела крыс было менее выраженным по сравнению с группой активного контроля. Так, потеря массы тела на 3-и и 8-е сут после операции была в 1,27 и 3,5 раза меньше соответствующих показателей в группе ЛПС. У ложно оперированных крыс отрицательной динамики массы тела после проведения процедуры операции не наблюдалось.

При оценке поведения крыс в тесте “Цилиндр” у животных группы активного контроля была выявлена акинезия передней конечности, контралатеральной стороне введения ЛПС, что выражалось в достоверном уменьшении касаний правой лапой стенок цилиндра на 17,7 % по сравнению с соответствующими данными в группе ложно оперированных крыс (табл. 3). Отмеченный факт свидетельствует о поражении дофаминергических нейронов в левой черной субстанции животных, получивших ЛПС. После введения гимантана у крыс наблюдалась тенденция к уменьшению активности передней конечности, контралатеральной стороне поражения, по сравнению с ложно оперированными животными. Однако снижение количества касаний стенок цилиндра правой конечностью крыс, получавших гимантан, относительно группы пассивного контроля было в 2 раза меньше, чем в группе активного контроля. Это позволяет предположить, что

**Таблица 4. Влияние гимантана на нарушенное обоняние, вызванное интранигральным введением липополисахарида (Mean + SEM)**

Группа	Продолжительность нахождения в зоне, с			Количество заходов в 1 зону
	1 зона	2 зона	3 зона	
ЛО	23,3 ± 10,7	10,0 ± 3,2	71,3 ± 6,8	1,5 ± 0,3
ЛПС	29,3 ± 6,5	18,3 ± 6,3	59,8 ± 4,1	2,3 ± 0,2
Гимантан, 10 мг/кг	14,6 ± 11,5	15,4 ± 7,0	86,8 ± 9,9*	0,8 ± 0,4*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ЛПС”, критерий Манна-Уитни.

гимантан оказывает нейропротекторное действие за счет снижения степени поражения дофаминергических нейронов.

БП начинает развиваться задолго до манифестации моторной симптоматики. О начальной стадии нейродегенерации могут свидетельствовать так называемые “домоторные” проявления — нарушения обоняния, сна, когнитивные расстройства, тревожность и депрессивное состояние пациентов, которые сохраняются на протяжении всего заболевания [23]. В нашем исследовании на модели ПС, индуцированного ЛПС, оценивалась обонятельная функция крыс по изменению их поведения в ответ на внесение раздражающего запаха. Этот метод часто используется для оценки обусловленных запахом различий поведения животных [24].

В группе активного контроля была отмечена тенденция к увеличению продолжительности нахождения животных в 1-й и 2-й зонах арены и количества заходов в 1-ю зону, интенсивность раздражающего запаха в которой была максимальна (табл. 4). На фоне гимантана обнаружено достоверное увеличение времени пребывания в 3-й, наиболее удаленной от помеченной раздражающим запахом, зоне и снижение количества заходов в 1-ю зону арены по сравнению с группой ЛПС, что может свидетельствовать о большей сохранности чувствительности обонятельного аппарата по сравнению с группой, которой вводился только ЛПС.

Таким образом, на модели ПС, вызванного интранигральным введением ЛПС, которая рассматривается также как модель нейровоспаления, выявлен корригирующий эффект гимантана в отношении индуцированных эндотоксином снижения массы тела, акинезии, контралатеральной повреждению передней конечности, и изменений поведения животных в ответ на раздражающий запах. Установленный эффект гимантана в совокупности с его противовоспалительным эффектом на модели периферического воспаления можно оценивать как способность изучаемого препарата препятствовать развитию и замедлять динамику нейровоспаления.

## ЛИТЕРАТУРА

1. S. Phani, J. D. Loike, and S. Przeborski, *Parkinson. Relat. Disorders*, **18** (Suppl), 207 – 209 (2012).
2. P. L. McGeer, C. Schwab, A. Parent, et al., *Ann. Neurol.*, **54**, 599 – 604 (2003).
3. T. Nagatsu, M. Mogi, H. Ichinose, et al., *J. Neural. Transm. Suppl.*, **60**, 277 – 290 (2000).
4. X. Gao, H. Chen, M. A. Schwarzschild, et al., *Neurology*, **76**, 863 – 869 (2011).
5. E. C. Hirsch and S. Hunnot, *Lancet Neurol.*, **8**, 382 – 397 (2009).
6. L. Qin, X. Wu, M. L. Block, et al., *Glia*, **55**, 453 – 462 (2007).
7. Y. C. Chang, H.-W. Kim, S. I. Rapoport, et al., *Neurochem. Res.*, **33**(11), 2318 – 2323 (2008).
8. Е. А. Вальдман, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Москва (2001).
9. Е. А. Цветкова, М. Ю. Волкова, О. Б. Степаненко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(11), 51 – 54 (2001).
10. Р. У. Хабриев (ред.), *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических ве-*

- цеств, ОАО "Издательство "Медицина", Москва (2005), сс. 695 – 709.
11. A. Castaño, A. Herrera, J. Cano, et al., *J. Neurochem.*, **70**(4), 1584 – 1592 (1998).
  12. J. Bures, M. Petran and J. Zachar, *Electrophysiological methods in biological research*, Academic Press, New York (1960).
  13. T. Schallert and T. A. Jones, *J. Neural. Transplant. Plast.*, **4**, 193 – 198 (1993).
  14. M. Lemasson, C. Delbe, G. Gheusi, et al., *Behav. Processes*, **68**(1), 13 – 23 (2005).
  15. Liu, L. Qin, G. Li, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 212 – 218 (2003).
  16. Francis F. Y. Lam and Ethel S. K. Ng, *Br. J. Pharmacol.*, **159**(4), 958 – 969 (2010).
  17. B. L. Fiebich, S. Schleicher, O. Spleiss, et al., *Abstrs. of Meeting of the Volkswagen Foundation and the GEBIN on Psycho Neuro Endocrino Immunology*, Regensburg (2001), Abstr. 15.
  18. H. M. Gao, J. Jiang, B. Wilson, et al., *J. Neurochem.*, **81**, 1285 – 1297 (2002).
  19. M. M. Irvani, C. C. Leung, M. Sadeghian, et al., *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 317 – 330 (2005).
  20. И. Г. Капица, Е. А. Иванова, А. В. Непоклонов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(7), 7 – 9 (2011).
  21. Е. А. Иванова, А. В. Непоклонов, И. И. Кокшенев и др., *Биомедицина*, № 1, 74 – 81 (2012).
  22. В. Е. Wisse, К. Ogimoto, J. Tang, et al., *Endocrinology*, **148**, 5230 – 5237 (2007).
  23. E. Tolosa, Y. Compta and C. Gaig, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **13** (Suppl), 2 – 7 (2007).
  24. E. K. Miller, T. Furuyashiki, P. C. Holland, et al., *J. Neurosci.*, **28**(19), 5127 – 5138 (2008).

Поступила 02.07.12

## THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF HEMANTANE IN MODELS OF PERIPHERAL INFLAMMATION AND LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED NEUROINFLAMMATION

E. A. Ivanova, I. G. Kapitsa, A. V. Nepoklonov, I. I. Kokshenev, E. A. Val'dman, and T. A. Voronina

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

Hemantane is a novel antiparkinsonian drug that is currently at the stage of clinical trials. Hemantane in a dosage range of 10 – 40 mg/kg demonstrates anti-inflammatory activity and significantly decreases the intensity of exudative reaction in a model of acetic acid-induced peritonitis in mice. In rats with a model of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide injection, hemantane (10 mg/kg) prevents weight loss, development of forepaw akinesia contralateral to the operation, and smell disturbance.

**Keywords:** Parkinsons disease; hemantane; neuroinflammation; lipopolysaccharide; peripheral inflammation.