

## ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДНОГО АНАЛОГА НЕЙРОТЕНЗИНА ДИЛЕПТА НА ВНЕКЛЕТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛУТАМАТА, ГАМК И ГОМОВАНИЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ МОЗГА КРЫС

Е. В. Шубенина, В. С. Кудрин, П. М. Клодт, В. Б. Наркевич,  
Т. А. Гудашева, Р. У. Островская<sup>1</sup>

Изучалось влияние дипептидного аналога нейротензина дилепта (N-капроил-L-пролил-L-тирозина метиловый эфир) на внеклеточное содержание глутамата,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в прилежащем ядре мозга крыс Вистар. Исследование показало, что дилепт повышает экстраклеточное содержание глутамата и ГАМК, а также снижает внеклеточную концентрацию ГВК в этой структуре. Такой спектр активности дилепта сходен с эффектами эндогенного «антипсихотика» нейротензина, вводимого в прилежащее ядро. Дилепт может рассматриваться в качестве системно активного дипептидного миметика нейротензина, способного устранять нейрорегуляторный дисбаланс в глутамат-, ГАМК- и ДА-ергических системах прилежащего ядра. Представленные данные нейрохимического анализа дилепта в сочетании с его поведенческими характеристиками позволяют охарактеризовать дипептид как потенциальный антипсихотик.

**Ключевые слова:** нейротензин, дилепт, глутамат, ГАМК, дофамин, гомованилиновая кислота, шизофрения, прилежащее ядро

### ВВЕДЕНИЕ

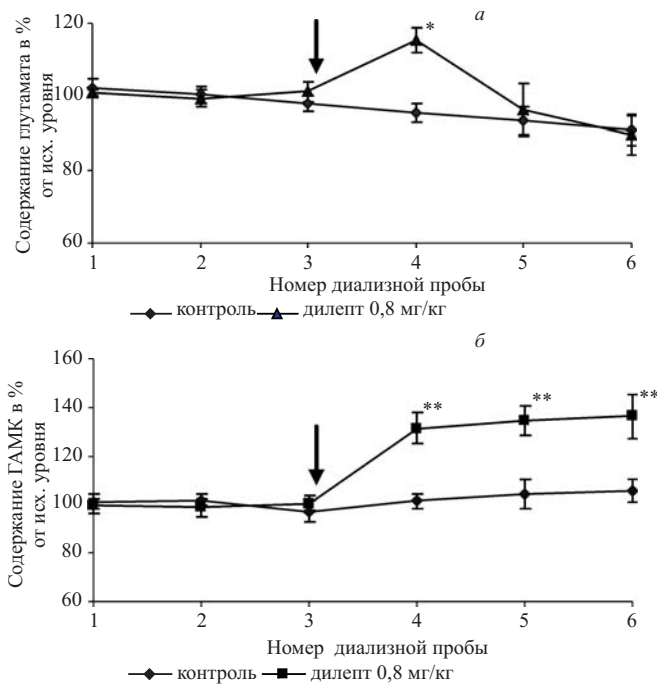
Имеется ряд убедительных экспериментальных и клинических данных о важной роли эндогенного тридекапептида нейротензина (НТ) в патогенезе шизофрении [5]. Способность НТ препятствовать развитию эффектов дофаминомиметиков, угнетать условные рефлексы, потенцировать эффекты барбитуратов, вызывать гипотермию позволили сформулировать гипотезу о роли НТ в качестве эндогенного нейролептика [5, 6]. Оligopeptидная структура НТ, обуславливающая его низкую биодоступность и неспособность проникать через ГЭБ, является причиной того, что эффекты НТ воспроизводятся только при введении этого тридекапептида в желудочки мозга или при его подведении к определенным структурам [12]. Это исключает возможность клинического применения НТ в качестве антипсихотического средства. Разработка миметиков нейротензина — гексапептидов, эффективных при системном введении, ведется на основе главного метаболита НТ (НТ<sub>8–13</sub>). Такие аналоги позиционируются многими авторами в качестве перспективного направления в разработке нейролептиков [5]. Оригинальный подход к поиску высокоактивных пептидных препаратов, развиваемый в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, состоит в создании замещенных дипептидов, имитирующих структуру активного центра эндогенного пептида и непептидного лекарственного препарата с соответствующей активностью. За основу моделирования активных НТ-подобных нейролептиков был взят дипептид пролил-тирозин в связи с

тем, что эта последовательность соответствует центральному фрагменту  $\beta$ -изгиба НТ<sub>8–13</sub> и имеет топологическое сходство с атипичным нейролептиком сульпиридом [14]. Из серии N-ацил-пролил-тирозинов для более подробного изучения был отобран N-капроил-L-пролил-L-тирозина метиловый эфир (дилепт), продемонстрировавший нейролептикоподобную активность по стандартным показателям дофаминергического действия [4]. Подобно другим нейролептикам и нейротензину он проявляет гипотермическое действие, а также потенцирует эффект барбитуратов. При этом в отличие от известных нейролептиков, дилепт оказывает положительное влияние на когнитивные функции, что связано в основном с его глутамат-позитивным действием, продемонстрированным на моделях амнезии и дефицита препульсового торможения, вызванного блокадой NMDA-рецепторов [2].

Значительная роль в патогенезе шизофрении отводится нарушению нейрорегуляторных механизмов в прилежащем ядре (ПЯ), которое является структурой, выполняющей функцию ретранслятора между лимбической и префронтальной областью, осуществляющей координацию когнитивных, эмоциональных и мотивационных процессов [16]. Известно, что антипсихотические препараты повышают уровень НТ в ПЯ, что может быть одним из механизмов их терапевтического эффекта [6].

Установлена тесная взаимосвязь НТ с дофаминергической системой прилежащего ядра [5]. Показано, что НТ, при введении в ПЯ, проявляет антипсихотоподобные эффекты: подавляет локомоторную гиперактивность и дефицит сенсомоторного гейтинга, вызванные амфетамином [9]. Известно, что регуляция нейро-

<sup>1</sup> НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.



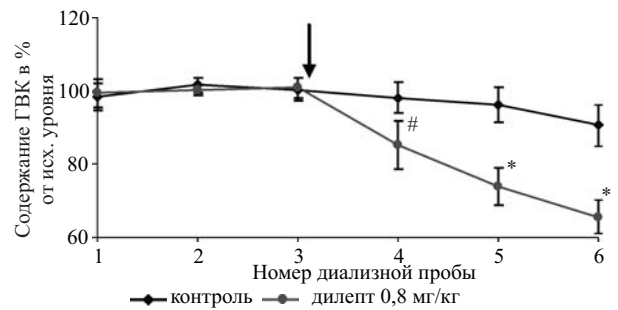
**Рис. 1.** Влияние дилепта (0,8 мг/кг внутривнутрибрюшинно) на внеклеточное содержание глутамата (а) и ГАМК (б) в прилежащем ядре крыс в % к исходному уровню. Стрелкой показан момент введения дилепта. Интервал между сбором диализных проб — 20 мин: \*  $p \leq 0,05$  (а) и \*\*  $p \leq 0,01$  (б) по сравнению с контролем.

тензином DA-ергической передачи в ПЯ осуществляется через системы глутамата и ГАМК [11].

Цель настоящей работы заключалась в оценке влияния аналога НТ дилепта на внеклеточный уровень глутамата, ГАМК и гомованилиновой кислоты (ГВК) в прилежащем ядре мозга крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 18 крысах самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Проведено изучение эффектов дилепта на внеклеточное содержание нейротрансмиттерных аминокислот (глутамата и ГАМК) и ГВК в прилежащем ядре мозга методом внутримозгового микродиализа. Животные случайным образом были разделены на 2 группы по 9 в каждой. Крыс обеих групп наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутривнутрибрюшинно) и фиксировали в стереотаксическом аппарате. Затем в прилежащее ядро имплантировали направляющие канюли для микродиализных зондов CMA12 с проницаемостью 20000 ДА (CMA Microdialysis) по координатам AP +1,7 мм; L — 2,6 мм; DV — 8,2 мм [10] под углом 10 градусов к сагиттальной плоскости и крепили их к костям черепа. Через 48 ч после операции зонды помещали в направляющую канюлю и в течение двух часов проводили перфузию искусственной цереброспинальной жидкостью со скоростью 2 мкл/мин [13]. В течение первых 60 мин собирали 3 базальных образца. Затем первой



**Рис. 2.** Влияние дилепта (0,8 мг/кг внутривнутрибрюшинно) на внеклеточное содержание гомованилиновой кислоты (ГВК) в прилежащем ядре крыс (в % к исходному уровню). Стрелкой показан момент введения дилепта. Интервал между сбором диализных проб — 20 мин. #  $p > 0,05$ ; \*  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

группе животных вводили дилепт (0,8 мг/кг внутривнутрибрюшинно), а второй — физиологический раствор в эквивалентном объеме. После этого собирали еще 3 диализных пробы с интервалом 20 мин. Далее крыс декапитировали, головной мозг извлекали, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до момента приготовления срезов на микротоме (Microm HM 500, “Walldorf”, Германия). Для контроля положения зонда в мозге срезы (20 мкм) окрашивали крезилвиолетом. Для статистической обработки использовали только образцы с подтвержденным расположением зондов в ПЯ. Содержание ГВК, глутамата и ГАМК в диализатах определяли методом ВЭЖХ [1]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

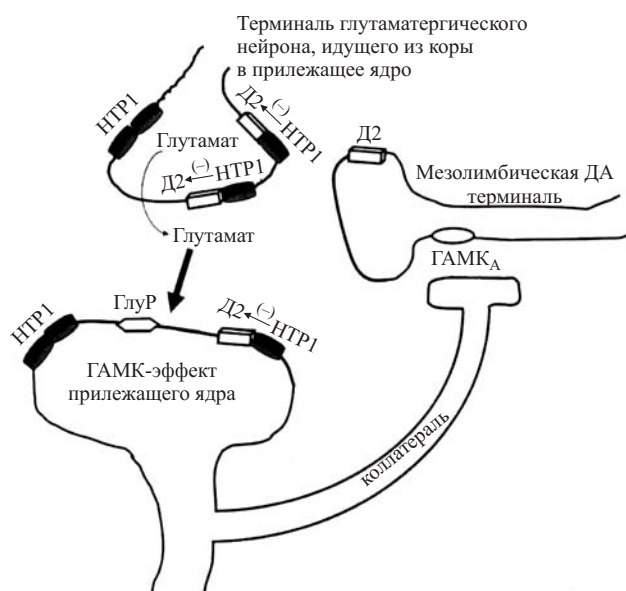
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рис. 1, а, через 20 мин после введения дилепта наблюдалось увеличение содержания глутамата до  $115 \pm 4\%$ ; в последующие 20 мин уровень аминокислоты снижался до исходных значений.

Через 20 мин после введения дилепта наблюдалось также повышение внеклеточной концентрации ГАМК до  $131 \pm 6\%$  относительно базальных значений. В дальнейшем содержание аминокислоты оставалось повышенным (до  $135 \pm 6\%$  через 40 мин и до  $136 \pm 9\%$  через 60 мин) (рис. 1, б).

Внеклеточное содержание ГВК через 40 мин достоверно снизилось (до  $87 \pm 5\%$  относительно базальных значений), а через 60 мин — до  $76 \pm 5\%$  (рис. 2).

До недавнего времени основное внимание при исследовании механизмов действия нейротензина и его аналогов было направлено на изучение их влияния на дофаминергическую систему мозга [9]. Однако исследованиями последних лет продемонстрировано, что нейротензин играет важную роль в регуляции баланса нейротрансмиттерных аминокислот, которые, в свою очередь, оказывают воздействие на DA-ергическую



**Рис. 3.** Механизмы нейрорегуляции, опосредованные NTR1-Д2 комплексом в прилежащем ядре (в соответствии с концепцией [11]).

ДА — дофамин, ГлуР — рецепторы глутамата. NTR-1 — рецепторы нейротензина (подтип 1). D2 — рецепторы дофамина (подтип 2), ГАМК-К<sub>A</sub> — рецепторы  $\gamma$ -аминоасляной кислоты (подтип А).

систему [11]. Как следует из концепции, представленной L. Ferraro и соавт. [11], в прилежащем ядре существует рецепторный комплекс, состоящий из рецепторов нейротензина подтипа 1 (NTR1) и рецепторов дофамина D2. Этот комплекс располагается преимущественно на окончаниях аксонов глутаматергических нейронов, идущих из коры в ПЯ. Нейротензин, воздействуя на NTR1-D2 комплекс, уменьшает аффинность D2-рецепторов к ДА на глутаматергических терминалях, что приводит к повышению высвобождения глутамата (рис. 3). Возможно, обнаруженное в наших исследованиях повышение высвобождения глутамата при введении дилепта осуществляется за счет подобного механизма.

L. Ferraro и соавт. полагают [11], что внеклеточное повышение уровня глутамата в ПЯ, вызванное введением НТ, ведет к ответной активации в этой структуре ГАМК-ергической импульсации. Далее сигнал от ГАМК-нейронов распространяется в двух направлениях: либо через коллатераль, идущую к окончаниям дофаминергических нейронов мезолимбического пути [15], либо через вентральный стриато-паллидарный ГАМК-ергический путь [11]. Нарушение активации последнего приводит к изменению нейрорегуляции в мезолимбической петле, что ведет к развитию некоторых симптомов шизофрении, в частности, когнитивного дефицита [15].

Усиление тормозного сигнала ГАМК-ергических нейронов через коллатераль приводит к активации рецепторов ГАМК<sub>A</sub> типа, находящихся на окончаниях дофаминергических нейронов мезолимбического

пути, и к последующему снижению высвобождения ДА [11] (рис. 3). Обнаруженное нами уменьшение экстраклеточного уровня ГВК в прилежащем ядре, вызванное дилептом, как мы полагаем — результат сниженного высвобождения ДА в межсинаптическую щель в этой структуре. Подобный эффект, вероятно, возникает вследствие повышения высвобождения ГАМК в прилежащем ядре после введения дилепта.

Гипофункция NMD<sub>A</sub>-рецепторов и снижение скорости синтеза ГАМК рассматривается в настоящее время как важная причина когнитивного дефицита при шизофрении [7, 8]. Обнаруженная нами способность дилепта повышать внеклеточное содержание глутамата и ГАМК в прилежащем ядре согласуется с выявленным ранее положительным влиянием этого дипептида на когнитивные функции [3].

В целом, обнаруженные нами эффекты дилепта в прилежащем ядре сходны с действием исходного тридекапептида НТ, в условиях его подведения к этой структуре. Таким образом, дилепт может рассматриваться в качестве системно активного дипептидного миметика нейротензина, способного устранять нейрорегуляторный дисбаланс в глутамат-, ГАМК- и ДА-ергических системах прилежащего ядра. Представленные данные нейрохимического анализа дилепта в сочетании с его поведенческими характеристиками позволяют позиционировать его как потенциальный антипсихотик.

## ВЫВОДЫ

1. В условиях системного введения дилепт повышает уровень глутамата и ГАМК в прилежащем ядре, т.е. оказывает эффект аналогичный действию нейротензина, вводимого в эту структуру.

2. Способность дилепта увеличивать внеклеточное содержание глутамата и ГАМК в прилежащем ядре согласуется с выявленным ранее положительным влиянием этого дипептида на когнитивные функции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Кондашевская, В. С. Кудрин, Л. А. Маликова и др., *Бюл. exper. биол.*, **141**(5), 599 – 601 (2006).
2. Р. У. Островская, Н. А. Крупина, Т. А. Гудашева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(5), 3 – 7 (2009).
3. Р. У. Островская, М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(1), 3 – 6 (2005).
4. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, *Патент РФ № 2091390*, (1998).
5. B. Kinkead and C. B. Nemeroff, *Neurol Disord Drug Targets*, **5**(2), 205 – 218 (2006).
6. C. B. Nemeroff, B. Levant, B. Myers, et al., *Acad Sci.*, № 668, 146 – 56 (1992).
7. D. C. Javitt, *Integrating the Neurobiology of Schizophrenia*, A. Abi-Dargham and O. Guillin (eds.), Elsevier Inc, London (2007), 70 – 96.
8. D. R. Grayson, Y. Chen, E. Dong, et al., *Epigenetics*, **4**(3), 144 – 149 (2009).
9. E. B. Binder, B. Kinkead, M. J. Owens, C. B. Nemeroff, *Pharmacol Rev.*, **53**(4), 453 – 486 (2001).

10. G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston (2005).
11. L. Ferraro, M. C. Tomasini, K. Fuxe, et al., *Brain Res Rev.*, **55**(1), 144 – 154 (2007).
12. M. Boules, P. Fredrickson, E. Richelson., *Peptides.*, **27**(10), 2523 – 2533 (2006).
13. M. M. Torregrossa and P. W. Kalivas, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **25**(2):556 – 566 (2008).
14. T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *J. Med. Chem.*, **41**(3), 284 – 290 (1998).
15. W. T. O'Connor, *J. Neurosci Methods*, **109**(1), 31 – 39 (2001).
16. Y. Smith, *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*, W. J. Schmidt, E. A. Reith, Maarten (eds.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey (2005), 65 – 70.

Поступила 08.06.10

## EFFECT OF DIPEPTIDE NEUROTENSIN ANALOG DILEPT ON EXTRACELLULAR CONCENTRATIONS OF GLUTAMATE, GABA AND HVA IN *N. ACCUMBENS* OF RAT BRAIN

E. V. Shubenina, V. S. Kudrin, P. M. Klodt, V. B. Narkevich, T. A. Gudasheva, and R. U. Ostrovskaya

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

The influence of dilept (GZR-123, N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine methyl ester) – a dipeptide analog of neurotensin (NT) – on extracellular concentration of glutamate,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and homovanillic acid (HVA) in n. accumbens of Wistar rats has been studied. By means of microdialysis, it was shown that dilept increases the concentrations of glutamate and GABA and decreases the HVA content in n. accumbens. These effects of dilept are similar to those produced by NT introduced into n. accumbens. Thus, dilept can be considered as a systemically active dipeptide analog of NT, which is capable of modulating the dysbalance of glutamate-, GABA-, and dopaminergic systems of n. accumbens. These neurochemical data taken together with previously established behavioral effects of dilept suggest that this dipeptide is a potential antipsychotic drug.

**Key words:** Dilept, neurotensin, glutamate, GABA, dopamine, homovanillic acid, schizophrenia, n.accumbens