

*Е. Л. Доведова, Н. Д. Ещенко*

## ДЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕТРАПЕПТИДАМИДА НА МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА

Всестороннее изучение биологических эффектов коротких пептидов привлекает в последние годы большое внимание. Установлено, что подобные пептиды определяют и регулируют болевую чувствительность, имеют непосредственное отношение к развитию амнезии, в значительной мере определяют эмоциональные и поведенческие реакции. Некоторые из них участвуют в патогенезе ряда нервно-психических заболеваний. Особый интерес представляют короткие пептиды, которые обладают широким спектром регуляторных функций — от стресс-протекторного и антидепрессантного до гипногенного и обезболивающего действия [1–3]. Подобные пептиды и их синтетические производные нашли применение в клинике. Например, на основе дельта-сон индуцирующего пептида в лаборатории химии пептидов Института биоорганической химии РАН создан препарат Дельтаран, использующийся в клинике в виде интраназального раствора [4, 5]. Подобные аналоги в настоящее время широко используются в медицинской практике; выпущена целая серия биопротеинов под общим названием «пептид-био», улучшающих жизнедеятельность организма [6, 7].

Большой интерес исследователей к изучению опиоидных пептидов обусловлен не только теоретическими соображениями, но и практической необходимостью замены синтетических обезболивающих средств эндогенными соединениями — энкефалинами и их аналогами. Как известно, природные пептиды весьма нестабильны в организме, они быстро расщепляются пептидазами. Поэтому усилия многих специалистов направлены на поиск путей получения более устойчивых и не вызывающих побочных эффектов аналогов биологически активных веществ эндогенного происхождения. В частности установлено, что наличие на С-конце пептидов группы глицин–пролин существенно повышает их устойчивость к протеолизу. Примером такого синтетического «глипролинового» пептида может служить препарат Семакс, обладающий выраженным длительным нейропротекторным и ноотропным эффектом, и нашедший применение в клинике [8, 9].

Еще одним путем повышения устойчивости пептидов к расщеплению протеазами является введение в молекулу d-аминокислот. Подобное соединение — простейший аналог энкефалинов тетрапептидамид (ТПА) получен в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ РАМН. Он имеет структуру d-Тур-Ala-Gly-Phe-NH<sub>2</sub> и способен связываться со специфическими опиоидными рецепторами. Как было обнаружено ранее, судя по электрофизиологическим и поведенческим показателям, ТПА, помимо анальгетического эффекта, способен снижать двигательную активность и ослаблять тонус мышц [10].

К настоящему времени в литературе накоплены многочисленные данные, свидетельствующие о тесных связях регуляторных пептидов с различными медиаторными системами в центральной и периферической нервной системах. Установлено, что нейропептиды могут модулировать метаболизм или высвобождение нейромедиаторов [11–13].

Целью данной работы было изучение действия ТПА на метаболизм нейромедиаторов серотонина и дофамина в структурах мозга крыс и кроликов в течение разных сроков после однократного введения препарата. Эффекты ТПА сравнивали с действием другого препарата — дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП). Известно, что ДСИП обладает гипногенными и нейропротекторными свойствами, повышает резистентность животных к различным видам стрессорных воздействий [14–16], однако это влияние пептида оказывается относительно кратковременным.

### Методика исследования

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар и кроликах породы Шиншилла. Исследуемые пептиды ТПА или ДСИП, приготовленные на физиологическом растворе, вводили внутримышечно однократно из расчета 500 мкг и 100 мкг на 1 кг массы тела соответственно. Группе контрольных животных вводили физиологический раствор. Параллельно проводили наблюдение за поведением животных в течение времени действия препаратов.

Через 30 или 90 мин (краткосрочное воздействие) и через трое суток (длительное воздействие) животных декапитировали в соответствии с требованиями, предъявляемыми при работе с животными.

Из двигательной зоны коры больших полушарий и хвостатого ядра мозга крыс с помощью дифференциального центрифугирования выделяли фракцию «грубых» митохондрий, которую использовали для спектрофотометрического определения активности ферментов. Анализировали активность тирозингидроксилазы (ТирГД) [17] и триптофангидроксилазы (ТрпГД) [18], участвующих в синтезе дофамина или серотонина соответственно. Кроме того, определяли активность ферментов, окисляющих эти нейромедиаторы: моноаминоксидазы типа А (МАО А) с серотонином как субстратом, используя метод Н. Попова и соавторов [19] в нашей модификации [20], и моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) с *p*-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата [21].

Субклеточные фракции из двигательной зоны коры и хвостатого ядра мозга кроликов выделяли в градиенте плотности сахарозы (0,8–1,4 М) для последующего определения активности МАО А и МАО Б, а также содержания серотонина [22].

Активность ферментов выражали в условных единицах:  $\Delta E_{250}$  (для МАО А),  $\Delta E_{450}$  (для МАО Б) или  $\Delta E_{355}$  (для триптофангидроксилазы), рассчитанных на 1 мг белка фракции за 60 мин. Активность тирозингидроксилазы выражали в нмоль/мг белка за 60 мин.

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

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты, представленные в табл. 1, указывают на наличие определенных изменений дофаминергической и серотонинергической систем в структурах мозга крыс через 30 мин после введения животным ДСИП, судя по активности ферментов синтеза и утилизации нейромедиаторов. Обращает на себя внимание разная выраженность изменений в исследованных структурах мозга и реципрокность сдвигов в отношении метаболизма дофамина и серотонина.

Таблица 1. Активность ферментов метаболизма серотонина и дофамина в митохондриях мозга крыс после однократного введения ДСИП ( $M \pm t$ ,  $n = 10$ )

Условия опыта	Ферменты			
	ТрпГД	МАО А	ТирГД	МАО Б
<i>Двигательная зона коры больших полушарий</i>				
Контроль	1,07 ± 0,21	0,25 ± 0,05	1,20 ± 0,19	0,48 ± 0,08
ДСИП, 30 мин	1,16 ± 0,20	0,32 ± 0,06*	1,17 ± 0,17	0,34 ± 0,06*
ДСИП, 90 мин	1,10 ± 0,17	0,30 ± 0,06	1,21 ± 0,16	0,41 ± 0,10
<i>Хвостатое ядро</i>				
Контроль	4,03 ± 0,59	0,45 ± 0,07	2,10 ± 0,19	0,50 ± 0,07
ДСИП, 30 мин	4,68 ± 0,37	0,74 ± 0,09*	1,72 ± 0,23	0,41 ± 0,06
ДСИП, 90 мин	3,90 ± 0,41	0,50 ± 0,09	1,88 ± 0,25	0,49 ± 0,04

\*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (тест Вилкоксона).

Наиболее резко через 30 мин после введения ДСИП менялась активность моноаминоксидаз: активность МАО А, окисляющей серотонин, возросла почти на 30% в двигательной зоне коры мозга, еще более значительное (в среднем на 62%) повышение активности этого фермента найдено в хвостатом ядре. Напротив, активность МАО Б, участвующей в утилизации дофамина, в обеих структурах мозга уменьшалась: на 29% в коре и примерно на 20% в хвостатом ядре (тенденция к снижению активности).

В то же время активность ферментов, участвующих в биосинтезе нейромедиаторов, — триптофан- и тирозингидроксилаз через 30 мин после введения ДСИП в митохондриях коры оставалась близкой к контрольным значениям. В митохондриях хвостатого ядра следует отметить тенденцию к повышению активности фермента, синтезирующего серотонин (на 16%) и, напротив, тенденцию к снижению активности фермента синтеза дофамина (на 18%).

Сопоставление степени изменения активности ферментов метаболизма нейромедиаторов позволяет предположить, что более резкое повышение активности МАО А при мало меняющейся активности триптофангидроксилазы способствует снижению уровня серотонина в коре, и особенно в хвостатом ядре. Аналогичное сопоставление активности МАО Б и тирозингидроксилазы указывает на возможное повышение количества дофамина в коре.

Таким образом, на основании этих данных можно говорить о нарушении медиаторных процессов в исследованных структурах мозга после кратковременного (30 мин) воздействия ДСИП. Обращает на себя внимание большая чувствительность к действию пептида ферментов утилизации нейромедиаторов (МАО) по сравнению с ферментами, участвующими в их синтезе (ТрпГД и ТирГД).

Через 90 мин после однократного введения крысам ДСИП практически все исследованные показатели как в двигательной зоне коры мозга, так и в хвостатом ядре были близки к контрольным значениям (см. табл. 1), что свидетельствует о прекращении действия пептида. При анализе поведенческих характеристик установлен кратковременный анальгетический эффект, который наблюдался в течение первых восьми-десяти минут после введения ДСИП животным.

Более выраженное и длительное изменение активности моноаминоксидаз обнару-

жено нами (табл. 2) после однократного введения крысам другого исследуемого пептида (ТПА).

Таблица 2. Активность моноаминоксидаз типа А и Б в митохондриях мозга крыс в норме и после однократного введения тетрапептида (M ± m, n = 10)

Условия опыта	Двигательная зона коры мозга		Хвостатое ядро	
	Ферменты		Ферменты	
	МАО А	МАО Б	МАО А	МАО Б
Контроль	0,25 ± 0,05	0,48 ± 0,08	0,45 ± 0,07	0,50 ± 0,07
ТПА, 30 мин	0,39 ± 0,06*	0,35 ± 0,06*	0,77 ± 0,11*	0,42 ± 0,11
ТПА, 3 сут	0,37 ± 0,05*	0,38 ± 0,05*	0,65 ± 0,03*	0,32 ± 0,08*

\*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (тест Вилкоксона).

Через 30 мин после введения крысам ТПА направленность изменений активности обоих типов моноаминоксидаз была аналогична той, которая обнаружена после введения ДСИП (см. табл. 1), а именно: активация МАО А и подавление МАО Б в обоих исследованных структурах мозга. Следует обратить внимание на то, что в митохондриях двигательной зоны коры введение ТПА приводило к более выраженному повышению активности МАО А (в среднем на 56% по сравнению с контролем), чем в опытах с введением ДСИП (увеличение на 28%).

Принципиально важно, что в отличие от экспериментов с ДСИП, активность ферментов деградации серотонина и дофамина не возвращалась к контрольным значениям даже через трое суток после однократного введения ТПА.

Сходные изменения активности МАО А найдены в субклеточных фракциях, выделенных в градиенте плотности сахарозы из мозга кроликов после введения ТПА (рис. 1). Как через 30 мин, так и через трое суток после инъекции ТПА активность

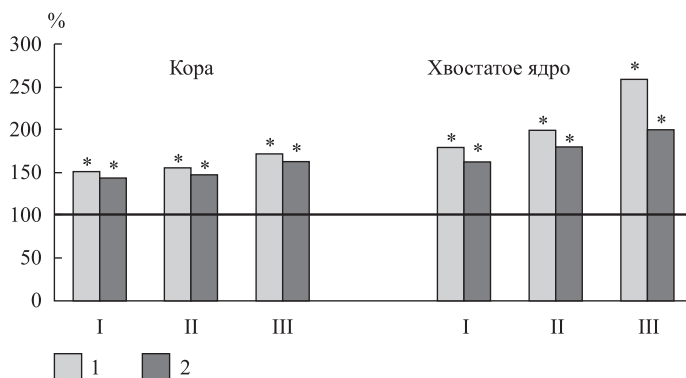


Рис. 1. Влияние ТПА на активность МАО А в субклеточных фракциях коры и хвостатого ядра мозга кроликов в разные сроки после однократного введения пептида:

1 — активность фермента через 30 мин после введения ТПА; 2 — активность фермента через трое суток после введения ТПА.

I — субфракция «легких» синапсом; II — субфракция «тяжелых» синапсом; III — субфракция митохондрий. Активность фермента выражена в % от контроля, принятого за 100%; \* —  $p < 0,05$  при сравнении с контролем.

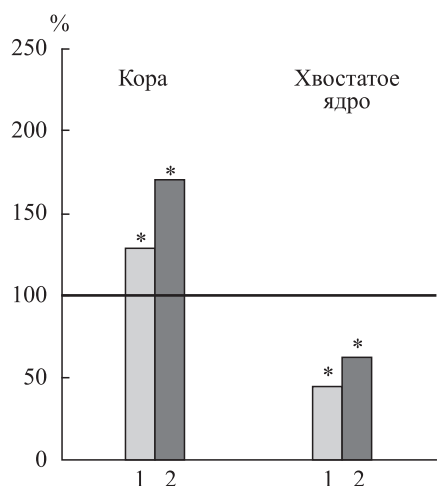


Рис. 2. Влияние ТПА на активность триптофангидроксилазы и содержание серотонина в структурах мозга кроликов через трое суток после однократного введения пептида:

1 — содержание серотонина; 2 — активность триптофангидроксилазы. Активность фермента и количество нейромедиатора выражены в % от контроля, принятого за 100%; \* —  $p < 0,05$  при сравнении с контролем.

инъекции ТПА оказались значительно ниже контрольного уровня (см. рис. 2) на фоне уже отмеченной выше активации МАО А. Таким образом, выявились сложные взаимоотношения в реакции разных структур мозга на длительное действие ТПА.

В литературе имеются сведения о подобной селективности действия пептидов в различных структурах мозга. Например, установлено разнонаправленное действие гептопептида пролонгированного действия Селанк (синтетического аналога тафтсина) на содержание моноаминов и их метаболитов, а также возбуждающих и тормозных аминокислот в коре, стриатуме и других структурах мозга крыс линии Вистар [23, 24].

Определение активности МАО Б во фракциях синапсом и митохондрий мозга кроликов в разные сроки после введения ТПА (рис. 3) подтвердило реципрокность изменений МАО Б по сравнению с МАО А (см. рис. 1), как это было найдено в экспериментах на крысах (см. табл. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что через трое суток после однократной инъекции ТПА снижение активности МАО Б было более выраженным по сравнению с краткосрочным (30 мин) воздействием; особенно это относится к фракциям, выделенным из хвостатого ядра.

Анализ наших экспериментальных данных показывает, что ТПА после однократного введения оказывает длительное и выраженное влияние на метаболизм нейромедиаторов дофамина и серотонина. Цитохимические данные, полученные Л. М. Герштейн [25] в аналогичных опытах, свидетельствуют о том, что под влиянием ТПА происходят определенные изменения в содержании и концентрации структурированных белков цитоплазмы и ядер нейронов.

фермента, окисляющего серотонин, была выше контрольных значений: во фракциях коры мозга — на 50–65%, в еще большей степени (в 1,75–2,5 раза) она повышалась во фракциях хвостатого ядра.

Изменение активности фермента, участвующего в биосинтезе серотонина, и содержания самого нейромедиатора в мозге кроликов через трое суток после введения ТПА носило несколько иной характер (рис. 2). В двигательной зоне коры повышение активности триптофангидроксилазы (в среднем в 1,7 раза) сопровождалось менее выраженным накоплением нейромедиатора, уровень которого превышал контрольные значения лишь на 28–30%, что может быть связано с усилением деградации серотонина под действием МАО А (см. рис. 1). Эти результаты указывают на то, что в двигательной зоне коры под действием ТПА происходит длительная (трое суток) активация всей системы обмена серотонина.

Напротив, в хвостатом ядре показатели синтеза серотонина (содержание медиатора и активность ТрГД) через трое суток после

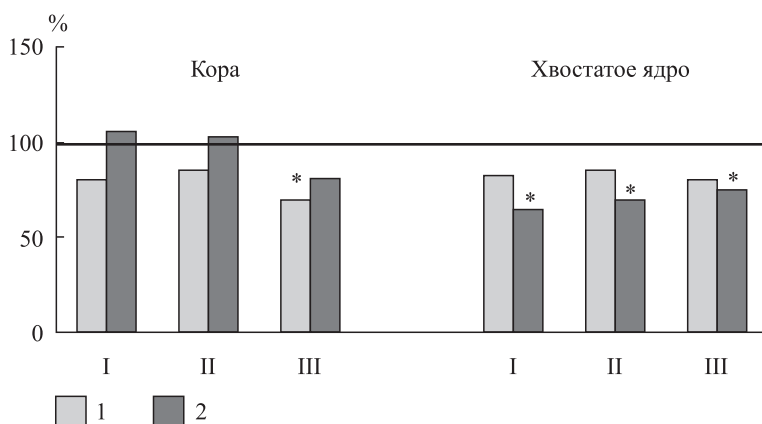


Рис. 3. Влияние ТПА на активность MAO Б в субклеточных фракциях коры и хвостатого ядра мозга кроликов в разные сроки после однократного введения пептида

Условные обозначения как на рис. 1.

Судя по ряду физиологических показателей, после краткосрочного (около 30 мин) анальгетического периода у животных под влиянием ТПА проявлялись двигательные расстройства по типу гипокинезии, сохраняющиеся длительное время, — у крыс в течение нескольких недель [10]. На основании результатов данного исследования можно предположить, что период анальгетического действия ТПА характеризуется изменением состояния моноаминергических систем, в первую очередь серотонинергической, а в более поздние сроки (3–6 сут) после введения ТПА происходит нарушение взаимоотношений медиаторных систем.

Особого обсуждения заслуживает вопрос о сроках, при которых регистрируются столь выраженные и многообразные биохимические эффекты после однократного введения ТПА. К сожалению, в нашем распоряжении нет конкретных данных о метаболической стабильности ТПА. Однако по аналогии с другими опиоидными пептидами и их производными, а также принимая во внимание сроки появления и исчезновения наиболее изученного эффекта опиоидов (анальгетическое действие), характерного для ТПА, можно с большой вероятностью предположить, что к третьим суткам после введения препарата общее содержание ТПА в организме будет ничтожным по сравнению с исходным. Следовательно, наблюдаемые на третьи сутки изменения биохимических и физиологических показателей можно толковать либо как следствие особо длительного сохранения ТПА в каких-то определенных структурах мозга, либо как результат включения каскадных механизмов.

Феномен длительных физиологических эффектов, вызываемых короткими пептидами и их производными, хорошо согласуется с теорией «функционального континуума» этих соединений [1, 8, 9]. Согласно этой теории, предполагается, что при взаимодействии пептидов с соответствующими клеточными рецепторами формируется сложный многоступенчатый каскадный процесс, когда пептид, помимо непосредственной биологической активности, может индуцировать выход других эндогенных регуляторов.

Кроме того, длительные эффекты ТПА могут быть связаны с процессом ингибирования ферментов деградации энкефалинов, что приводит к замедлению их распада. Подобное предположение было высказано в отношении препарата Селанк, проявляющего длительный анксиолитический эффект в структурах мозга [23, 26]. Замедление протеолитической деградации ТПА может быть связано с присутствием в его молекуле d-формы тирозина.

Полученные нами результаты и литературные данные позволяют сделать заключение о том, что вызванное введением ТПА длительное изменение двигательных функций определяется специфической реакцией корковых и подкорковых структур двигательной системы, при которой происходит нарушение метаболизма нейромедиаторов серотонина и дофамина, а также обмена белков.

## Литература

1. Ашмарин И. П. Сигнальные молекулы и социальное поведение // *Нейрохимия*. 2001. Т. 18, № 4. С. 243–250.
2. Козина Л. С., Стволинский С. Л., Фёдорова Т. Н. Изучение антиоксидантных и мембранопротекторных свойств коротких пептидов в модельных экспериментах // *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии*. 2008. № 6. С. 31–36.
3. Лысенко А. В., Арутюнян А. В., Козина Л. С. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям. СПб.: ВМедА, 2005. 207 с.
4. Конорова И. Л., Ганнушкина И. В., Коплик Е. В., Антелава А. Л. Профилактика препаратом Дельтаран негативных последствий перенесенного эмоционального стресса при последующей церебральной ишемии низкорезистентных животных // *Бюл. exper. биол. и мед.* 2006. Т. 141, № 5. С. 499–502.
5. Koplík E. V., Umrykhin E. P. Delta-sleep inducing peptide and Deltaran: potential approaches to antistress protection // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008. Vol. 38. P. 953–957.
6. Бондаренко Т. И., Майборода Е. А., Михалева И. А. Биологическая активность синтетических аналогов природных олигопептидов // *Матер. VII Всерос. науч. конф. «Химия и медицина, Архимед-2009»*. Уфа, 2009. С. 131.
7. Khavinson V. Kh., Arutjunyan A. V., Kozina L. S. Geroprotective peptides of the pineal gland and antioxidative protection system / *Abstr. 18<sup>th</sup> World Congress of Gerontology. Rio de Janeiro, Brazil, 2005* // *J. Gerontology*. Vol. 60, N 1. 2005. P. 106.
8. Ашмарин И. П. Перспективы практического применения некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов // *Вопр. мед. химии*. 1984. Т. 3. С. 2–7.
9. Нейропептиды — индивидуальные регуляторы и предшественники комплекса биологически активных молекул / Вьюнова Т. В., Шевченко К. В., Шевченко В. П., Безуглов В. В., Мясоедов Н. Ф. // *Тез. докл. Междунар. конф. «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга»*. СПб., 2008. С. 26.
10. Попова Н. С., Доведова Е. Л., Адрианов О. С. Системные, клеточные и молекулярные перестройки, обусловленные воздействием пептидов с различной опиоидной активностью // *Физиол. журн. СССР*. 1987. № 6. С. 730–736.
11. 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.
12. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П. Модулирующее действие некоторых пептидов на моноаминергические процессы мозга как основа их психотропного эффекта // *Вопр. мед. химии*. 1984. Т. 30, № 3. С. 56–63.

13. Менджерцкиий А. М., Ускова Н. И., Лысенко А. В., Маклецова М. Г. Нейромедиаторный механизм адаптивного действия дельта-сон индуцирующего пептида в экспериментальной аудиогенной эпилепсии, вызванной гипокинезией // Эксперим. клин. фармакол. 1996. Т. 59, № 1. С. 8–10.
14. 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. 15–10.
15. Стрекалова Т. В. Дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП): проблемы эндогенного происхождения и биологической активности // Нейрохимия. 1998. Т. 15, № 3. С. 227–239.
16. Khvatova E. M., Samartzev V. N., Zagoskin P. A. Delta-sleep inducing peptide (DSIP): effect on respiration activity in rat brain mitochondria and stress protective potency under experimental hypoxia // Peptides. 2003. Vol. 24, N 2. P. 307–311.
17. Минеева-Вялых М. Ф. Метод прямого спектрофотометрического определения скорости тирозингидроксилазной реакции // Вопр. мед. химии. 1976. Т. 22, № 2. С. 274–279.
18. Friedman P., Kapplman H., Haufman S. Partial purification and characterization of Tryptophan Hydroxylase from rabbit hindbrain // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 274. P. 4165–4173.
19. Popov N., Roseler C., Thiemann C., Matties H. Eine empfindliche methode zur Bestimmung der Monoaminoxidase in Gewebe durch Aldehydsemicarbazone-Messung // Acta. Biol. Med. Germ. 1971. N 26. S. 239–245.
20. 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.
21. Методы исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий / Горкин В. З., Веревкина А. В., Гриднева Л. И., Жердева Л. В., Леонтьева Г. А., Криченкова Р. С., Комиссарова Н. В., Кляшторин А. Б., Романова Л. А., Северина И. С. // Современные методы в биохимии. № 2. М.: Медицина. 1968. С. 155–177.
22. Коган Б. Н., Нечаев Н. В. Чувствительный и быстрый метод одновременного определения дофамина, норадреналина, серотонина, 5'-оксииндолуксусной кислоты в одной пробе // Лабораторное дело. 1979. № 5. С. 301–303.
23. Изучение эффектов гептапептида 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. // Психофармакол. биол. наркол. 2005. Т. 5, № 3. С. 984–988.
24. Влияние гептапептида Селанка на содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в структурах мозга крыс Вистар / Наркевич В. Б., Клодт П. М., Кудрин В. С., Майский А. И., Раевский К. С. // Психофармакол. биол. наркол. 2007. Т. 7, № 2. С. 1563–1567.
25. Герштейн Л. М. Нейрохимические и нейрофизиологические перестройки в структурах мозга при воздействии некоторых нейропептидов // Нейрохимия. 1987. Т. 6, № 1. С. 51–56.
26. Зозуля А. А., Кост Н. В., Соколов О. И., Габаева Н. В. Ингибирующее действие Селанка на энкефалин-деградирующие ферменты как возможный механизм его анксиолитической активности // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т. 131, № 4. С. 315–317.

Статья поступила в редакцию 15 марта 2012 г.