

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.15.06

© Коллектив авторов

### ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЫШАМ ИЗАТИНА И ГИМАНТАНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ Б МОЗГА К ИНГИБИРОВАНИЮ ДЕПРЕНИЛОМ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Е.А. Вальдман<sup>1</sup>, И.Г. Капица<sup>1</sup>, Л.Н. Неробкова<sup>1</sup>, Л.Н. Аксенова<sup>2</sup>,  
О.А. Бунеева<sup>2</sup>, А.Е. Медведев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, Москва, Балтийская ул. д. 8

<sup>2</sup>ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,  
Погодинская ул. д. 10, тел.: 245-05-09; эл. почта: medvedev@ibmh.msk.su

Ежедневное введение низкой дозы (20 мг/кг) обратимого ингибитора моноаминоксидазы (МАО) Б изатина или гимантана мышам в течение 21 дня не влияет на активность этого фермента, измеренную в изолированных митохондриях мозга. При этом чувствительность МАО Б мозга к необратимому ингибитору депренилу, введенному животным сразу после окончания курсового введения обратимых ингибиторов, резко снижается. Это свидетельствует о накоплении исследуемых препаратов (или их метаболитов?) в мозге и защите ими активного центра МАО Б от специфического механизм-активируемого ингибитора депренила. Торможение депренилом *in vitro* активности МАО Б митохондрий, изолированных из мозга животных, получавших курсовое введение изатина или гимантана, была несколько выше чем в контроле. Последнее позволяет предположить, что длительное введение обратимых легко диссоциирующих ингибиторов может оказывать влияние на регуляторные свойства МАО Б.

**Ключевые слова:** моноаминоксидаза Б, изатин, гимантан, мозг

**ВВЕДЕНИЕ.** Новый потенциальный противопаркинсонический препарат гимантан (гидрохлорид N-2-адамантил-гексаметиленмина) и эндогенный индол изатин (индолдион-2,3), обладающий широким спектром фармакологической активности, проявляют свойства селективных обратимых конкурентных ингибиторов моноаминоксидазы Б (МАО Б) [1-4]. Из-за легкой диссоциации этих соединений из активного центра торможение МАО Б мозга экспериментальных животных *in vivo* удастся определить только по снижению необратимой инактивации этого фермента под действием специфических механизм-активируемых ингибиторов, введенных вместе с изатином или гимантаном [1, 5]. Однако при однократном введении даже высокие дозы гимантана (100 мг/кг) [1] или изатина (80 мг/кг) [5] лишь частично защищали МАО Б мозга от действия необратимых механизм-активируемых ингибиторов (депренила или фенелзина). Поскольку каждому из этих соединений свойственны и другие МАО-независимые биологические эффекты возникает закономерный вопрос о выраженности

## ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ И РЕГУЛЯЦИЯ МАО Б

торможения МАО Б при хроническом (курсовом) введении гимантана и изатина.

Поэтому в данной работе исследовали влияние длительного введения мышам изатина и гимантана на чувствительность МАО Б к ингибированию депренилом.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали мышей самцов линии С57ВL/6, массой 20-25 г. Гимантан был получен из опытно-технологического отдела ГУ НИИ фармакологии им. В.В.Закусова РАМН (рук. проф. Б.М.Пятин).

Препараты вводили ежедневно однократными подкожными инъекциями в течение 21 дня в дозах, указанных в таблицах 1 и 2. Контрольным животным вводили эквивалентный объем физиологического раствора. При сочетанном введении депренил вводили через 45 мин после введения изатина или гимантана, забой животных проводили через 1 час после введения депренила.

Митохондрии мозга крысы выделяли, как описано ранее [6]. Активность МАО Б определяли радиометрически, используя 10 мкМ [<sup>14</sup>C]2-фенилэтиламин гидрохлорид производства "Amersham" (Англия) [7]. Изатин, депренил и другие реактивы были приобретены у фирмы "Sigma" (США).

Торможение МАО Б депренилом исследовали после предварительной преинкубации препарата с изолированными митохондриями мозга в течение 60 мин при 37°C.

Таблица 1. Влияние введения изатина и депренила мышам на активность МАО Б мозга

Депренил	Изатин	Остаточная активность МАО Б (% от контроля)
1 мг/кг, однократно	-	24,0 ± 3,5
	20 мг/кг, однократно	100%
	20 мг/кг, 21 день	95,4 ± 8,7*
1 мг/кг, однократно	20 мг/кг, 21 день	103 ± 8,1

Примечание. Здесь и в далее представлены средние значения (±ошибка средней). В каждой группе было по 5-7 животных. \*-различие между эффектом депренила и его комбинации с изатином -  $p < 0,01$ .

Таблица 2. Влияние введения гимантана и депренила мышам на активность МАО Б мозга

Депренил	Гимантан	Остаточная активность МАО Б (% от контроля)
-	20 мг/кг, 21 день	92,0 ± 8,7
1 мг/кг, однократно	-	21,3 ± 1,5
1 мг, однократно	20 мг/кг, 21 день	69,2 ± 9,9*#
-	100 мг/кг, однократно	85,6 ± 10,1
1 мг/кг, однократно	100 мг/кг, однократно	33,0 ± 2,2*

Примечание. \*-Различие между эффектом депренила и его комбинации с гимантаном -  $p < 0,05$ ; #-различие между выраженностью торможения МАО Б депренилом при однократном и курсовом введении гимантана  $p < 0,01$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Ранее было установлено, что однократное введение изатина в дозах 10-80 мг/кг не влияет на активность МАО Б, измеренной в изолированных митохондриях мозга крыс [5]. Хроническое введение изатина мышам в дозе 20 мг/кг в течение 21 дня также не влияло на активность МАО Б, измеренную в изолированных митохондриях мозга (табл. 1). При этом введение депренила сразу же после последней инъекции изатина не оказывало никакого эффекта на активность МАО Б, в то время как в группе контрольных животных введение той же дозы депренила приводило к ингибированию этого фермента на 75% (табл. 1). Последнее свидетельствует в пользу того, что хроническое введение изатина приводит к полной защите МАО Б от необратимого ингибирования депренилом *in vivo*.

Хроническое введение гимантана в дозе 20 мг/кг также не влияло на активность МАО Б, измеренную в изолированных митохондриях мозга мышей (табл. 2). Однако и в этом случае введение депренила сразу после последней инъекции гимантана вызывало значительно меньшее ингибирование МАО Б, чем у контрольных животных.

Хроническое введение гимантана (20 мг/кг) приводило к более эффективной защите МАО Б *in vivo* от ингибирования депренилом, чем однократная инъекция высокой дозы этого препарата (100 мг/кг).

Таким образом, хроническое введение обратимых ингибиторов МАО Б изатина и гимантана вызывает более эффективную защиту этого фермента от необратимой инактивации депренилом *in vivo*. Поскольку в опытах *in vitro* высокие концентрации изатина и гимантана могут вызывать практически полную защиту МАО Б от действия специфических ацетиленовых ингибиторов (паргилин, депренил) [5, 8], полученные результаты могут свидетельствовать о кумуляции изатина и гимантана в мозге. Нельзя исключить также и образования метаболитов этих веществ, более эффективно защищающих МАО Б от инактивации депренилом. Эта возможность требует отдельного изучения.

Следует отметить, что снижение чувствительности МАО Б к депренилу *in vivo* после хронического введения изатина или гимантана может быть следствием изменения регуляторных свойств самого фермента. Хотя модификация каталитических и регуляторных свойств, вызванная различными воздействиями, более характерна для МАО А [9, 10], нельзя было исключить снижения чувствительности МАО Б к необратимому ингибитору на фоне длительного введения обратимых ингибиторов. Поэтому мы исследовали влияние депренила на активность МАО Б митохондрий, выделенных из мозга животных, которым вводили изатин и гимантан в течение 21 дня. Поскольку активность данного фермента в изолированных митохондриях мозга этих групп животных практически не отличалась от контрольных значений, это свидетельствует о полном удалении изатина и гимантана в процессе выделения митохондрий.

Преинкубация митохондрий мозга с депренилом в течение 60 мин вызывает торможение МАО Б (рис. 1), которое в диапазоне концентраций 10-100 нМ оказывалось более выраженным в случае МАО Б митохондрий мозга животных, подвергнутых курсовому введению изатина и гимантана. Исследование зависимости ингибирования МАО Б 10 нМ депренилом от времени преинкубации,

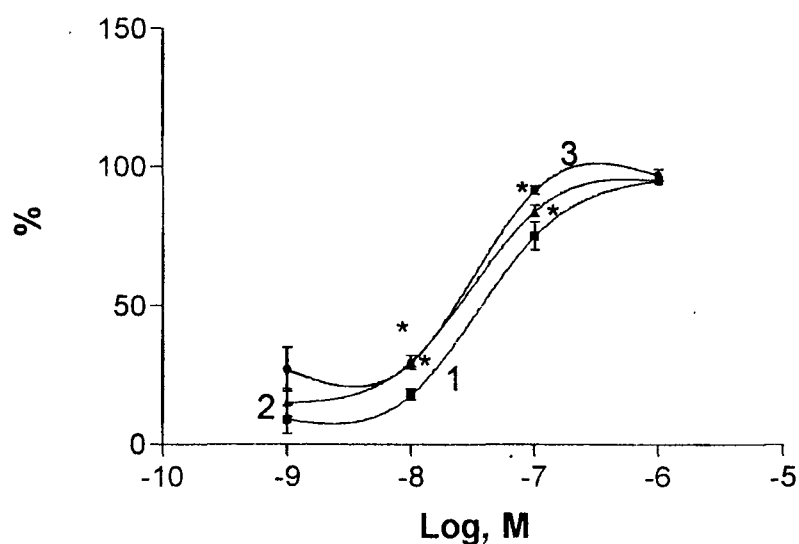


Рисунок 1.

Ингибирование моноаминоксидазы Б митохондрий, выделенных из мозга контрольных мышей (1) и мышей, получавших курсовое введение изатина (2) или гимантана (3), при инкубации с депренилом в течение 60 мин. Звездочки указывают значимость различий в торможении моноаминоксидазы Б по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

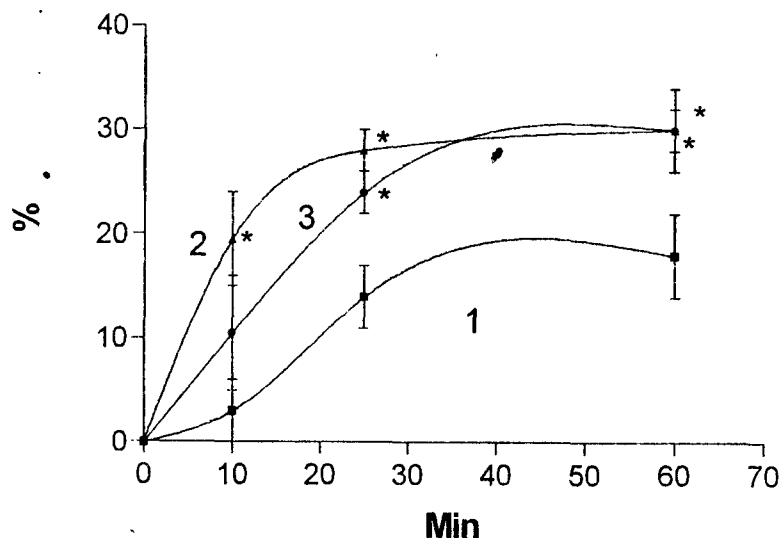


Рисунок 2.

Динамика ингибирования моноаминоксидазы Б митохондрий, выделенных из мозга контрольных мышей (1) и мышей, получавших курсовое введение изатина (2) или гимантана (3), при инкубации с 10 нМ депренилом. Звездочки указывают значимость различий в торможении моноаминоксидазы Б по сравнению с контролем ( $p < 0,05-0,01$ ).

показывает, что торможение этого фермента развивалось более быстро в митохондриях мозга животных, подвергнутых курсовому введению изатина и гимантана (рис. 2). Эти результаты демонстрируют, что хроническое введение обратимых ингибиторов не только не снижает, но даже несколько увеличивает чувствительность МАО Б митохондрий мозга к низким концентрациям депренила. Природа этого явления пока неясна. Ранее было установлено, что МАО (А и Б) является не единственной мишенью действия изатина в митохондриях [11], вполне возможно, что взаимодействие изатина с другими изатин-связывающими белками этих (или других?) органелл оказывает определенное регуляторное влияние и на МАО.

Таким образом, длительное введение мышам изатина и гимантана существенно снижает чувствительность МАО Б к ингибированию депренилом *in vivo*, что обусловлено аккумуляцией препаратов в мозге и очевидным увеличением их взаимодействия с этим ферментом.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (гранты № 03-04-48244 и 03-04-49228)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Аксенова Л.Н., Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2003) Экспер. клин. фармакол., **60** (5), 3-5
2. Medvedev A.E., Ivanov A.S., Kamyshanskaya N.S., Kirkel A.Z., Moskvitina T.A., Gorkin V.Z., Li N.Y., Marshakov V.Yu. (1995) Biochem. Mol. Biol. Int., **36**, 113-122.

3. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
4. Medvedev A.E., Glover V. (2004) *Neurotoxicology*, **25**, 185-192.
5. Panova N. G., Zemskova M.A., Axenova L.N., Medvedev A.E. (1997) *Neurosci. Lett.*, **233**, 58-60.
6. Medvedev A.E., Rajgorodskaya D.I., Gorkin V.Z., Fedotova I.B., Semiokhina A.F. (1992) *Mol. Chem. Neuropathol.*, **16**, 187-201.
7. Medvedev A.E., Kirkel A.Z., Kamyshanskaya N.S., Axenova L.N., Moskvitina T.A., Gorkin V.Z., Andreeva N.I., Golovina S.M., Mashkovsky M.D. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 303-308.
8. Medvedev A.E., Buneva O.A., Ivanov A.S., Veselovsky A.V. (2003) In: Monoamine oxidase inhibitors and their role in neurotransmission (drug development), Medicina Publishing House, Budapest pp. 249-278.
9. Горкин В.З. (1981) Аминоксидазы и их значение в медицине Медицина, Москва.
10. Медведев А.Е., Туптон К.Ф. (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 471-481.
11. Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 73-83.

Поступила 15.06.2004

**THE EFFECT OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF ISATIN AND HIMANTAN TO MICE ON SENSITIVITY OF BRAIN MONOAMINE OXIDASE B TO INHIBITION BY DEPRENYL IN VIVO AND IN VITRO**

E. A. Val'dman<sup>1</sup>, I. G. Kapitsa<sup>1</sup>, L. N. Nerobkova<sup>1</sup>, L. N. Axenova<sup>2</sup>, O. A. Buneva<sup>2</sup>, A. E. Medvedev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia;  
e-mail: medvedev@ibmh.msk.su

Chronic administration of a low dose of reversible monoamine oxidase (MAO) B inhibitors isatin or himantane (20 mg/kg) to mice during 21 day did not influence the enzyme activity assayed in isolated brain mitochondria. However *in vivo* sensitivity of brain MAO B to irreversible mechanism-based inhibitor deprenyl injected to animals right after the last administration of the reversible inhibitor sharply decreased. This suggests accumulation of these compounds (or their metabolites?) in the brain accompanied by increased protection of active site of MAO B against specific irreversible inhibitor deprenyl. *In vitro* inhibition of MAO B activity in mitochondria isolated from brain of mice treated with isatin or himantane was somewhat higher than in control mitochondria. The latter suggests that long term treatment of animals with reversible easily dissociating inhibitors may influence regulatory properties of MAO B.

**Key words:** monoamine oxidase B, isatin, himantane, brain