

Тбилисский государственный медицинский университет

На правах рукописи

Мелкадзе Ольга

**Хронофармакологический анализ действия amitриптилина и тразодона на
серотонинергическую систему**

14.00.25 – Фармакология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

**ТБИЛИСИ
2006**

Работа выполнена в НИИ психиатрии им. М. М. Асатиани

Научный руководитель - ***Зурабашвили Зураб***,
доктор медицинских наук,
профессор

Официальные оппоненты - ***Гонгадзе Николоз***,
доктор медицинских наук,
профессор (14.00.25)

- ***Берия Зураб***
кандидат медицинских наук,
доцент (14.00.18)

Защита диссертации состоится _____ 2006 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 8.14.16.№6 Тбилисского Государственного Медицинского Университета (0177, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела, 33).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тбилисского Государственного Медицинского Университета (0160, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела, 29).

Автореферат разослан _____ 2006 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук, доцент

/Н. Бежиташвили/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В работах, посвященных вопросам индивидуализации и оптимизации действия антидепрессантов недостаточно учитывается многообразие циркадно повторяющихся изменений, происходящих в организме человека или животного в течение отдельных, четко очерченных отрезков времени, не учитываются физиологические закономерности колебаний отдельных биохимических параметров (Н. А.

Абдулов, 1994) в утренние и вечерние часы суточного приема лекарств и связь этих колебаний с результатами лечения (Н. А. Андреева и др., 2000; А. Е. Бунин и др., 1991; S. Anne, Y. Burdock, 2001; K. Seyner, 2000).

Известно, что циркадные (утро-вечерние) суточные колебания уровня моноаминов, а также связанные с этим процессом изменения активности синаптических рецепторов ложатся в основу динамики функционального состояния ЦНС не только в различные времена суток, но и в различные времена года. Согласно мнению многих авторов (Б. გობჯაძე და სხვ., 1991; С. Н. Маслов, 1995; M. Nakatis, 1998) циркадность биохимических процессов должна учитываться в деле оптимизации и индивидуализации проводимого лечения. Еще Э. Ф. Лавренко (1985) было показано, что белково-азотистый обмен при депрессивных состояниях в отдельные периоды сна и бодрствования значительно меняется. Индивидуальные, циркадные особенности фармакокинетики Л. Е. Холодов (1981) считает важной причиной полиморфизма скорости окислительного метаболизма лекарств в зависимости от времени суток. Особенности "доза - эффекта" в различные интервалы времени подчеркивают также Б. გობჯაძე, გ. თურმანაშვილი (1996); ა. ზურაბაშვილი (2003); А. Д. Зурабшвили (1988); П. Е. Зиганшина (1997); G. Alexander, N. Dun (2004); G. Burrowas, T. Norman (2004).

На важность ритмических процессов в функционировании ЦНС указывает Р. Carlton (2001). Бесспорна (К. Yversen, 2000) тесная связь циркадных изменений биохимических реакций воздействием окружающей среды. Циркадные сдвиги сопутствуют внешним, повторяющимся экстремальным факторам (день-ночь, сезон года) и являются, по мнению L. Hollistes (2001) защитными реакциями.

Таким образом, изучение характера циркадных (индивидуальных, утро-вечерних) колебаний уровня отдельных медиаторов и их производных в процессе лечения антидепрессантами дает определенное представление о реально существующем (в четко очерченном отрезке времени суток) функциональном состоянии соответствующих морфо-функциональных систем мозга, что, в свою очередь, имеет важное значение в деле оптимизации и индивидуализации проводимой терапии, избежания лекарственной интоксикации.

Имеющиеся в этом отношении данные носят фрагментарный характер и касаются только отдельных сторон медиатор-рецепторных взаимодействий при терапии антидепрессантами. Не изучены эти вопросы также при длительном назначении amitriptyline (базового трициклического антидепрессанта), действие которого в первую очередь связано с изменением функционального состояния серотонинергических систем мозга и развитием на этом фоне побочных явлений.

Исключительная важность этой задачи служит основанием комплексного изучения циркадных колебаний функционального состояния индолалкиламиновой системы мозга в разные периоды суток, уровня медиаторов в утренние и вечерние часы приема типичных и атипичных антидепрессантов.

Трудно переоценить значение циркадных колебаний в фармакологическом действии лекарственных веществ на суточные ритмы нейрональных рецепторов. Эти вопросы необходимо учитывать при изучении регуляции ответа нейронов на действие медиаторов или психотропных средств: индукции нейрональных рецепторов.

Несмотря на определенные достижения в области психофармакологии депрессии и большое количество утвердившихся в клинической практике антидепрессантов, изучение их фармакодинамики продолжается. Это обусловлено тем, что существующие средства не лишены побочных эффектов. Клинический эффект антидепрессантов развивается со слишком большим латентным периодом. За последние годы появились препараты, резко отличающиеся от трициклических соединений не только по строению, но и по фармакологическому спектру (тразодон), в следствие чего они объединены термином

"атипичные" антидепрессанты. Особенно большой прогресс произошел в области изучения механизма действия антидепрессантов.

Изучение биологических основ действия психотропных средств, особенно таких, как антидепрессивные препараты, представляется чрезвычайно важным не только с позиции объяснения их фармакологического эффекта, но и для углубления в чрезвычайно сложную проблему патогенеза психопатологических процессов и биологических основ лечения. Важнейшей и труднейшей проблемой психофармакологии является осознание сущности взаимодействия химических соединений с носителем нейродинамических процессов мозга. Каким образом психофармакологическое воздействие основано на связях между биохимическими системами мозга

В настоящее время хорошо известно, что механизм действия антидепрессантов опирается на нейрохимические процессы синтеза и обратного захвата медиатора, воздействие на пре- и постсинаптические рецепторы. Факты взаимодействия антидепрессантов с нейромедиаторами различных систем мозга, привели к доминирующей катехоламиновой и индоламинановой гипотезам депрессии.

Принципиальное значение для дальнейшего развития проблемы фармакологии антидепрессантов имеет и то, что большинство исследований по действию антидепрессантов на рецепторы и нейрохимические процессы проведены на субстратах, полученных от здоровых животных. Эти модели пригодны для изучения как классических, так и атипичных антидепрессантов, не только при однократном, но и при хроническом введении.

Большой интерес приобретает проблема взаимодействия антидепрессантов с рецепторами синаптических мембран, открытие имипраминовых, дезимипраминовых мест связывания, изучение их роли в функциональных процессах нейромедиаторных систем. Функция рецепторов зависит от иерархии супрамолекулярной организации химического сигнала, сопряжения детектора (места связывания лиганда) с преобразователем и преобразования химического сигнала, возникающего экстраклеточно по отношению к рецептору, в метаболический ответ клетки.

Факт, что пресинаптические терминалы содержат более одного передатчика, а интегративное воздействие медиатора и комедитатора на постсинаптическую мембрану определяет ответную функцию и состояние рецептора - открывает новые перспективы изучения механизма действия антидепрессантов.

Между тем, изучение действия антидепрессантов с позиции хронофармакологии почти не проводилось, или же выполнялись единичные, фрагментарные исследования.

Остается малоизученным вопрос о влиянии базового трициклического антидепрессанта-амитриптилина на функциональное состояние медиаторных систем мозга (в первую очередь серотонинергических) в зависимости от исходного циркадного ритма у животных, находящихся в условиях свободного поведения, как при остром (одноразовом), так и хроническом действии препарата.

Цель и задачи исследования. В условиях острого эксперимента провести хронофармакологический анализ действия амитриптилина (неизбирательный ингибитор обратного нейронального захвата нейромедиаторов) и тразодона (избирательный ингибитор обратного нейронального захвата серотонина) на функциональное состояние серотонинергической системы мозга.

Для решения указанной задачи были необходимы следующие исследования:

- I. Выделить среди половозрелых лабораторных мышей – самцах массой тела $26,0 \pm 2,0$ гр., группу особей с четко очерченными циркадными характеристиками функционального состояния индолалкиламинановой системы мозга.

- II. Провести хронофармакологический анализ влияния одноразовой инъекции amitriptilina (1,0%, 2,0 мл) на функциональное состояние серотонинергической системы мозга. С этой целью ввести препарат:
- в момент минимальной активности серотонинергической системы;
 - в момент максимальной активности серотонинергической системы.
- III. Провести хронофармакологический анализ влияния одноразовой инъекции trazodona (1,0%, 5,0 мл) на функциональное состояние серотонинергической системы мозга. С этой целью ввести препарат:
- в момент минимальной активности серотонинергической системы;
 - в момент максимальной активности серотонинергической системы.
- IV. Провести хронофармакологический анализ сочетанного действия amitriptilina и trazodona (в тех же дозах) на функциональное состояние серотонинергической системы мозга. С этой целью ввести препараты:
- в момент минимальной активности серотонинергической системы;
 - в момент максимальной активности серотонинергической системы.

Для оценки функционального состояния серотонинергической системы мозга определить:

- уровень свободного и связанного серотонина в цельной крови;
- уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в сыворотке крови;
- уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в моче;
- уровень свободного триптофана в плазме крови;
- уровень свободного тирозина в плазме крови;
- уровень триптамина в плазме крови.

V. В связи с тем, что у выделенных животных цикл циркадных колебаний функционального состояния серотонинергической системы соответствовал $16,0 \pm 0,6$ часам, провести анализ биологических субстратов согласно полупериоду цикла ($8,0 \pm 0,3$ часа).

- до введения препарата;
- через 8 часов после инъекции;
- через 16 часов после инъекции.

VI. Параллельно фармакодинамическому анализу провести фармакокинетические исследования антидепрессантов в указанные выше часы. Определить:

- активные формы amitriptilina: свободный amitriptilin; нортриптилин; cis-10-гидрокси-amitriptilin;
- неактивные формы amitriptilina: trans-10-гидрокси-amitriptilin-N-оксид; cis-10-гидрокси-нортриптилин; trans-10-гидрокси-нортриптилин; дезметил-нортриптилин, amitriptilin-N-oxide.
- активные формы trazodona. свободный trazodon и cis-10-гидрокси-trazodon.

Выносимые на защиту положения. Определена фармакокинетика amitriptilina, trazodona и их дериватов через 8 и 16 часов после одноразового введения.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проведен одновременный анализ серотонина цельной крови, 5-оксииндолуксусной кислоты сыворотки и мочи, триптофана, тирозина и триптамина плазмы после одноразовой фармакологической нагрузки amitriptилином, trazодоном и их сочетанным действием.

Показано, что в результате индивидуального или сочетанного действия антидепрессантов, функциональное состояние серотонинергической системы мозга меняется неодинаково.

При однократном сочетании действия amitriptilina и trazodona характер изменений зависит от функционального состояния серотонинергической системы, во время введения антидепрессантов.

При однократном действии антидепрессантов в период максимальной концентрации серотонина в крови, чувствительность индолалкиламинергической системы мозга намного ниже к неизбирательному ингибитору обратного нейронального захвата нейромедиаторов (амитриптилин), чем к избирательному ингибитору обратного нейронального захвата серотонина (тразодон).

При однократном действии антидепрессантов в период минимальной функциональной активности серотонинергической системы мозга эта зависимость зеркально меняется. Аффинитет (чувствительность) индолалкиламиновой системы намного выше к неизбирательному ингибитору обратного нейронального захвата нейромедиаторов (амитриптилин), чем к избирательному ингибитору обратного нейронального захвата серотонина (тразодон).

Найденные различия зависят от циркадных изменений чувствительности периферических и центральных серотонинергических рецепторов.

Научная новизна и практическая значимость. Проведена дифференцированная оценка функционального состояния серотонинергической системы мозга на разных этапах фармакологической нагрузки amitriptilinom, trazodonom и их сочетанным действием.

В условиях эксперимента найдена зависимость отдельных этапов синтеза и метаболизма моноамина от концентрации amitriptilina или trazodona в сыворотке крови.

Впервые показано различие действия антидепрессантов и связь этого различия с текущим моментом циркадного состояния индолалкиламиновой системы мозга.

Таким образом, как в индивидуальной форме, так и в комбинации, становится возможным определить оптимальное время инъекции amitriptilina или trazodona. Хронофармакологический анализ позволит оценить участие каждого антидепрессанта в фармакодинамике их совместного действия.

Апробация результатов работы.

Фрагменты работы доложены на:

1. Regional Meeting: "Financing mental and addictive disorders in Central Eastern Europe" (2001); Academy of Economic Studies Bucharest.
2. Regional Meeting: "Mental health Economics and Psychiatric Practice in Central and Eastern Europe (2002); International Center of Mental Health. Milano, Italy.
3. Закавказский симпозиум по медико-биологическим наукам (2002). Тбилиси.

Результаты проведенных исследований широко освещались на итоговых ежегодных сессиях НИИ психиатрии, на систематических семинарах Республиканского хроматографического центра в 2003-2004 годах.

Диссертация рекомендована к публичной защите.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликованы 3 работы.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 138 страницах печатного текста. Содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов собственных исследований, анализ итогов исследований, выводы и список использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 6 хроматограммами и 18 таблицами. Список литературы содержит 151 работ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал. Исследования проведены на 140 половозрелых лабораторных мышах – самцах массой $26,0 \pm 2,0$ гр. и представлены 4 сериями наблюдений.

В первой серии наблюдений среди 140 мышей были отобраны 90 мышей с четко очерченными циркадными характеристиками содержания суммарного серотонина в крови.

Для этого у каждой мышки 5 раз с промежутком 4 часа брали кровь из немного подогретого хвоста (путем отсечения) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли суммарный уровень свободного и связанного серотонина в цельной крови.

В результате проведенного анализа была сформирована группа мышей с $16,0 \pm 0,6$ час. циклом колебаний функционального состояния индолалкиламинергической системы мозга.

Во второй серии наблюдении (30 мышей) каждое животное получало 1,0%, 2,0 мл. амитриптилина путем внутримышечной одноразовой инъекции (так называемая фармакологическая нагрузка амитриптилином). Антидепрессант вводили в начальный и срединный периоды циркадного колебания, т. е. в может максимальной и минимальной концентрации серотонина в цельной крови.

В связи с тем, что у выделенной группы мышей цикл циркадных колебаний функционального состояния серотонинергической системы мозга был равен $16,0 \pm 0,6$ часам - 5 мышей забивали сразу после введения, 5 мышей через 8 часов после введения и 5 мышей через 16 часов после введения препарата.

В третьей серии наблюдений (30 мышей) каждое животное получало 1,0%, 5,0 мл тразодона в форме внутримышечной одноразовой инъекции (так называемая фармакологическая нагрузка тразодонам). Антидепрессант вводили в начальный и срединный периоды циркадного колебания серотонина, т. е. в момент его максимальной и минимальной концентрации в цельной крови.

В связи с тем, что у выделенной группы мышей цикл циркадных колебаний функционального состояния серотонинергической системы мозга также составил $16,0 \pm 0,6$ час - 5 мышей забивали сразу после введения (в качестве фоновых показателей), 5 мышей забивали через 8 часов после введения и 5 мышей через 16 часов после введения препарата.

В четвертой серии наблюдений (30 мышей) каждое животное получало 1,0%, 2,0 мл амитриптилина и 1,0%, 5,0 мл тразодона в форме внутримышечной одноразовой инъекции (так называемая комбинированная фармакологическая нагрузка). Препараты вводили в начальный и средний периоды циркадного колебания серотонина, т. е. в момент его максимальной и минимальной концентрации в цельной крови.

В связи с тем, что у выделенной группы мышей цикл циркадных колебаний функционального состояния серотонинергической системы мозга также был равен $16,0 \pm 0,6$ час., - 5 мышей забивали сразу после введения (в качестве фоновых показателей), 5 мышей забивали через 8 часов после введения и 5 мышей забивали через 16 часов после комбинированного введения антидепрессантов.

Параллельно фармакодинамическому анализу действия амитриптилина, тразодона и их сочетанной комбинации на функциональное состояние серотонинергической системы мозга у забитых крыс приведен анализ фармакокинетики амитриптилина и тразодона.

Определены активные формы амитриптилина и тразодона (свободный амитриптин; нортриптин; *cis*-10-гидрокси-амитриптин; свободный тразодон и *cis*-10-гидрокси-тразодон).

Из неактивной формы амитриптилина определены: trans-10-гидрокси-амитриптилин; амитриптилин-N-оксид; cis-10-гидрокси-нортриптилин; trans-10-гидрокси-нортриптилин и дезметил-нортриптилин.

Функциональное состояние серотонинергической системы мозга оценивали по уровню следующих показателей:

- уровень серотонина в цельной крови;
- уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в сыворотке крови и моче (мочу забирали у забитых мышей шприцем из мочевого пузыря).
- уровень свободного триптофана плазмы.
- уровень свободного тирозина плазмы.
- уровень триптамина плазмы.

Весь полученный материал обработан методом вариационно-статистического анализа по системе «Нептун» контроля и управления экспериментальными исследованиями. (Киев. Техника вычислений. 1996).

Методы исследования. Экстракция препаратов проведена согласно описанной З. А. Зурабашвили (1996) методике. Анализ активных и неактивных форм амитриптилина и тразодона проведен согласно методической рекомендации Y. Kraak, P. Bijster (1995). Анализ концентрации аминокислот плазмы крови (триптофан, тирозин) проведен методом Н. Horke, M. Weiner (1994); Количественное определение метиловых эфиров N-трифторацетил производных триптамина проведено по прописи Y. Wagner, H. Wagner (1999). Экстракция серотонина из цельной крови и его хроматографическая идентификация проведены по методу Y. Wagner (1999). Анализ 5-оксииндолуксусной кислоты в сыворотке крови и моче проведен по методу B. Williams (1999).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью работы является провести хронофармакологический анализ индивидуального и совместного действия препарата, неизбирательно ингибирующего обратный нейрональный захват неиромедиаторов (амитриптилин) и препарата, избирательно ингибирующего обратный нейрональный захват серотонина (тразодон) на функциональное состояние серотонинергической системы мозга. Определить участия и роль серотонинергической системы мозга в развитии циркадного ритма функциональной динамики серотонинергической системы мозга, а также значение этого ритма в действии антидепрессантов.

Согласно современным представлениям эффективность действия антидепрессантов связана с выравниванием медиаторных взаимодействий, т. к. для нормального функционирования мозга необходимо оптимальное соотношение нейрональной активности всех морфо-функциональных систем мозга (холинергической, адренергической, дофаминергической, серотонинергической и т. д.). Поэтому нами было изучено индивидуальное и совместное действие антидепрессантов на функциональное состояние серотонинергической системы мозга. О функциональном состоянии серотонинергической системы мозга судили по уровню серотонина в цельной крови и содержанию в плазме и моче конечного производного серотонина -5-оксииндолуксусной кислоты.

Вместе с этим, с целью выяснения влияния антидепрессантов на основные пути синтеза и метаболизма серотонина мы определяли уровень свободного триптофана (предшественника серотонина), тирозина (конкурирующая аминокислота), а также важного метаболита триптофана - триптамина, в плазме крови белых мышей, на разных

этапах фармакологической нагрузки амитриптилином, тразодоном или их совместного действия.

При анализе функционального состояния моноаминергических систем мозга на фоне действия антидепрессантов необходимо учитывать тот факт, что между этими системами существует взаимодействие, связанное с одной стороны, особенностями их метаболизма, конкуренцией за место накопления и с другой стороны - обусловленное их анатомическим взаимодействием.

Исходя из локализации моноаминергических систем мозга и многочисленных физиологических и фармакологических исследований, можно сделать предположение, что основная роль моноаминсодержащих нейронных систем в интегративной деятельности мозга, заключается в восходящем активирующем и нисходящем тормозном влияниях стволовых отделов мозга на переднемозговые структуры. Таким образом, влияние моноаминергических нейронов складывается из интеграции различных сигналов, поступающих из внутренней и внешней среды организма, и дальнейшей передачи этой информации в структуры промежуточного и переднего мозга.

Согласно условиям хронофармакологического анализа, антидепрессанты вводились отдельно в период максимальной и минимальной концентрации серотонина в крови.

С этой целью исследования были проведены до, через 8 и 16 часов после введения препаратов в периоды максимальной и минимальной активности серотонинергической системы мозга.

Одновременно забивались (гильетинизировали) по 5 белых мышей. Кровь забирала для определения уровня суммарного серотонина, 5-оксииндолуксусной кислоты в цельной крови и в моче, свободного триптофана и свободного тирозина в плазме, а также триптамина в плазме крови.

У забитых животных шприцем осторожно забирала мочу из мочевого пузыря. Далее все 5 порций сливались и определяли уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в моче.

Проведенные нами исследования показали, что в/м инъекция антидепрессанта в период максимальной или минимальной активности серотонинергической системы мозга приводит к неодинаковым результатам. После инъекции амитриптилина в период максимальной активности серотонинергической системы мозга уровень суммарного серотонина в цельной крови намного выше, чем после инъекции препарата в период минимальной активности серотонинергической системы мозга. Вместе с этим, в указанном случае уровень серотонина не только выше, но держится на высоком уровне намного дольше (таблица 1).

Функциональное состояние серотонинергической системы мозга после в/м инъекции 1,0%, 2,0мл. амитриптилина. Препарат введен в период максимальной (0,0 часов) и минимальной (8,0 часов) концентрации серотонина в цельной крови

Таблица №1

Субстрат	Стат. пок.	Время экспозиции (часы)					
		0,0	8,0	16,0	8,0	16,0	24,0
Серотонин в крови (нг/мл)	M	2,30	2,30	3,40	1,25	2,10	2,80
	$\pm\sigma$	0,45	0,30	0,41	0,50	0,48	0,54
	$\pm m$	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,04
	P		>0,5	<0,01		<0,01	<0,01
5-оксииндолуксусная кислота в	M	1,15	1,00	1,00	0,98	1,24	1,00

крови (нг/мл)	$\pm\sigma$	0,10	0,10	0,14	0,10	0,20	0,22
	$\pm m$	0,01	0,02	0,04	0,02	0,03	0,02
	P		<0,01	>0,5		<0,01	<0,01
5-оксииндолуксусная кислота в моче (нг/мл)	M	3,74	3,95	4,20	4,45	4,00	3,80
	$\pm\sigma$	0,52	0,40	0,49	0,41	0,32	0,28
	$\pm m$	0,03	0,02	0,03	0,02	0,01	0,03
	P		<0,01	<0,01		<0,01	<0,01
Свободный триптофан в плазме (нг/мл)	M	1,18	1,00	0,81	1,06	0,98	1,00
	$\pm\sigma$	0,10	0,10	0,14	0,11	0,28	0,20
	$\pm m$	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03
	P		<0,01	<0,01		>0,5	>0,5
Свободный тирозин в плазме (нг/мл)	M	1,10	1,24	1,28	1,22	1,20	1,10
	$\pm\sigma$	0,10	0,13	0,22	0,12	0,20	0,22
	$\pm m$	0,01	0,02	0,03	0,08	0,04	0,02
	P		<0,01	>0,5		<0,01	<0,01
Триптамин в плазме (нг/мл)	M	1,10	1,54	1,50	1,48	1,10	1,15
	$\pm\sigma$	0,10	0,15	0,18	0,10	0,18	0,22
	$\pm m$	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
	P		<0,01	>0,5		>0,5	>0,5

Проведенные нами исследования показали, что инъекция амитриптилина (1,0%, 2,0мл) в период высокой концентрации серотонина в крови белых мышей резко увеличивает уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в моче животных. Инъекция амитриптилина в период минимальной концентрации серотонина в крови белых мышей, снижает уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в моче животных.

Согласно нашим наблюдениям, динамика колебаний триптофана в плазме во многом повторяла динамику колебаний 5-оксииндолуксусной кислоты в моче.

Инъекция амитриптилина в период максимальной концентрации серотонина в крови белых мышей на 16,0 часов снижала уровень триптофана в плазме крови животных. В отличие от вышесказанного, инъекция амитриптилина в период минимальной концентрации серотонина в крови белых мышей практически не меняла уровня триптофана в плазме крови животных.

Серотонин является ярко выраженным химическим соединением, которое обладает свойством быстро и специфично повышать образование "второго передатчика" - 3,5-ц-АМФ. В свою очередь, повышение уровня циклического 3,5-АМФ путем угнетения катализирующего его фермента (фосфодиэстеразы), вызывает повышение уровня серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты.

Фармакологическая диагностика функционального состояния серотонинергической системы мозга основана на обнаружении в крови избытка серотонина, и в моче 5-оксииндолуксусной кислоты.

Если в организме секретируется только 5-окситриптофан, содержание серотонина в крови не увеличивается, но в моче имеется помимо 5-окситриптофана, также и серотонин (образуется в почках) и 5-оксииндолуксусная кислота. Принято считать, что эти три соединения обнаруживаются в моче в тех случаях, когда содержание серотонина и 5-окситриптофана в крови очень высокое.

Далее нами был изучен уровень тирозина в плазме крови мышей, которым амитриптилин вводили в период максимальной и минимальной концентрации серотонина в крови.

Регуляция поступления триптофана в мозг достаточно сложна. Согласно литературным данным, уровень триптофана и оксииндолов в ЦНС не просто отражает содержание триптофана в мозге. Содержание этих компонентов также зависит от концентрации в плазме других нейтральных аминокислот. В первую очередь необходимо указать на основную конкурирующую незаменимую аминокислоту - тирозин.

Проведенные нами исследования показали, что после инъекции амитриптилина (в период малых концентраций) уровень тирозина значительно падает.

Уровень триптамина в плазме белых мышей, после в/м инъекции амитриптилина в период максимальной концентрации серотонина в крови, достоверно увеличивается (в течении 16,0 часов эксперимента). Инъекция амитриптилина в период минимальной концентрации серотонина в крови мышей, практически не меняет уровня триптамина в плазме.

Далее весь комплекс приведенных выше изменений (вызванных в/м инъекций амитриптилина) мы сравниваем с комплексом изменений, вызванных в/м инъекцией тразодона (таблица 2).

Функциональное состояние серотонинергической системы мозга после в/м инъекции 1,0%, 5,0мл. тразодона. Препарат введен в период максимальной (0,0 часов) и минимальной (8,0 часов) концентрации серотонина в цельной крови

Таблица №2

Субстрат	Стат. пок.	Время экспозиции (часы)					
		0,0	8,0	16,0	8,0	16,0	24,0
Серотонин в крови (нг/мл)	M	2,42	2,84	3,15	2,10	2,50	2,90
	±σ	0,40	0,32	0,44	0,40	0,35	0,42
	±m	0,03	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04
	P		<0,01	<0,01		<0,01	<0,01
5-оксииндолуксусная кислота в крови (нг/мл)	M	1,23	1,30	1,48	1,10	1,30	1,50
	±σ	0,13	0,20	0,31	0,12	0,10	0,14
	±m	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
	P		>0,5	<0,01		<0,01	<0,01
5-оксииндолуксусная кислота в моче (нг/мл)	M	4,00	4,40	4,82	3,52	4,00	4,00
	±σ	0,46	0,28	0,37	0,30	0,32	0,41
	±m	0,03	0,01	0,03	0,08	0,04	0,01
	P		<0,01	<0,01		<0,01	>0,5
Свободный триптофан в плазме (нг/мл)	M	1,25	1,10	1,10	1,14	1,10	1,12
	±σ	0,12	0,20	0,15	0,10	0,10	0,14

	$\pm m$	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
	P		<0,01	>0,5		>0,5	>0,5
Свободный тирозин в плазме (нг/мл)	M	1,15	1,10	1,12	1,05	1,19	1,10
	$\pm \sigma$	0,10	0,18	0,31	0,12	0,14	0,18
	$\pm m$	0,01	0,02	0,01	0,08	0,02	0,02
	P		>0,5	>0,5		>0,5	>0,5
Триптамин в плазме (нг/мл)	M	1,21	1,12	1,14	1,00	0,89	0,84
	$\pm \sigma$	0,10	0,20	0,15	0,12	0,15	0,10
	$\pm m$	0,01	0,92	0,02	0,02	0,01	0,01
	P		<0,01	>0,5		<0,01	>0,5

В отличие от амитриптилина, тразодон является избирательным ингибитором обратного захвата серотонина.

Инъекция тразодона в период максимальной активности функционального состояния серотонинергической системы мозга повысила уровень серотонина в крови белых мышей. Повышение наступило в период первой (небольшое повышение) и второй половины (резкозаметное повышение) циркадного цикла.

Инъекция тразодона в период минимальной активности функционального состояния серотонинергической системы мозга вызвала такой же эффект.

Таким образом, инъекция тразодона способствует длительному (16,0 часов) увеличению уровня серотонина в цельной крови. Принципиального различия от времени инъекции нет.

В отличие от вышесказанного, уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в крови белых мышей меняется по другому.

Инъекция тразодона в период максимальной активности вызывает пролонгированное увеличение уровня 5-оксииндолуксусной кислоты в крови (только через 16,0 часов после инъекции). Инъекция тразодона в период минимальной активности вызывает более отчетливое увеличение уровня 5-оксииндолуксусной кислоты в крови белых мышей.

По нашему мнению, стимуляция совобождение серотонина из резервных форм с увеличением его концентрации в крови (а также увеличение содержания 5-оксииндолуксусной кислоты в моче) сопровождается сложные изменения в ЦНС. Серотонин не проходит через гематоэнцефалический барьер. Однако, согласно современным представлениям, высокие концентрации серотонина в крови способствуют его приходу через гемато-энцефалический барьер.

Уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в моче белых мышей после введения тразодона увеличивается. Характер увеличения принципиально одинаков для времени инъекции. Инъекция тразодона в период максимальной и минимальной активности функционального состояния серотонинергической системы мозга вызывает одинаковые изменения 5-оксииндолуксусной кислоты в моче.

Внутримышечная инъекция тразодона в период максимальной и минимальной активности функционального состояния серотонинергической системы мозга вызывает сходные изменения уровня незаменимых аминокислот (триптофан, тирозин). Уровень триптамина достоверно падает.

В следующей серии наблюдений проведена комбинированная фармакологическая нагрузка. Белым мышам одновременно вводили амитриптилин и тразодон в тех же дозах. Препараты введены в период максимальной и минимальной активности функционального состояния серотонинергической системы мозга (таблица 3).

Функциональное состояние серотонинергической системы мозга после в/м инъекции амитриптилина (1,0%, 2,0мл.) и тразодона (1,0%, 5,0мл.). Препараты введены в период максимальной (0,0 часов) и минимальной (8,0 часов) концентрации серотонина в цельной крови

Таблица №3

Субстрат	Стат. Пок.	Время экспозиции (часы)					
		0,0	8,0	16,0	8,0	16,0	24,0
Серотонин в крови (нг/мл)	М	2,15	2,60	3,00	2,32	3,00	3,15
	±σ	0,34	0,30	0,42	0,50	0,40	0,48
	±m	0,05	0,01	0,04	0,08	0,04	0,06
	P		<0,01	<0,01		<0,01	>0,5
5-оксииндолуксусная кислота в крови (нг/мл)	М	1,07	1,20	1,30	1,16	1,30	1,40
	±σ	0,12	0,14	0,13	0,12	0,18	0,14
	±m	0,01	0,02	0,04	0,01	0,02	0,02
	P		<0,01	<0,01		<0,01	<0,01
5-оксииндолуксусная кислота в моче (нг/мл)	М	3,40	4,00	4,56	3,86	4,15	4,56
	±σ	0,46	0,40	0,37	0,64	0,70	0,28
	±m	0,02	0,01	0,02	0,02	0,04	0,02
	P		<0,01	0,01		<0,01	<0,01
Свободный триптофан в плазме (нг/мл)	М	1,10	1,00	0,82	1,20	1,16	1,25
	±σ	0,21	0,80	0,32	0,10	0,10	0,18
	±m	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
	P		>0,5	<0,01		>0,5	>0,5
Свободный тирозин в плазме (нг/мл)	М	1,00	1,00	1,08	1,10	1,10	1,12
	±σ	0,10	0,13	0,12	0,12	0,14	0,18
	±m	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,04
	P		>0,5	>0,5		>0,5	>0,5
Триптамин в плазме (нг/мл)	М	1,00	0,90	0,82	1,00	0,85	0,72
	±σ	0,09	0,07	0,08	0,12	0,14	0,10
	±m	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04
	P		<0,01	<0,01		<0,01	<0,01

После комбинированной фармакологической нагрузки амитриптилином и тразодоном уровень серотонина в крови резко увеличился. Инъекция препаратов в период максимальной активности функционального состояния серотонинергической системы мозга увеличила уровень серотонина в крови более интенсивно, чем инъекция в период минимальной активности.

Уровень 5-оксииндолуксусной кислоты как в крови, так и в моче также увеличился. Однако дифференцированной реакции не наблюдалось.

Фармакологическая нагрузка в период максимальной активности значительно снизила уровень свободного триптофана плазмы крови и не изменила уровня свободного тирозина. Уровень триптамина резко снизился.

В отличие от вышесказанного, фармакологическая нагрузка в период минимальной активности не изменила уровня свободного триптофана и тирозина плазмы. Уровень триптамина резко уменьшился.

Известно, что в результате окислительного дезаминирования серотонин превращается в 5-оксииндолацетальдегид из которого затем образуется 5-оксииндолуксусная кислота. Действие моноаминоксидаз зависит от их локализации. В ЦНС моноаминоксидазы регулируют пресинаптическую концентрацию нейротрансмиттеров, в том числе и серотонина. Они разрушают также серотонин, который выделившись и подействовав на постсинаптическую мембрану (мембрану серотонинового рецептора) затем снова захватывается аксоном, из которого произошло его выделение.

При хронофармакологическом изучении проблем, связанных с действием антидепрессантов на функциональное состояние серотонинергической системы мозга, а также вопросов, связанных с источником синтеза серотонина - триптофаном, необходимо учитывать следующее обстоятельство. Серотониновый путь обмена не является единственным путем метаболизма триптофана.

Триптофан декарбоксилируется также в триптамин, который в свою очередь превращается в N-метилтриптамин и N, N-диметилтриптамин. Роль триптамина в функционировании ЦНС окончательно не изучена. Большинство исследователей указывает на важное значение следующего пути обмена: триптофан-триптамин- N-метилтриптамин и N, N-диметилтриптамин.

В настоящее время высоко оценивается физиологическое значение отмеченного пути обмена. В этом случае указывают на изменение активности специфической моноаминоксидазы, которая участвует в основном пути разрушения триптофана - его окислительном дезаминировании. Исследования такого пути обмена триптофана особенно важны для психиатрической клиники, т. к. диметилтриптамин обладает ярко выраженным психотомиметическим свойством.

Широко известна роль триптофана в процессе синтеза серотонина и участие триптофандекарбоксилазы в указанной выше реакции. Оценивая полученные данные мы учитывали также, что триптофандекарбоксилаза не является специфичным для 5-окситриптофана ферментом. Этот фермент катализирует также декарбоксилирование другой аминокислоты - тирозина.

Как было вышесказано, триптофандекарбоксилаза не является самостоятельным ферментом, осуществляющим декарбоксилирование L-ароматических аминокислот. Этот фермент идентичен дофамин-декарбоксилазе, превращающей субстрат в дофамин.

Вопрос очень важен, т. к. от специфичности 5-окситриптофандекарбоксилазы зависит активность ее ингибиторов в понижении синтеза серотонина и изменении функционального состояния серотонинергической системы.

С этим, видимо, связан известный клинический эффект, что малые дозы антидепрессантов вызывают часто депрессивное действие, в то время как стимулирующее

действие проявляется в присутствии больших концентраций. Принято считать, что каждый эффект, имеющий одинаковые параметры, характеризует препараты с одинаковым типом действия. Таким образом, роль количественных соотношений окисленной и неизменной форм антидепрессантов, при анализе их фармакокинетики имеет большое практическое и теоретическое значение.

Объективное прогнозирование действия антидепрессантов на функциональное состояние моноаминергических систем мозга невозможно без четкого представления о биохимических процессах, которым подвергается этот препарат в организме, а также о кинетических закономерностях циркадного распределения и содержания неизменной и окисленной форм антидепрессантов во внутренней среде организма. Закономерности циркадного биоритма препаратов в организме, их всасывание, связывание с белками сыворотки крови, транспорт, распределение в органах и тканях, а также биотрансформация и выделение являются основными проблемами, без которых невозможно оптимальное назначение антидепрессантов (хроматограмма 1).

На хроматограмме приведено % содержание активных и клинически неактивных форм амитриптилина в период его максимальной концентрации (C_{max}) в сыворотке крови белых мышей.

К относительно медленно изменяющимся факторам, влияющим на ответ клетки при действии медиатора, относятся прежде всего циклические изменения в рецепторной системе. Интересно отметить, что эти изменения могут быть разнонаправленными в различных органах, а возможно, и отделах (структурах) мозга.

Весьма интересны циклические изменения концентраций ряда нейрональных рецепторов. Суточные колебания концентрации обнаружены для мест специфического связывания амитриптилина, мест специфического связывания спироперидола в стриатуме, а также для α -АР, β -АР, опиатных, мускариновых и никотиновых рецепторов (K. Frederick, B. Goodwin, 2000). Изменения концентрации рецепторов не являются следствием смены дня и ночи, так как их можно зарегистрировать у животных, содержащихся в полной темноте.

Вместе с тем, увеличение продолжительности светового периода отражается в снижении уровня специфического связывания серотонина в стриатуме (K. Kaiser, 1994). Амплитуда колебаний концентраций рецепторов достигает 40-50% от минимального уровня.

Максимальные значения для α -АР, β -АР, опиатных рецепторов, в коре мозга и мест специфического связывания серотонина в стриатуме приходится у крысы на ночное время суток. Для мускариновых, ацетилхолиновых рецепторов отмечено два максимума концентрации мест связывания, соответствующих в переднем мозге крысы 10 часам утра и 2 часам ночи, при световом периоде с 7 до 19 ч. (M. Lager, 1999). Суточные ритмы концентраций нейрональных рецепторов не одинаковы в различных отделах мозга. При исследовании колебаний концентрации мест связывания амитриптилина в мозге крысы K. Martini, H. Hirshfeld, (2001), обнаружили в супраоптическом ядре максимум концентрации (135% от минимального уровня) в 5ч. утра в хвостатом ядре и медиальной преоптической зоне пик концентрации наступал несколько раньше.

С другой стороны, продолжительное введение агонистов или ингибиторов обратного захвата и распада медиатора, приводит к снижению концентрации мест связывания. Так, хроническое введение антидепрессантов - ингибиторов обратного захвата серотонина или норадреналина приводит к снижению концентрации серотониновых или адреналиновых рецепторов соответственно (E. Usbin, 2000). Индукционный эффект достаточно специфичен, так как концентрация мускариновых рецепторов при этом не меняется (L. Stein, 2000). Хроническое введение тразодона также приводит к снижению содержания серотониновых и дофаминовых рецепторов.

Описаны два максимума концентрации мест связывания амитриптилина в начале темного и светлого периода суток в гипокампе. В септальном отделе достоверных изменений концентрации не выявлено. Не всем классам рецепторов присущи достоверные суточные колебания концентрации. Например, изменение концентрации мест связывания бензодиазепинов в целом мозге крысы не превышало в течение суток 10%, что однако не исключает возможности существования колебаний их концентрации в отдельных структурах (W. Potter, 1994; L. Renaud, 2000).

Суточные колебания в концентрациях нейрональных рецепторов чувствительны к лекарственной терапии. При хроническом введении амитриптилина мышам происходит уменьшение (в 2 раза) и сдвиг (на четыре часа вперед) положения максимума концентрации мест специфического связывания серотонина в стриатуме (K. Moore, H. Kelly, 1999).

Хроническое введение мышам trazодона не приводит к сдвигам в суточных ритмах α - и β -адренорецепторов, серотониновых рецепторов в переднем мозге. Изменения в суточных ритмах концентраций ряда нейрональных рецепторов были обнаружены на фоне хронического введения.

Молекулярными механизмами, лежащими в основе изменений концентраций рецепторов, происходящие в ходе циклических колебаний могут быть: изменения в скорости их синтеза или распада, а также появление скрытых (ранее недоступных для лиганда) рецепторов или переход активных рецепторов в скрытую форму.

Эти данные подтверждают, что распад рецепторов может быть одним из механизмов, участвующих в изменениях их концентрации. Другим возможным механизмом циркадных изменений в концентрациях рецепторов может быть переход рецепторов из доступного для лиганда состояния в недоступное. Так, β -АР в эритроцитах лягушки при связывании с агонистом способны переходить из мембраны клетки во внутриклеточное пространство - интернализироваться, что делает их недоступными для связывания с медиатором. Концентрация рецепторов на мембране при этом снижается (R. Wang, 2000).

Известно также, что многие рецепторы к пептидным гормонам при взаимодействии с лигандом образуют, благодаря латеральной диффузии, скопления (кластеры) на клеточной мембране, которые в дальнейшем поступают внутрь клетки (Y. Wernicke, 1999). Возможно, что циркадные изменения наряду с передачей сигнала внутрь клетки являются также пусковым этапом в их деградации.

Другими, известными в настоящее время механизмами, приводящими к переходу рецептора из доступного в недоступное для лиганда состояние и наоборот, являются механизмы быстрого реагирования и осуществляются на уровне рецепторных комплексов. Механизмы быстрого реагирования не связаны с циркадными (суточными, сезонными) процессами организма (Y. Shildkraut, 2000; M. William, 2001).

ВЫВОДЫ

- 1) На разных этапах фармакокинетики амитриптилина, trazодона или их сочетанного действия уровень серотонина в цельной крови, 5-оксииндолуксусной кислоты в моче, свободного триптофана, тирозина и триптамина в плазме меняются неодинаково. Найденные различия связаны с порогом чувствительности периферических и центральных рецепторных механизмов и носят защитно-компенсаторный характер.

- 2) Фармакологическая нагрузка амитриптилином, тразодоном или их сочетанным действием меняет функциональное состояние серотонинергической системы мозга в зависимости от времени внутримышечного воздействия.
- 3) В период максимальной интенсивности функционального состояния серотонинергической системы мозга в/м инъекция амитриптилина вызывает более пролонгированные сдвиги, чем в/м инъекция тразодона. Инъекция тразодона в период минимальной интенсивности функционального состояния серотонинергической системы мозга более эффективна.
- 4) Хрономодулирующее влияние на циркадные изменения функционального состояния серотонинергической системы мозга проявляется только при раздельном действии амитриптилина и тразодона. Их сочетанная инъекция в период максимальной или минимальной интенсивности функционального состояния серотонинергической системы мозга вызывает практически одинаковые сдвиги.
- 5) Стабилизация уровня серотонина в цельной крови связана с переходом серотонина из связанного состояния в свободное. Сочетанное действие амитриптилина и тразодона в первую очередь увеличивает уровень 5-оксииндолуксусной кислоты в моче. Содержание незаменимых аминокислот плазмы практически не меняется.
- 6) Хронофармакологические исследования с применением различных фармакологических агентов (препараты неизбирательно и избирательно ингибирующие обратный захват серотонина) способствуют более четкому использованию антидепрессантов с различной фармакологической активностью.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Хронофармакологические исследования позволяют подобрать каждому больному оптимальный режим (часы приема) назначения антидепрессантов. В результате этого эффективность действия антидепрессантов, длительность их назначения и дозировка будут соответствовать индивидуальному уровню функционального состояния серотонинергической системы мозга.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. О. Мелкадзе, З. Зурабашвили. Функциональное состояние дофаминергической системы мозга больных на фоне доз амитриптилина в эксперименте. *Georgian Medical News*. 2006, N4 (133), ст. 91-94.

2. O. Melkadze, Z. Zurabashvili. Динамика адсорбции тразодона на поверхности эритроцитов. Georgian Medical News. 2006, N2 (131), ст. 88-92.
3. O. Melkadze, Z. Zurabashvili. Хроматографический анализ галоперидола в смывом с поверхности эритроцитов супернатанте. საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე. ბიოლოგიის სერია A. 2004, ტ. 30, №4, გვ. 489-492