

НООПЕПТ УЛУЧШАЕТ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ПАМЯТЬ И СТИМУЛИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ К ПРЕФИБРИЛЛЯРНОЙ СТРУКТУРЕ β -АМИЛОИДА_(25–35) У МЫШЕЙ

Н. В. Бобкова¹, М. А. Грудень², А. Н. Самохин¹, Н. И. Медвинская¹, Е. И. Елистратова²,
L. Morozova-Roch⁴, Т. А. Гудашева³, Р. У. Островская³, С. Б. Серединин³

Ранее показано, что мыши линии NMRI с удаленными обонятельными луковицами по ряду поведенческих, морфологических и биохимических признаков могут рассматриваться в качестве модели болезни Альцгеймера. В опытах на этих мышках исследовали влияние оригинального ноотропного и нейропротекторного дипептида ноопепта (этилового эфира N-фенилацетил L-пролилглицина) на пространственную память, тестируемую в водном лабиринте Морриса, и на титры аутоантител к молекулярным факторам, вовлеченным в патогенез болезни Альцгеймера, а именно к префибриллярным структурам β -амилоида_(25–35), нейроспецифическому белку S100b, а также профиламентам лизоцима лошади. Установлено, что животные, подвергшиеся бульбэктомии, не способны распознавать сектор, в котором при обучении находилась спасательная площадка, что указывает на нарушение пространственной памяти. Введение бульбэктомированным животным ноопепта (0,01 мг/кг внутривнутрибрюшинно в течение 3 нед) улучшает показатели пространственной памяти и повышает титр антител к β -амилоиду_(25–35). Эффект ноопепта в отношении антителообразования к β -амилоиду_(25–35) более выражен у ложнооперированных, чем у бульбэктомированных животных, что связано, по-видимому, с глубоким угнетением иммунитета после бульбэктомии. Усиление под влиянием ноопепта продукции специфических антител к β -амилоиду может ослаблять его нейротоксический эффект. Полученные данные указывают на потенциальную эффективность ноопепта при нарушениях нейродегенеративного генеза благодаря мнемотропному эффекту и иммуностимулирующему действию.

Ключевые слова: ноопепт, ольфакторная бульбэктомия, пространственная память, β -амилоид_(25–35), нейротоксичность, иммунитет

ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов, препятствующих разработке новых подходов к диагностике и лечению болезни Альцгеймера (БА), является дефицит экспериментальных моделей этого заболевания, в частности, наиболее распространенной спорадической формы БА. В качестве одной из моделей нейродегенеративной патологии при БА нами ранее были предложены животные с удаленными обонятельными луковицами, которые демонстрируют поведенческие, морфологические и биохимические признаки, сходные с БА, что проявляется в ухудшении когнитивных функций, гибели нейронов в структурах, ответственных за формирование, хранение и воспроизведение памяти, на фоне повышения уровня мозгового β -амилоида и нарушения иммунного статуса [1, 3, 5]. Эта модель воспроизводит также дефицит холинергической системы, который является одним из ведущих патогенетических звеньев, ответственных за нарушения памяти при БА [2, 14]. Имеются

указания на использование веществ с ноотропной и нейропротективной активностью для лечения БА, однако данные об эффективности этой терапии противоречивы [8]. В Институте фармакологии РАМН развивается оригинальное направление поиска ноотропов, основанное на пептидергической концепции действия пирацетама [13]. Одним из наиболее перспективных соединений из предложенного ряда N-ацилпролил-содержащих дипептидов [16] является ноопепт (ГВС-111, этиловый эфир N-фенилацетил L-пролилглицина), который оказывает сочетанное ноотропное и нейропротективное действие [7], а также проявляет иммуностимулирующий эффект [4, 11]. Учитывая вышесказанное, целью настоящего исследования явилось изучение влияния ноопепта на процессы пространственной памяти и гуморального иммунитета на модели БА у бульбэктомированных мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ноопепт был синтезирован в соответствии с описанной ранее методикой [13]; т.пл. 96–97° С; $[\alpha]_D^{20}$ – 120° (с 0,4, CHCl₃).

Работа выполнена на мышках-самцах линии NMRI, которые были получены из колонии (*Charles Rivers Laboratories*, Wilmington, MA, США) и находились в

¹ Институт биофизики клетки РАН.

² Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН.

³ ГУ НИИ фармакологии РАМН им. В. В. Закусова, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

⁴ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Umeå, SE-90741, Sweden.

Таблица 1. Влияние ноопепта на латентные периоды нахождения спасательной площадки у БЭ и ЛО животных при обучении ($M \pm SEM$).

Группа животных	Дни обучения					Среднее значение латентного периода, с
	1	2	3	4	5	
БЭ + ноопепт	40,25 ± 5,5	29,43 ± 3,5	25,2 ± 3,1	23,81 ± 3,5	18,5 ± 3,1	27,43 ± 3,6
БЭ + физраствор	46,8 ± 4,3	35,0 ± 4,4	26,5 ± 4,2	18,9 ± 3,2	14,8 ± 2,4	28,4 ± 3,7
ЛО + ноопепт	44,2 ± 3,6	29,8 ± 3,7	25,5 ± 3,1	17,2 ± 2,9	16,7 ± 1,8	26,7 ± 3,1
ЛО + физраствор	41,2 ± 4,7	26,1 ± 3,1*	24,9 ± 3,8	18,3 ± 3,0	14,7 ± 4,1	25,04 ± 4,1

* — $p < 0,05$.

условиях барьерного контроля в специализированном vivарии (Пушино, ФИБХ). В возрасте 2,5 мес животных подвергали операции бульбэктомии (БЭ) либо ложной операции [2]. Двухстороннее удаление обонятельных луковиц проводили путем их аспирации через трепанационное отверстие в черепае животных, находящихся под наркозом этаминал-натрием (40 мг/кг внутривенно) и местной анестезией (0,5 % раствор новокаина). Ложнооперированные (ЛО) животные подвергались аналогичной процедуре, но без удаления луковиц. Через 4 нед после операции все животные произвольным образом были разделены на 4 группы, двум из которых (ЛО + ноопепт и БЭ + ноопепт) в течение 3 последующих недель ежедневно вводили препарат в дозе 0,01 мг/кг внутривенно по нижеприведенной схеме, а двум другим (ЛО + физраствор и БЭ + физраствор) вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Схема введения препарата: две недели до начала обучения 1 раз в день, далее в течение недели в ходе обучения за 1 ч до начала сеанса и далее за 1 ч перед тестированием памяти. Через 6 недель после операции всех животных тестировали на способность к плаванию и на поведение в водном лабиринте Морриса. Животных всех экспериментальных групп, отобранных на отсутствие исходного предпочтения отсеков водного лабиринта Морриса, в течение 5 дней (по 4 сеанса ежедневно) обучали находить погруженную под воду площадку. Скорость обучения оценивали по латентному периоду нахождения спасательной площадки. Через 24 ч после завершения процесса обучения у мышей в течение 1 мин тестировали пространственную память, показателями которой являлись как число заходов в отсек, где при обучении находилась

спасательная площадка, так и выделение этого отсека по времени пребывания в нем. Для индивидуальной оценки памяти каждого животного вычислялись два показателя: разница между временем пребывания животного в отсеке обучения и наибольшим значением времени его пребывания в одном из индифферентных отсеков при тестировании памяти. Другим показателем служила разница в числе заходов в отсек обучения и наибольшим показателем индифферентного отсека. Оба показателя оценивали индивидуальную степень выделения отсека обучения по отношению к индифферентным отсекам. Через день после тестирования пространственной памяти у всех групп экспериментальных животных и дополнительно у группы нативных самцов линии NMRI того же возраста производили забор крови из глазной вены. Операцию проводили под эфирным наркозом.

Для оценки состояния гуморального иммунитета методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA определяли титры аутоантител к молекулярным факторам, вовлеченным в процессы патогенеза БА, а именно префибрилярным структурам β -амилоида_(25–35), нейроспецифическому белку S100b (“Сигма”, США), а также профиламентам лизоцима лошади, полученным по описанным нами ранее методам [12, 15]. Для морфологической характеристики изучаемых белков, проводимой на факультете медицинской биохимии и биофизики Университета г. Умеå, Швеция с помощью Atomic Force Microscopy использовали Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, США) и PICO PLUS SPM (Molecular Imaging, США) микроскопы.

Титр антител для каждой пробы сыворотки определяли как величину наибольшего разведения, при кото-

Таблица 2. Факторный анализ показателей выделения секторов в водном лабиринте Морриса бульбэктомированными мышами

Группа животных	Значение фактора различения секторов по времени пребывания		Значение фактора различения секторов по числу заходов	
	F	p	F	p
ЛО + физраствор (n = 6)	F(3,20) = 9,73	0,0004*	F(3,20) = 7,11	0,0023*
ЛО + ноопепт (n = 7)	F(3,24) = 22,671	0,0001*	F(3,24) = 22,89	0,0001*
БЭ + физраствор (n = 6)	F(3,20) = 0,811	0,503	F(3,20) = 0,609	0,616
БЭ + ноопепт (n = 8)	F(3,28) = 7,48	0,0008*	F(3,28) = 8,63	0,000325*

Примечание. Значение фактора различения секторов в лабиринте Морриса достоверны * — $p < 0,001$

ром фермент-субстратная реакция давала величину оптической плотности, превышающую вдвое среднюю оптическую плотность таковой в контрольной лунке планшета.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica VI. Для проверки статистической значимости различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента; в поведенческих экспериментах использовали также однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим Post hoc-тестом LSD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных в табл. 1, латентные периоды достижения спасательной площадки в водном лабиринте Морриса животными разных экспериментальных групп в процессе обучения достоверно не отличаются друг от друга, что свидетельствует об отсутствии различий в скорости обучения между всеми группами.

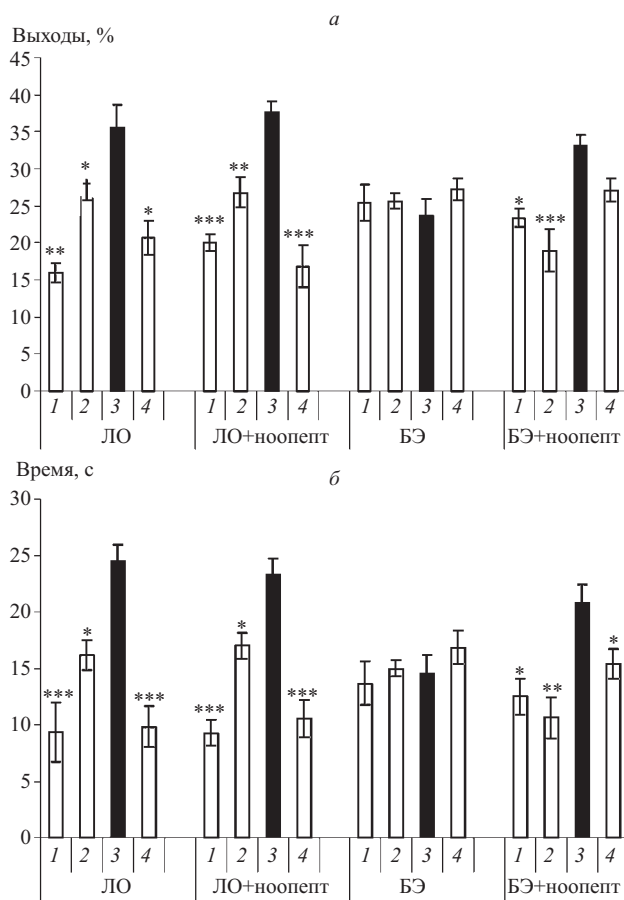
Результаты факторного анализа показателей пространственной памяти животных всех 4 групп (табл. 2), указывают на то, что только БЭ животные не показали предпочтения какому-либо из секторов лабиринта Морриса ни по времени пребывания, ни по числу заходов. Группа БЭ животных, получавших ноопепт, демонстрировала показатели, близкие к контролю (ЛО + физраствор).

Результаты Post hoc анализа (рисунок) свидетельствуют о том, что животные, подвергшиеся бульбэктомии, не помнят сектор, в котором при обучении находилась спасательная площадка, что соответствует полученным нами ранее данным о нарушении у них пространственной памяти. Применение ноопепта не

Таблица 3. Уровень антител к префибриллам β-амилоида_(25–35), протофиламентам лизоцима лошади и белку S100b у бульбэктомированных (БЭ), ложнооперированных (ЛО) и интактных мышей линии NMRI (*M* ± *SEM*)

Группа животных	Титры антител к изученным белкам		
	β-амилоид _(25–35)	лизоцим лошади	белок S100b
Интактные животные (<i>n</i> = 7)	8 ± 2	8 ± 2	10 ± 2
ЛО + физраствор (<i>n</i> = 7)	10 ± 2	10 ± 2	10 ± 2
ЛО + ноопепт (<i>n</i> = 8)		18 ± 2	16 ± 2
а) гр. 1 (<i>n</i> = 5)	52 ± 10*		
б) гр. 2 (<i>n</i> = 3)	1280 ± 0**		
БЭ + физраствор (<i>n</i> = 7)	12 ± 2	15 ± 2	10 ± 2
БЭ + ноопепт (<i>n</i> = 7)	21 ± 2	10 ± 2	10 ± 2

* — *p* < 0,05, ** — *p* < 0,01 — по сравнению с величиной титров антител к префибриллам β-амилоида_(25–35) у животных группы ЛО + физраствор.



Влияние ноопепта на пространственную память БЭ и ЛО мышей, тестируемую в водном лабиринте Морриса.

a — распределение числа заходов в разные отсеки лабиринта (1–4), выраженного в % от суммарного числа посещений отсеков двумя экспериментальными группами животных ЛО + ноопепт и БЭ + ноопепт, получавшими препарат, и двумя контрольными группами, получавшими инъекции физраствора ЛО и БЭ. *б* — значения времени, проведенного вышеперечисленными группами животных в разных отсеках водного лабиринта. 1, 2 и 4 — индифферентные отсеки водного лабиринта; 3 — отсек, в котором во время сеансов обучения находилась спасательная платформа. Отличия соответствующих показателей в индифферентных отсеках достоверны относительно значений в 3 отсеке при: * — *p* < 0,05; ** — *p* < 0,01; *** — *p* < 0,001.

влияло на показатели памяти ложнооперированных (ЛО) животных, однако у БЭ животных применение ноопепта существенно улучшило показатели их пространственной памяти по сравнению с группой БЭ, которой вводили физиологический раствор.

Результаты исследования титров антител к изучаемым антигенам представлены в табл. 3.

БЭ животные, которым вводили физиологический раствор, отличались от группы ЛО мышей только незначительно повышенным титром антител к лошадиному лизоциму. Субхроническое введение ноопепта вызвало достоверное повышение титра антител к β-амилоиду_(25–35) у ЛО животных, при этом были отмечены выраженные отличия в индивидуальной иммунореактивности животных: выявлены две подгруппы мышей, демонстрирующих различные титры сыворо-

точных антител к префибриллярным образованиям β -амилоида_(25–35) (52 ± 10 и 1280 ± 0). У БЭ животных на фоне субхронического введения ноопепта имело место определенное (хотя статистически недостоверное) повышение титров антител к β -амилоиду_(25–35). Уровень антител к лизоциму лошади и белку S100b не изменялся под влиянием ноопепта.

Проведенные эксперименты выявили способность ноопепта, вводимого субхронически в дозе 0,01 мг/кг, устранять повреждающий эффект бульбэктомии на пространственную память животных. Следует подчеркнуть, что доза, в которой ноопепт проявляет активность в тесте водного лабиринта, в 10–50 раз меньше, чем те, в которых он устраняет эффект амнестических факторов на условные рефлексии пассивного и активного избегания [7]. Такое соотношение эффективных доз соответствует представлениям о том, что пространственная память является наиболее чувствительной мишенью действия ноотропов. Ранее было показано, что мнестический дефицит, вызванный бульбэктомией, устраняется применением холиноэргических веществ [17]. Можно полагать, что в реализации мнестического эффекта ноопепта при бульбэктомии играют роль выявленные ранее в электрофизиологических экспериментах холино-сенсibiliзирующие свойства этого дипептида [6].

Ранее была отмечена способность ноопепта стимулировать иммунитет у животных с исходно низкой иммунореактивностью (мыши линии C57BL/6) и вторичным иммунодефицитом, вызванным циклофосфамидом [4] либо пренатальной гипоксией [11]. Учитывая представления о тесной связи иммунной и нервной регуляции, можно было бы предположить, что позитивный эффект ноопепта на память, нарушенную бульбэктомией, также опосредуется его иммунопротективной активностью. Однако при сопоставлении показателей пространственной памяти и уровнем сывороточных антител к исследованным белкам у индивидуальных животных всех групп нам не удалось выявить корреляции между данными параметрами. Кроме того, поведенческий эффект ноопепта был наиболее выражен у БЭ животных, в то время как иммунопротективный — у ЛО мышей. Менее выраженная иммунопротективная активность ноопепта у БЭ животных, по-видимому, связана с глубоким угнетением их иммунной системы. Ранее нами было установлено, что БЭ мыши даже через 12 месяцев после операции демонстрировали трехкратное уменьшение концентрации фактора некроза опухолей наряду с угнетением митоген-стимулированной пролиферации Т- и В-лимфоцитов селезенки и с подавлением продукции фактора некроза опухолей в перитонеальных макрофагах и спленocyтах [5]. На стадии выраженной клинической картины заболевания, которому соответствуют тяжелые когнитивные нарушения, у больных также отмечается снижение активности иммунной системы. Полученные в настоящей работе данные в сочетании с выявленными ранее фактами эффективности ноопепта

при различных видах иммунодефицита указывают на способность этого дипептида повышать общую иммунореактивность. Преимущественная направленность эффекта ноопепта в отношении антителообразования к префибриллам β -амилоида_(25–35), которые, как известно, оказывают наибольший нейротоксический эффект [9] на ранних стадиях заболевания и тем самым инициируют гибель нервных клеток по типу апоптоза, представляет специальный интерес. Известно, что специфические антитела к β -амилоиду способствуют его нейтрализации [10, 12]. Усиление под влиянием ноопепта продукции специфических антител к β -амилоиду может ослаблять его нейротоксический эффект и способствовать замедлению прогрессирования заболевания.

В целом полученные данные указывают на потенциальную эффективность ноопепта при нарушениях нейродегенеративного генеза на ранних фазах развития патологии. В реализации этого эффекта могут играть роль не только мнемоторные свойства препарата, но и его многокомпонентное нейропротекторное действие [7], в осуществлении которого определенная роль принадлежит описанной иммуностимулирующей активности.

ВЫВОДЫ

1. Операция ольфакторной бульбэктомии, выполненная на мышах линии NMRI, рассматривается в качестве модели болезни Альцгеймера.
2. Пролин-содержащий дипептид с ноотропной и нейропротективной активностью ноопепт, вводимый после операции в течение 21 дня в дозе 0,01 мг/кг, устраняет дефицит пространственной памяти, вызванный бульбэктомией.
3. Лечение ноопептом ведет также к избирательному повышению титра антител к префибриллам β -амилоида_(25–35), что может служить важным фактором нейропротективного действия этого препарата.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 03-04-49049, РГНФ 04-06-00165а, Программы Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине 2004” и Swedish Medical Research Council. Препарат β -амилоид_(25–35) был предоставлен Институтом биорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Ю. Александрова, В. В. Кувичкин, И. В. Кашпаров и др., *Биохимия*, **69**, 218–224 (2004).
2. Н. В. Бобкова, И. В. Нестерова, В. И. Нестеров, *Бюлл. эксп. биол.*, **131**, 507–511 (2001).
3. Н. В. Бобкова, И. В. Нестерова, Р. Дана и др., *Морфология*, **123**, 27–31 (2003).
4. Л. П. Коваленко, М. Г. Мирамедова, Т. А. Гудашева и др., *Internat. J. Immunorehabilitation*, **3**(1), 19 (2001).
5. Е. Г. Новоселова, Н. В. Бобкова, О. А. Синотова и др., *ДАН*, **393**, 559–561 (2003).
6. Р. У. Островская, Т. Х. Мирзоев, Ф. А. Фирова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 11–14 (2001).

7. P. У. Островская, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(5), 66 – 72 (2002).
8. O. Beneshova, *Drugs & Aging*, **4**(4), 285 – 303 (1994).
9. M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, et al., *Nature*, **416**, 507 – 511 (2002).
10. J. C. Dodart, K. R. Bales, and S. M. Paul, *Trends Mol. Med.*, **9**(3), 85 – 87 (2003).
11. M. A. Gruden, R. U. Ostrovskaya, S. S. Trofimov, et al., *Materials of 2nd Meeting of European Neuroscience*, Strasbourg, France (1996), p. 94.
12. M. A. Gruden, T. B. Davidova, M. Mališauskas, et al., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **18**, 165 – 171 (2004).
13. T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *Europ. J. Med. Chem.*, **31**(2), 151 – 157 (1996).
14. S. Hozumi, et al., *Behav Brain Res*, **138**(1), 9 – 15 (2003).
15. M. Malisauskas, V. Zamotin, J. Jass, et al., *J. Mol. Biol.*, **330**, 879 – 890 (2003).
16. S. B. Seredenin, T. A. Voronina, T. A. Gudasheva, et al., Patent US, 5, 439, 930 (1995).
17. T. Yamamoto, J. Jin, and S. Watanabe, *Behav Brain Res.*, **83** (1 – 2), 57 – 62 (1997).

Поступила 16.11.04

NOOPEPT IMPROVES THE SPATIAL MEMORY AND STIMULATES PREFIBRILLAR β -AMYLOID_(25–35) ANTIBODY PRODUCTION IN MICE

N. V. Bobkova¹, M. A. Gruden², A. N. Samokhin¹, N. I. Medvinskaya¹, E. I. Elistratova², L. Morozova-Roch⁴, T. A. Gudasheva³, R. U. Ostrovskaya³, and S. B. Seredenin³

¹ Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia;

² Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia;

³ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, 125315 Moscow, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia;

⁴ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Umeå, SE-90741, Sweden

The effects of the novel proline-containing nootropic and neuroprotective dipeptide noopept (GVS-111, N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester) were studied on NMRI mice upon olfactory bulbectomy, which had been previously shown to imitate the main morphological and biochemical signs of Alzheimer's disease (AD). The spatial memory was assessed using the Morris (water maze) test; the immunological status was characterized by ELISA with antibodies to prefibrillar β -amyloid_(25–35), S100b protein, and protofilaments of equine lysozyme, which are the molecular factors involved in the pathogenesis of AD. The control (sham-operated) animals during the Morris test preferred a sector where the safety platform was placed during the learning session. Bulbectomized animals treated with saline failed to recognize this sector, while bulbectomized animals treated with noopept (0.01 mg/kg for 21 days) restored this predominance, thus demonstrating the improvement of the spatial memory. These animals also demonstrated an increase in the level of antibodies to β -amyloid_(25–35) — the effect, which was more pronounced in the sham-operated than in bulbectomized mice. The latter demonstrated a profound decrease of immunological reactivity in a large number of tests. Noopept, stimulating the production of antibodies to β -amyloid_(25–35), can attenuate the well-known neurotoxic effects of β -amyloid. The obtained data on the mnemotropic and immunostimulant effects noopept are indicative of good prospects for the clinical usage of this drug in the therapy of patients with neurodegenerative diseases.