

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 612.44+612.821

Е. Л. Доведова, Н. Д. Ещенко

ДИСБАЛАНС НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ НЕЙРОЛЕПТИКА И ВОЗМОЖНОСТЬ КОРРЕКЦИИ ПЕПТИДОМ ТАФЦИНОМ

Для изучения психо- и невропатологических нарушений в экспериментальной неврологии используется моделирование дисфункции дофаминергической системы при фармакологической индукции — длительное введение лекарственных препаратов животным, приводящее к развитию экспериментального паркинсонизма [1–3]. Известно, что введение нейролептиков вызывает изменение поведения, нарушение двигательной активности и в целом характеризуется как депрессивноподобное состояние. В значительной степени такие нарушения опосредованы воздействием этих препаратов на метаболизм дофамина, а именно — блокированием D_2 -рецепторов и нарушением обратного захвата медиатора (в экспериментах с галоперидолом), или ингибированием работы везикулярного транспортера моноаминов VMAT-2, приводящим к замедлению включения медиатора в везикулы (в опытах с резерпином) [4, 5].

При анализе причин развития болезни Паркинсона и паркинсоноподобных двигательных расстройств наряду со сдвигами в метаболизме ДА исследователи особое внимание уделяют нарушению баланса и взаимосвязи основных нейромедиаторных систем в структурах мозга. В первую очередь речь идет о соотношении между дофаминергической системой, с одной стороны, и серотонинергической и холинергической системами — с другой [6, 7]. В целом изменение эффективности нейротрансдачи *in vivo* вызывает появление специфических симптомов, таким образом, можно говорить о развитии синдрома дисфункции медиаторных систем.

При лечении двигательных нарушений в клинике используются различные лекарственные препараты, способствующие нормализации нейромедиаторных процессов, однако при их длительном использовании нередко проявляются побочные эффекты и привыкание, требующее повышения дозы лекарств. Для выхода из этих затруднений актуален поиск новых антипаркинсонических препаратов, применение которых позволило бы избежать подобных недостатков [8, 9]. В этом отношении большое

Доведова Елизавета Леонтьевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория ультраструктуры и цитохимии мозга Научного центра неврологии РАМН; e-mail: natdmtr@mail.ru

Ещенко Наталья Дмитриевна — доктор биологических наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: natdmtr@mail.ru

© Е. Л. Доведова, Н. Д. Ещенко, 2013

внимание уделяют природным биологически активным веществам, в том числе коротким пептидам — эндогенным соединениям, участвующим в регуляции многих физиологических функций. Действие таких регуляторных пептидов сводится к нейрохимическим пластическим перестройкам мозга на клеточном и субклеточном уровнях [10–13].

Особый интерес представляют пептиды, обладающие широким спектром регуляторных функций: от стресс-протективного и антидепрессивного до гипногенного и обезболивающего действий [14–16]. Одним из таких регуляторных пептидов является тетрапептид тафцин (Tyr-Lys-Pro-Arg) и его синтетические аналоги [17, 18].

Целью данной работы было изучение взаимоотношения дофамин- и серотонинергической систем в условиях длительного воздействия нейролептика галоперидола и выяснение роли тетрапептида тафцина на фоне развивающегося экспериментального паркинсонизма.

В задачу исследования входило определение активности моноаминоксидаз А и Б, уровня нейромедиаторов: дофамина и серотонина, а также конечных продуктов их метаболизма в хвостатом ядре и сенсомоторной зоне коры мозга крыс.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г, разделенных на две группы по 10 животных в каждой. Экспериментальным животным 1-й группы ежедневно внутривентриально вводили галоперидол («Гедеон Рихтер») в дозе 0,5 мг/кг массы тела в течение 30 дней. Животным 2-й группы на фоне последнего введения препарата галоперидола однократно вводили тетрапептид тафцин (Serva) в дозе 0,5 мг/кг массы тела; время действия тафцина составляло один час. Контролем служили интактные животные ($n = 10$). В течение всего эксперимента животных содержали в условиях свободного доступа к воде и пище при 12-часовой смене освещенности. Обращение с животными соответствовало требованиям «Правил лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)», Москва, 2003.

В день опыта крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Мозг извлекали на холоде и промывали в охлажденном растворе сахарозы (0,32М). Ткань исследуемых образований мозга — сенсомоторной коры и хвостатого ядра — гомогенизировали в растворе сахарозы (0,32М); в 10%-ном гомогенате флуориметрически определяли содержание дофамина (ДА), серотонина (5'-ОТ) и 5'-оксииндолуксусной кислоты (5'-ОИУК) в одной пробе по методу Б. Н. Когана и Н. В. Нечаева [19], а также гомованилиновой кислоты (ГВК) по методу из работы [20]. Содержание биогенных аминов и их метаболитов выражали в пг/г ткани.

Из гомогената исследуемых структур мозга с помощью дифференциального центрифугирования (10 000 g, 15 мин) выделяли фракцию «грубых» митохондрий, которую использовали для спектрофотометрического определения активности ферментов. Активность моноаминоксидазы типа А (МАО А) определяли, используя серотонин как субстрат, по методу Н. Попова и соавторов [21] в нашей модификации [22]. Активность моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) с *n*-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата анализировали по методу из работы [23]. Активность ферментов выражали в условных единицах: ΔE_{250} (для МАО А) или ΔE_{450} (для МАО Б), рассчитанных на 1 мг белка митохондриальной фракции за 60 мин. Содержание белка в пробах определяли при длине волны 750 нм по общепринятому методу Лоури.

Полученные экспериментальные данные анализировали с помощью пакета статистических программ «STATISTICA 5.0». Различия между контрольной и опытными группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

В наших экспериментах после введения препарата галоперидола в течение первых 15–20 мин крысы проявляли двигательное беспокойство, затем успокаивались и к 60-й мин замирали в определенной позе, характеризовавшейся скованностью и ригидностью мышц. После 30-суточного ежедневного введения препарата состояние животных ухудшалось, фаза возбуждения сокращалась, уменьшалась масса тела, наблюдался тремор головы и хвоста. Снижение общей двигательной активности, брадикардия свидетельствовали о наступлении выраженной формы экспериментального паркинсонизма.

Длительное введение животным галоперидола приводило к значительным изменениям активности обеих форм MAO в исследованных структурах мозга (табл. 1). Активность оксидазы, преимущественно окисляющей ДА (MAO Б), в этих условиях снижалась, причем более выраженным уменьшение активности фермента было в хвостатом ядре (на 37%), в то время как в коре мозга выявлена лишь тенденция к замедлению окисления ДА.

Несколько иной характер носили изменения активности MAO А, окисляющей 5'-ОТ (см. табл. 1). На фоне значительного (более чем в 1,5 раза) повышения активности MAO А в хвостатом ядре, в коре мозга при длительном действии нейролептика этот показатель, напротив, несколько уменьшался.

Таблица 1. Активность моноаминоксидаз в структурах мозга крыс при длительном введении галоперидола и краткосрочном воздействии тафцина ($M \pm m$, $n = 10$)

Активность ферментов, ΔЕ/мг белка за 60 мин	Условия эксперимента		
	Контроль	Галоперидол	Галоперидол + тафцин
<i>Сенсомоторная зона коры мозга</i>			
MAO Б, ΔЕ ₄₅₀	2,96 ± 0,19	2,36 ± 0,18	3,26 ± 0,30
MAO А, ΔЕ ₂₅₀	8,71 ± 0,58	6,14 ± 0,49*	4,78 ± 0,28*
<i>Хвостатое ядро</i>			
MAO Б, ΔЕ ₄₅₀	2,17 ± 0,20	1,37 ± 0,13*	3,02 ± 0,40*+.
MAO А, ΔЕ ₂₅₀	7,37 ± 0,12	11,12 ± 0,19*	5,99 ± 0,15*+.

Примечание. * — статистически значимые отклонения ($p < 0,05$) от контроля; + — статистически значимые отклонения ($p < 0,05$) группы «галоперидол + тафцин» от группы «галоперидол» (то же для табл. 2).

Однократное введение животным тафцина на фоне длительного действия галоперидола позволило обнаружить нормализующий эффект тетрапептида (см. табл. 1), причем направленность изменений активности обеих форм MAO была противоположна тем, которые найдены в исследованных структурах мозга при действии только

нейролептика. Более выраженные изменения активности обнаружены в хвостатом ядре. Так, активность МАО Б в этой структуре возрастала в 2,2 раза (по сравнению с показателем группы «галоперидол»), а существенно увеличенная под влиянием нейролептика активность МАО А после инъекции тафцина снижалась в среднем на 48%. Таким образом, в этих экспериментах показано реципрокное изменение под влиянием галоперидола активности моноаминоксидаз, связанных с дофаминергической (МАО Б) или серотонинергической системой (МАО А), и отмечена противоположная направленность эффектов тетрапептида тафцина по сравнению с воздействием нейролептика.

Более полно охарактеризовать состояние исследуемых медиаторных систем позволяет сопоставление изменений активности моноаминоксидаз с количеством нейромедиаторов и продуктов их катаболизма (табл. 2).

Таблица 2. Влияние тафцина на содержание биогенных аминов и их метаболитов в структурах мозга при длительном введении галоперидола ($M \pm m$, $n = 10$)

Содержание биогенных аминов и их метаболитов, пг/г ткани	Условия эксперимента		
	Контроль	Галоперидол	Галоперидол + тафцин
<i>Сенсомоторная зона коры мозга</i>			
ДА	717,6 ± 8,4	598,4 ± 13,4	645,8 ± 18,3
ГВК	7,8 ± 0,8	5,7 ± 0,9*	7,4 ± 0,8 ⁺
5'-ОТ	160,1 ± 12,6	138,5 ± 9,2	156,9 ± 8,1 ⁺
5'-ОИУК	118,1 ± 10,0	120,7 ± 9,1	118,4 ± 9,4
<i>Хвостатое ядро</i>			
ДА	2260,4 ± 64,2	1310,6 ± 12,6*	2168,0 ± 51,6 ⁺
ГВК	6,9 ± 0,8	2,4 ± 0,9*	6,4 ± 0,7 ⁺
5'-ОТ	271,4 ± 15,2	274,5 ± 12,0	360,2 ± 9,8* ⁺
5'-ОИУК	350,5 ± 16,3	754,7 ± 8,4*	508,5 ± 12,3* ⁺

Введение галоперидола в течение 30 дней приводило к снижению уровня самого нейромедиатора — дофамина, и особенно продукта его катаболизма — ГВК, в исследованных образованиях мозга (см. табл. 2). Более выраженным было уменьшение количества ДА и ГВК в хвостатом ядре по сравнению с корой. Так, в хвостатом ядре экспериментальных животных содержание ДА составляло 57%, а ГВК — около 35% от контрольного уровня, в то время как изменение уровня нейромедиатора в коре имело лишь тенденцию к снижению, а статистически значимым (на 23%) было уменьшение количества ГВК.

Подавление как синтеза нейромедиатора, так и его окисления при длительном действии галоперидола согласуется с имеющимися в литературе сведениями об ингибировании всех этапов метаболизма дофамина [24]. В сходных условиях эксперимента под влиянием галоперидола нами также было показано снижение активности тирозингидроксилазы на 39% в хвостатом ядре мозга крыс [25]. Наряду с замедлением метаболизма ДА гипопункция дофаминергической системы при длительном действии

галоперидола характеризуется блокадой до 70–75% D₂-рецепторов, торможением обратного захвата нейромедиатора, а также вторичной активацией катаболизма 5'-ОТ [26].

В результате краткосрочного воздействия тафцина на фоне длительного введения животным галоперидола показано (см. табл. 2) изменение исследованных показателей метаболизма ДА в сторону их нормализации, а именно — в сенсомоторной зоне коры содержание нейромедиатора несколько повышалось по сравнению с уровнем ДА у крыс, которым вводили галоперидол, составляя около 90% по сравнению с контролем. Количество ГВК в этой структуре изменялось под влиянием тафцина статистически значимо, увеличиваясь практически до контрольных значений. Более выраженной была нормализация показателей обмена ДА в хвостатом ядре, где содержание нейромедиатора возрастало в 1,65 раза, а уровень его метаболита — в 2,7 раза по сравнению с показателями у животных после длительного введения нейролептика, и данные значения приближались к цифрам у контрольных животных. Эти изменения согласуются с установленной активностью MAO Б в обоих образованиях мозга (см. табл. 1).

Некоторый нормализующий эффект однократного введения тафцина на фоне длительного действия галоперидола выявлен и в отношении метаболизма серотонина (см. табл. 2): в хвостатом ядре содержание 5'-ОИУК снижалось почти в 1,5 раза по сравнению с уровнем метаболита у крыс, которым вводили галоперидол, что сопровождалось уменьшением активности MAO А (см. табл. 1). Однако уровень самого нейромедиатора в хвостатом ядре после введения тафцина возрастал примерно на 30%, что указывает на нарушение равновесия между процессами синтеза и окисления серотонина. В сенсомоторной коре после введения тафцина количество серотонина и конечного продукта его метаболизма было в пределах контрольных значений.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что длительное введение препарата, вызывающего нарушение метаболизма дофамина (галоперидол) сопровождается выраженным дисбалансом исследованных медиаторных систем — дофамин- и серотонинергической. Это может лежать в основе экстрапирамидных нарушений — расстройств двигательной активности и психической деятельности [6, 27]. Судя по электрофизиологическим и поведенческим показателям, состояние животных изменяется от депрессивно-подобного при коротких экспозициях до явления брадикинезии при хроническом применении галоперидола [28].

Полученные нами материалы о нормализующем эффекте тафцина на активность ферментов и содержание нейромедиаторов в условиях длительного воздействия галоперидола позволяют предположить, что регулирующее действие этого пептидного препарата на метаболизм биогенных аминов, в первую очередь ДА, по-видимому, опосредовано его влиянием на синаптическую передачу, что может привести к перестройкам медиаторных систем мозга, а на поведенческом уровне проявиться в широком спектре антипсихотических эффектов. Ранее нами и другими исследователями показано, что введение крысам тафцина приводит к изменению ЭЭГ активности и уменьшению брадикинезии [29, 30].

Известно, что модулирующее действие пептидов более ярко проявляется в тех системах, где патологические процессы выражены в наибольшей степени [11, 14], что нашло подтверждение и в наших экспериментах: действие галоперидола первично направлено на нигростриатную систему, и именно в хвостатом ядре, по нашим данным, влияние тафцина более выражено по сравнению с сенсомоторной зоной коры мозга.

В целом полученные нами результаты можно рассматривать как предпосылки к испытанию коротких пептидов в качестве лекарственных средств при патологических состояниях, сопровождающихся развитием острого синдрома гипофункции дофаминергической системы.

Литература

1. Монаков М. Ю., Доведова Е. Л. Сравнительный анализ биогенных аминов при моделировании гипо- и гиперфункции моноаминергической медиаторной системы // *Нейрохимия*. 1998. Т. 15, № 3. С. 286–292.
2. Dauer W., Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models // *Neuron*. 2003. Vol. 39. P. 889–909.
3. De Lau M. M., Bretler M. M. Epidemiology of Parkinson's disease // *The Lancet Neurology*. 2006. Vol. 5, N 6. P. 525–535.
4. Storch A., Ott S., Hwang Y. I. The dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurodegeneration // *Neurotoxic factors in Parkinson's disease and related disorders* / ed. by A. Storch, M. Collins. New York: Kluwer Acad. Publ., 2000. P. 17–40.
5. Козловский В. Л., Прахье И. В. Стойкие нарушения поведения у мышей, вызванные поочередными введениями фенамина и галоперидола // *Нейронауки*. 2006. № 2. С. 13–17.
6. Нодель М. Р., Яхно Н. Н. Нервно-психические нарушения при болезни Паркинсона // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2009. № 2. С. 3–7.
7. Parent M., Parent A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship // *Can. J. Neurol. Sci.* 2010. Vol. 37, N 3. P. 313–319.
8. Иллариошкин С. Н. Молекулярные основы болезни Паркинсона // *Матер. I Национального конгресса «Болезнь Паркинсона и расстройства движений»*. М., 2008. С. 8–17.
9. Paris I., Lozano J., Perez-Pastene C. Molecular and neurochemical mechanisms in Parkinson's disease pathogenesis // *Neurotoxicity Research*. 2009. Vol. 16, N 3. P. 271–279.
10. Ашмарин И. П. Перспективы практического применения некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов // *Вопр. мед. химии*. 1984. № 3. С. 2–7.
11. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П. Модулирующее действие коротких пептидов на моноаминергические процессы мозга как основа их психотропного эффекта // *Вопр. мед. химии*. 1984. Т. 30, № 3. С. 36–43.
12. Экспериментальное развитие концепции О. С. Адрианова о соотношении функциональных и нейрохимических процессов: регуляторные пептиды при дисфункции медиаторных систем / Адрианов О. С., Попова Н. С., Доведова Е. Л., Герштейн Л. М., Качалова Л. А. // *Усп. физиол. наук*. 2000. Т. 31, № 1. С. 71–80.
13. Siemion I. Z., Kluczyk Z. Z. The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems // *Amino Acids*. 2005. Vol. 29, N 3. P. 161–176.
14. Koroleva S. V., Ashmarin I. P. Functional continuum of regulatory peptides (RPs): Vector model of RP-effects representation // *J. Theor. Biol.* 2002. Vol. 216. P. 257–271.
15. Структурно-функциональная организация нейронов коры большого мозга у крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу при воздействии пептида, вызывающего дельта-сон / Боголепов Н. Н., Попова Э. Н., Коплик Е. В., Кривицкая Г. Н., Судаков К. В. // *Морфология*. 2003. Т. 123, № 2. С. 10–15.
16. Лысенко А. В., Арутюнян А. В., Козина Л. С. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям. СПб.: ВМедА, 2005. 207 с.
17. Влияние тафцина на некоторые стороны обмена в двигательной системе мозга животных / Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Камышева А. С., Сергутина А. В., Чеботарева Т. Л. // *Вопр. мед. химии*. 1990. Т. 36, № 4. С. 15–17.
18. Изучение эффектов гектапептида Селанка на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс Вистар / Клодт П. М., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Козловская М. М., Майский А. И., Раевский К. С. // *Психофармакология и биол. наркология*. 2005. Т. 5, № 3. С. 1012–1015.
19. Козан Б. Н., Нечаев Н. В. Чувствительный и быстрый метод одновременного определения ДА, НА, 5'-НТ, 5'-индолуксусной кислоты в одной пробе // *Лабораторное дело*. 1979. № 5. С. 301–303.
20. Anden N. E., Roos B. E., Verdinius B. On the occurrence of homovanillic acid in brain and cerebrospinal fluid and its determination by a fluorometric method // *Life science*. 1963. Vol. 2. P. 448–458.

21. Popov N., Rosler V., Thiemann V., Mathies H. Eine empfindliche Methode zur Bestimmung der monoaminoxidase Aktivität // Acta Biol. Med. Germ. 1971. Bd 26. S. 239–245.
22. Доведова Е. Л., Хрусталева Д. А. Сравнительная характеристика ферментативных систем обмена нейромедиаторов в мозге крыс Вистар и Август при различных сроках воздействия амфетамина *in vivo* // Нейрохимия. 2007. Т. 24, № 2. С. 150–155.
23. Методы исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий / Горкин В. З., Вережкина А. В., Гриднева Л. И., Жердева Л. В., Леонтьева Г. А., Криченпова Р. С., Комисарова Н. В., Кляшторин А. Б., Романова Л. А., Северина И. С. // Современные методы в биохимии. М., 1968. Т. 2. С. 155–177.
24. Chertkow Y., Weinreb O., Youdim M. B., Silver H. Dopamine and serotonin metabolism in response to chronic administration of fluvoxamine and haloperidol combined treatment // J. Neural Transm. 2007. Vol. 114, N 11. P. 1443–1454.
25. Доведова Е. Л., Воронков Д. Н. Сравнительная характеристика ферментных систем метаболизма биогенных аминов в различные сроки введения галоперидола и резерпина как отражение морфохимической пластичности мозга // Матер. конф. «Современные направления исследований функциональной и межполушарной асимметрии и пластичности мозга». М.: Научный мир, 2010. С. 364–367.
26. Dalley J. W., Roiser J. P. Dopamine, serotonin and impulsivity // J. Neurosci. 2012. Vol. 32, N 17. P. 5843–5852.
27. Семенова Т. П. Роль взаимодействия серотонин- и норадреналинергической систем в регуляции поведения // Журн. высш. нерв. деят. 1997. Т. 47, № 2. С. 358–363.
28. Попова Н. С., Качалова Л. М. Функциональное взаимодействие структур мозга: принципы, варианты, моделирование. М., 2001. 180 с.
29. Доведова Е. Л., Качалова Л. М., Орлова Е. И. Метаболизм и биоэлектрическая активность отдельных структур мозга при действии тетрапептида тафцина // Журн. невропатологии и психиатрии. 1986. Т. 86, № 7. С. 1025–1028.
30. Весков Р., Попова Н. С., Адрианов О. С. Различное влияние тетрапептида тафцина на биоэлектрическую активность структур мозга при различных функциональных состояниях ЦНС // Бюл. экпер. биол. и мед. 1995. Т. 119, № 4. С. 365–368.

Статья поступила в редакцию 13 июня 2013 г.