

## СЕМАКС УСИЛИВАЕТ ЭФФЕКТЫ D-АМФЕТАМИНА НА УРОВЕНЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОФАМИНА В СТРИАТУМЕ КРЫС СПРЕГ-ДОУЛИ И НА ЛОКОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МЫШЕЙ C57BL/6

К. О. Еремин<sup>1</sup>, П. Сарансаари<sup>2</sup>, С. Ойя<sup>2</sup>, К. С. Раевский<sup>1</sup>

Изучено влияние семакса (АКТГ<sub>4-7</sub>-Pro-Gly-Pro) (0,6 мг/кг) на вызванное d-амфетамином (5 мг/кг) высвобождение дофамина в стриатуме крыс Спрег-Доули, а также на локомоторную гиперактивность, обусловленную введением d-амфетамина (2 мг/кг) у мышей C57BL/6. Базальное содержание дофамина (ДА) в диализатах стриатума крыс составляло 0,5 – 1,0 пмоль/мл, 3,4-диоксифенилуксусной (ДОФУК) и гомованилиновой кислот — 996 ± 25, 761 ± 37 пмоль/мл соответственно ( $n = 7$ ). D-амфетамин (5 мг/кг) вызывал значительное пикообразное повышение уровня ДА до 20 пмоль/мл через 20 – 40 мин после введения и длительное (на протяжении всего эксперимента) снижение внеклеточной концентрации ДОФУК до 30 % от базального уровня. При предварительном (за 20 мин до d-амфетамина) введении семакса наблюдалось более выраженное повышение пиковых концентраций ДА ( $p < 0,05$ ) и более отчетливое снижение содержания ДОФУК ( $p < 0,01$ ) по сравнению с эффектами психостимулятора. В поведенческих экспериментах на мышах C57BL/6 d-амфетамин (2 мг/кг) вызывал повышение двигательной активности до уровня 182 % ( $p < 0,01$ ). В то же время при введении семакса (0,6 мг/кг) и d-амфетамина (2 мг/кг) наблюдалось более выраженное увеличение локомоторной активности до уровня 261 % ( $p < 0,05$ ). Предполагается, что пептид оказывает позитивное модулирующее влияние на дофаминергические системы, участвующие в формировании психостимулирующего эффекта d-амфетамина.

**Ключевые слова:** семакс, аналог АКТГ, d-амфетамин, дофамин, микродиализ, двигательная активность

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время новый пептидный препарат с ноотропными свойствами семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) находит успешное применение в клинике при инсультах, ишемических повреждениях мозга и некоторых других нарушениях ЦНС [1, 6]. Однако нейрхимические механизмы, лежащие в основе терапевтического эффекта семакса, остаются мало изученными. В последние годы появились работы, в которых показано, что ряд аналогов АКТГ, в том числе АКТГ<sub>(4-7)</sub>-Pro-Gly-Pro (семакс), обладают свойствами антагонистов меланокортиновых (МС) рецепторов [7]. Сообщается о наличии тесных функциональных и анатомических связей между меланокортиновой и дофаминергической системами мозга [8, 11 – 14]. Так, введение  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона в желудочки мозга крыс вызывает “груминг” и сопутствующее повышение внеклеточного уровня дофамина в хвостатом и прилежащем ядрах животных [12, 13]. Ранее отмечалось, что в механизме действия семакса могут принимать участие моноаминергические системы мозга [2, 5]. В нашей предыдущей работе было показано, что через 24 ч после внутрибрюшинного введения семакса в дозе 0,6 мг/кг наблюдается повышение тка-

невого содержания дофамина, серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты в стриатуме мышей C57BL/6 [4]. В качестве анализатора функционального состояния моноаминергических, в первую очередь дофаминергических, систем мозга широко используется d-амфетамин, проявляющий свойства непрямого агониста дофаминовых рецепторов. Показано, что последний вызывает многократное пикообразное повышение внеклеточного содержания дофамина (ДА) в условиях микродиализного эксперимента в стриатуме крыс [9].

Целью работы явилось изучение влияния семакса на внеклеточное содержание дофамина и его метаболитов в стриатуме крыс Спрег-Доули с использованием метода внутримозгового микродиализа. Представлялось также целесообразным изучить влияние препарата на параметры двигательной активности мышей C57BL/6. В обеих сериях опытов использовали введение семакса в отдельности и в комбинации с d-амфетамином.

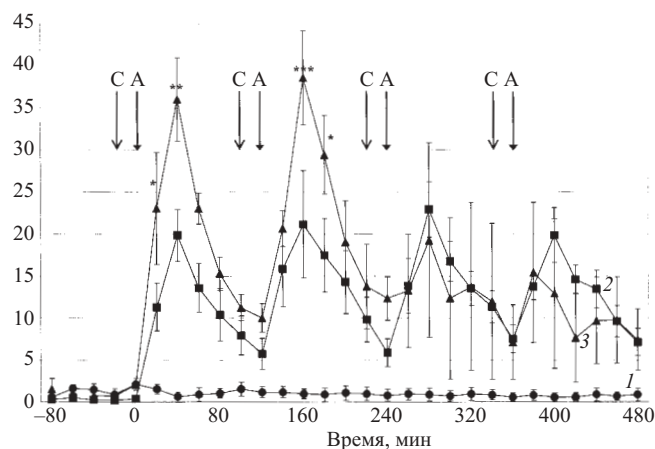
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы самцы крыс Спрег-Доули массой 250 – 300 г и мышей линии C57BL/6 массой 16 – 22 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

В первой серии экспериментов было изучено влияние семакса (Институт молекулярной генетики РАН) в дозе 0,6 мг/кг на внеклеточное содержание ДА, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме свободноподвижных крыс Спрег-Доули при 4-кратном введе-

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

<sup>2</sup> Центр по изучению мозга, Университет Тампере, Финляндия



**Рис. 1.** Эффекты семакса и d-амфетамина на внеклеточное содержание дофамина в стриатуме свободноподвижных крыс Спрег-Доули (в пмоль/мл).

Здесь и на рис. 2: стрелки — введение препаратов: С — семакс, А — d-амфетамин.

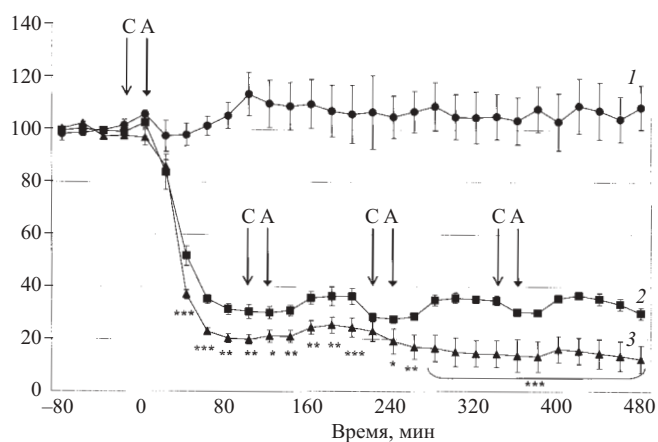
\*\*\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ , \*  $p < 0,1$  — ANOVA, Duncan's post hoc тест при сравнении с группой амфетамина. 1 — NaCl 0,9%; 2 — NaCl + d-амфетамин (5 мг/кг); 3 — семакс (0,6 мг/кг) + d-амфетамин (5 мг/кг).

нии d-амфетамина сульфата ("Sigma") с использованием методики внутримозгового микродиализа. В каждой группе было 6–8 животных. В работе применялись аналоги микродиализных зондов СМА12 (СМА Microdialysis, Швеция) изготовленные в лаборатории по оригинальной методике (при изготовлении использовалась диализная мембрана с диаметром пор 10 кДа). Через 1 сут после стереотаксической имплантации зондов в стриатум с координатами AP + 0,5, L – 3,0, DV + 6,5 относительно т. Брега [16] животных брали в опыт. Зонды перфузировались со скоростью 2 мкл/мин искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (в мМ):  $\text{Na}^+$  — 155,0,  $\text{K}^+$  — 2,9,  $\text{Ca}^{2+}$  — 1,1,  $\text{Mg}^{2+}$  — 0,8,  $\text{Cl}^-$  — 133,0, pH 7,4 (30 мин 5%  $\text{CO}_2$ ). D-амфетамин сульфат 5 мг/кг (в пересчете на основание) вводили внутривентрикулярно (в/б) 4-кратно через 2 ч. Семакс вводили в/б в дозе 0,6 мг/кг за 20 мин до каждого введения d-амфетамина. Диализные пробы собирали каждые 20 мин в течение 8 ч после 1-го введения психостимулятора. 3–4 базальные пробы были собраны перед первой инъекцией препарата. Определение ДА, ДОФУК, ГВК проводили методом ВЭЖХ (ESA 850) с электрохимическим детектором Coulcochem II (ESA) и ячейкой Microdialysis Cell 5014 B (ESA) при потенциалах – 175 и + 200 мВ на колонке Phenomenex C-18, 4 мкм, 150 × 4,6 мм. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин.

Во второй серии экспериментов были изучены эффекты семакса (0,6 мг/кг, в/б), d-амфетамина сульфата (2 мг/кг в пересчете на основание, в/б) и их комбинации в тех же дозах на спонтанную двигательную активность мышей C57BL/6. Регистрацию индивидуальной локомоторной активности животных проводили с помощью установки Opto-Varimex в течение 10 мин. Каждая группа состояла из 10–12 мышей.

Мыши были разделены на 4 группы: 1-я контроль (0,9% NaCl + 0,9% NaCl); 2-я амфетамин (0,9% NaCl + d-амфетамин 2 мг/кг); 3-я семакс (семакс 0,6 мг/кг + 0,9% NaCl); 4-я семакс + амфетамин (семакс 0,6 мг/кг + d-амфетамин 2 мг/кг).

В ходе опыта животных каждой группы трижды последовательно помещали в регистрационную камеру, измеряя их двигательную активность в течение 10 мин: первая посадка — тестирование 0–10 мин, сразу после этого введение семакса (0,6 мг/кг, в/б) или 0,9% NaCl. Вторая посадка — через 10 мин после инъекции (20–30 мин), сразу после этого введение d-амфетамина (2 мг/кг, в/б) или 0,9% NaCl. Третья посадка — через 20 мин после второй инъекции (50–60 мин).



**Рис. 2.** Эффекты семакса и d-амфетамина на внеклеточное содержание ДОФУК в стриатуме свободноподвижных крыс Спрег-Доули (в %).

Обозначения те же, что на рис. 1.

Данная схема введения соответствует схеме введения препаратов в микродиализных экспериментах.

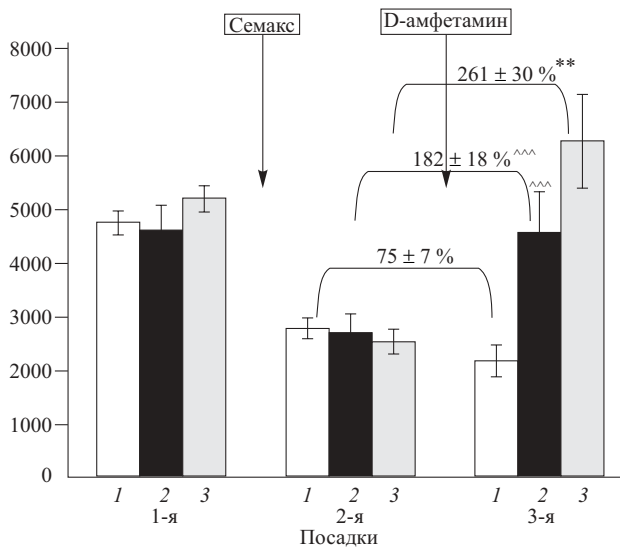
Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 5.0. Результаты микродиализных экспериментов обрабатывали с помощью дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений с использованием Duncan's post hoc критерия. Результаты поведенческих экспериментов обрабатывались с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде  $M \pm S. E. M.$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о влиянии семакса и d-амфетамина на внеклеточное содержание ДА и его метаболита (ДОФУК) в стриатуме свободноподвижных крыс Спрег-Доули приведены на рис. 1 и 2. Базальное содержание ДА в диализатах стриатума составляло 0,5–1,0 пмоль/мл, ДОФУК и ГВК —  $996 \pm 25$ ,  $761 \pm 37$  пмоль/мл соответственно ( $n = 7$ ). Максимальное увеличение содержания ДА в ответ на введение d-амфетамина наблюдается через 20–40 мин после введения и достигает концентрации 20 пмоль/мл (рис. 1), т.е. приблизительно в 20–30 раз выше базального уровня. К 120-й минуте уровень ДА снижается до 5 пмоль/мл. Повторные введения той же дозы d-амфетамина вызывали аналогичные по высоте и форме подъемы внеклеточного содержания ДА.

Семакс достоверно не изменял внеклеточные уровни ДА, ДОФУК и ГВК.

При предварительном введении семакса за 20 мин до d-амфетамина внеклеточный уровень ДА оказался достоверно повышенным с 20-й по 200-ю минуту по сравнению с эффектами d-амфетамина (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Максимальные концентрации ДА при комбинированном введении препаратов достигают 36–38 пмоль/мл, в то время как при введении d-амфетамина содержание ДА повышается до уровня 20 пмоль/мл. Duncan's post hoc анализ выявил достоверные различия между этими группами на 40 и 160 мин ( $p < 0,05$ ), а также на 20 и 180 мин ( $p < 0,1$ ).



**Рис. 3.** Эффекты семакса и d-амфетамина на параметры двигательной активности мышей C57BL/6.

1 — контроль, 2 — NaCl + d-амфетамин (2 мг/кг), 3 — семакс (0,6 мг/кг) + d-амфетамин (2 мг/кг). ^^  $p < 0,01$  — U-критерий Манна-Уитни, по сравнению с контрольной группой; \*\*  $p < 0,05$  — по сравнению с группой амфетамина.

(рис. 1). Во второй половине опыта (после 240 мин) потенцирующий эффект семакса в отношении вызванного d-амфетамином подъема внеклеточной концентрации ДА не наблюдался. Следует отметить, что в этот период часть животных (3 из 7), которым вводили семакс и d-амфетамин погибала, в то время как при введении только d-амфетамина гибели животных не отмечалось. По-видимому, это может быть обусловлено значительным усилением возбуждающего и, возможно, гипертермического эффекта d-амфетамина.

На рис. 2 показано влияние семакса и d-амфетамина на внеклеточное содержание ДОФУК. Как видно из представленных данных наряду с известным снижением уровня ДОФУК в ответ на введение d-амфетамина [9], что может быть обусловлено ингибирующим влиянием последнего на моноаминоксидазу (МАО) мозга, отмечается закономерное еще более выраженное снижение диализной концентрации ДОФУК (нижняя кривая) (ANOVA  $p < 0,01$ ). Логично предположить, что и в этом случае семакс усиливает действие d-амфетамина, следствием чего является более глубокое угнетение ферментативной активности МАО.

Уровень ГВК при введении d-амфетамина снижался в условиях наших опытов на 40 – 50 % к 120 мин. В дальнейшем наблюдалось повышение содержания этого метаболита с максимумом, который достигал 100 % от базального уровня через 40 – 60 мин после введения психостимулятора. Достоверных изменений уровня ГВК в диализатах стриатума при совместном введении семакса и d-амфетамина выявлено не было.

Целью следующей серии экспериментов явилось изучение эффектов совместного воздействия семакса и d-амфетамина на локомоторную активность мышей

C57BL/6, принимая во внимание участие дофаминергических систем мозга в формировании двигательного поведения. На рис. 3 представлены эффекты семакса и d-амфетамина на параметры двигательной активности мышей C57BL/6. В контрольной группе локомоторная активность снижалась в течение всего эксперимента. Так, во вторую посадку количество движений составило 58 % от первоначального, в третью посадку —  $75 \pm 7 \%$  по сравнению с активностью во второй посадке (рис. 3)

Семакс в дозе 0,6 мг/кг достоверно не изменял показатели двигательной активности животных.

D-амфетамин (2 мг/кг, в/б) вызывал значительное увеличение двигательной активности мышей. Так, после введения психостимулятора локомоторная активность достигала уровня  $182 \pm 18 \%$  по сравнению с показателями предыдущей посадки ( $p < 0,01$ ) (рис. 3).

При комбинированном применении семакса (0,6 мг/кг) и d-амфетамина (2 мг/кг) наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение локомоторной активности мышей по сравнению с группой амфетамина. Так, горизонтальная активность животных при совместном введении семакса и d-амфетамина достигает уровня  $261 \pm 30 \%$  по сравнению с соответствующими данными предыдущей посадки (рис. 3).

При сравнении данных микродиализных и поведенческих экспериментов можно видеть, что их результаты в целом коррелируют друг с другом. Это дает основание предположить, что наблюдаемое усиление локомоторных эффектов d-амфетамина при его совместном применении с семаксом может быть обусловлено повышением дофаминергической передачи в стриатуме. Потенцирование семаксом возбуждающих эффектов d-амфетамина может быть связано с активацией экспрессии нейротрофического фактора BDNF [3]. Такое объяснение согласуется с результатами работы в которой продемонстрировано уменьшение эффектов метамфетамина на внеклеточный уровень ДА и ДА-зависимое поведение животных при введении антител к BDNF [15].

Предположение об участии МС рецепторов в действии семакса в условиях использованной нами экспериментальной модели не получило прямого подтверждения. Вместе с тем нельзя исключить возможного взаимодействия семакса с мелакортиновой системой мозга [8], которая, как известно, тесно взаимодействует с дофаминергическими механизмами поведения [11 – 14]. Нами не исключается также возможность вовлечения других нейромедиаторных систем мозга, в частности адренергической, в d-амфетамин-индуцированные эффекты семакса. Как было недавно показано, вызываемое d-амфетамином повышение внеклеточной концентрации ДА в прилежащем ядре оказалось значительно менее выражено у мышей с нокаутом по  $\alpha_{1b}$ -адренорецептору [10].

Полученные нами данные могут представлять интерес в плане возможного использования семакса в терапии дофамин-дефицитных, в частности, когнитивных нарушений у больных.

## ВЫВОДЫ

1. В микродиализных экспериментах на свободно-подвижных крысах Спрег-Дюули семакс в дозе 0,6 мг/кг при однократном введении достоверно усиливает эффекты d-амфетамина (5 мг/кг) на уровни дофамина и 3,4-диоксифенилуксусной кислоты в диализатах стриатума.

2. В опытах на мышах C57BL/6 семакс в дозе 0,6 мг/кг усиливает эффект d-амфетамина (2 мг/кг), проявляющийся в увеличении локомоторной активности.

Авторы выражают благодарность профессору Т. А. Ворониной за помощь в проведении данной работы.

Работа поддержана грантами РФФИ № 00-04-55055; 02-04-49236, а также грантом Center for International Mobility (СИМО), Финляндия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Г. В. Алексеева, Н. А. Боттаев, В. В. Горюшкова, *Анестезиол. и реаниматол.*, № 1, 40 – 43 (1999).
2. Л. В. Антонова, А. А. Каменский, Т. И. Власова и др., *Бюл. exper. биол.*, 11, 569 – 571 (1986).

3. О. В. Долотов, Т. С. Середенина, Н. Г. Левицкая и др., *Докл. АН*, 391(1), 1 – 4 (2003).
4. К. О. Еремин, В. С. Кудрин, Л. А. Андреева и др., *Нейрохимия*, 19(4), 269 – 272 (2002).
5. Р. И. Кругликов, Н. В. Орлова, В. М. Гецова, *Ж. высш. нервной деят.*, 41(2), 359 – 363 (1991).
6. Н. Ф. Мясоедов, В. И. Скворцова, Е. А. Насонов и др., *Ж. неврол. и психиатр.*, 99(5), 15 – 19 (1999).
7. R. A. H. Adan, J. Oosterom, G. Ludvigsdottir, et. al., *Eur. J. Pharmacol.*, 269, 331 – 337 (1994).
8. R. A. H. Adan and W. H. Gispen, *Peptides*, 18(8), 1279 – 1287 (1997).
9. I. I. Afanas'ev, E. A. Anderzhanova, V. S. Kudrin, and K. S. Rayevsky, *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 69, 653 – 658 (2001).
10. A. Auclair, S. Cotecchia, J. Glowinsky, and J. P. Tassin, *J. Neurosci*, 22(21), 9150 – 9154 (2002).
11. F. Drago, A. Contarino, and L. Busa, *European Journal of Pharmacology*, 365, 125 – 131 (1999).
12. W. J. Florijn, A. J. Holtmaat, H. de Lang, et. al., *Brain Res.*, 625(1), 169 – 172 (1993).
13. J. LindBLom, B. Opmane, F. Mutulis, et al., *Neuroreport*, 12(10), 2155 – 2158 (2001).
14. J. LindBLom, A. Kask, E. Hagg, et al., *Pharmacological Research*, 45(2), 119 – 124 (2002).
15. M. Narita, K. Aoki, M. Takagi, et al., *Neuroscience*, 119, 767 – 775 (2003).
16. G. Paxinos and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2-nd edition, Academic Press, Sydney (1986).

Поступила 24.12.03

## SEMAX POTENTIATES THE EFFECT OF D-AMPHETAMINE ON THE LEVEL OF EXTRACELLULAR DOPAMINE IN THE STRIATUM OF SPRAIG – DOWLEY RATS AND ON THE LOCOMOTOR ACTIVITY OF C57BL/6 MICE

K. O. Eremin<sup>1</sup>, P. Saransaari<sup>2</sup>, S. Oja<sup>2</sup>, and K. S. Raevskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

<sup>2</sup> Center for Brain Research, Tampere University, Tampere, Finland

The synthetic peptide semax (a fragment of ACTH 4-7 Pro-Gly-Pro) enhances the release of extracell dopamine (DA) induced by D-amphetamine (5 mg/kg) in the striatum of Spraug – Dowley (SD) rats and increases the locomotor activity stimulated by D-amphetamine (2 mg/kg) in C57/BL<sub>6</sub> mice. The basal content of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), and homovanillic acid (HVA) in dialysate of SD rats was 0.5 – 1.0, 996 ± 25, and 761 ± 37 pmole/ml, respectively (*n* = 7). D-amphetamine (5 mg/kg) induced a sharp increase in the DA level (up to 20 pmole/ml) 20 – 40 min after treatment and reduced the extracell DHPAA content to 30 % of the basal level for a prolonged time (over the entire experimental period). Preliminary (20 min before D-amphetamine) administration of semax resulted in a greater peak of DA concentration (*p* < 0.05) and a more pronounced drop in DHPAA level (*p* < 0.01) as compared to the effects produced by the psychostimulant alone. In behavioral tests on C57/BL<sub>6</sub> mice, D- amphetamine (2 mg/kg) increased the locomotor activity to a level of 182 % (*p* < 0.01). Simultaneous introduction of semax (0.6 mg/kg) and D-amphetamine (2 mg/kg) led to a more pronounced increase in the locomotor activity of mice (261 %, *p* < 0.01). It is suggested that the peptide modulates dopaminergic systems involved in the formation of the psychostimulant effect.