

НОВЫЙ ТРИПЕПТОИДНЫЙ АНАЛОГ НЕЙРОТЕНЗИНА, ДИЛЕПТ, ОКАЗЫВАЕТ СЕЛЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ОБОРОТ ДОФАМИНА В ПРИЛЕЖАЩЕМ ЯДРЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ

М. В. Ретюнская, В. С. Кудрин, П. М. Клодт, К. С. Ус, Т. А. Гудашева, Р. У. Островская¹

Изучали влияние нового пептидомиметика нейротензина, дилепта (N-капроил-L-пролил-L-тирозина метилового эфира), на содержание моноаминов и главных продуктов их метаболизма в структурах мозга крыс при однократном и субхроническом введении у интактных животных, а также на фоне блокады глутаматных NMDA-рецепторов кетаминном. Показано, что при повторном введении дилепт способствует накоплению ДОФУК в тканях прилежащего ядра, увеличивая оборот дофамина (ДА), и снижению величины показателя ДОФУК/ДА в гипоталамусе. Субхроническое введение дилепта приводит также к полному устранению активирующего воздействия кетамина на оборот дофамина в гипоталамусе. Селективное влияние дилепта на активность ДА-ергической системы прилежащего ядра при отсутствии эффекта в стриатуме в сочетании с полученными ранее данными поведенческих экспериментов позволяют рассматривать дилепт в качестве нового атипичного нейролептика, лишённого побочных экстрапирамидных расстройств.

Ключевые слова: дилепт, нейролептики, нейротензин, прилежащее ядро, гипоталамус, шизофрения

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения является патогенетически гетерогенным заболеванием, в основе которого лежат расстройства функционирования нескольких нейромедиаторных систем мозга. Исследования последних лет выявили, что наряду с нарушениями дофамин (ДА)-, глутамат- и серотонин-ергических процессов, при шизофрении имеют место изменения содержания эндогенного пептида нейротензина в ряде структур мозга. Существуют данные о тесной нейроанатомической и функциональной взаимосвязи нейротензин (НТ)- и ДА-ергической систем, сходстве профиля фармакологической активности нейротензина и антипсихотических средств, а также об усилении под действием антипсихотиков синтеза и высвобождения НТ. На основании указанных данных было предложено рассматривать НТ в качестве эндогенного нейролептика [8] и потенциального лекарственного препарата для лечения шизофрении. Однако сложная структура этого тридекапептида, обуславливающая низкую биодоступность и неспособность проникать через гематоэнцефалический барьер, исключает возможность его клинического применения. В настоящее время некоторыми фармацевтическими фирмами ведется поиск аналогов НТ, активных при системном введении. Этот поиск основывается преимущественно на создании гексапептидов, являющихся структурными аналогами активного участка нейротензина (НТ₈₋₁₃).

Оригинальный подход к поиску высокоэффективных нейролептиков, разрабатываемый в НИИ фарма-

кологии РАМН, основан на создании модифицированных дипептидов, имитирующих структуру β-поворотного биологически активного фрагмента НТ₈₋₁₃ и атипичного антипсихотика сульпирида [14]. Из серии синтезированных пептидомиметиков нейротензина был отобран N-капроил-L-пролил-L-тирозина метиловый эфир (дилепт), обладающий наиболее выраженной ДА-негативной активностью в диапазоне доз 0,4 – 4 мг/кг, не проявляющий каталептогенного, седативного и миорелаксирующего побочных эффектов [2, 7]. Это позволило рассматривать дилепт в качестве потенциального атипичного нейролептика, не вызывающего экстрапирамидных расстройств.

Известно, что типичные и атипичные нейролептики способны ускорять оборот дофамина в головном мозге, преимущественно благодаря активации ДА-ергических систем по механизму отрицательной обратной связи [5]. Сведения, касающиеся влияния НТ на ДА-ергическую передачу, противоречивы: наряду с сообщениями об увеличении синтеза и оборота ДА в некоторых областях мозга [18] имеются свидетельства ингибирующего влияния НТ на высвобождение ДА [11]. Помимо взаимодействия с ДА системой, обнаружено также модулирующее влияние НТ на центральную глутаматергическую передачу [12].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния дилепта на уровень ДА и его основных метаболитов, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), а также на оборот серотонина и норадреналина в 4 функционально важных структурах мозга — префронтальной коре, гипоталамусе, стриатуме и прилежащем ядре. Ранее в поведенческих экспериментах нами было показано, что

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

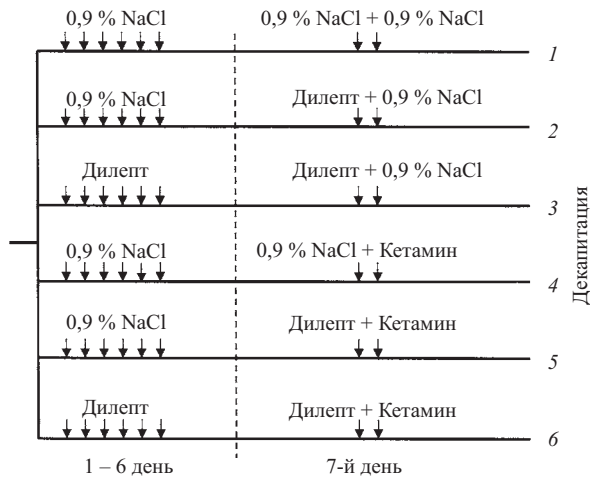


Рис. 1. Схема формирования экспериментальных групп.

дилепт проявляет глутаматпозитивные свойства, снижая выраженность амнестического эффекта блокатора канала NMDA-рецепторного комплекса кетамина [6]. Исходя также из того, что ДА- и глутаматергические системы взаимосвязаны, а при шизофрении наблюдаются расстройства функционирования обеих этих систем, целесообразным представлялось оценить активность дилепта на фоне нарушений, вызванных кетамин.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. Изменения содержания моноаминов и их метаболитов в структурах мозга под действием дилепта оценивали при его однократном и субхроническом (в течение 7 дней) введении в дозе 0,8 мг/кг, для которой ранее продемонстрирован максимально выраженный антагонистический эффект в дофамин-зависимых тестах [2]. Дилепт вводили внутривентриально в виде свежеприготовленной суспензии в твин 80. Экспериментальные животные были случайным образом разделены на шесть групп (рис. 1). На протяжении 6 дней крысам 1-й, 2-й, 4-й и 5-й групп вводили физиологический раствор, а животным 3-й и 6-й групп — дилепт. На 7-й день эксперимента крысам всех групп делали две инъ-

екции — за 35 и 20 мин до декапитации. 1-й группе (контроль) дважды вводили растворитель; 2-й и 3-й — дилепт и физиологический раствор; 4-й — растворитель и кетамин (25 мг/кг внутривентриально); животным 5-й и 6-й групп — дилепт за 15 мин до кетамина (25 мг/кг внутривентриально). Вещества инъецировали в объеме из расчета 2 мл на 1 кг массы тела животного.

Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом ВЭЖХ с обращенной фазой с электрохимической детекцией. На льду извлекали префронтальную кору, гипоталамус, стриатум и прилежащее ядро. Выделенные структуры мозга крыс взвешивали и гомогенизировали в 20 объемах 0,1 н. раствора HClO_4 , содержащего в качестве внутреннего стандарта диоксибензиламин (ДОБА) в количестве 0,5 нмоль/мл. Пробы центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. На аналитическую колонку Phenomenex C_{18} 4 мкм ($4,6 \times 150$ мм) наносили 20 мкл супернатанта. Разделение изучаемых веществ проводили на хроматографе, снабженном инжектором (Rheadine) и электрохимическим детектором LC-4B (BAS, США). В качестве подвижной фазы применяли 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ ионопарного реагента октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 8 % ацетонитрила (pH 3,1). Определение веществ осуществляли на стеклоуглеродном электроде при потенциале +0,85 В против Ag/AgCl электрода сравнения. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,7 мл/мин [3].

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $M \pm \text{SEM}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные о базальном уровне моноаминов и главных продуктов их метаболизма в исследуемых структурах мозга представлены в таблице.

Повторное (но не однократное) введение дилепта усиливало оборот ДА в прилежащем ядре, достоверно увеличивая величину соотношения ДОФУК/ДА на 16 % по сравнению с контролем (рис. 2, а); показатель ГВК/ДА при этом не изменялся (рис. 3). В гипоталамусе величина показателя ДОФУК/ДА незначительно, но достоверно снижалась (рис. 2, б). Влияния дилепта на ДА-ергическую систему стриатума и коры, а также на содержание норадреналина, серотонина и 5-окси-

Содержание моноаминов и главных их метаболитов (в нмоль/г ткани) в структурах головного мозга интактных крыс

Вещество	Префронтальная кора	Гипоталамус	Стриатум	Прилежащее ядро
Норадреналин	$2,49 \pm 0,08$	$8,34 \pm 0,52$	$1,37 \pm 0,20$	$4,73 \pm 0,94$
Дофамин	$0,71 \pm 0,03$	$1,87 \pm 0,14$	$71,49 \pm 6,9$	$50,12 \pm 4,29$
3,4-диоксифенилуксусная кислота	—	$0,06 \pm 0,01$	$6,85 \pm 0,63$	$6,97 \pm 0,48$
Гомованилиновая кислота	$0,21 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,04$	$4,36 \pm 0,61$	$2,61 \pm 0,16$
Серотонин	$3,95 \pm 0,15$	$6,01 \pm 0,23$	$4,94 \pm 0,20$	$6,05 \pm 0,25$
5-оксиндолуксусная кислота	$1,86 \pm 0,08$	$4,79 \pm 0,16$	$9,22 \pm 0,39$	$6,82 \pm 0,26$

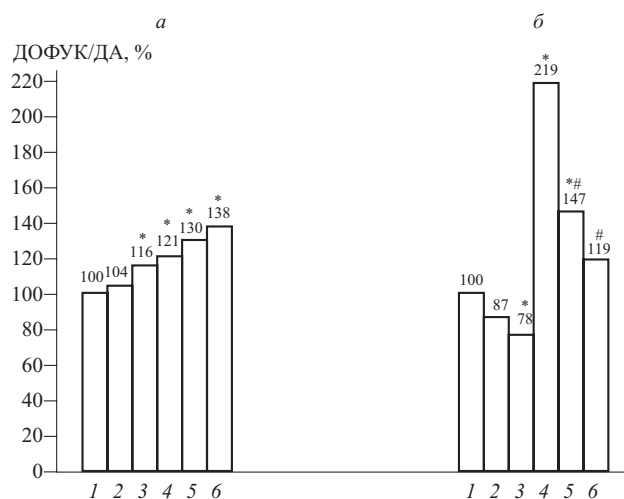


Рис. 2. Влияние дилепта (0,8 мг/кг внутривнутрибрюшинно), кетамина (25 мг/кг внутривнутрибрюшинно) и их сочетанного применения на скорость оборота дофамина в прилежащем ядре (а) и гипоталамусе (б), оцениваемого по показателю величины соотношения ДОФУК/ДА.

Здесь и на рис. 3: 1 — 0,9 % NaCl + 0,9 % NaCl (контроль); 2 — дилепт (однократно) + 0,9 % NaCl; 3 — дилепт (7 дней) + 0,9 % NaCl; 4 — 0,9 % NaCl + кетамин; 5 — дилепт (однократно) + кетамин; 6 — дилепт (7 дней) + кетамин. Различия достоверны при $p < 0,05$ в сравнении: * — с контролем; # — с группой активного контроля, подвергшейся воздействию кетамина (t -критерий Стьюдента). Данные представлены в % от контроля.

индолуксусной кислоты (5-ОИУК) зарегистрировано не было.

Кетамин вызывал увеличение содержания ДОФУК и ГВК в прилежащем ядре на 28 и 52 % соответственно ($p < 0,05$ относительно контрольной группы), что свидетельствует об усилении оборота ДА (рис. 2, а и рис. 3). Еще более выраженное действие кетамина по показателю ДОФУК/ДА отмечалось в гипоталамусе (рис. 1, б); при этом достоверного изменения содержания ГВК в этой структуре не наблюдалось. Такое активирующее влияние кетамина на ДА систему мозга согласуется с современными представлениями о реципрокных отношениях между глутамат- и ДА-ергическими системами и может объясняться усилением высвобождения ДА из нервных окончаний [10] или ингибированием обратного захвата медиатора [17], вызываемых антагонистом NMDA-рецепторов.

Однократное и субхроническое введение дилепта крысам, подвергавшимся воздействию кетамина, приводило к выраженному снижению эффекта последнего в гипоталамусе (рис. 2, б). В прилежащем ядре при повторном введении дилепта отмечалась тенденция к усилению эффекта кетамина по показателю ДОФУК/ДА (рис. 2, а). Значимых изменений уровня ДА и его метаболитов в стриатуме дилепт не вызывал. Влияния на содержание других моноаминов дилепт также не оказывал.

Известно, что развитие собственно антипсихотического действия нейролептиков обусловлено их воздействием на мезолимбические и мезокортикальные ДА

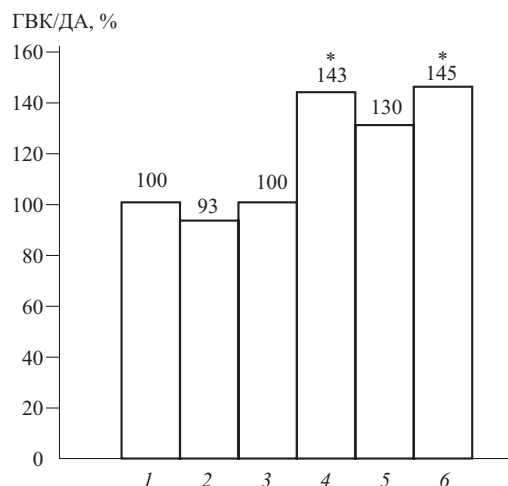


Рис. 3. Влияние дилепта (0,8 мг/кг внутривнутрибрюшинно), кетамина (25 мг/кг внутривнутрибрюшинно) и их сочетанного применения на скорость оборота дофамина в прилежащем ядре, оцениваемого по показателю величины соотношения ГВК/ДА.

Обозначения те же, что на рис. 2.

проекции, в то время как экстрапирамидные расстройства являются следствием блокады ДА-рецепторов nigrostriatalного пути [16]. Отличительной чертой атипичных антипсихотиков является их избирательное действие на мезолимбическую ДА систему мозга. В связи с этим выявленное в настоящей работе селективное влияние дилепта на активность ДА системы прилежащего ядра является дополнительным фактором, позволяющим рассматривать его в качестве потенциального атипичного нейролептика. При этом увеличение содержания ДОФУК и оборота ДА — эффекта, характерного для веществ, обладающих нейролептикоподобной активностью, — является, по-видимому, следствием функциональной блокады ДА-рецепторов. Следует отметить, что по выраженности стимулирующего влияния на метаболизм ДА в прилежащем ядре дилепт уступает представителям типичных антипсихотиков [13], однако, проявляет сходство с атипичными нейролептиками и нейротензином, также обладающим нейролептикоподобной активностью [4, 13]. Показано, что введение НТ (0,1 мкг) в вентральную область покрышки повышает уровень ДОФУК в прилежащем ядре на 18 %; при этом инъекция в область черной субстанции не сопровождается выраженными изменениями метаболизма ДА в стриатуме [13]. Такое умеренное влияние НТ, как и его структурного аналога дилепта на функциональную активность ДА нейронов свидетельствует об их модулирующем влиянии на мезолимбическую ДА-ергическую систему мозга. Способностью дилепта усиливать оборот ДА, по-видимому, объясняется его мягкое усиливающее влияние на действие кетамина, повышающего тканевую концентрацию ДА и его метаболитов.

Согласно данным [9], степень тяжести побочных экстрапирамидных симптомов, вызываемых нейро-

лептиками, коррелирует с повышением уровня ГВК в ликворе больных [9]. Поэтому выявленное у дилепта отсутствие влияния на величину показателя ГВК/ДА в тканях мозга позволяет полагать, что при его клиническом использовании указанных побочных расстройств наблюдаться не будет.

Воздействие типичных и атипичных нейролептиков на тубероинфундибулярную ДА систему наряду с активацией ДАД нейронов и накоплением ДОФУК сопровождается усилением секреции ряда гормонов, в том числе пролактина [15]. Отличным от других антипсихотических средств свойством дилепта является его способность снижать оборот ДА в гипоталамусе как в нормальных условиях, так и при стимулирующем воздействии кетамина. Основываясь на этих данных можно допустить, что при клиническом применении дилепт не проявит нежелательных эффектов, связанных с воздействием на нейроэндокринную систему. Исследования, проведенные Е. Richelson ("Mayo Foundation", США) показали, что дилепт обладает способностью связываться с нейротензиновыми рецепторами [1]. Учитывая также сведения о высокой концентрации НТ в тканях гипоталамуса [8], логично предположить, что влияние дилепта на тубероинфундибулярную ДА систему частично может объясняться НТ-ергическим компонентом его действия.

ВЫВОДЫ

1. Атипичный нейролептик дипептидной структуры дилепт при субхроническом введении усиливает оборот дофамина (ДА) в прилежащем ядре, увеличивая тканевое содержание ДОФУК, но не ГВК. В отношении гипоталамуса дилепт проявляет противоположный эффект. Изменений содержания и метаболизма ДА в стриатуме дилепт не вызывает.

2. Повторное введение дилепта предотвращает чрезмерную активацию ДА нейронов гипоталамуса, вызванную неконкурентным блокатором NMDA-рецепторов кетамином, но имеет тенденцию к усилению стимулирующего воздействия последнего на оборот ДА в прилежащем ядре.

3. Совокупность указанных свойств дилепта в сочетании с полученными ранее поведенческими данными

свидетельствует о том, что дилепт проявляет свойства атипичных нейролептиков, не вызывающих экстрапирамидных побочных расстройств.

Авторы выражают благодарность профессору К. С. Раевскому за ценные советы и помощь, оказанные при работе над статьей. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 03 – 04 – 49049.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, Москва (1998).
2. Л. С. Гузевых, Р. У. Островская, Т. А. Гудашева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(1), 3 – 6 (2002).
3. В. С. Кудрин, С. А. Сергеева, Л. М. Красных и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **58**(4), 8 – 11 (1995).
4. И. И. Мирошниченко, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (1988).
5. К. С. Раевский, *Психиатрия и психофармакотерапия*, **2**(5), 132 – 134 (2000).
6. М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых, Н. А. Бондаренко и др., *Бюл. экспер. биол.*, **136**(11), 527 – 531 (2003).
7. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева и др., Патент 2091390 (1998).
8. E. B. Binder, B. Kinkead, E. Nemeroff, et al., *Pharmacol. Rev.*, **53**(4), 453 – 486 (2001).
9. M. V. Bowers, *Psychopharmacology*, **85**, 184 – 186 (1984).
10. A. Breier, C. M. Adler, N. Weisenfeld, et al., *Synapse*, **29**(2), 142 – 7 (1998).
11. P. Brun, M. Leonetti, F. Sotty, et al., *J. Neurochem.*, **77**(6), 1542 – 52 (2001).
12. L. Ferraro, M. C. Tomasini, M. Fernandez, et al., *Neuroscience*, **102**(1), 113 – 20 (2001).
13. A. P. Ford and C. A. Marsden, *Brain Res.*, **534**, 243 – 250 (1990).
14. T. A. Gudashева, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *J. Med. Chem.*, **41**, 284 – 290 (1998).
15. G. A. Gudelsky, J. F. Nash, S. A. Berry, and H. Y. Meltzer, *Psychopharmacology* (Berl), **99**, Suppl: S13 – 7 (1989).
16. J. M. Radke, M. J. Owens, J. C. Ritchie, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11462 – 11464 (1998).
17. S. K. Shahani, R. Lingamaneni, and H. C. Jr. Hemmings, *Anesth. Analg.*, **95**(4), 893 – 9 (2002).
18. E. Widerlov, C. D. Kilts, R. B. Mailman, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **223**(1), 1 – 6 (1982).

Поступила 01.10.04

THE NEW TRIPEPTOID NEUROTENSIN ANALOG DILEPT SELECTIVELY AFFECTS DOPAMINE TURNOVER IN NUCLEUS ACCUMBENS AND HYPOTHALAMUS

M. V. Retyunskaya, V. S. Kudrin, P. M. Klodt, K. S. Us, T. A. Gudashева, and R. Y. Ostrovskaya

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

The effects of dilept (N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine methyl ester) — a new peptidomimetic of neurotensin — on the level of monoamines and their main metabolites in four functionally important brain structures has been studied upon single and subchronic administration in intact rats and in those pretreated with the NMDA receptor blocker ketamine. Repeated administration of dilept favors the accumulation of DOPAC and accelerates the dopamine (DA) turnover in nucleus accumbens, as manifested by an increase in the DOPAC/DA ratio. The opposite effect (decrease in the DOPAC/DA ratio) was observed in the hypothalamus, where the subchronic treatment with dilept completely inhibited the activating action of ketamine on the DA turnover. The selective influence of dilept on the dopaminergic system activity in nucleus accumbens (but not in striatum), together with the previously obtained behavioral data, suggest that dilept is a new atypical neuroleptic producing no extrapyramidal side effects.