



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006142767/15, 04.12.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.12.2006

(45) Опубликовано: 20.05.2008 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Kim MS et. al., *Neuroprotective effect
of Ginkgo biloba L. extract in a rat model
model of Parkinsones disease* // *Phytother
Res*, 2004 Aug., 18(8): 663-6, PubMed,
реферат, PMID: 15472919. RU 2176145 C2,
27.11.2001. RU 2174003 C1, 27.09.2001.

Адрес для переписки:

119034, Москва, Пречистенский пер., 14,
стр.1, 4 этаж, "Гоулингз Интернэшнл Инк.",
В.Н.Дементьеву

(72) Автор(ы):

Ковалев Георгий Иванович (RU),
Абаимов Денис Александрович (RU),
Фирстова Юлия Юрьевна (RU),
Балакшин Владимир Владимирович (RU),
Чистяков Алексей Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Березовый мир" (RU)

(54) СРЕДСТВО ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической
промышленности, в частности к средству для
профилактики и лечения болезни Паркинсона.
Применение экстракта бересты с определенным

содержанием бетулина для профилактики и
лечения болезни Паркинсона. Вышеописанный
экстракт бересты эффективен для профилактики и
лечения болезни Паркинсона. 19 ил., 7 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 324 492** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006142767/15, 04.12.2006**

(24) Effective date for property rights: **04.12.2006**

(45) Date of publication: **20.05.2008 Bull. 14**

Mail address:

**119034, Moskva, Prechistsenskij per., 14,
str.1, 4 ehtazh, "Goulingz Internehshnl
Ink.", V.N.Dement'evu**

(72) Inventor(s):

**Kovalev Georgij Ivanovich (RU),
Abaimov Denis Aleksandrovich (RU),
Firstova Julija Jur'evna (RU),
Balakshin Vladimir Vladimirovich (RU),
Chistjakov Aleksej Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Berezovyj mir" (RU)**

(54) **AGENT FOR TREATMENT AND PREVENTION OF PARKINSON'S DISEASE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: extract of the birch bark
containing the specific amount of betulin is used

in prevention and treatment of Parkinson's disease.

EFFECT: extract of birch bark is efficient for
prevention and treatment of Parkinson's disease.
19 dwg, 7 tbl

R U 2 3 2 4 4 9 2 C 1

R U 2 3 2 4 4 9 2 C 1

Область техники

Изобретение относится к области медицины. Более конкретно оно относится к изысканию новых средств для профилактики и лечения болезни Паркинсона.

Уровень техники

5 Болезнь Паркинсона - хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание центральной нервной системы, клинически проявляющееся нарушением произвольных движений.

Болезнь Паркинсона относится к первичному, или идиопатическому, паркинсонизму. Различают также вторичный паркинсонизм, который может быть обусловлен различными
10 причинами, например энцефалитом, избыточным приемом лекарственных препаратов, атеросклерозом сосудов головного мозга. Понятие "паркинсонизм" применяется к любому синдрому, при котором наблюдаются характерные для болезни Паркинсона неврологические нарушения.

В России, по разным данным, насчитывается от 117000 до 338000 больных болезнью
15 Паркинсона. После деменции, эпилепсии и церебрососудистых заболеваний болезнь Паркинсона является наиболее частой проблемой пожилых людей, о чем свидетельствует ее распространенность в России (1996 год):

- 1.8:1000 в общей популяции
- 1.0:100 в популяции тех, кому за 70
- 20 - 1.0:50 в популяции тех, кому за 80

Происхождение болезни Паркинсона остается до конца не изученным, тем не менее в качестве причины заболевания рассматривается сочетание нескольких факторов:

- старение
- наследственность
- 25 - некоторые токсины и вещества.

Средний возраст начала болезни Паркинсона - 55 лет. В то же время у 10% больных заболевание наступает в молодом возрасте, до 40 лет. Заболеваемость паркинсонизмом не зависит от половой и расовой принадлежности, социального положения и места проживания. Предполагают, что с увеличением среднего возраста населения в ближайшие
30 годы распространенность болезни Паркинсона в популяции будет увеличиваться.

Лекарственная терапия болезни Паркинсона направлена на восполнение дефицита дофамина, развивающегося при болезни Паркинсона в результате гибели клеток мозга, а также на затормаживание прогрессирования болезни, или гибели нейронов мозга - нейропротекторная терапия.

35 Для фармакотерапии паркинсонизма применяют холинолитические средства, производные аминоксанта, ДОФА-содержащие средства, ингибиторы моноаминоксидазы (МАО) типа В, ингибиторы катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) и агонисты дофаминовых рецепторов.

Холинолитики

40 Эта группа препаратов начала применяться для лечения болезни Паркинсона более 100 лет назад, но и в настоящее время полностью не утратила свое значение. В клинической практике холинолитические препараты используют как изолированно, так и в сочетании с другими антипаркинсоническими средствами, однако в последние годы преобладает достаточно сдержанное отношение к их применению вследствие относительно низкой
45 эффективности и широкого круга побочных эффектов. Холинолитические препараты не восполняют дефицита дофамина и не останавливают прогрессирование заболевания, а лишь угнетают повышение активности холинергических систем. Применение этих препаратов показано в начальных стадиях заболевания и при индивидуальной клинически выявляемой положительной динамике. Препараты этой группы противопоказаны при
50 глаукоме, аденоме предстательной железы, интеллектуально-мнестических нарушениях.

Холинолитические препараты оказывают наибольшее влияние на ригидность и вегетативные проявления паркинсонизма. Лишь некоторые из них эффективны в отношении тремора.

К числу широко используемых холинолитических препаратов относят циклодол, бипериден.

Производные амантадина

Существует несколько предположений относительно механизма действия амантадина и его аналогов. Препараты этой группы оказывают мягкое антихолинергическое действие и угнетают обратный захват дофамина, а также дают амфетаминоподобный эффект, способствуя высвобождению дофамина из пресинаптических терминалей. В последние годы было установлено, что амантадин действует как антагонист NMDA-рецепторов, что с учетом доказанных нарушений глутаматергической нейротрансмиссии при болезни Паркинсона и ее значении в изменении кортикостриарных, таламокортикальных и других взаимосвязей также является одним из возможных механизмов действия препаратов этой группы.

Амантадины достаточно эффективны при ригидных и акинетических формах меньшее влияние оказывают на тремор. Отличительной их особенностью являются малая токсичность, редкие побочные эффекты, практически отсутствие противопоказаний, однако в целом эффективность этих препаратов невысока и улучшение состояния наблюдается не более чем у половины больных (Walker и соавт., 1972). К числу побочных эффектов обычно относят головокружение, сухость во рту, беспокойство, зрительные галлюцинации. Препараты этой группы не следует применять больным пожилого возраста с интеллектуально-мнестическими нарушениями.

К числу препаратов этой группы относят амантадина гидрохлорид и сульфат.

Дофа - содержащие препараты

Роль дофамина, как возможного основного терапевтического средства при лечении болезни Паркинсона, изучается с 50-х годов, когда Carlsson отметил, что симптомы паркинсонизма вызываются резерпином. В последующие годы было установлено уменьшение содержания дофамина в стриатуме при болезни Паркинсона (Ehringer, Hornykiewicz, 1960), что привело к появлению значительного количества дофаминсодержащих препаратов, составляющих и сейчас "золотой стандарт" терапии болезни Паркинсона.

Дофамин не проходит через гематоэнцефалический барьер. Поэтому для заместительной терапии применяют метаболитический предшественник дофамина леводопу (L-диоксифенилаланин), которая проходит через гематоэнцефалический барьер и в дофаминергических нейронах под действием церебральной ДОФА-декарбоксилазы (ДДК) превращается в дофамин (N.Quin, 1987).

Одна таблетка "чистой" леводопы содержит 250 или 500 мг активного вещества; максимальная суточная доза 3 г. Однако в силу особенностей метаболизма L-ДОФА, который подвергается "преждевременным" биохимическим превращениям вне мозга посредством декарбоксилирования, трансаминирования и метилирования, чистую леводопу в настоящее время практически не применяют.

Патогенетически оправданной и поэтому широко распространенной в мире является комбинация леводопы с ингибиторами периферической L-ДДК карбидопой или бензеразидом. Это позволяет уменьшить дозу и увеличить длительность действия препарата (В.Н.Шток, 1995; В.Н.Голубев и соавт., 1999, N.Quinn, C.Olanow, 1996). Наиболее часто применяемые препараты этой группы - мадопар (леводопа / бензеразид в соотношении 4:1), наком (леводопа / карбидопа - 10:1), синемет (леводопа / карбидопа - 10:1).

Побочные эффекты леводопы проявляются в трех сферах: в вегетативной нервной системе (тошнота, рвота, ортостатическая гипотония, тахикардия), моторной системе (дискинезии, клинические флюктуации), психической сфере (беспокойство, возбуждение, галлюцинации, депрессии с опасностью суицида), кроме того, отмечено тератогенное действие препарата. Необходимо соблюдать осторожность при одновременном применении других лекарственных средств, которые могут усилить лечебные и побочные эффекты леводопы (агонисты адренорецепторов, трициклические антидепрессанты) или,

наоборот, ослабить их (витамин В6, нейролептики, резерпин, метилдофа).

Ингибиторы МАО (В)

Ингибиторы МАО (В) по своему фармакологическому действию препятствуют метаболизму образовавшегося дофамина по пути окислительного дезаминирования с превращением его в конечном итоге в гомованилиновую кислоту. Показано, что селегилин также ингибирует обратный захват дофамина. Ингибиторы МАО увеличивают, таким образом, содержание дофамина в мозговой ткани, предотвращая его распад. Кроме того, имеются данные об антиоксидантном действии ингибиторов МАО (В), их нейропротекторной способности, что оправдывает применение селегилина на ранних стадиях паркинсонизма (J.Knoll, 1996; Myllyla и соавт., 1992).

Более эффективной по действию, особенно на поздних стадиях, является комбинация ингибиторов МАО (В) с ДОФА-содержащими препаратами, что позволяет существенно уменьшить дозу L-ДОФА, а значит и выраженность побочных эффектов.

Агонисты дофаминовых рецепторов

Важным и перспективным направлением стал поиск лекарственных средств, способных действовать "в обход" дегенерирующего нейрона, минуя пресинаптическую его часть, непосредственно на дофаминовые рецепторы. Так появился новый класс противопаркинсонических препаратов - агонисты дофаминовых рецепторов.

Агонисты дофаминовых рецепторов показаны как монотерапия на ранних стадиях болезни и в более поздние сроки в сочетании с препаратами леводопы. На ранних стадиях заболевания эффективность агонистов дофамина сравнима с таковой препаратами леводопы. Однако через несколько лет эффективность лечения агонистами дофамина уменьшается и появляется необходимость присоединения препаратов леводопы. В литературе широко обсуждается вопрос о том, насколько применение агонистов дофаминовых рецепторов позволяет отсрочить развитие осложнений при применении препаратов L-DOPA.

У больных с умеренно или значительно выраженными признаками заболевания присоединение агонистов дофамина к препаратам леводопы позволяет во многих случаях увеличить эффективность лечения и снизить выраженность моторных флуктуаций. (A.Lieberman и соавт., 1983; C.Goetz и соавт., 1985; R.McDonald, R.Horowski, 1983; Y.Mizuno и соавт., 1995).

Побочными эффектами агонистов дофамина являются тошнота, рвота, ортостатическая гипотензия, что вызвано стимуляцией периферических дофаминергических рецепторов. К числу побочных эффектов, обусловленных влиянием на центральные дофаминергические рецепторы, относят галлюцинации, ночные кошмары, изменения высших психических функций. У части больных наблюдаются запоры.

В настоящее время накоплен значительный опыт по применению эрголиновых агонистов дофаминовых рецепторов (бромокриптин, перголида, лизурида).

Ингибиторы КОМТ

Одним из перспективных и значительных достижений за последние годы стало открытие принципиально нового, высокоэффективного класса антипаркинсонических препаратов - ингибиторов КОМТ. КОМТ - один из основных ферментов, обеспечивающих метаболизм леводопы, дофамина, других катехоламинов и их метаболитов. КОМТ является достаточно распространенным ферментом, присутствует в различных отделах организма, включая нейроны и глию, за исключением нигростриарных дофаминергических нейронов (A.Kastner и соавт., 1994). Периферические ингибиторы КОМТ снижают метаболизм леводопы и увеличивают тем самым ее содержание в стриатуме.

Следует отметить, что препараты, являющиеся как центральными, так и периферическими ингибиторами КОМТ (толкапон), по мнению большинства авторов, дают значительно более выраженные побочные эффекты (K.Holm, C.Spencer, 1999). В настоящее время целесообразность применения толкапона обсуждается.

Сущность изобретения

Несмотря на достаточно широкий спектр реально применяемых и находящихся в стадии

исследования препаратов для терапии болезни Паркинсона, продолжает оставаться актуальной задача отыскания новых средств этого назначения, что обусловлено не только недостаточной эффективностью известных средств, но и их побочными эффектами. Именно на решение этой задачи и направлено настоящее изобретение.

5 Сущность его заключается в неожиданно обнаруженной авторами изобретения возможности применения для профилактики и лечения болезни Паркинсона и, соответственно, для изготовления лекарственных средств данного назначения экстракта бересты верхней белой части коры березы. Экстракт представляет собой совокупность соединений тритерпенового ряда, с преобладанием (до 70%) бетулина (бетулинола).

10 Раскрытие изобретения

В ранее проведенных авторами настоящего изобретения исследованиях экстракта бересты (заявка на изобретение РФ №2005138574) было обнаружено, что в поведенческих тестах общего и направленного скрининга на мышах препарат демонстрирует психотропное действие, профиль которого можно охарактеризовать как проявление

15 дофамин-позитивной активности, в частности, в связи с тем, что:

1. экстракт в дозе 50 мг/кг увеличивает горизонтальную двигательную активность в актометре Ugo Basile;

2. экстракт усиливает тимолептический эффект антидепрессанта Пиразидола при сочетанном введении в тесте «отчаяния»;

20 3. экстракт вызывает ноотропный эффект в тестах «крестообразный лабиринт» и «условный рефлекс пассивного избегания».

Кроме того, другими исследователями были получены экспериментальные свидетельства в пользу антиоксидантных свойств экстракта бересты.

Совокупность вышеупомянутых экспериментальных данных позволила выдвинуть
25 предположение, что сочетание описанных свойств соответствует требованиям, которые можно предъявить к препарату с противопаркинсоническим потенциалом (Tillerson J.L, Caudle W.M., Reveron M.E., Miller G.W. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Exp. Neurol., 2002, 178:80-90).

30 Дальнейшие исследования, проведение комплекса экспериментов с применением стандартных поведенческих и фармакологических тестов, рекомендованных для обнаружения противопаркинсонической активности (Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению антипаркинсонической активности фармакологических веществ. В кн.: «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», Москва, 2000, 147-152), сущность и
35 результаты которых изложены далее, подтвердили это предположение.

Исследования проводились с использованием «Бересты экстракта сухого» (БЭС), производимого ООО «Березовый мир», Россия, г.Москва и используемого для изготовления биологически активных добавок. Опыты были проведены на 196 мышах-самцах линии C57/Bl с массой 20-25 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартной диете.

БЭС вводили мышам за 1,5 часа до тестирования с помощью зонда внутрижелудочно в форме суспензии в 1%-ном растворе картофельного крахмала в дозе 50 мг/кг веса животных. Мышам контрольных групп вводили эквивалентные объемы 1%-ного крахмала.

45 Результаты исследований отражены на чертежах, на которых изображены:

фиг.1 - Влияние БЭС на общее время каталепсии, вызванной галоперидолом.

фиг.2 - Влияние БЭС на латентный период тремора, вызванного Ареколином, через 90 мин после приема внутрь.

фиг.3 - Динамика влияния БЭС на латентный период начала тремора у мышей.

50 фиг.4 - Влияние БЭС на продолжительность ареколинового тремора у мышей.

фиг.5 - Влияние БЭС на продолжительность у мышей, вызванного Ареколином, через 90 мин после приема внутрь.

фиг.6 - Влияние 5-кратного предварительного введения БЭС (50 мг/кг/день) на

олигокинетический эффект МФТП (24 мг/кг) в актометре (**/* - достоверное отличие от гр.2).

фиг.7 - Влияние однократного введения БЭС (50 мг/кг, внутрь), Мидантана (20 мг/кг, в, б) и их комбинации на горизонтальную двигательную активность мышей C57Bl/6 в тесте «открытое поле» (среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднеквадратичного отклонения).

5 Фиг. 8 - Влияние однократного введения БЭС (50 мг/кг, внутрь), Мидантана (20 мг/кг, в, б) и их комбинации на двигательную активность мышей C57Bl/6 в актометре Ugo Basile (среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднеквадратичного отклонения).

Определение способности экстракта бересты (БЭС) изменять каталепсию, вызванную у мышей галоперидолом

10 Галоперидол является типичным нейролептиком - производным бутирофенона.

Действие его наступает быстро и продолжается длительное время. Механизм действия галоперидола связывают с блокадой дофаминовых рецепторов, центральным альфа-адреноблокирующим действием и нарушением процесса обратного нейронального захвата и депонирования катехоламинов. Наиболее частым побочным эффектом галоперидола являются экстрапирамидные расстройства.

15 В эксперименте было использовано 48 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте около 2-х месяцев (масса тела 18-23 г), распределенных случайным образом на 4 экспериментальные группы:

1. Перорально - 1% крахмал; в/б - физраствор (ФР);
- 20 2. Перорально - БЭС; в/б - ФР;
3. Перорально - 1% крахмал; в/б - 1 мг/кг галоперидол;
4. Перорально - БЭС; в/б - 1 мг/кг галоперидол.

Длительность каталептического состояния каждой мыши фиксировали в течение 2 мин сессий через 30, 60 и 90 мин после введения галоперидола. Суспензию БЭС вводили с помощью внутрижелудочного зонда внутрь за 1,5 часа до инъекции нейролептика.

25 Результаты статистической обработки данных по группам представлены на фиг.1.

Статистически значимый эффект каталепсии развивался к 90 минуте после введения нейролептика (диаграмма справа), занимая 112 секунд из 120-секундной сессии ($p < 0.02$). Действие самого БЭС после приема внутрь в дозе 50 мг/кг не отличалось от эффекта плацебо, однако существенно (более чем вдвое, $p < 0.05$) снижало продолжительность каталепсии, индуцированной галоперидолом.

Следовательно, БЭС в данных условиях эксперимента проявляет дофамин-позитивную активность, противодействуя эффекту блокатора ДА-рецепторов галоперидола.

35 Определение способности экстракта бересты (БЭС) влиять на тремор, вызванный ареколином у мышей.

Ацетилхолин (АХ) является нейромедиатором многочисленных интернейронов хвостатого ядра, и именно в этой структуре наблюдается наибольшая концентрация АХ (Guttman M., Kish S.J., Furukawa Y. Current concepts in the diagnosis and management of Parkinson's disease. CMAJ, 2003, 168 (3), 293-301). Холинергическая модель паркинсонического синдрома воспроизводится первичной активацией холинергических нейронов хвостатого ядра системным введением ареколина или оксотреморина. В данном опыте использовали агонист м-холинорецепторов ареколин в стандартной треморогенной дозе 25 мг/кг, подкожно.

45 В эксперименте было использовано 24 самца мышей линии C57BL/6 в возрасте около 2-х месяцев (масса тела 18-23 г), распределенных случайным образом на 2 экспериментальные группы:

1. Перорально - 1% крахмал; п/к - 25 мг/кг ареколин;
2. Перорально - БЭС; п/к - 25 мг/кг ареколин.

Суспензию БЭС (50 мг/кг) вводили в соответствии с протоколом, представленным выше.

50 Через 30, 60, 90, 120 и 150 минут после введения ареколина у мышей регистрировали: а), латентный период начала тремора (сек); б), продолжительность тремора (сек).

Результаты статистической обработки данных представлены на фиг.2, 3, 4 и 5.

Обнаружено, что введение ареколина на фоне плацебо приводит к началу тремора на 33

сек, тогда как то же на фоне 50 мг/кг БЭС отставляет начало тремора до 73 сек (фиг.2; $p < 0.00000$).

Причем величина латентного периода под действием БЭС возрастает в течение 2-х часов после введения ареколина, после чего начинает снижаться (фиг.3).

5 Динамика продолжительности ареколинового тремора после введения БЭС представлена на фиг.4, из которого следует, что действие экстракта приводит к уменьшению длительности вплоть до полутора часов после введения ареколина. В более поздние периоды наблюдения (2 и 2,5 ч) эффективность БЭС исчезает.

10 Таким образом, максимум эффективности действия на продолжительность тремора, вызванного ареколином, приходится на 90 мин ($F(1, 22) = 4.9959$ при $p = 0.03588$) (фиг.5).

Таким образом, БЭС демонстрирует наличие холинолитических свойств, проявляющихся в снижении латентного периода и длительности ареколинового тремора.

15 Определение способности экстракта бересты (БЭС) влиять на снижение двигательной активности мышей в актометре Ugo Basils и «открытом поле», на модели паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП в режиме профилактического применения БЭС

20 Модель паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина МФТП (4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина), является наиболее адекватной моделью паркинсонизма, поскольку МФТП избирательно повреждает дофаминергические нейроны черной субстанции. Токсин под действием МАО-В в астроцитах превращается в 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП+), который с помощью дофаминового транспортера захватывается ДА-ергическими нейронами. Эффекты МФТП обусловлены токсическим действием МФП+, вызывающим энергетическую недостаточность за счет ингибирования комплекса-1 митохондриальной дыхательной цепи. Этот эффект наиболее выражен у приматов, а у мышей - в линии C57Bl/6 (Feldman R.S., Meyer J.S., Quenzer L.F. Parkinson's disease and Alzheimer's disease. In: Principles of Neuropsychopharmacology, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts, 1997, 861-909).

25 Настоящий эксперимент был направлен на обнаружение предполагаемой анти-токсической активности БЭС, когда МФТП вводили однократно на фоне предварительного 5-кратного применения суспензии экстракта. В данном варианте опыта предполагалось оценить возможную «профилактическую» значимость БЭС.

30 В эксперименте было использовано 36 самцов мышей линии C57Bl/6. Суспензию БЭС вводили внутрь ежедневно в дозе 50 мг/кг /день в течение 5 суток. Токсин в дозе 25 мг/кг или плацебо вводили за 30 мин до начала 10-мин наблюдения за двигательной активностью в актометре Ugo Basile.

Животных случайным образом распределяли на 3 экспериментальные группы:

1. Внутрь - 1% крахмал 5-кратно; в/б - физраствор (ФР) 1-кратно;
2. Внутрь - 1% крахмал 5-кратно; в/б - МФТП 1-кратно;
3. Внутрь - БЭС 5-кратно; в/б - МФТП 1-кратно.

40 Общее поведение животных после введения БЭС или плацебо не обнаруживало существенных отличий от привычного. Однако после введения токсина у мышей наблюдались отклонения от нормальных вегетативных и поведенческих признаков: пилоэрекция, слюнотечение, ретропульсия, нарушение дыхания.

45 Статистически обработанные показатели горизонтальной двигательной активности, автоматически измеренной в актометре Ugo Basile за 10-мин сессию, представлены на фиг.6.

Полученные данные свидетельствуют, что введение БЭС мышам C57Bl/6 в течение 5 суток по 50 мг/кг в день приводит к восстановлению общего числа горизонтальных перемещений в актометре Ugo Basile за 10-мин сессию на 50% ($p < 0.01$), сниженного однократной инъекцией МФТП на 5-й день эксперимента.

Результат свидетельствует о наличии у экстракта защитных свойств против олигокинезии, вызываемой токсическим действием МФТП на ДА-ергические нейроны.

Определение способности экстракта бересты (БЭС) влиять на снижение двигательной

активности мышей в актометре и «открытом поле», на модели паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП в режиме лечебного действия БЭС

Настоящий эксперимент был направлен на обнаружение предполагаемой анитоксической активности БЭС на фоне двукратного предварительного применения МФТП. В данном варианте опыта предполагалось: а) оценить собственную анитоксическую активность БЭС; б) оценить способность экстракта модулировать эффект известного противопаркинсонического препарата Мидантана (Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.А. Фармакология адамантанов, Волгоград, 2001).

В эксперименте было использовано 88 самцов мышей линии С57В1/6. Токсин в дозе 30 мг/кг или плацебо вводили внутривентриально один раз в день в течение 2-х суток подряд. БЭС вводили на вторые сутки однократно в дозе 50 мг/кг за 1,5 часа до инъекции МФТП. Мидантан вводили однократно в дозе 20 мг/кг, в/б за 30 мин до введения токсина. Предварительно животных случайным образом распределяли на 5 экспериментальных групп:

Таблица 1		
Протокол эксперимента		
№ группы	1-й день	2-й день
1 (n=12)	Физраствор, в/б	Плацебо, внутрь Физраствор, в/б
2 (n=19)	МФТП, в/б	Плацебо, внутрь МФТП, в/б
3 (n=19)	МФТП, в/б	Мидантан, в/б МФТП, в/б
4 (n=19)	МФТП, в/б	БЭС, внутрь МФТП, в/б
5 (n=19)	МФТП, в/б	БЭС, внутрь Мидантан, в/б МФТП, в/б

Через 30 мин после второй инъекции МФТП у мышей последовательно оценивали поведение в актометре (5 мин) и в «открытом поле» (3 мин).

Через 30-40 мин после введения МФТП на второй день горизонтальная двигательная активность (число пересеченных квадратов) существенно уменьшалось с $101,17 \pm 6,74$ в группе 1 до $4,58 \pm 1,21$ в группе 2 ($p=0,000000$, t-критерий Стьюдента).

Результаты введения БЭС, мидантана и их комбинации на горизонтальную активность представлены на фиг.7. Видно, что острый эффект 50 мг/кг БЭС почти эквипотенциален действию препарата сравнения Мидантана (20 мг/кг): первый увеличивал число перемещений до 331% ($p=0,021$, t-критерий Стьюдента), а второй - до 327% ($p=0,008$, t-критерий Стьюдента) относительно этого показателя в группе с МФТП.

Эффективность использования их комбинации также отличалась от эффекта токсина - 413% ($p=0,007$, t-критерий Стьюдента), но статистической значимости от результатов влияния препаратов в отдельности не отмечено.

Аналогичные результаты были получены в случае измерения двигательной активности этих же групп мышей с использованием актометра (фиг.8):

Двукратное введение токсина приводило к падению числа перемещений с $234,8 \pm 32,2$ в группе 1 до $11,2 \pm 3,2$ в группе 2 ($p=0,000$; t-критерий Стьюдента). В свою очередь, острое применение БЭС, Мидантана и их комбинации частично восстанавливало индуцированный двигательный дефицит до 265% ($p=0,013$; t-критерий Стьюдента), 275% ($p=0,033$; t-критерий Стьюдента) и 311% ($p=0,040$; t-критерий Стьюдента) соответственно относительно значений группы 2, принятых за 100%.

Следует отметить, что под влиянием МФТП и препаратов изменялись не только количество перемещений, но и качественный состав двигательной активности: введение токсина также приводило к снижению вертикальной активности (стойки) и поисковой активности (заглядывание в отверстия) в тесте «открытое поле» с $31:1:1,7$ в группе 1 до $0,11 \pm 0,11$ в группе 2 ($p=0,000$; t-критерий Стьюдента) и с $5,3 \pm 0,1$ до $0,6 \pm 0,2$ ($p=0,000$; t-

критерий Стьюдента) соответственно.

Введение БЭС и его комбинации с Мидантаном частично, но статистически достоверно восстанавливало эти параметры локомоторной активности избирательно. Так, экстракт и комбинация увеличивали сниженный показатель «вертикальная активность» со статистической достоверностью 0,04 и 0,03 по критерию Манна-Уитни соответственно.

Таким образом, экспериментально подобранные условия позволили обнаружить в двух вариантах тестирования («открытое поле» и автоматический актометр Ugo Basile), что экстракт бересты в дозе 50 мг/кг при однократном введении внутрь обладает способностью частично, но статистически достоверно компенсировать локомоторный дефицит у самцов мышей C57Bl/6, вызванный двукратным введением токсина МФТП.

Данный эффект был количественно сопоставим с острым действием клинически распространенного противопаркинсонического препарата Мидантана (Амантадина), использованного во внутрибрюшинной дозе 20 мг/кг.

Комбинация упомянутых веществ также приводила к увеличению количества и улучшению структуры двигательной активности у мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом, несколько лучшими в сравнении с эффектами обоих препаратов в отдельности.

Целью дальнейшего исследования являлось проведение дальнейшего комплекса экспериментов *in vitro* и *ex vivo*, направленных на изучение предполагаемых дофамин-позитивных свойств БЭС с применением общепринятых нейрохимических подходов, характеризующих фармакодинамику специфических эффектов БЭС.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить возможность взаимодействия БЭС с рецепторами дофамина, серотонина, глутамата и ацетилхолина с использованием мембранных препаратов и меченных по тритию лигандов названных рецепторов.

2. Изучить влияние БЭС на функциональные показатели пресинаптической активности: синапсоматальный захват, биосинтез и секрецию дофамина, а также метаболизм дофамина и серотонина в гомогенатах компетентных структур мозга мышей и крыс.

Материалы и животные

Опыты были проведены на мышах-самцах линии C57/Bl с массой 20-25 г и крысах-самцах Вистар с массой 180-200 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартной диете.

В экспериментах *ex vivo* БЭС вводили животным за 1,5-2 часа до декапитации с помощью зонда внутрь в форме суспензии в 1%-ном растворе картофельного крахмала в дозе 50 мг/кг. Особям контрольных групп вводили эквивалентные объемы 1%-ного крахмала.

Результаты исследований

Эксперимент 1. Изучение влияния БЭС на специфическое связывание с рецепторами нейромедиаторов в структурах мозга крыс

Постановка данной серии экспериментов преследовала 2 цели: (1) изучить, не являются ли рецепторы основных нейромедиаторов мозга возможными молекулярными мишенями для первичного (прямого) фармакологического действия БЭС - в условиях *in vitro*; и (2) изучить, не оказывает ли системное введение БЭС существенного косвенного воздействия на рецепторные характеристики через 2 и 24 часа - в условиях *ex vivo*.

Степень возможного сродства экстракта к рецепторам в экспериментах *in vitro* оценивали величиной IC50, равной концентрации БЭС, ингибирующей связывание радиолиганда на 50%.

Возможные динамические изменения рецепторов под влиянием БЭС в экспериментах *ex vivo* выражали в величинах B_{max} и K_d, отражающими количество связывающих мест и степень сродства к рецептору соответственно.

При изучении рецепторного связывания использовали следующие лиганды: для дофаминовых D1-, D2- и D3-подтипов в стриатуме - [G-³H]-SCH-23390, [G-³H]-спиперон, 7-OH-[G-³H]-DPAT соответственно; для серотониновых 5-HT₂-подтипа во фронтальной коре -

[G-³H]-кетансерин; для глутаматных NMDA-подтипа в гиппокампе - [3H-G](+)МК-801; для холинорецепторов никотинового подтипа в целом мозге - [3H-G]-(±)Никотин. Все меченые лиганды были получены методом твердофазного катализа в ОХВАБ ИМГ РАН (зав. - академик РАН Н.Ф.Мясоедов). Подбор конкретных лигандов осуществляли в соответствии с рекомендациями IUPHAR ("Guide to Receptors and Channels", S.P.H.Alexander, A.Mathie and J.A.Peters, BJP, v.147, Suppl.3, 2006).

1.1. Связывание с рецепторами дофамина in vitro.

а) Методика

Изучение радиорецепторного связывания с ДА-рецепторами проводили по методу Sun et al. (2003) с модификациями. Стриатумы крыс гомогенизировали в 10 мл ледяного (0-4°C) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7,4 при 4°C), используя гомогенизатор «тефлон-стекло». Полученную суспензию центрифугировали при 40000 g в течение 20 мин в ультрацентрифуге «Optima L-70K» (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 10 мл 50 mM Tris-HCl инкубационного буфера (pH 7,4 при 37°C) с добавлением солей (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂-2H₂O, 1 mM MgCl₂-6H₂O) [11] и использовали по 250 мкл в процедуре связывания [G-³H]-лигандов дофаминовых рецепторов. Полученную мембранную фракцию инкубировали с [G-³H]-SCH23390 (удельная активность 60 Ки/ммоль), [G-³H]-спипероном (95 Ки/ммоль), 7-ОН-[G-³H]-DPAT (120 Ки/ммоль). При связывании 7-ОН-[G-³H]-DPAT, с целью увеличения селективности к D3-рецепторам, из реакционной смеси исключали двухвалентные катионы и добавляли 1 mM Na₄EDTA.

[G-³H]-лиганд добавляли в инкубационную смесь в объеме 50 мкл в конечной концентрации 0.1 нМ и инкубировали в течение 20 мин при температуре 37°C с использованием твердотельного термостата «Термит» (НПО «ДНК-технология»). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда (20 мкМ), которое составляло 12-14% от общего. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием.

IC₅₀ по отношению к связыванию [G-³H]-лигандов определяли при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемых соединений в конечных концентрациях в диапазоне 10⁻³-10⁻⁸ М. Объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Процесс связывания останавливали путем добавления 2 мл ледяного 50 mM Tris-HCl буфера и быстрой фильтрации через стекловолокнистые фильтры типа GF/B (Whatman) с последующей промывкой ледяным буфером общим объемом 14 мл. Фильтры предварительно смачивали перед экспериментом в ледяном 50 mM Tris-HCl буфере в течение 3 часов.

Фильтры высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объемом 4 мл и использовали для сцинтилляционного счета. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счетчике Wallac 1411. Эффективность счета составляла 40-45%.

б) Результаты

D1-дофаминовые рецепторы. Концентрационная зависимость влияния БЭС на дофаминовые рецепторы D1-типа представлена на фиг.9.

Вывод: БЭС не обладает сродством к дофаминовым рецепторам D1-типа.

D2-дофаминовые рецепторы. Концентрационная зависимость влияния БЭС на дофаминовые рецепторы D2-типа представлена на фиг.10.

Показано, что влияние общепринятого антагониста этого типа рецептора Галоперидола описывается классической кривой (пунктир) и характеризуется величиной IC₅₀=0,57 мкмоль/л. Внесение БЭС не обнаруживает эффекта конкуренции за рецепторные места связывания вплоть до максимальной использованной концентрации 1 mM (сплошная кривая).

Вывод: БЭС не обладает сродством к дофаминовым рецепторам D2-типа.

D3-дофаминовые рецепторы. Концентрационная зависимость влияния БЭС (Бетулина) на дофаминовые рецепторы DS-типа представлена на фиг.11.

Влияние стандартного антагониста этого типа рецептора (+)-7-ОН-DPAT описывается классической кривой (пунктир) и характеризуется величиной $IC_{50}=14,6$ нмоль/л. Внесение БЭС не обнаружило эффекта конкуренции за рецепторные места связывания вплоть до максимальной использованной концентрации 1 мМ (сплошная кривая).

Вывод: БЭС не обладает сродством к дофаминовым рецепторам D3-типа.

1.2. Связывание с рецепторами серотонина *in vitro*

а) Методика

Изучение радиорецепторного связывания с 5-HT₂-рецепторами проводили по методу Sun et al. (2003), описанному для изучения D₂-рецепторов дофамина (см 1.1.) с тем исключением, что в исследование брали мембранные препараты фронтальной коры мозга, а в качестве специфического лиганда использовали [G-3H]-кетансерин с удельной радиоактивностью 60 кюри/ммоль.

б) Результаты

Серотониновые 5-HT₂-рецепторы

Концентрационная зависимость влияния БЭС на серотониновые рецепторы 5-HT₂-типа представлена на фиг.12.

Видно, что влияние стандартного антагониста этого типа рецептора кетансерина описывается классической кривой (пунктир) и характеризуется величиной $IC_{50}=0,70$ мкмоль/л. Внесение БЭС не обнаружило эффекта конкуренции за рецепторные места связывания вплоть до максимальной использованной концентрации 1 мМ (сплошная кривая).

Вывод: БЭС не обладает сродством к серотониновым рецепторам 5-HT₂-типа.

1.3. Связывание с NMDA-рецепторами *in vitro*.

а) Методика

Изучение связывания на NMDA-подтипах рецепторов производили согласно методу L.-M.Zhou et al. (1996) с модификациями. Использовали меченный тритием МК-801 (дизоцилпин) с удельной активностью 210 Кюри/моль. Ткань гиппокампа или мозжечка гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера («тефлон-стекло») в 10 объемах 5 мМ HEPES/4.5 мМ Трис буфера (pH 7.6), содержащего 0.32 М сахарозу (буфер №1). Гомогенат разбавляли до 50 объемов буфера для исследования №2 (5 мМ HEPES/4.5 мМ Трис буфера (pH 7.6) и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Супернатант отбирали и вновь центрифугировали 20 мин при 25000 g. Осадок гомогенизировали в 50 объемах буфера №2 и центрифугировали 20 мин при 8000 g. Супернатант и его мягкий, зыбкий надслой отбирали и центрифугировали 20 мин при 25000 g. Полученный осадок суспендировали в буфере №3 (5 мМ HEPES/4.5 мМ Трис буфера, содержащем 1 мМ Na₄EDTA (pH 7.6), и суспензию вновь центрифугировали. Такую процедуру отмывки проводили четырежды, причем при последней отмывке EDTA был исключен из состава. Конечный осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера №2 и сохраняли в жидком азоте. Реакционная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 200 мкл буфера №2, 50 мкл меченого лиганда (50 нМ р.р.) и 250 мкл белковой суспензии. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда.

Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолочные фильтры GF/B (Whatman), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 часов при 4°C. Каждую пробирку промывали один раз холодным буфером №2, затем фильтры промывали три раза тем же объемом буфера. Фильтры сушили на воздухе, до полного высыхания, и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной смеси, содержащей 4 г PPO, 0.2 г POPOP на 1 л толуола. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике Wallac 1411, с эффективностью счета около 45%.

б) Результаты

Глутаматные NMDA-рецепторы

Концентрационная зависимость влияния БЭС (Бетулина) на глутаматные рецепторы NMDA-типа представлена на фиг.13.

Видно, что влияние стандартного антагониста этого типа рецептора МК-801 (дизоцилпина) описывается классической кривой (сплошная) и характеризуется величиной $IC_{50}=7,3$ нмоль/л. Внесение БЭС (Бетулина) обнаруживает эффект конкуренции за рецепторные места связывания с $IC_{50}=8,5$ мкмоль/л.

Вывод: БЭС обладает микромолярным сродством к NMDA-рецепторам глутамата.

1.4. Связывание с н-холинорецепторами in vitro

а) Методика

Изучение радиорецепторного связывания с никотиновыми рецепторами проводили по методу (Michael et al., 1986) с модификациями. Конечный объем инкубационной смеси содержал 50 мкл $[^3H-G](\pm)$ Никотина, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран. Для определения неспецифического связывания добавляли немеченый никотин в диапазоне концентраций от 10^{-10} до 10^{-4} М. Пробирки термостатировали в шейкере-инкубаторе при $37^{\circ}C$ в течение 40 минут (Charles et al., 1997). Затем пробирки охлаждали во льду 20 минут (Regina et al., 2002). Фильтрацию проводили через фильтры GF/C, предварительно смоченные в течение суток в 0.3% растворе полиэтиленимина при $4^{\circ}C$ с последующей промывкой холодным буфером. Фильтры переносили в сцинтилляционные флаконы и добавляли по 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе диоксана. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «Wallac 1411» с эффективностью счета около 42%.

б) Результаты

Ацетилхолиновые рецепторы никотинового типа

Концентрационная зависимость влияния БЭС на н-холинорецепторы представлена на фиг.14.

Видно, что влияние стандартного антагониста этого типа рецептора - Никотина описывается классической кривой (сплошная) и характеризуется величиной $IC_{50}=13,4$ нмоль/л. Внесение БЭС (Бетулина) не обнаруживает эффекта конкуренции за рецепторные места связывания вплоть до 10^{-4} моль/л.

Вывод: БЭС не проявляет сродства к никотиновым холино-рецепторам.

2.1. Связывание с рецепторами дофамина ex vivo

Результаты изучения влияния однократного введения суспензии БЭС (50 мг/кг, внутрь) на константы рецепторного связывания меченого спироперидола через 2 и 24 часа в сравнении с эффектом плацебо представлены на фиг.15.

Из данных на чертеже следует, что введение БЭС приводит к уменьшению связывания меченого лиганда в стриатуме как через 2 часа, так и через сутки после инъекции. Причем изменения эти происходят не за счет уменьшения аффинитета к рецепторам дофамина (K_d), а благодаря индуцированному БЭС снижению числа мест связывания (B_{max}): через два часа их плотность падает с 904 фмоль/мг белка в контроле до 670 фмоль/мг белка, продолжая снижаться через 24 часа до 625 фмоль/мг белка.

Вывод: острое введение БЭС в дозе 50 мг/кг индуцирует постепенное уменьшение плотности D2-дофаминовых рецепторов в стриатуме крыс.

2.2 Связывание с рецепторами серотонина ex vivo

Результаты изучения влияния однократного введения суспензии БЭС (50 мг/кг, внутрь) на константы рецепторного связывания меченого кетансерина через 2 и 24 часа в сравнении с эффектом плацебо представлены на фиг.16.

Из данных на чертеже следует, что введение БЭС приводит к увеличению плотности серотониновых рецепторов в лобной коре через 2 часа со 106 фмоль/мг белка до 164 фмоль/мг белка, тогда как через сутки происходит некоторое уменьшение этого показателя (130 фмоль/мг белка), не достигающее, впрочем, значений при плацебо. Обращает на себя внимание и наблюдаемое через 2 часа после введения БЭС снижение

аффинитета лиганда к рецептору с 5 до 8 нМ, исчезающее через сутки (5,9 нМ).

Вывод: острое введение БЭС в дозе 50 мг/кг индуцирует преходящее увеличение связывания с рецепторами серотонина в коре мозга.

2.3 Связывание с NMDA-рецепторами глутамата *ex vivo*

5 Результаты изучения влияния однократного введения суспензии БЭС (50 мг/кг, внутрь) на константы рецепторного связывания меченого МК-801 через 2 и 24 часа в сравнении с эффектом плацебо представлены на фиг.17.

10 Из представленных данных следует, что введение 50 мг/кг БЭС приводит к существенному увеличению плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе крыс через 24 часа с 3154 фмоль/мг белка до 8276 фмоль/мг белка без изменения аффинитета. Вместе с тем, через 2 часа после введения БЭС отмечается и транзитное ухудшение сродства к рецепторам на 22%.

Вывод: острое введение БЭС в дозе 50 мг/кг индуцирует увеличение связывания с NMDA-рецепторами в гиппокампе мозга крыс через 24 часа.

15 2.4 Связывание с н-холинорецепторами *ex vivo*

Результаты изучения влияния однократного введения суспензии БЭС (50 мг/кг, внутрь) на константы рецепторного связывания меченого никотина через 2 и 24 часа в сравнении с эффектом плацебо представлены на фиг.18.

20 Из представленных данных следует, что введение 50 мг/кг БЭС приводит к существенному увеличению плотности никотиновых рецепторов в лобной коре мозга крыс через 24 часа с 232 белка до 334 фмоль/мг белка без изменения аффинитета. Через 2 часа после введения БЭС значимых перемен в рецепторных характеристиках не отмечается.

Вывод: острое введение БЭС в дозе 50 мг/кг индуцирует существенное увеличение связывания с н-холинорецепторами в коре больших полушарий мозга крыс.

Эксперимент 2. Изучение влияния БЭС на функциональную систему обратного захвата дофамина в синапсосамах мозга крыс

30 Система обратного захвата (пресинаптического транспорта) нейромедиаторов ЦНС представляет собой эффективный способ регуляции синаптической нейротрансмиссии, поэтому является мишенью действия многих психотропных препаратов: психостимулирующих, противопаркинсонических, антидепрессивных.

С учетом фармакологического профиля действия БЭС, включающего эти виды активности, в данной серии экспериментов было изучено влияние БЭС на систему обратного захвата дофамина в изолированных нервных окончаниях стриатума крыс.

35 а) Методика

Синаптосомальный захват [^3H]-ДА

Получение грубой фракции синаптосом: иссеченные из мозга крыс стриатумы гомогенизировали с помощью гомогенизатора «стекло-тефлон» в 10 объемах охлажденного раствора 0.32 М сахарозы, уравновешенного 10 мМ Tris-HCl при 0-4°C.

40 Образовавшийся гомогенат центрифугировали на центрифуге при 1000 g в течение 10 мин. Далее супернатант (S1) декантировали и вновь центрифугировали при 12000 g в течение 25 мин. Полученный осадок P2 («грубая фракция синаптосом») ресуспендировали в модифицированном буфере Кребса (125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.2 мМ MgSO₄, 1.2 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкозы; pH 7.4), из расчета 5 мл буфера на 1 г исходной ткани.

45 Изучение захвата [^3H]-ДА. Процедуру захвата проводили по протоколу [13]. Для проведения реакции захвата использовали среду инкубации, содержащую 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.2 мМ MgSO₄, 1.2 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES, 10 мМ D-глюкозы, 200 мкМ раствора паргилина (ингибитор MAO-B) (pH инкубационной среды = 7.4). Для определения доли неспецифических процессов вместо среды инкубации использовали 0.32 М раствор сахарозы, содержащий 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), в которой синаптосомы инкубировали при 50 0-4°C.

Реакцию захвата запускали внесением в инкубационную среду, содержащую необходимую концентрацию [^3H]-ДА, паргилина и исследуемого вещества, 50 мкл

суспензии синаптосом. Пробирки инкубировали в твердотельном термостате «Термит» (НПО «ДНК-технология») 3 мин при 37°C. Реакцию останавливали быстрой ультрафильтрацией через стекловолокнистые фильтры Whatman GF/C. Фильтры промывали дважды по 5 мл ледяного физиологического раствора, просушивали при

5 комнатной температуре, переносили в сцинтилляционные флаконы и добавляли по 7 мл сцинтилляционной жидкости Брея, после чего измеряли уровень их радиоактивности с помощью сцинтилляционного счетчика Wallac 1411 с эффективностью счета трития 40-45%.

б) Результаты

10 Изучение действия препарата БЭС на синаптосомальный обратный захват дофамина *in vitro* запускали внесением в инкубационную среду, содержащую необходимую концентрацию [³H]-ДА, паргилина (ингибитор МАО) и исследуемого вещества, 50 мкл суспензии синаптосом. Ранее было показано, что ППС Мидантан способен ингибировать обратный захват дофамина с концентрацией полуингибирования с IC₅₀, лежащей в

15 диапазоне концентраций ~200-250 мкМ. В этой связи измеряли обратный захват дофамина при концентрации Мидантана (250 мкМ) в инкубационной смеси.

Определение влияния БЭС на обратный захват дофамина в ткани мозга крыс проводили в 4-х группах: 1 группа - физ. р-р. (0.9% NaCl); 2 группа - БЭС (Бетулин) 500 мкМ; 3 группа - Мидантан (250 мкМ); 4 группа - Мидантан (250 мкМ) + БЭС (Бетулин) 500 мкМ.

20 Было обнаружено статистически значимое угнетение обратного захвата дофамина (на 40%). При совместном внесении Мидантана (250 мкМ) + БЭС (Бетулина 500 мкМ) обнаружено более выраженное, по сравнению с введением Мидантана (250 мкМ), ингибирование обратного захвата - порядка 60%, что свидетельствует о способности БЭС

25 потенцировать на 30% ингибирующее действие Мидантана на обратный захват дофамина (фиг. 19).

Вывод: БЭС не обладает прямым эффектом на работу транспортера дофамина, однако способен потенцировать ингибирующий эффект Мидантана дополнительно на 30%.

Эксперимент 3. Изучение влияния БЭС на процесс регуляции биосинтеза дофамина и серотонина в структурах мозга мышей в условиях *ex vivo*

30 Биосинтез нейромедиаторов в пресинаптических нервных окончаниях представляет собой второе из функциональных звеньев нейротрансмиссии, находящегося под регулирующим влиянием мембранных рецепторов и внутриклеточных факторов. Поэтому была изучена возможность воздействия БЭС на активность биосинтеза дофамина и серотонина в гомогенатах коры мозга, стриатума и гиппокампа мышей.

а) Методика

35 Содержание моноаминов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД).

Определение содержания моноаминов и их метаболитов в ткани мозга мышей проводили в 2-х группах. Исследуемые вещества вводили внутривенно в объеме 2

40 мл/кг NSD1015 за 30 минут, БЭС за 2 часа до декапитации животных.

Первой группе животных вводили физ. раствор перорально и NSD 1015 (50 мг/кг) внутривенно. Второй группе животных вводили БЭС (50 мг/кг) перорально и NSD 1015 (50 мг/кг) внутривенно.

45 Необходимость использовать NSD1015 для оценки биосинтеза обусловлена высокой интенсивностью процессов биосинтеза моноаминов, следствием чего является достаточно низкое содержание их предшественников в мозге. NSD1015 блокирует синтез дофамина из ДОФА за счет ингибирования фермента L-аминодекарбоксилазы ароматических кислот (ДААК). При этом происходит накопление ДОФА и соответственно снижение концентрации дофамина и продуктов его метаболизма, также происходит накопление тирозина, что

50 приводит к увеличению концентрации 5-ГТП (предшественника серотонина).

б) Результаты

Представленные в Таблицах 2-4 данные указывают, что системное введение БЭС в дозе 50 мг/кг через два часа приводит к уменьшению активности биосинтеза нейромедиаторов в

стриатуме мозга мышей: синтез дофамина (концентрация предшественника дофамина ДОФА) подавляется на 22%, а синтез серотонина (концентрация предшественника серотонина 5-ГТП) - на 32% (Табл.2).

5

Таблица 2								
Влияние БЭС на содержание биогенных аминов в стриатуме мышей линии C57Bl/6 на фоне NSD 1015 (m±S.E.M)								
	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГБК	СТ
Физ. р-р. + NSD1015	2,87±0,31	1,95±0,18	1,43±0,18	1,06±0,06	45,37±2,75	2,30±0,27	4,30±0,62	3,23±0,20
БЭС + NSD1015	2,24±0,08*	1,82±0,14	1,26±0,18	0,72±0,07*	52,98±2,60	2,43±0,32	3,85±0,75	3,78±0,19

* - статистически значимое отличие, U-критерий Манна-Уитни, p<0,05.

10

В коре мозга БЭС не оказывал влияния ни на синтез ДА, ни на синтез СТ (Табл.3), а в гиппокампе подавлялся лишь синтез серотонина (Табл.4):

15

Таблица 3								
Влияние БЭС на содержание биогенных аминов в коре мышей линии C57Bl/6 на фоне NSD 1015 (m±S.E.M)								
	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГБК	СТ
Физ. р-р. + NSD1015	0,98±0,09	3,45±0,36	0,10±0,04	1,00±0,15	0,37±0,09	1,86±0,20	0,68±0,06	5,61±0,24
БЭС + NSD1015	0,86±0,11	4,21±0,37	0,10±0,03	0,82±0,05	0,36±0,07	1,79±0,19	0,41±0,07*	7,98±0,90*

* - статистически значимое отличие, U-критерий Манна-Уитни, p<0,05

20

Таблица 4								
Влияние БЭС на содержание биогенных аминов в гиппокампе мышей линии C57Bl/6 на фоне NSD 1015 (m±S.E.M)								
	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГБК	СТ
Физ. р-р. + NSD1015	0,51±0,12	2,39±0,36	0,12±0,04	1,39±0,27	1,58±0,71	3,05±0,46	0,48±0,20	3,42±0,58
БЭС + NSD1015	0,33±0,10	1,89±0,37	0,06±0,02	0,78±0,14*	1,28±0,61	2,72±0,60	0,28±0,13	2,96±0,59

* - статистически значимое отличие, U-критерий Манна-Уитни, p<0,05

25

Вывод: однократное введение 50 мг/кг БЭС приводит к подавлению биосинтеза ДА в ткани стриатума, а также к ингибированию биосинтеза СТ в ткани стриатума и гиппокампа.

Эксперимент 4. Изучение влияния БЭС на внутриклеточный метаболизм и секрецию дофамина в тканях стриатума, фронтальной коры и гиппокампа мышей в условиях ex vivo

30

Изучение влияния БЭС (50 мг/кг, внутрь, через 2 часа) на метаболизм моноаминергических нейромедиаторов и секрецию дофамина проводили в структурах мозга мышей C57Bl/6.

а) Методика

Содержание моноаминов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД).

35

Определение содержания моноаминов и их метаболитов в ткани мозга мышей проводили в 2-х группах. Инъекции вещества проводили за 2 часа до декапитации животных.

Первой группе животных вводили плацебо, а второй группе вводили БЭС (50 мг/кг) перорально.

40

б) Результаты

Метаболизм катехоламинов (дофамина и норадреналина) и индоламинов в пресинаптических окончаниях осуществляется ферментами моноаминоксидазами типов А (серотонин) и В (катехоламины), в результате деятельности которых из первого образуется 5-гидроксииндолуксусная кислота (ГИУК), а из вторых - диоксифенилуксусная кислота (ДОФУК), обнаруживаемые внутриклеточно. Внеклеточный, синаптически активный дофамин подвергается воздействию фермента КОМТ (катехоламин-о-метилтрансферазы) и метаболизируется в гомованилиновую кислоту (ГБК), внеклеточный метаболит дофамина.

50

Поэтому по уровню ГБК возможно судить об интенсивности секреторных процессов в мозге ex vivo. Так, через два часа после введения БЭС в изученных структурах мозга не наблюдается изменений интенсивности секреции дофамина (Табл.5, 6 и 7).

Таблица 5									
Влияние БЭС на содержание биогенных аминов в стриатуме мышей линии C57Bl/6 (m±S.E.M)									
	ДОФА	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГБК	СТ	5-ГИУК/СТ

Контроль	0,74±0,15	3,01±0,10	3,54±0,33	0 0	64,57±7,37	2,08±0,20	6,20±0,65	5,33±0,23	0,39±0,05
БЭС	0,74±0,08	1,88±0,43*	4,78±0,43*	0 0	63,55±2,84	3,77±0,22*	5,82±0,40	4,59±0,18	0,82±0,04*
* - статистически значимое отличие, U-критерий Манна-Уитни, p<0,05									

Вместе с тем, в стриатуме происходит уменьшение уровня норадреналина (-37%), сопровождающееся соответствующим нарастанием концентрации его внутриклеточного метаболита ДОФУК (+35%), что указывает на активацию метаболизма норадреналина (Табл.4). Эффект ускорения внутриклеточного метаболизма катехоламинов наблюдается также в коре мозга, где уровень ДОФУК возрастает на 52% (Табл.6).

Таблица 6								
Влияние БЭС на содержание биогенных аминов в коре мышей линии C57Black/6. (m±S.E.M)								
	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	5-ГИУК/СТ
Контроль	3,53±0,32	0,29±0,05	0,07±0,01	0,74±0,17	1,56±0,18	0,75±0,11	5,90±0,09	0,27±0,03
БЭС	4,15±0,34	0,44±0,07*	0,07±0,01	0,73±0,08	3,21±0,36*	0,90±0,16	6,46±0,64	0,50±0,02*
* - статистически значимое отличие, U-критерий Манна-Уитни, p<0,05								

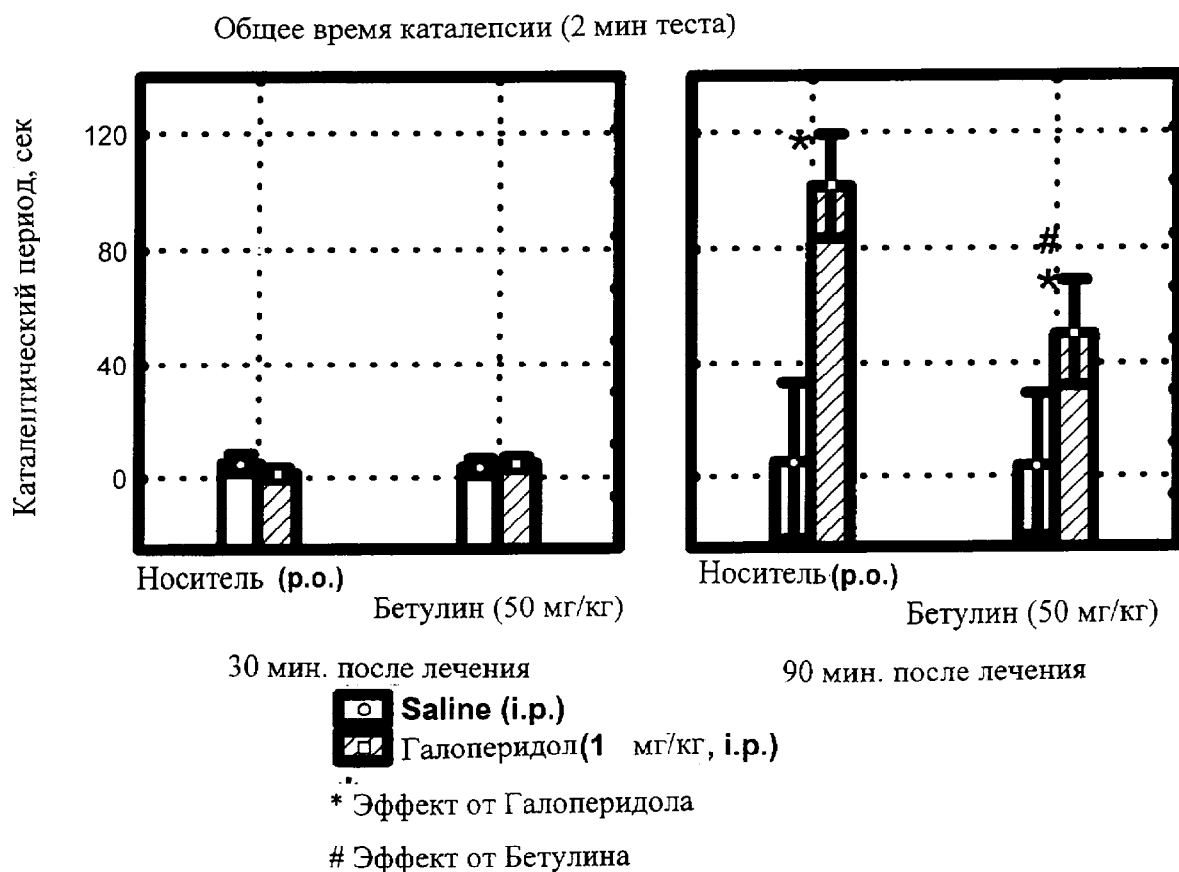
Обращает на себя внимание воздействие БЭС на метаболизм серотонина - во всех трех структурах мозга регистрируется существенная активация метаболизма этого нейромедиатора, оцениваемая по приросту концентрации главного метаболита серотонина - 5-гидроксииндолуксусной кислоты.

Таблица 7								
Влияние БЭС на содержание биогенных аминов в гиппокампе мышей линии C57Black/6. (m±S.E.M)								
	НА	ДОФУК	5-ГТП	ДА	5-ГИУК	ГВК	СТ	ДОФУК/ДА 5ГИУК/СТ
Контроль	4,27±0,25	0,35±0,04	0,05±0,01	1,20±0,55	3,05±0,28*	0,47±0,06	4,44±0,18	0,37±0,06*
БЭС	2,09±0,47	0,51±0,19	0,05±0,01	1,05±0,28	4,20±0,73*	0,44±0,15	3,62±0,54	1,18±0,25*

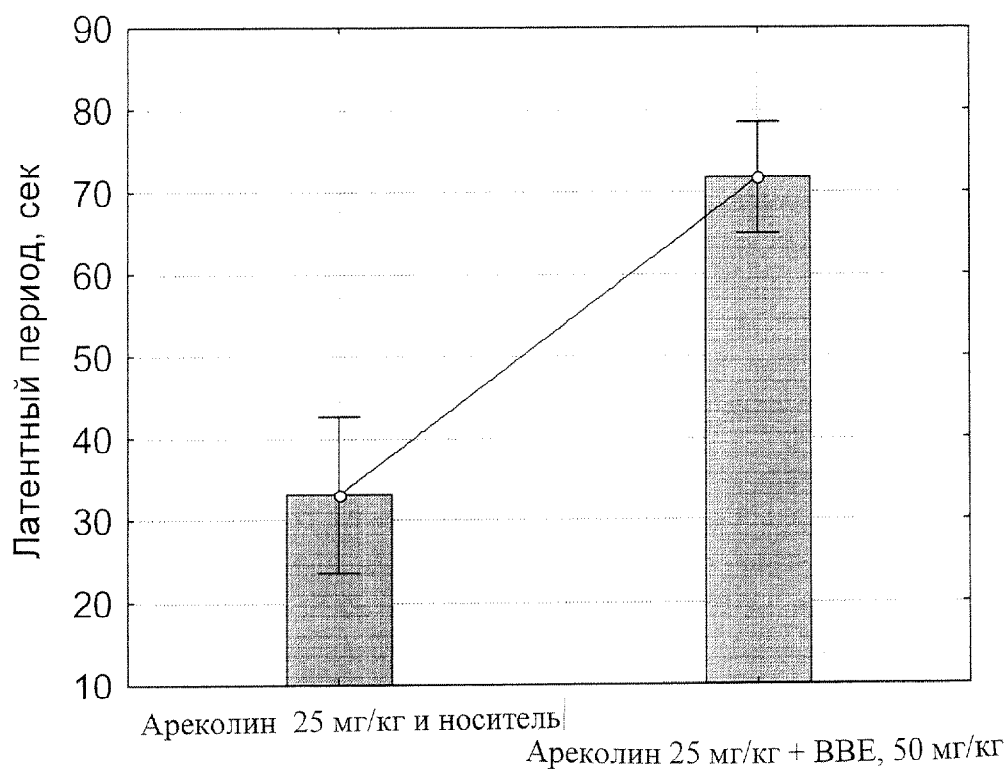
Вывод: Введение БЭС не приводит к существенному изменению секреции дофамина, но активизирует метаболизм ДА. Вместе с тем, мало изученный ранее СТ-ергический компонент играет существенную роль как функционального антагониста дофамина, так и самостоятельную. Спектр фармакологической активности БЭС подтверждает важность последнего утверждения.

Формула изобретения

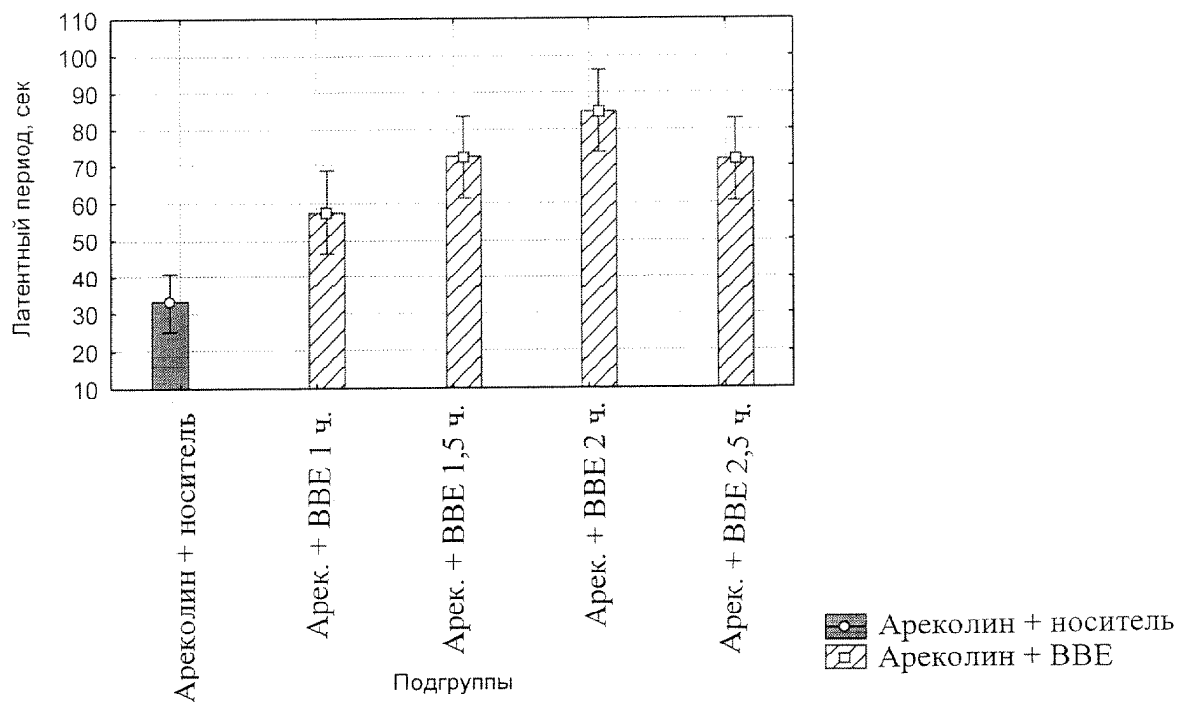
Применение экстракта бересты с преобладающим до 70%-ным содержанием бетулина для профилактики и лечения болезни Паркинсона.



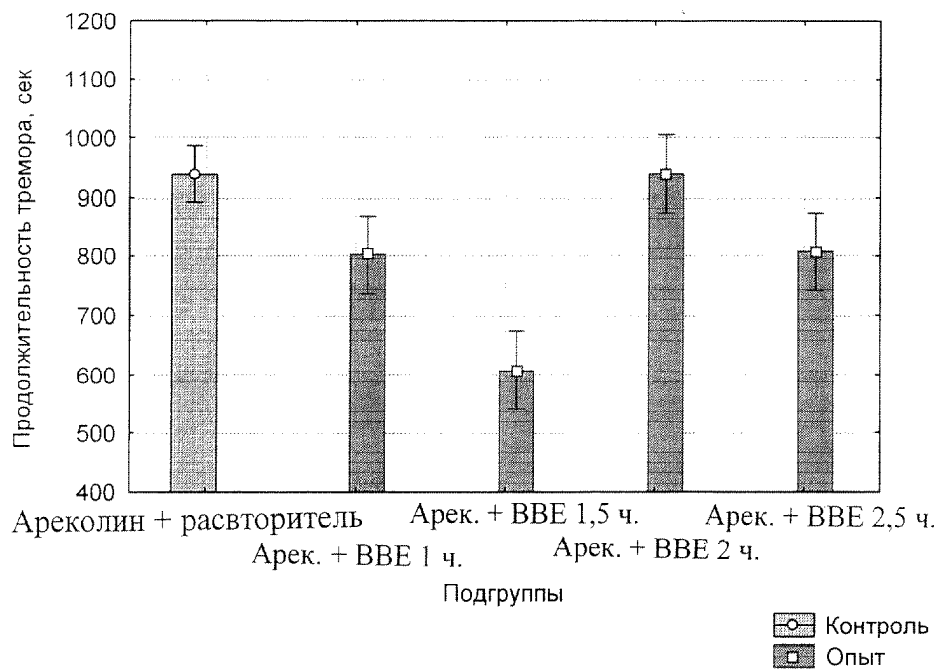
Фиг. 1



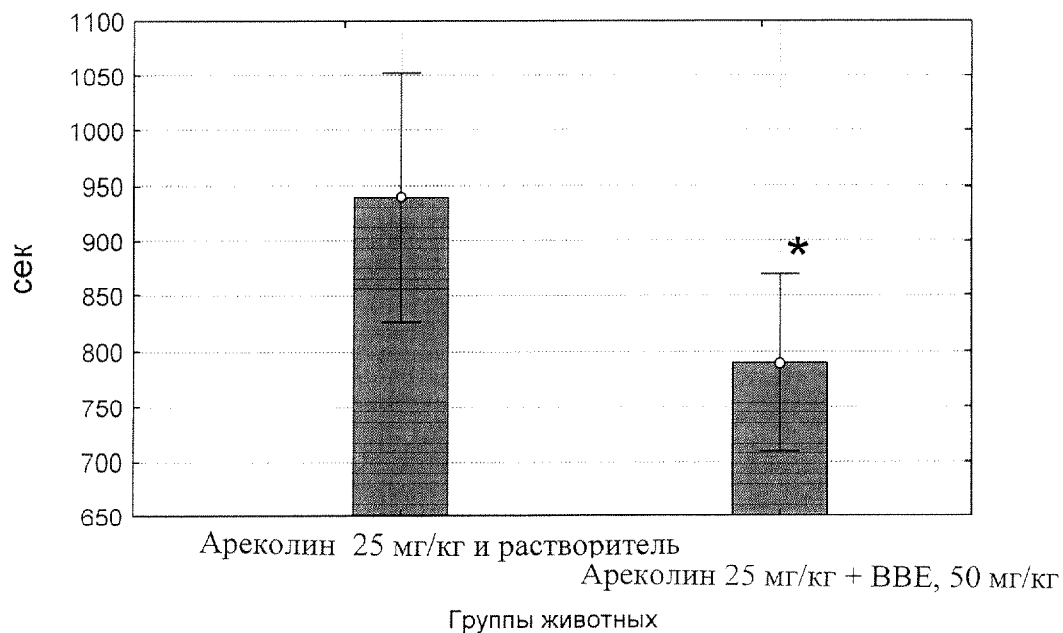
Фиг. 2



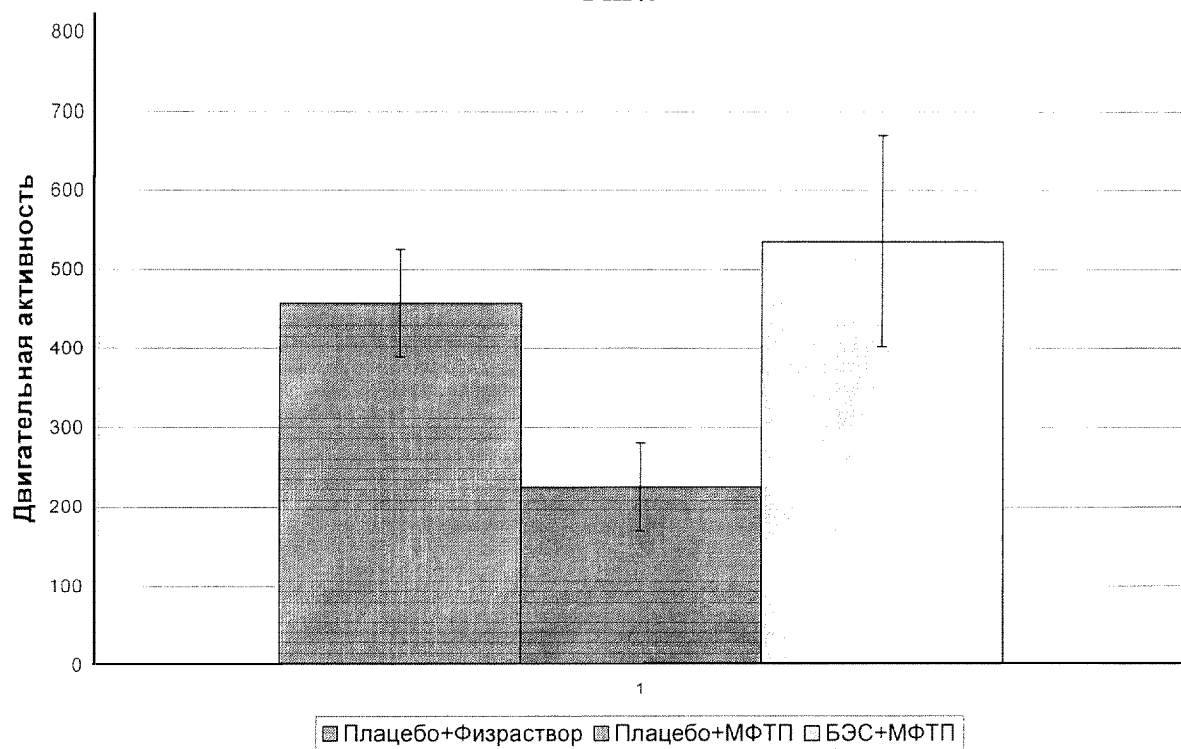
Фиг.3



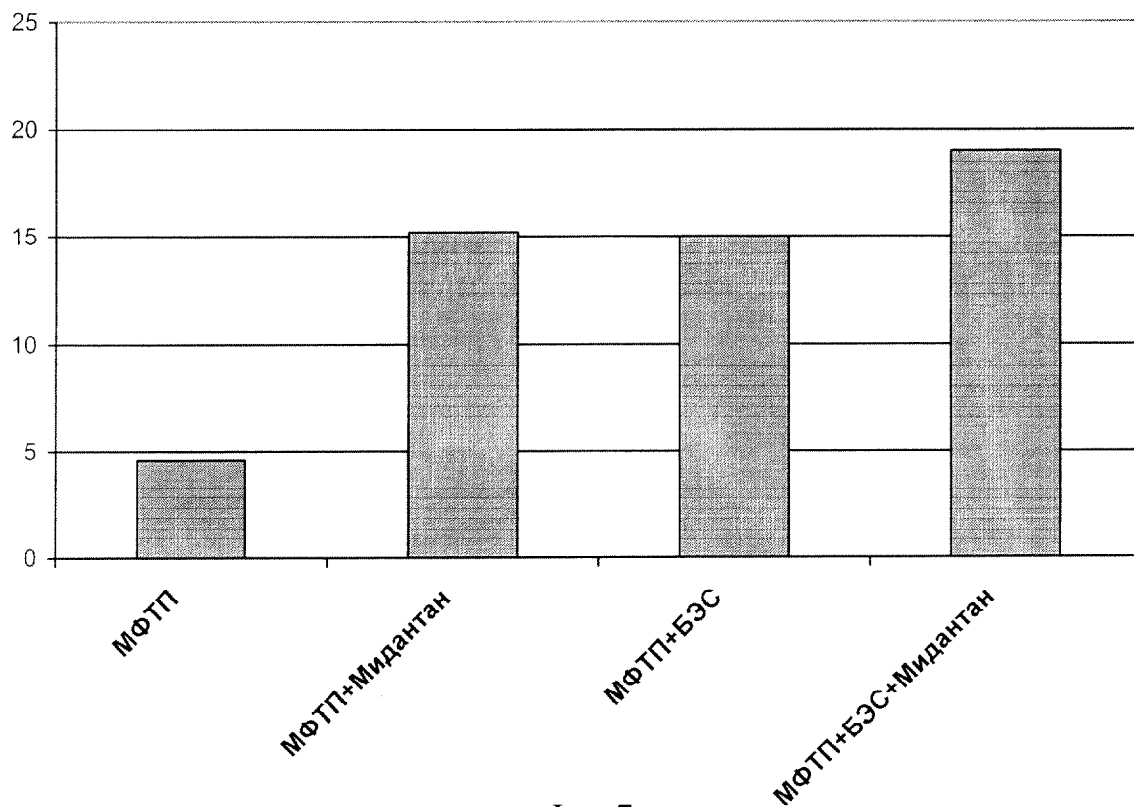
Фиг.4



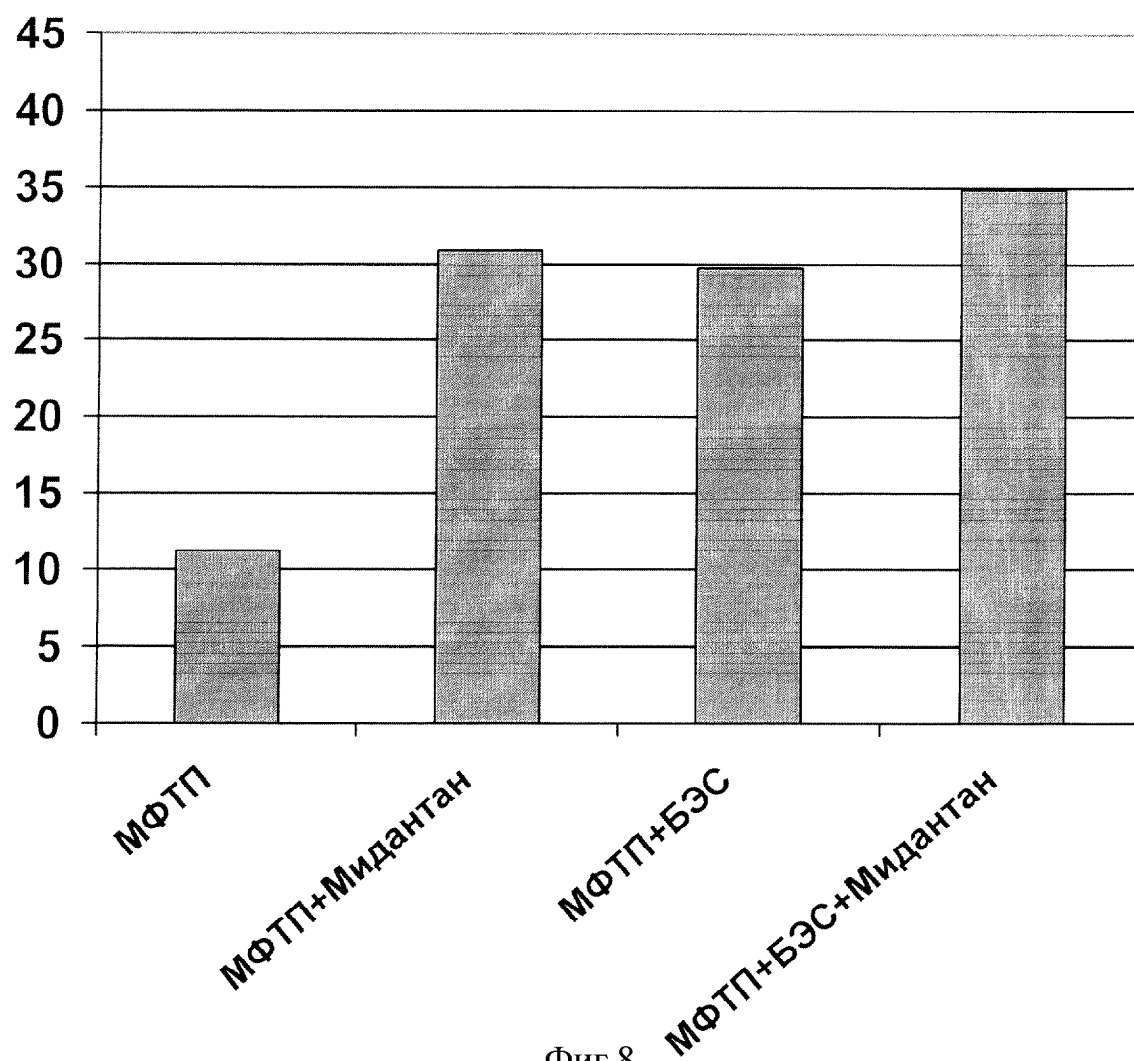
Фиг.5



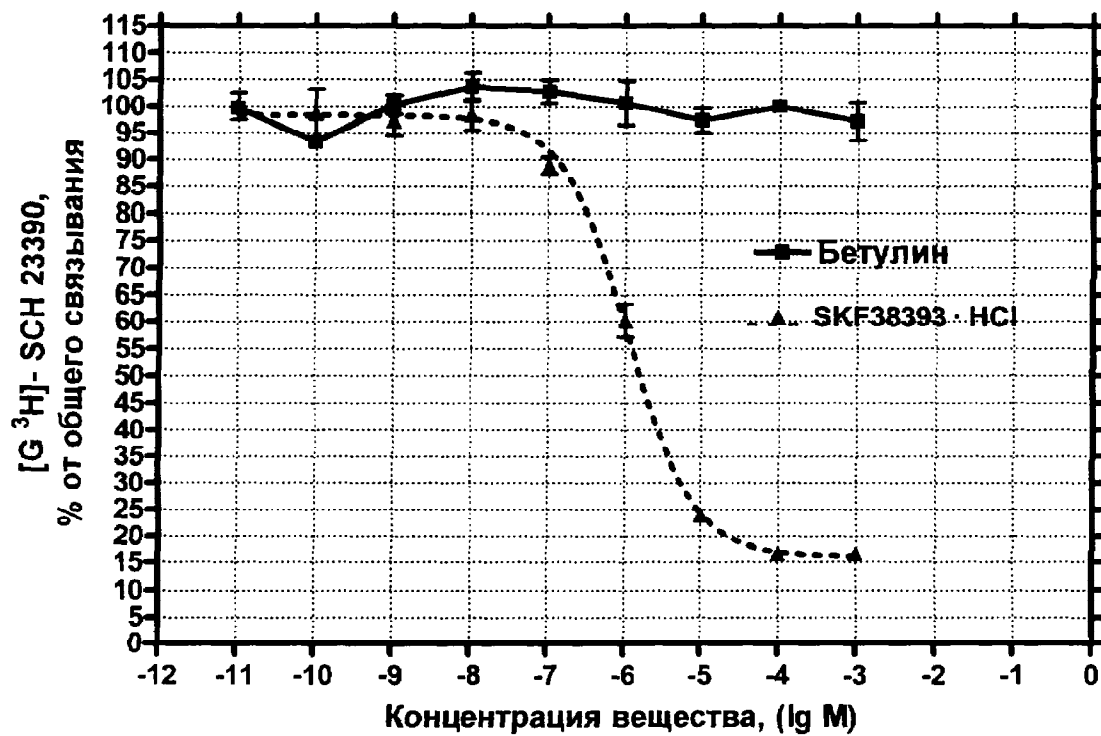
Фиг.6



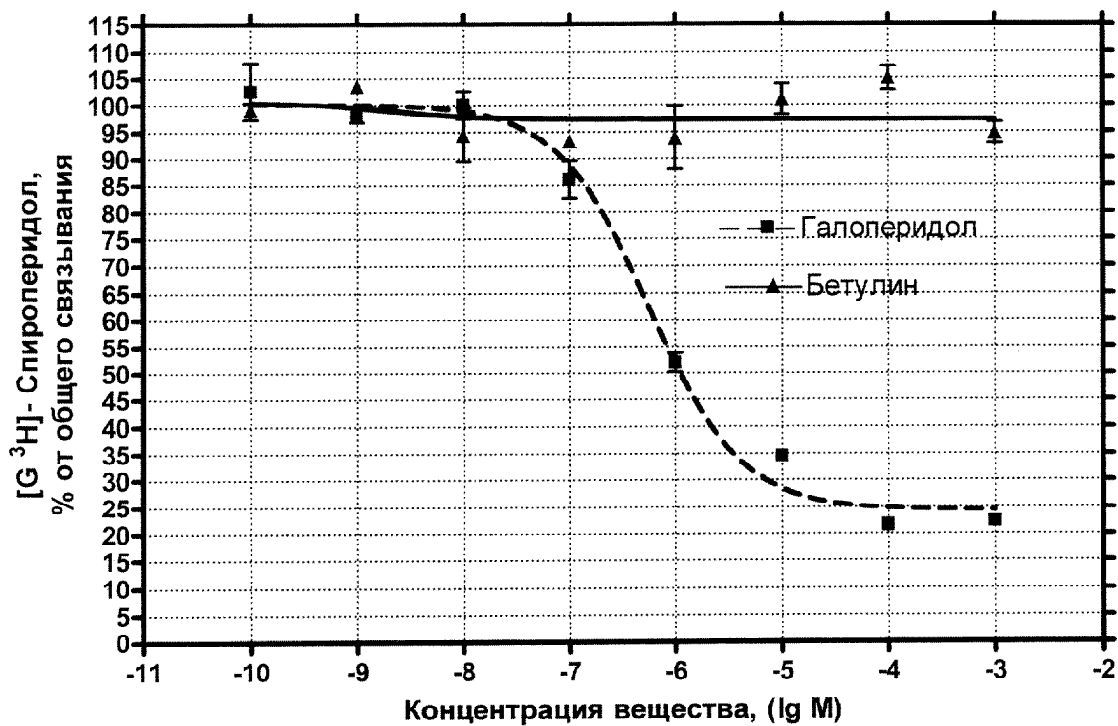
Фиг.7



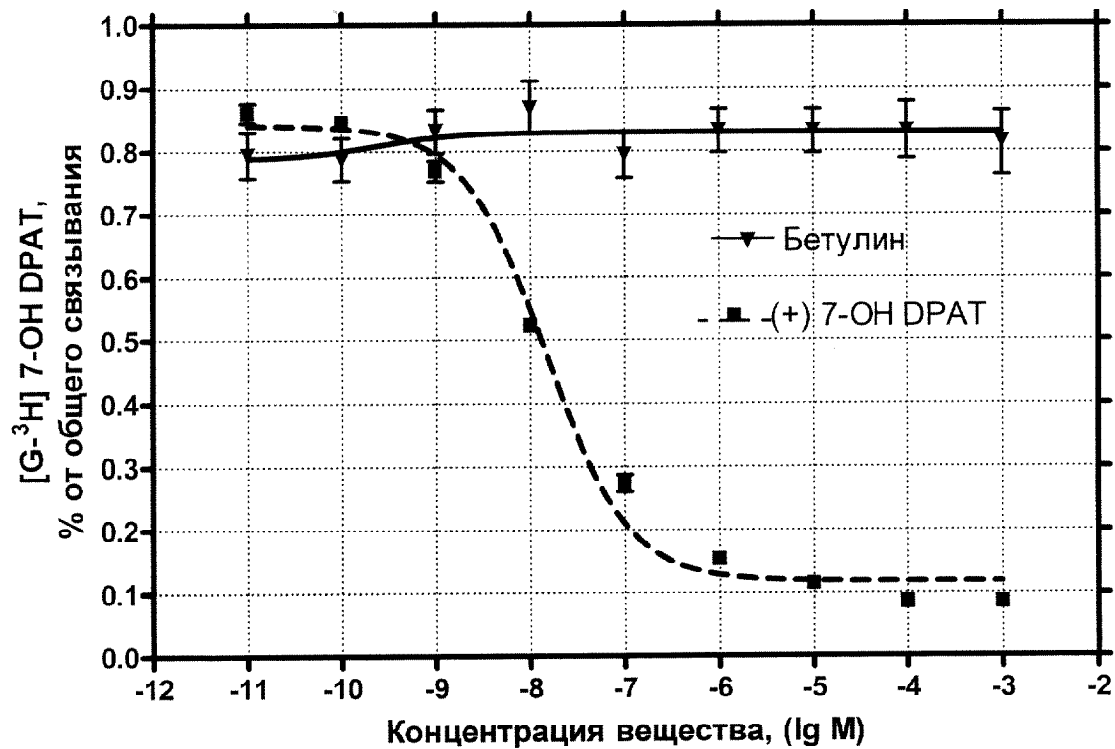
Фиг.8



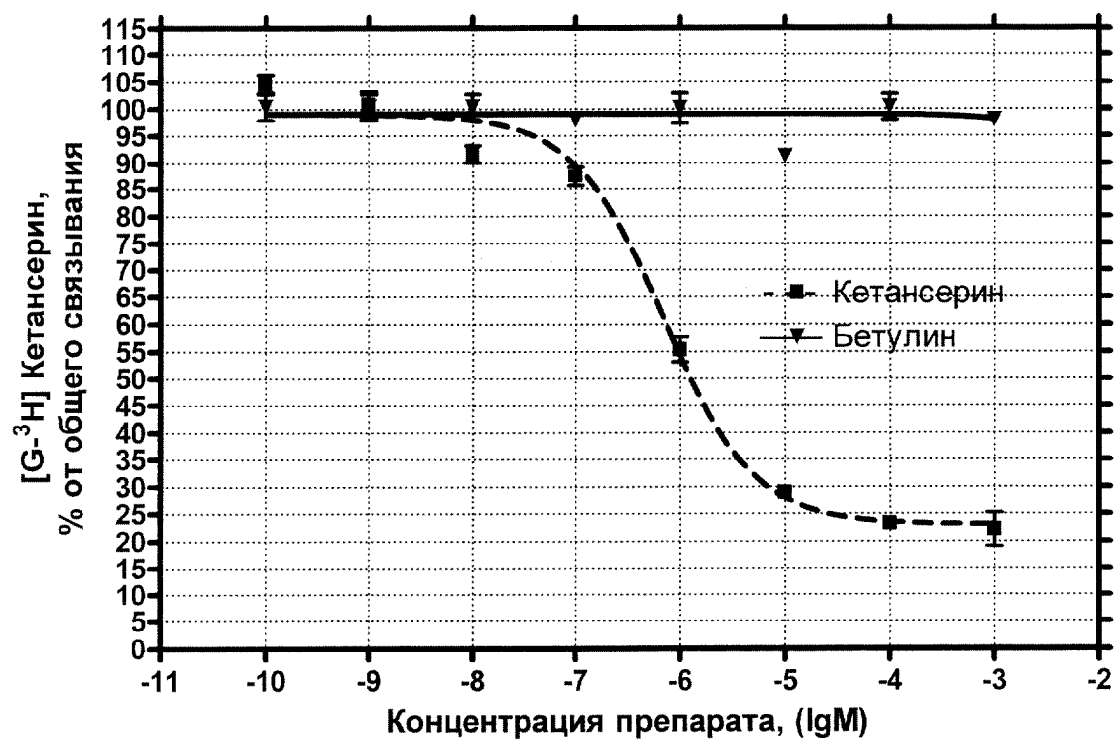
Фиг.9



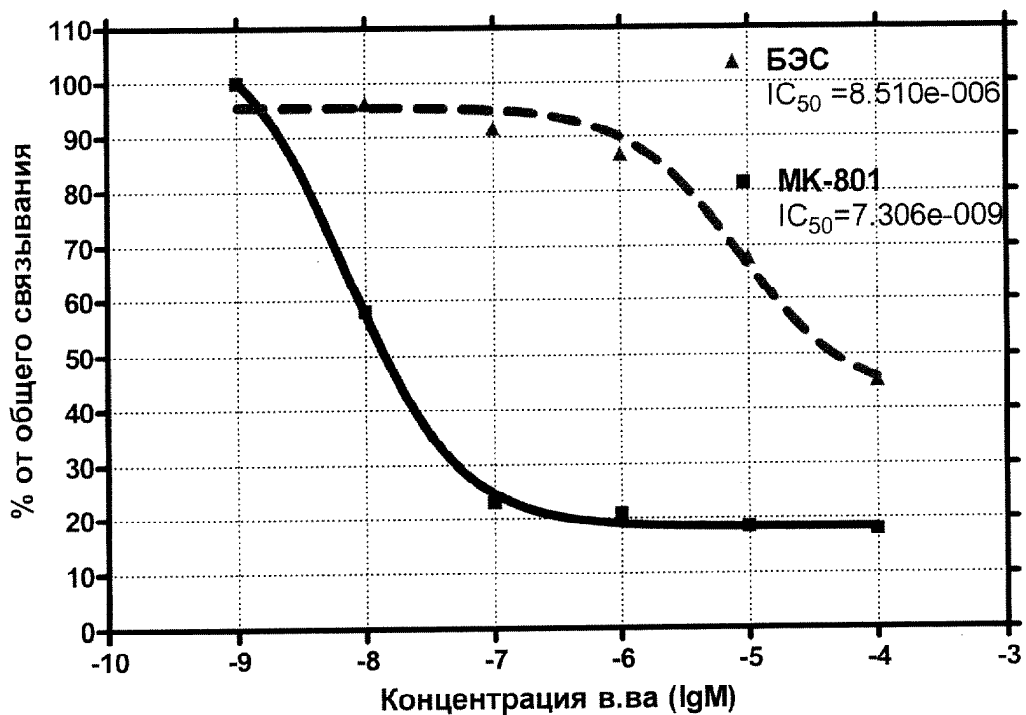
Фиг.10



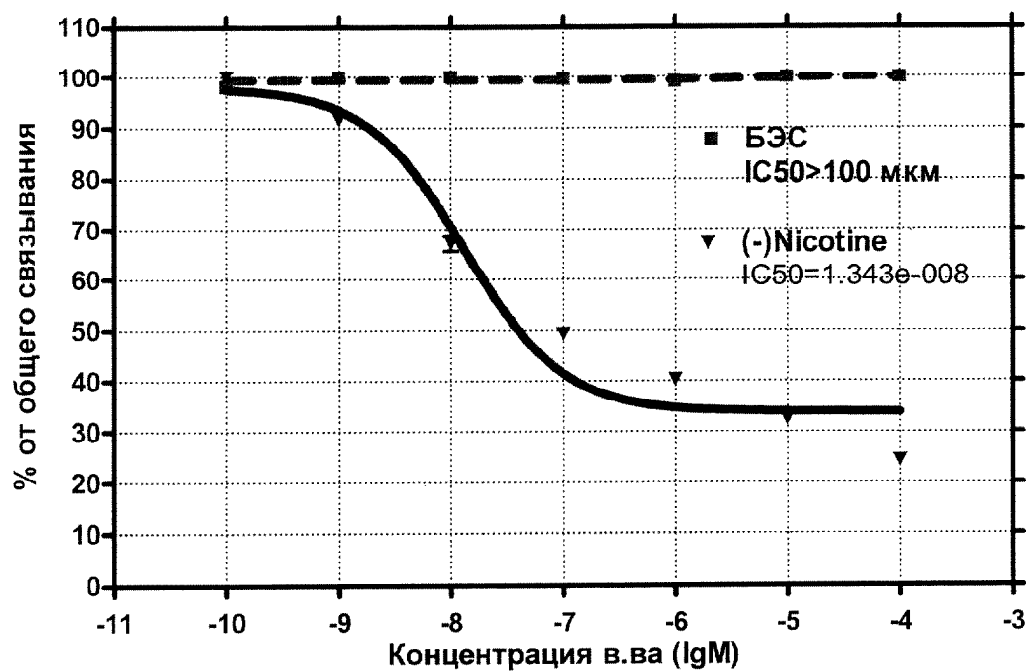
Фиг.11



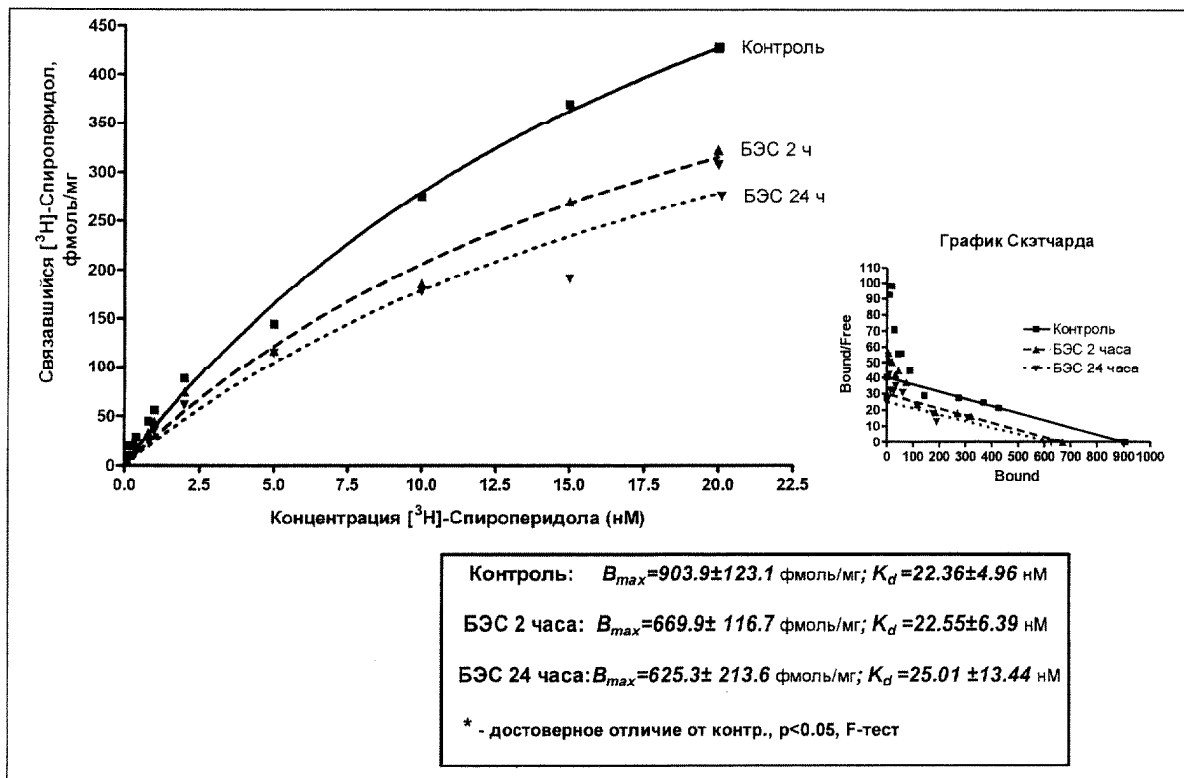
Фиг.12



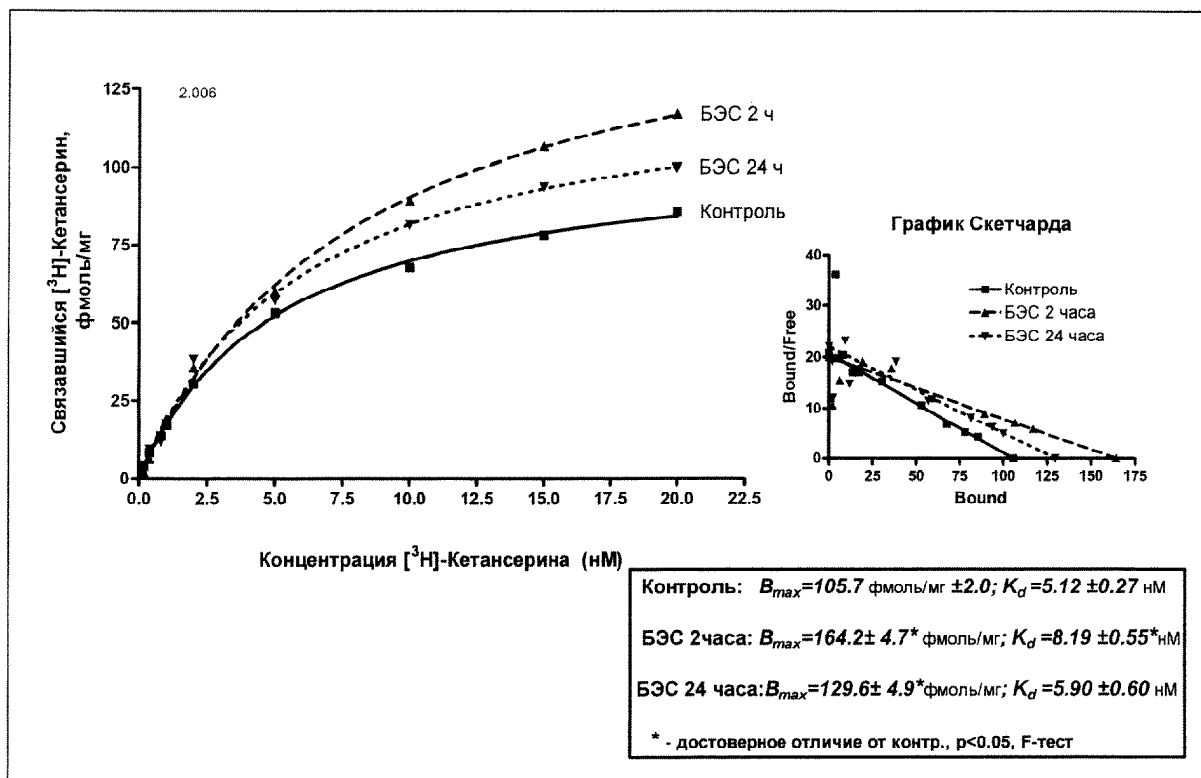
Фиг.13



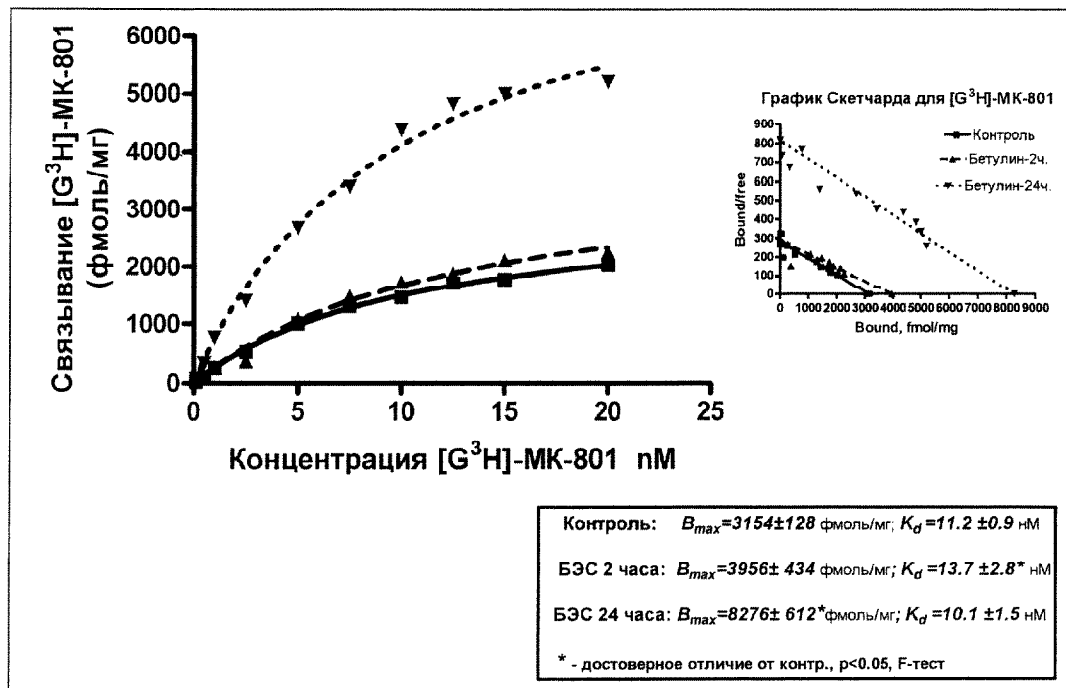
Фиг.14



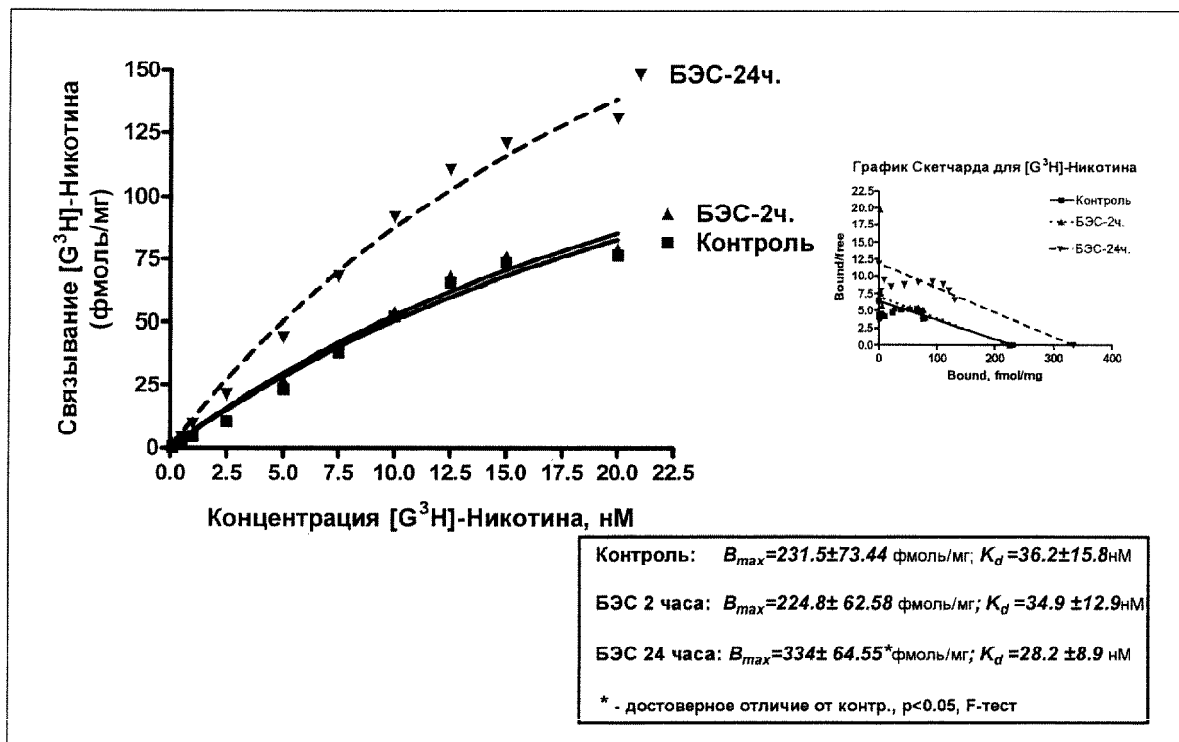
Фиг.15



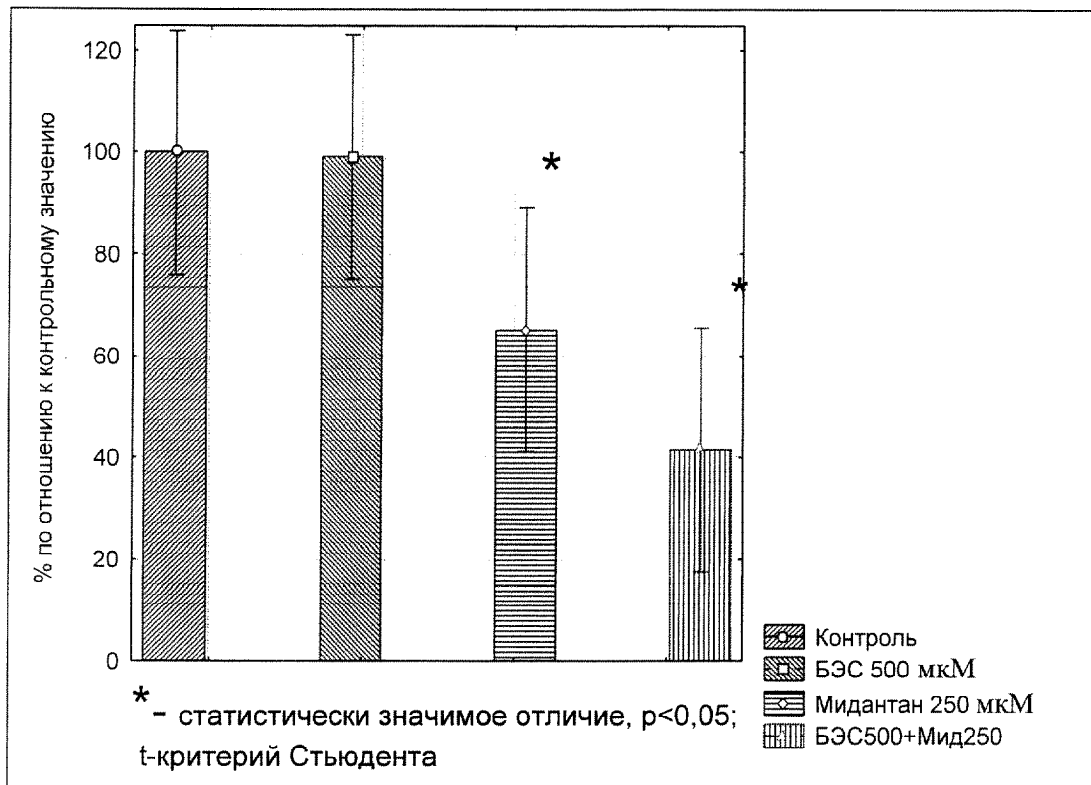
Фиг.16



Фиг.17



Фиг.18



Фиг.19