

УДК577.352.46

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ФЕНИЛПИРИДИНА И 4,4'-ДИПИРИДИЛА НА ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ ДОФАМИНА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА МЫШЕЙ

Соляков Л.С., Петрова Л.Н., Калашников В.В.,
Ткаченко С.Е., Бачурин С.О.

*Институт физиологически активных веществ
АН СССР, Черноголовка*

Недавно было установлено, что 1-метил-4-фенилтетрагидропиридин (МФТП) — побочный продукт химического синтеза аналога опиата мепиридина способен вызывать у людей и приматов клинические симптомы и биохимические изменения в мозгу, характерные для случаев заболевания паркинсонизмом [1]. Возможность получения экспериментальной модели паркинсонизма путем воздействия относительно простого химического соединения на лабораторных животных (мыши и приматы) привлекает пристальное внимание к изучению механизма действия МФТП и структурно близких ему веществ. К настоящему времени считается установленным, что нейротоксическим действием обладает не сам МФТП, а продукт его метаболизма — 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП), образующийся в астроцитах под действием МАО типа Б [2]. В результате последующих процессов МФП транспортируется системой обратного захвата дофамина (ДА) в ДА-ергические нейроны, где депонируется в виде комплекса с нейромеланином [3]. Одной из главных причин, лежащих в основе дегенеративных процессов, развивающихся в ДА-ергических нейронах, считают ингибирование МФП окислительного фосфорилирования, приводящего к нарушению метаболического баланса клеток [4]. Взаимодействие с системой обратного захвата ДА представляется, таким образом, как ключевой этап, обеспечивающий высокую селективность действия в отношении ДА-ергических нейронов МФП, а также его возможных эндогенных и экзогенных аналогов.

В настоящей работе нами были исследованы структурно-функциональные закономерности взаимодействия системы обратного захвата ДА с близкими структурными аналогами МФП в ряду N-замещенных 4-фенилпиридинов (ФП) и 4,4'-дипиридилов (ДП), которые рассматриваются в последние годы в качестве возможного экологотоксического фактора, способствующего развитию паркинсонизма у людей [5].

Работа была проведена на Р₂-фракции синапсом, полученных по методу Najos [6] из мозга мышей. Обратный захват ДА проводили в растворе Кребса-Хенселейта следующего состава (в mM): NaCl — 132,

KCl — 5; MgCl₂ — 1,2, CaCl₂ — 1,2, глюкоза — 10, HEPES — 5, в который вносили аскорбиновую кислоту (1мМ), ниазамид (12,5 мкМ) и ЭДТА (70 мкМ) с целью предотвращения неспецифического окисления ДА [7]. Концентрацию [¹⁴C]ДА в инкубационном растворе варьировали в интервале 0,1—2,0 мкМ. Для определения неспецифического захвата [¹⁴C]ДА синапсосомами параллельно проводили контрольные эксперименты, в которых инкубационная среда содержала LiCl вместо NaCl. Каждая проба ставилась в трех параллелях, а каждый препарат исследовался в 2—3-х независимых экспериментах. Конечный результат выражался графически в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, значения K_m определяли из графика зависимости K_m от [I]. Значения IC₅₀ определяли при конечной концентрации [¹⁴C]ДА, равной 5 · 10⁻⁸ М. Концентрацию препаратов подбирали таким образом, чтобы ингибирование обратного захвата [¹⁴C]ДА составляло от 20 до 80%, по отношению к контролю. Все вещества, приведенные в таблице, кроме соединения УП («Sigma», США), были синтезированы в ИФАВ АН СССР.

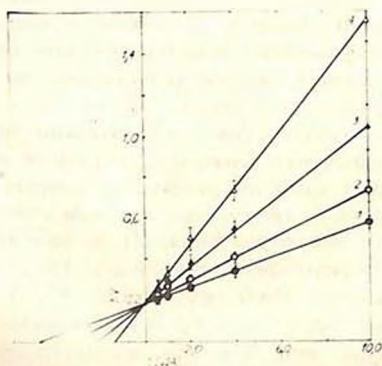
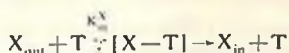
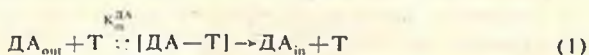


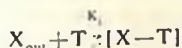
Рис. Ингибирование обратного захвата [¹⁴C]ДА синапсосомами мозга мышей 1-метил-4-фенилпиридином. Захват [¹⁴C]ДА в отсутствие 1-метил-4-фенилпиридина (1), в присутствии 1-метил-4-фенилпиридина: 0,1 мкМ (2); 0,5 мкМ (3); 1,0 мкМ (4). Каждая точка получена как результат 2—3 независимых экспериментов, проведенных в 3-х параллелях. Кривые представлены в координатах Лайнуивера-Берка. Аналогичные по характеру зависимости были получены для всех исследованных соединений. По оси абсцисс — 1/[ДА], мкМ; по оси ординат — 1/V, пмоль · мг белка · мин.

Одним из важнейших этапов в механизме нейротоксичности МФТП и его метаболитов, во многом определяющем высокую избирательность действия этого соединения в отношении ДА-ергических нейронов ЦНС, является взаимодействие с системой обратного захвата ДА. Исследование обратного захвата радиоактивно меченных препаратов показало, что МФТП практически не транспортируется в изолированные нервные окончания. В отличие от МФТП, его метаболит МФП активно захватывается синапсосомами мозга. Имеющиеся в литературе данные [8, 9] по взаимному конкурентному ингибированию меченых ДА и МФП указывают на

практически полное совпадение соответствующих параметров: для ДА $K_m^{DA} = 150 \pm 15 \text{ нМ}$, а $K_i^{МФП} = 160 \pm 16 \text{ нМ}$; для МФП $K_m^{МФП} = 170 \pm 17 \text{ нМ}$, $K_i^{DA} = 140 \pm 14 \text{ нМ}$. Это дает основание рассмотреть в качестве наиболее общей следующую кинетическую схему процесса:



а также с учетом возможности «непродуктивного» связывания:



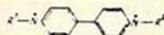
где T — транспортная система, а X — вещество (в данном случае МФП), взаимодействующее с этой транспортной системой. Зависимость Михаэлиса-Ментен при этом описывается уравнением:

$$V = \frac{V_{max} [DA]}{[DA] + K_{m(sax.)}} \quad (2),$$

$$\text{где } K_{m(sax.)} = K_m^{DA} + K_m^{DA} \frac{[X]}{K_i^{DA}} \quad (3), K_i^{DA} = \left(\frac{1}{K_i} + \frac{1}{K_m} \right)^{-1} \quad (4).$$

Таблица

Ингибирование обратного захвата [3 C]ДА в синапсомы мозга мышей производными 4-фенилпиридина и 4,4'-дипиридина.



№	R	R	$K_{eff}, \text{мкМ}$	№	R	R	$K_{eff}, \text{мкМ}$
I	Ph		$81,3 \pm 4,3$	VI		CH ₃	$19,65 \pm 1,38$
II	Ph	CH ₃	$0,37 \pm 0,04$	VII	CH ₃	CH ₃	$28,30 \pm 2,10$
III	Ph	C ₂ H ₅	$2,42 \pm 0,18$	VIII	CH ₃ Ph	CH ₃ Ph	$4,76 \pm 0,34$
IV	Ph	CH ₃ Ph	$9,86 \pm 2,70$				
V	H	CH ₃ Ph	$8,42 \pm 2,8$				

Очевидно, что если процесс «непродуктивного» связывания препарата X характеризуется значительно более низкой аффинностью по сравнению с процессом собственного транспорта ($K_i^X \gg K_m^X$), то значение экспериментально определенной эффективной величины K_i обратного захвата [3 C]ДА будет соответствовать значению константы Михаэлиса процесса собственного транспорта, то есть $K_{i\text{эфф.}}^{DA} \approx K_m^X$ (5), что и отмечается в случае МФП и ДА. Таким образом, проведенный кинетический анализ подтверждает, что захват МФП первыми окончаниями осуществляется специфической системой обратного захвата ДА и может быть адекватно описан схемой (1) и уравнениями (2) — (5). С целью выяснения специфичности системы обратного транспорта ДА к соединениям, структурно близким МФП, нами было исследовано ингибирование обратного захвата ДА рядом пиридиновых производных, имеющих различие в заместителях в 1 и 4 положениях, а также их 4,4'-дипиридиновых аналогов. Результаты исследования представлены в таблице. Установлено, что все исследованные соединения обратимо и конкурентно ингибируют обратный захват ДА (рисунок). Наиболее

сильным ингибитором является МФП, значение K_i для которого близко к соответствующей величине для ДА. Для N-замещенных производных ФП (таблица, соединения II—IV) ингибирующая активность уменьшается с увеличением липофильности соединений, что согласуется с имеющимися в литературе данными об обратной взаимосвязи между липофильностью и аффинностью соединений в отношении переносчиков биогенных аминов [10]. Близкая по характеру закономерность была показана ранее и в отношении производных МФТП, имеющих разные заместители по атому азота [11]. Очень низкая ингибирующая способность ФП (таблица, соединение I) объясняется, по-видимому, тем, что в условиях эксперимента при pH 7,4 атом азота в пиридиальном фрагменте практически не протонирован ($pK_{\text{Фп}}=5,5$) [12], в то время как система обратного захвата ДА высоко специфична в отношении моноаминов, которые при pH 7,4 содержат протонированную аминогруппу (pK_a около 10) [13]. В ряду производных ДП сродство к переносчику ДА менее выражено и фактически не зависит от липофильности соединений. При этом соединения, содержащие общий структурный элемент — 1-бензилпиридиный, характеризуются близкими значениями K_i (таблица, соединения IV, V, VIII), которые не зависят от природы заместителя в 4-м положении пиридинового кольца. Таким образом, в целом система обратного захвата ДА проявляет значительно более высокую степень избирательности в отношении N-алкилзамещенных производных ФП, которые можно рассматривать как циклические аналоги биогенных аминов, по сравнению с соответствующими дипиридиловыми аналогами, что может также свидетельствовать о различных механизмах взаимодействия с системой переносчика ДА данных рядов соединений. Хотя в настоящей работе исследовалось лишь ингибирование обратного захвата ДА рядом аналогов МФП, представляется целесообразным сделать некоторые предположения относительно возможности их собственного транспорта в нервные терминалы через эту транспортную систему. Используемые нами соединения являются гомологами или близкими структурными аналогами МФП и все они конкурентно и обратимо ингибируют обратный захват ДА в синапсомы. Это дает основание считать, что данные соединения взаимодействуют с переносчиком ДА по схеме (1) с учетом возможности «непродуктивного» связывания. В этом случае кинетика транспорта соединений в нервные окончания должна описываться уравнениями (2) — (4). Из уравнения (4) следует, что $K_m^x \geq K_i^{\text{эфф}}$, то есть в условиях реализации данного механизма значения констант Михаэлиса собственного транспорта исследованных соединений могут только превышать наблюдаемые величины кажущейся константы K_i обратного захвата ДА. Таким образом, для всех изученных соединений процесс транспорта в нервные терминалы системой обратного захвата ДА будет осуществляться со значительно меньшим сродством к переносчику, чем в случае МФП. Ранее подобное соотношение было показано для МФТП, который практически не захватывается в синапсомы (менее 5% от захвата МФП), а его ингибирующее действие почти на порядок слабее чем у МФП как по нашим данным (для МФП $IC_{50}=6,3 \cdot 10^{-7}$, для МФТИ $IC_{50}=4 \cdot 10^{-6}$), так и по данным других авторов [11].

EFFECT OF NEUROACTIVE DERIVATIVES OF 4-PHENYLPYRIDINE AND 4,4'-BIPYRIDINE UPON DOPAMINE UPTAKE BY MICE SYNAPTOSOMES

Soljakov L.S., Petrova L.N., Kalashnikov V.V.,
Tkachenko S.E., Bachurin S.O.

*Institute of Physiologically Active Substances, USSR
Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region*

The effect of neuroactive derivatives of 4-phenylpyridine (PP) and 4,4'-bipyridine (BP) upon the murine dopamine (DA) uptake system was studied. All compounds were reversible competitive inhibitors of [14 C]DA uptake. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (an agent provoking clinical symptoms of Parkinson disease in humans and laboratory animals) had the highest specificity toward the DA-transport system ($K_i=0,37\pm0,04$ mM). The inhibitory capacity of a series of N-substituted PP was inversely proportional to their lipophilicity. DA transporter had higher affinity to PP-derivatives as compared to BP-derivatives. Analysis of reciprocal competitive inhibition of DA and MPP uptake was used to formulate a kinetic model of DA-transporter interaction with these compounds. We also estimated the potential of MPP structural analogues uptake by nerve endings.

ЛИТЕРАТУРА

1. Langston J. W., Ballard R., Tetrud J. W., Irwin I. Science, v. 219, p. 979-980, 1983.
2. Markey S. P., Johannessen J. N., Chiueh C. C., Burns R. S., Herkenham M. A. Nature, v. 311, p. 464-467, 1984.
3. D'Amato R. J., Alexander G. M., Schwartzman R. J., Kitt C. A., Price D. L., Snyder S. H. Nature, v. 327, p. 324-326, 1987.
4. Singer T. P., Castagnoli N., Ramsay R. R., Trevor A. J. J. Neurochem., v. 49, p. 1-8, 1987.
5. Lewin R. Science, v. 229, p. 257-258, 1985.
6. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485-489, 1975.
7. Жариков С.И., Жарикова А.Д., Буданцев А.Ю. Докл. АН СССР, т. 292, с. 1494-1497, 1987.
8. Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittmatter S. M., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 82, p. 2173-2177, 1985.
9. Chiba K., Trevor A. J., Castagnoli N. Jr. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 128, p. 1228-1232, 1985.
10. Ross S. B. TIPS, v. 8, p. 227-321, 1987.
11. Heikkila R. E., Youngster S. K., Manzino L., Cabbat F. S., Duvoisin R. C. J. Neurochem., v. 44, p. 310-313, 1985.
12. Katritzky A. R. Handbook of Heterocyclic Chemistry. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt, Pergamon Press, p. 153, 1985.
13. Mc Ewen C. M., Jr., Sasaki G., Jones D. C. Biochemistry, v. 8, p. 3952-3962, 1969.

Поступила 16.12.1988