

# РОЛЬ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ДЕЙСТВИИ НОВОГО ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ AGB-31

УДК 615.213:615.015.11

© О. А. Ярош

Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины, Киев

## Ключевые слова:

производное монокарбамата AGB-31; ГАМК; азота оксид; тиол-дисульфидная система.

## Резюме

Производное монокарбамата соединение AGB-31 обнаруживает высокую противоэпилептическую активность, в механизмах которой регистрируется преимущественное достоверное повышение уровня глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в левом полушарии головного мозга, вызывая тенденцию к снижению содержания глутамата в первую очередь в левом полушарии и тенденцию к повышению ГАМК в обоих полушариях. AGB-31 достоверно (более чем в 3 раза) повышает в левом полушарии активность синтазы оксида азота, что вызывает тенденцию к снижению содержания оксида азота в обоих полушариях мозга. Под влиянием AGB-31 достоверно (на 63,4 %) снижается активность глутатионпероксидазы в правом полушарии мозга без изменения в левом, с тенденцией к повышению активности глутатионредуктазы в обох полушариях.

Эпилепсия остается одним из самых распространенных заболеваний ЦНС, поскольку, по данным ВОЗ, в мире насчитывается более 40 млн таких больных. Из них примерно 75 % не получают адекватного лечения, а у 50 % пациентов регистрируются постоянные рецидивы с более чем 12 припадками в год [3, 6, 9, 21]. По существующим формулярам, приоритетным в лечении эпилепсии является монотерапия, однако она осуществляется только у 40 % больных, политерапию получают также 41 %, а почти 20 % больных вовсе не обеспечены фармакотерапией [3, 10, 18]. К тому же у 30–35 % больных имеются резистентные формы, что требует поиска принципиально новых противосудорожных средств с отсутствием перекрестной толерантности [22].

В Украине в отделе нейрофармакологии ГУ «ИФТ НАМНУ» у циклического производного монокарбаматов, синтезированного в Институте органической химии НАНУ (рабочий шифр соединения AGB-31), обнаружены значительные противоэпилептические свойства [7, 8, 13]. Было определено, что у нового соединения основным механизмом действия является влияние на ГАМК и глицинергические нейромедиаторные процессы головного моз-

га, что частично совпадает с механизмом действия большинства существующих в настоящее время антиконвульсантов. Основными сайтами механизма действия AGB-31 могут быть белки различных субпопуляций рецепторов как потенциалзависимых ионных каналов, так и метаболитных субъединиц специализированных рецепторов.

Сравнительно недавно стало известно, что кроме нейроаминокислот на роль нейромедиатора во многих системах организма (сосудистой, нейрональной и иммунной) претендует также оксид азота (NO) и его основной фермент — нейрональная синтаза (NOS) [2, 4, 16, 20]. Антиконвульсанты также могут изменять активность ферментных белков, участвующих в метаболизме нейромедиаторов, что приводит к их количественным изменениям и, таким образом, определять функциональное состояние нейронов в сторону возбуждения или торможения [11, 15, 17].

На конечный этап развития судорожной активности нейронных комплексов и их нейромедиаторную активность оказывает также существенное влияние состояние окислительно-восстановительных процессов, регулируемых тиол-дисульфидной системой (ТДСС), фармакологическое влияние на которую может быть компонентом этиотропного действия антиконвульсантов [2, 5, 22]. Исследования последних лет указывают на важную роль в различных патологических состояниях ферментативного равновесия в тиол-дисульфидной системе [2, 5, 22]. Однако к настоящему времени отсутствуют данные о влиянии AGB-31 на ТДСС, особенно в отношении ее количества и активности в отдельных полушариях головного мозга. Поэтому в оценке активности и механизма действия потенциального противоэпилептического соединения было целесообразным определение участия ГАМК, азота оксида и ТДСС.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью исследования было определить влияние протиэпилептического соединения AGB-31 на содержание ГАМК, глутамата, активность фермента глутаматдекарбоксилазу, систему оксида азота и ее синтазу, а также равновесие ферментов тиолов-дисульфидной системы в разных полушариях головного мозга экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Влияние AGB-31 на содержание нейроактивных аминокислот (ГАМК и глутамата) и активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК) изучалось на белых крысах. Все эксперименты проводились с соблюдением условий «Положения об использовании животных в биомедицинских исследованиях» [5, 12]. Животным опытной группы внутрижелудочно (в/ж) зондом вводили 100 мг/кг массы соединения AGB-31 в виде водной суспензии с добавлением Твин-80. Контрольная группа получала только растворитель. Через 60 мин после введения животных декапитировали и изымали головной мозг без мозжечка, который разделяли на правое и левое полушария. Полушария мозга промывали в 0,9%-м охлажденном растворе KCl и гомогенизировали в ступке с жидким азотом. Цитоплазматическую фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге фирмы «Sigma 3-30k» (ФРГ) сначала 10 мин при 1000 g, а затем 10 мин при 1400 g при +40 °C. Далее процедуры выполнялись в строгом соответствии с методическими рекомендациями Государственного экспертного центра (ГЭЦ) МОЗ Украины [9]. Определяли спектр поглощения ГАМК и глутамата при длине волны 540 нм. Количественное содержание ГАМК и глутамата в мкмоль рассчитывали по калибровочной кривой с перечислением на массу образца ткани (г) и выражали в мкмоль/г ткани.

Активность фермента глутаматдекарбоксилазы (ПДК) определяли у 36 взрослых крыс-самцов массой 180–220 г по уровню изменения количества НАДФ при длине волны поглощения 340 нм. Размер поглощения считался эквимольным количеством субстрата, использованного в реакции окисления/восстановления НАДФ [1, 5, 14]. Активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в тканях полушарий головного мозга выражали мкмоль/мг белка/мин.

Определение стабильных метаболитов (NO) и синтазы оксида азота (NOS) в отдельных полушариях головного мозга проводили у 36 белых беспородных крыс массой 180–200 г с использованием метода Грисса [2, 5, 14]. Исследование активности фермента NO-синтазы (NOS) в гомогенате полушарий головного мозга осуществляли с помощью спектрофотометра фирмы «Biochrom Ltd» (Великобритания). Метод определения ак-

тивности NO-синтазы основан на использовании процесса стехиометрического окисления НАДФН при осуществлении реакции образования NO из L-аргинина. Изменения количественного уровня НАДФН является эквимольным количеству образованного оксида азота, который регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Определение ферментов тиол-дисульфидной системы (глутатионредуктазы — ГР и глутатионпероксидазы — ГПР) в мозговых полушариях осуществляли по ее способности восстанавливать дисульфидные связи окисленного глутатиона в его сульфгидрильной форме [5]. При этом регистрировали изменения оптической плотности раствора контрольного и подопытного полушарий. Определение активности глутатионпероксидазы (ГПР) осуществляли с помощью восстановленного глутатиона (ВГ). Активность ГПР выражали мкмоль ВГ/мг белка/мин.

Все результаты представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартной ошибки (m) с учетом количественной выборки (n). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Изменения считались достоверными при  $p \leq 0,05$ . Расчеты проводили с использованием программы Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о степени участия гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), глутамата и глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в отдельных полушариях головного мозга в эффектах противоэпилептического соединения AGB-31 представлены в таблице 1.

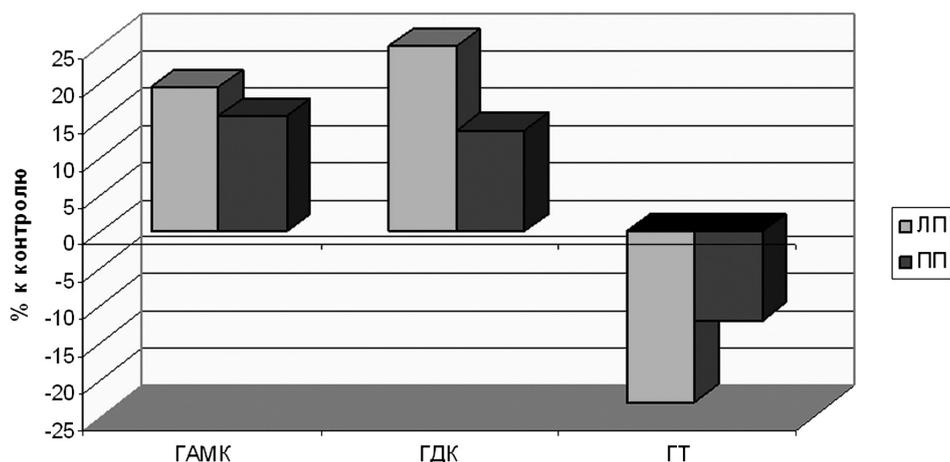
Результаты экспериментов показали (табл. 1, рис. 1), что количество ГАМК и глутамата (ГТ) в правом и левом полушариях у животных контрольной и подопытной групп достоверно не отличались, хотя тенденция к возрастанию содержания ГАМК и уменьшению глутамата в левом полушарии наблюдалась. Активность фермента глутаматдекарбоксилазы (ГДК), при участии которой образуется ГАМК, была в 1,34 раза выше в левом полушарии ( $19,0 \pm 0,67$  мкмоль/г/мин) в сравнении с правым ( $15,8 \pm 0,52$  мкмоль/г/мин).

Исследование действия соединения AGB-31 на систему оксида азота в отдельных полушариях головного мозга приведены в таблице 2 и рисунке 2.

■ Таблица 1. Влияние AGB-31 на уровень ферментов системы ГАМК в полушариях головного мозга крыс

Показатели	Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)				Глутаматдекарбоксилаза (ГДК)				Глутамат (ГТ)			
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт		Контроль		Опыт	
	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП
M	4,1	3,2	4,9	3,7	15,2	13,9	19,0*	15,8	10,9	10,0	8,3	8,8
±m	0,2	0,59	0,59	0,44	0,76	0,95	0,67	0,52	0,99	0,92	0,66	0,54

Примечание. \* —  $P < 0,05$  в сравнении с контролем



■ Рисунок 1. Изменения содержания основных компонентов ГАМК-ергической системы в полушариях головного мозга при действии AGB-31

Полученные данные показали, что уровень стабильных метаболитов оксида азота (NO) у интактных и подопытных животных в обоих полушариях достоверно не отличался, хотя в обеих полусферах имелась тенденция к уменьшению NO под влиянием соединения AGB-31 в среднем на 21–23%.

В то же время количественное содержание NO-синтазы у животных, которым вводили соединение AGB-31, увеличивалось в левом полушарии более чем в 3 раза (+354%; рис. 2) по сравнению с ее активностью у животных контрольной группы.

Таким образом, накопление и активность синтазы оксида азота (NOS) в левом полушарии головного мозга может быть одной из составляющих механизма противоэпилептического действия сое-

динения AGB-31. Вполне допустимо, что у соединения AGB-31 в механизме действия имеется наличие тормозных влияний не только на ЦНС и триггерные зоны судорожной готовности, но и периферическое действие на NO-синтазу мышц, реализующих судорожные сигналы с «судорожных нервных центров» в скелетной мускулатуре.

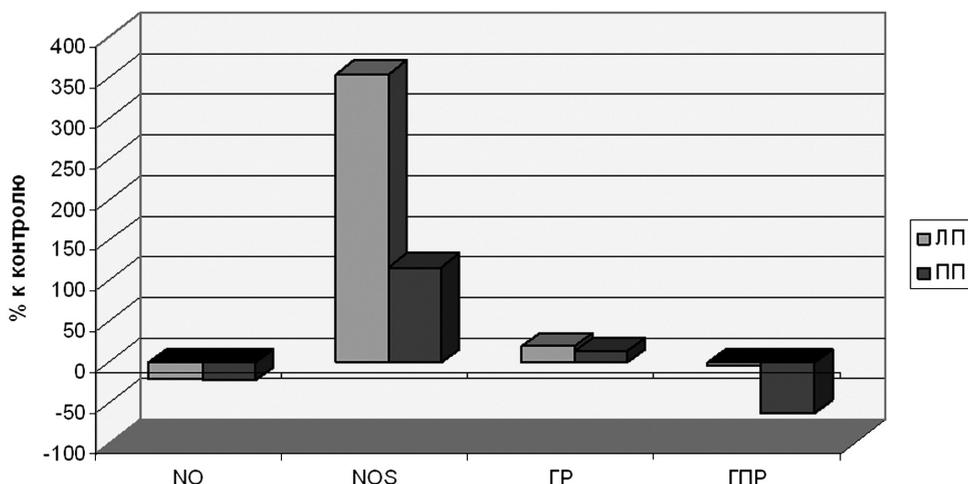
Исследования и результаты по изучению действия соединения AGB-31 на тиол-дисульфидную систему отдельных полушарий головного мозга представлены в таблице 3 и рисунке 2.

Результаты исследования этих процессов показали, что тиол-дисульфидная система меняется в условиях введения в организм AGB-31 неодинаково: практически без изменений оставалась

■ Таблица 2. Влияние соединения AGB-31 на систему оксида азота в полушариях головного мозга

Показатели	NO				NO-синтаза			
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт	
	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП
М	11,3	13,3	8,9	10,3	1,74	2,35	7,9*	5,1
±m	0,97	1,07	0,81	0,62	1,82	2,44	7,95	5,12

Примечание. \* — P < 0,05 в сравнении с контролем



■ Рисунок 2. Действие соединения AGB-31 на систему оксида азота и тиол-дисульфидное равновесие полушарий головного мозга

■ Таблица 3. Влияние AGB-31 на систему ферментов тиол-дисульфидного равновесия в полушариях головного мозга

Показатели	Глутатионредуктаза (ГР)				Глутатионпероксидаза (ГПР)			
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт	
	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП	ЛП	ПП
М	22,4	17,6	26,8	19,9	63,4	60,6	66,2	22,2*
±m	1,66	1,05	1,56	1,02	1,62	1,51	0,57	0,75

Примечание. \* —  $P < 0,05$  в сравнении с контролем

активность фермента глутатионредуктазы (ГР), но резко, почти в 3 раза (2,73), уменьшалась активность глутатионпероксидазы (ГПР), однако только в правом полушарии. В левом полушарии активность ГПР оставалась практически на уровне контрольных показателей.

Таким образом, на основе проведенных данных об участии тиол-дисульфидной ферментной системы можно считать, что в нервных тканях правого полушария мозга статистически достоверно ( $P < 0,01$ ) снижается активность фермента (на 63,4%) в сравнении с активностью фермента в левой полусфере.

## ВЫВОДЫ

1. Противозепилептическое соединение AGB-31 достоверно повышает активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК) в левом полушарии головного мозга, вызывая тенденцию к снижению содержания глутамата в первую очередь в левом полушарии, а в обоих полушариях — тенденцию к повышению ГАМК.
2. Под влиянием AGB-31 достоверно (более чем в 3 раза) возрастает активность синтазы оксида азота в левом полушарии мозга, что вызывает умеренное снижение содержания оксида азота в обоих полушариях мозга.
3. Тиол-дисульфидная система под влиянием соединения AGB-31 изменяет равновесие: активность глутатионпероксидазы снижается на 63,4% в правом полушарии мозга без изменения в левом, с тенденцией к повышению уровня глутатионредуктазы в обеих мозговых полусферах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. — М.: Наука, 1969. — 739 с.
2. Беленичев И. Ф., Черний В. И., Колесник Ю. М., Павлов С. В. Рациональная нейропротекция. — Донецк: ИД Заславского, 2009. — 260 с.
3. Власов П. Н. Алгоритмы диагностики и терапии эпилепсии у взрослых в поликлинических условиях // Фарматека. — 2006. — № 7. — С. 96–104.
4. Горбунов Н. В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток-зерен мозжечка // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1995. — № 7. — С. 40–48.
5. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: ме-

- тод. рекомендации / Под. ред. И. С. Чекмана и др. — Киев, 2010. — 81 с.
6. Дубенко А. Е. Применение брендовых и генерических противозепилептических препаратов // Здоров'я України. — 2011. — № 5(32). — С. 54–71.
  7. Ємельянова О. І. Аналіз протисудомної дії нових похідних монокарбамату на моделі хімічно-індукованих судом // Вісник Вінницького нац. мед. університету. — 2007. — № 11(2/1). — С. 470–472.
  8. Ємельянова О. І., Сироватська Л. П., Овінова Г. В. Скринінг протисудомної активності хімічних сполук у ряду монокарбаматів // Ліки. — 2007. — № 1–2. — С. 108–112.
  9. Карлов В. А. Стратегия и тактика эпилепсии сегодня // Журнал неврол. и психиатрии. — 2004. — № 8. — С. 28–34.
  10. Киссин М. Я. Особенности терапии больных эпилепсией с психическими пароксизмами // Эпилепсия. — 2011. — № 4. — С. 58–59.
  11. Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К., Реутов В. П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. — 2000. — Т. 65. — С. 485–503.
  12. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та робот і з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайретдінова. — Київ, 2002. — 155 с.
  13. Патент України № 82566 N-арилалкінілкарбамати та їх циклічні ізомери, які виявляють проти судомну активність / Авт. Біденко Г. В., Гудима А. О., Лозинський М. О., Громов Л. О. і др. // Опубл. 25.04.2008. Бюл. № 8.
  14. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). — Л.: Изд-во ЛГУ. — 1982. — 272 с.
  15. Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Гранстрем О. К. и др. Возможная роль оксида азота в повреждении глутаматных рецепторов при эпилепсии // Вести нац. Акад. наук Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. — 2002. — № 1. — С. 18–22.
  16. Glyan'ko A., Mitanova N. B., Stepanov A. B. Physiological role of nitric oxide (NO) at vegetative organisms // J. Stress Physiol. Biochem. — 2009. — Vol. 5, N 3. — P. 33–52.
  17. Landmark C. J. Targets for antiepileptic drugs in the synapse // Med. Sci. Monit. — 2007. — Vol. 13, N 1. — P. 1–7.
  18. Leppik I. E., Hovinga C. A. Extended-release antiepileptic drugs: A comparison of pharmacokinetic parameters relative to original immediate-release formulations // Epilepsia. — 2013. — Vol. 54, N 1. — P. 28–35.
  19. Marletta M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis // Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 927–930.
  20. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification // J. Biol. Chem. — 1988. — Vol. 263, N 33. — P. 17205–17208.
  21. Perucca E., Beghi E., Dulac O. et al. Assessing risk to benefit ratio in antiepileptic drug therapy // Epilepsy Res. — 2000. — Vol. 41. — P. 107–139.
  22. Schachter S. C. Pharmacology of antiepileptic drugs // Epilepsia. — 2012. — Vol. 58, N 9. — P. 1906–1918.

**THE ROLE OF NEUROTRANSMITTER SYSTEMS SEPARATE THE HEMISPHERES OF THE BRAIN IN ACTION THE NEW ANTIEPILEPTIC COMPOUNDS AGB-31**

Yarosh O. A.

◆ **Summary:** Compound AGB-31, a monocarbamate derivative, is shown to possess a high antiepileptic activity. The mechanisms of antiepileptic action are connected with significant increase in glutamic acid decarboxylase activity in the left hemisphere of the brain, with trend of the glutamate content decrease in the left hemisphere and the tendency to increase GABA in both hemispheres. AGB-31 significantly (more than 3-fold) increases syntase nitric oxide activity in the left hemisphere and has a tendency to reduce the NO content in both hemispheres. AGB-31 significantly (by 63.4%), reduced glutathione peroxydase activity in the right hemisphere without changing it in the left, with a tendency to increase the activity of glutathione reductase in both hemispheres.

◆ **Key words:** monocarbamate derivative AGB-31; GABA; nitric oxide; thiol-disulfide system.

◆ Информация об авторе

Ярош Олег Александрович — соискатель. ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины». 03680, Киев-80, ул. Э. Потье, д. 14. E-mail: ogia@novonordisk.com; levemir@mail.ru.

Yarosh Oleg Aleksandrovich — fellow. Institute of Pharmacology and Toxicology, NAMS of Ukraine. 03680, Kiev, E.Potie St., 14, Ukraine. E-mail: ogia@novonordisk.com; levemir@mail.ru.