

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## НЕЙРОТЕНЗИНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТИПСИХОТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА: ВЛИЯНИЕ НА ДОФАМИНОВУЮ СИСТЕМУ

Н. В. Кост<sup>1</sup>, В. К. Мешавкин<sup>1</sup>, Е. Ю. Батищева<sup>1</sup>, О. Ю. Соколов<sup>1</sup>,  
Л. А. Андреева<sup>2</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>2</sup>

По данным литературы нейротензин рассматривается как эндогенное антипсихотическое вещество. В проведенном исследовании на основании структуры предполагаемого активного участка этого пептида синтезирован ряд олигопептидов, которые были названы нейротензинподобными (НТП). Проведен скрининг активности этих пептидов в поведенческих моделях, в которых функциональное состояние дофаминовой системы модифицировали введением животным апоморфина. В тестах “вертикализация”, стереотипия и зевание выявлены НТП, обладающие свойствами функциональных антагонистов дофаминовых рецепторов. Радиолигандный анализ показал, что НТП конкурируют за специфическое связывание с селективным антагонистом дофаминовых рецепторов D<sub>2</sub>-типа сульпиридом. Высокая степень совпадения эффективности пептидов в поведенческих экспериментах и радиолигандном анализе свидетельствует о том, что механизм антипсихотического действия НТП может быть опосредован дофаминовыми рецепторами.

**Ключевые слова:** нейротензин, дофаминовые рецепторы, антипсихотические средства, апоморфин, сульпирид

### ВВЕДЕНИЕ

Известные в настоящее время антипсихотические средства пока далеки от совершенства: они не всегда эффективны и нередко оказывают отрицательное побочное действие. Поэтому проблема создания новых эффективных и безопасных препаратов для лечения шизофрении и других психозов весьма актуальна. Из патогенетически значимых для шизофрении нейрохимических систем в качестве основной, на данный момент, рассматривается дофаминовая. С нарушением ее функционирования в мезолимбической системе связывают развитие продуктивной симптоматики психозов, в мезокортикальной — негативную симптоматику и когнитивные нарушения [7]. Предполагается, что эндогенным антагонистом дофамина является регуляторный пептид нейротензин (НТ). НТ и дофамин совместно локализованы в нейронах ряда структур мозга, где НТ регулирует выброс дофамина, серотонина, ГАМК и глутамата в синаптическую щель [3, 9, 10]. В настоящее время НТ рассматривается как эндогенное антипсихотическое средство. Показано, что уровень НТ в СМЖ больных шизофренией снижен и повышается после терапии антипсихотиками [13]. Поведенческие эффекты НТ, модификаций его пептидных фраг-

ментов и синтетических агонистов нейротензиновых рецепторов (NTR1) сходны с эффектами антипсихотиков [4, 14]. На основе структуры β-поворотного участка этого пептида (Pro-Tyr) были синтезированы соединения, которые продемонстрировали свойства антипсихотиков в экспериментах на животных [2, 4, 11].

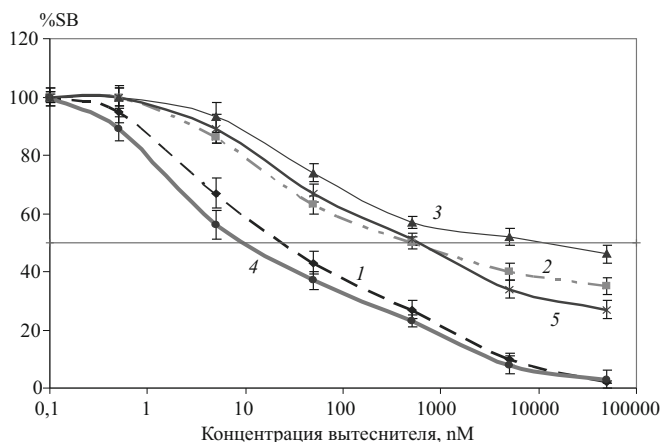
В результате направленного синтеза в ИМГ РАН получен ряд олигопептидов, в которых последовательность Pro-Tyr была окружена природными аминокислотами. Они были названы нейротензинподобными пептидами (НТП). Исследование их взаимодействия с дофаминовыми рецепторами проводилось радиолигандным методом с использованием селективного антагониста этих рецепторов сульпирида. В экспериментах *in vivo* было изучено влияние НТП на поведение животных, индуцированное введением агониста дофаминовых рецепторов апоморфина в различных дозах, в тестах “вертикализация”, стереотипия и зевание.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на беспородных белых мышцах-самцах массой 23–25 г и беспородных белых крысах-самцах массой 200–250 г, полученных из питомника РАМН “Крюково-Центральное”. Пептиды вводили внутрибрюшинно за 30 мин до начала тестирования в 0,2 мл физиологического раствора. Феномен “вертикализации” вызывали введением мышам апоморфина (“Sigma”) в дозе 5 мг/кг (подкожно, непо-

<sup>1</sup> Научный центр психического здоровья РАМН, 115522, Москва, Каширское ш., 34.

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика И. В. Курчатова, 2.



Влияние нейротензинподобных пептидов на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -сульпирида с мембранами клеток стриатума крыс.

По оси ординат — % специфического связывания в присутствии: 1 — сульпирида, 2 — Met-Pro-Tyr-Pro-Gly-Pro, 3 — Met-Pro-Tyr-Phe-OMe, 4 — Met-Pro-Tyr-Arg, 5 — Trp-Pro-Tyr-Phe.

средственно перед тестированием). Тестирование проводили в специальных цилиндрических камерах (диаметром 140 мм) со стеной, изготовленной из вертикально расположенной нержавеющей проволоки толщиной 2 мм и длиной 200 мм при расстоянии между прутьями в 10 мм. Определение уровня вертикализации проводили в течение 10 с каждые две минуты на протяжении 1 ч. По окончании эксперимента подсчитывали суммарный балл (число лапок на проволочной стене камеры) для каждого животного за всё время наблюдения. Феномен стереотипии вызывали инъекцией крысам апоморфина в дозе 0,75 мг/кг (подкожно, непосредственно перед тестированием). Оценивали общую продолжительность стереотипного поведения и интенсивность стереотипных реакций по шкале: 1 балл — отдельные стереотипные движения; 2 — интенсивная непродолжительная стереотипия; 3 — постоянная интенсивная стереотипия. Определение уровня стереотипии проводили в течение 60 с каждые 10 мин на протяжении 80 мин. Подсчитывали суммарный балл для каждого животного за всё время наблюдения. Феномен “зевания” вызывали инъекцией апоморфина крысам в дозе 0,1 мг/кг (подкожно, непосредственно перед тестированием). В этой дозе препарат способен влиять преимущественно на пресинаптические рецепторы дофамина. Подсчитывали количество зеваний каждого животного в течение 1 ч.

Реакционная смесь для изучения связывания сульпирида с рецепторами стриатума крыс (конечный объем 300 мкл) содержала: 50 мМ Трис-НСI буфер, pH 8; 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, мембранную фракцию стриатума (0,5 мг белка/мл); 50 мкг/мл бацитрацина; 20 нМ  $^3\text{H}$ -сульпирида (56 Ки/ммоль, синтезирован и предоставлен Ю. А. Золотаревым, ИМГ РАН), пептиды в концентрациях

0,1 – 100 мкМ. Инкубацию проводили при 25° С в течение 40 мин. Отделение связанной и несвязанной метки проводили на харвестере Skatron (Швеция) на фильтрах GF/B (Whatman), предварительно замоченных в 0,1 % растворе полиэтиленimina. Каждая точка определялась в трех параллелях в трех независимых экспериментах.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни в программе Statistica for Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Апоморфин в высоких дозах (5 мг/кг) активирует дофаминовую нейротрансмиссию в мезолимбической системе, что приводит к развитию феномена “вертикализация”. На этом фоне большинство исследованных НТП снижали выраженность вертикализации мышей (таблица). Как показано нами ранее [1], в этом тесте минимальные эффективные дозы некоторых пептидов, в частности, Trp-Pro-Tyr-Phe были ниже (от 0,01 мг/кг), чем у препарата сравнения атипичного антипсихотика оланзапина. В дозах, близких эквиваленту терапевтической дозы оланзапина (0,1 – 1 мг/кг), эффекты Trp-Pro-Tyr-Phe, Met-Pro-Tyr-Trp-OMe, Met-Pro-Tyr-Phe-OMe, Tyr-Pro-Tyr-Phe и оланзапина были сравнимы по выраженности. Повышение дозы оланзапина приводило к гибели мышей, а пептиды во всем использованном диапазоне доз не оказывали видимого отрицательного побочного действия на животных [1]. Поскольку тест “вертикализация” считается одной из основных моделей продуктивной симптоматики шизофрении, можно предполагать, что эффективные в этом тесте пептиды обладают свойствами нейрореплетиков.

В дозе 0,75 мг/кг апоморфин усиливает дофаминергическую передачу в нигростриальной системе, что вызывает стереотипию. В этой модели пептиды Trp-Pro-Tyr-Phe, Met-Pro-Tyr-Trp-OMe и Met-Pro-Tyr-Ala достоверно снижали количество стереотипных движений у крыс на 10 – 15 % (таблица). В тесте “зевание” эффективными оказались 5 из 12 НТП, причем выраженность их эффектов была выше, чем в остальных поведенческих тестах: НТП в дозе 1 мг/кг снижали количество зеваний на 30 – 70 % (таблица). Тест “зевание” рассматривается некоторыми авторами в качестве модели негативной симптоматики шизофрении [5], что дает возможность предполагать перспективность использования НТП для купирования этой симптоматики.

Считается, что апоморфин стимулирует двигательную и стереотипическую активность экспериментальных животных через постсинаптические дофаминовые рецепторы D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>-типов [8, 12]. В то же время феномен зевания в первую очередь обусловлен подавлением выброса дофамина за счет активации пресинаптических D<sub>3</sub>-рецепторов малыми дозами апоморфина [5]. Сопоставляя результаты, полученные в пове-

денческих тестах, можно предположить, что Trp-Pro-Tyr-Phe, Met-Pro-Tyr-Arg и Met-Pro-Tyr-Ala (или их активные фрагменты) могут блокировать эффекты апоморфина, опосредуемые дофаминовыми рецепторами всех трех упомянутых типов. Met-Pro-Tyr-Phe и Met-DPro-Tyr-Phe предположительно взаимодействуют только с D<sub>3</sub>-рецепторами, а Met-Pro-Tyr-Trp-OMe, Met-Pro-Tyr-Phe-OMe, Tyr-Pro-Tyr-Phe, Lys-Pro-Tyr-Phe и Lys-Pro-Tyr-Phe-OMe — с рецепторами D<sub>1</sub>- и/или D<sub>2</sub>-типов.

Для выяснения возможности прямого действия пептидов на дофаминовые рецепторы данные, полученные в поведенческих экспериментах, были сопоставлены с результатами радиолигандного анализа. Была исследована способность НТП влиять на специфическое связывание относительно селективного лиганда дофаминовых рецепторов D<sub>2</sub>- и D<sub>3</sub>-типов сульпирида с мембранной фракцией клеток стриатума крыс. На рисунке приведены типичные кривые вытеснения <sup>3</sup>H-сульпирида холодным сульпиридом, Trp-Pro-Tyr-Phe, Met-Pro-Tyr-Arg и Met-Pro-Tyr-Phe-OMe. Концентрация холодного сульпирида, при которой на 50 % снижается связывание <sup>3</sup>H-сульпирида (IC<sub>50</sub>), соответствует концентрации метки (20 нМ), что свидетельствует о сохранении биологических свойств препарата после введения в него трития методом твердофазного каталитического изотопного обмена.

**Сравнение эффективности пептидов в поведенческих тестах в условиях фармакологически измененного состояния дофаминовой системы и их способности взаимодействовать с дофаминовыми рецепторами *in vitro***

Пептиды	Поведенческие эффекты (% от контроля), доза пептидов 1 мг/кг			Вытеснение <sup>3</sup> H-сульпирида (IC <sub>50</sub> , мкМ)
	Вертикализация <sup>1</sup>	Стереотипия <sup>2</sup>	Зевание <sup>3</sup>	
Met-Pro-Tyr-Phe	99		50**	> 100
Met-DPro-Tyr-Phe	98		61*	10
Met-Pro-Tyr-Phe-OMe	81*		89	10
Met-Pro-Tyr-Trp-OMe	80*	90*	109	0,5
Met-Pro-Tyr-Pro-Gly-Pro	100		93	0,5
Met-Pro-Tyr-Ala	88*	84*	49**	> 100
Met-Pro-Tyr-Arg	87*		68**	0,01
Trp-Pro-Tyr-Phe	78*	84*	31**	0,52
Tyr-Pro-Tyr-Phe	83*		96	> 100
Val-Pro-Tyr-Phe	93		125	> 100
Lys-Pro-Tyr-Phe	72*		85	> 100
Lys-Pro-Tyr-Phe-OMe	75*		95	0,1

\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  достоверность отличия от контроля.  
<sup>1</sup> В тесте “вертикализация” доза апоморфина 5 мг/кг, значения тестируемого показателя в контрольной группе варьировали в разных экспериментах и в среднем составили  $81 \pm 5$  баллов.  
<sup>2</sup> В тесте “стереотипия” доза апоморфина 0,75 мг/кг, средние значения выраженности стереотипии в контрольной группе были  $24 \pm 1$  балл.  
<sup>3</sup> В тесте “зевание” доза апоморфина 0,1 мг/кг, средние значения тестируемого показателя в контрольной группе составили  $10 \pm 3$  зевания/час.

Met-Pro-Tyr-Arg полностью вытесняет <sup>3</sup>H-сульпирид из мест его специфического связывания (рисунок), т.е. взаимодействует как с D<sub>2</sub>-, так и с D<sub>3</sub>-рецепторами, что согласуется с его эффективностью в тестах “вертикализация” и “зевание” (таблица). При этом аффинность Met-Pro-Tyr-Arg к этим рецепторам даже несколько выше, чем у сульпирида (IC<sub>50</sub> = 10 нМ). Для Trp-Pro-Tyr-Phe также характерно сочетание высокой эффективности во всех использованных поведенческих тестах (таблица) со способностью взаимодействовать с D<sub>2</sub>- и D<sub>3</sub>-рецепторами, хотя и с меньшей аффинностью (IC<sub>50</sub> = 520 нМ, рисунок). Met-Pro-Tyr-Phe-OMe вытесняет <sup>3</sup>H-сульпирид из мест его специфического связывания лишь частично (рисунок) и эффективен только в тесте “вертикализация” (таблица). Возможно, это обусловлено тем, что он взаимодействует с D<sub>2</sub>-, но не с D<sub>3</sub>-рецепторами.

В таблице сопоставлена способность пептидов оказывать “дофаминблокирующее” действие в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Как правило, НТП, способные влиять на связывание сульпирида, эффективны и в поведенческих тестах. Отсутствие полного совпадения можно объяснить гидролизом пептидов в процессе их доставки в ЦНС, что может сопровождаться образованием как неактивных (как в случае Met-Pro-Tyr-Pro-Gly-Pro), так биологически активных фрагментов. Не исключены и другие механизмы влияния НТП на дофаминовую систему, в частности, взаимодействие этих пептидов с NTR, активация которых влияет на выброс дофамина и других нейромедиаторов в синаптическую щель [3, 9, 10], уменьшает активность K<sup>+</sup> каналов дофаминергических нейронов [15]. Кроме того, известно, что НТ аллостерически снижает аффинность D<sub>2</sub> рецепторов к агонистам [3, 6]. Поскольку в настоящем исследовании радиолигандный анализ проводился с использованием антагониста D<sub>2</sub>-рецепторов, обнаружить подобный эффект НТП не было возможности.

**ВЫВОДЫ**

1. В поведенческих моделях с фармакологически измененным состоянием дофаминовой системы выявлены нейротензинподобные пептиды, способные в дозе 1 мг/кг блокировать эффекты апоморфина в тестах “вертикализация”, стереотипия и зевание, то есть обладающие свойствами, характерными для антипсихотиков. Наиболее эффективны в этих тестах Trp-Pro-Tyr-Phe и Met-Pro-Tyr-Ala.

2. Сопоставление результатов, полученных в экспериментах *in vivo*, и данных радиолигандного анализа *in vitro* показало, что механизмы антипсихотического действия этих пептидов, в первую очередь, Trp-Pro-Tyr-Phe могут быть опосредованы дофаминовыми рецепторами D<sub>2</sub>- и D<sub>3</sub>-типов.

Работа поддержана РФФИ, грант 09-04-12190.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Зозуля, Н. В. Кост, В. К. Мешавкин и др., *Психиатрия*, **4**(28), 55 – 61 (2007).
2. Р. У. Островская, М. В. Ретюнская, Л. С. Гузеватых и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(1), 3 – 6 (2005).
3. T. Antonelli, K. Fuxe, M. C. Tomasini, et al., *Prog. Neurobiol.*, **83**(2), 92 – 109 (2007).
4. M. Boules, A. Shaw, P. Fredrickson, et al., *CNS Drugs*, **21**(1), 13 – 23 (2007).
5. G. T. Collins, J. M. Witkin, A. H. Newman, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**(1), 310 – 319 (2005).
6. K. Fuxe, D. Marcellino, A. S. Woods, et al., *J. Neural. Transm.*, **116**(8), 923 – 939 (2009).
7. S. Kapur and D. Mamo, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **27**(7), 1081 – 1090 (2003).
8. R. K. McNamara, A. Logue, K. Stanford, et al., *Synapse*, **60**(5), 399 – 405 (2006).
9. P. Petkova-Kirova, A. Rakovska, G. Zaekova, et al., *Neurochem. Int.*, **53**(6 – 8), 355 – 361 (2008).
10. K. A. Petrie, D. Schmidt, M. Bubser, et al., *J. Neurosci.*, **25**(7), 1629 – 1636 (2005).
11. A. J. Prus, M. Huang, Z. Li, et al., *Brain Res.*, **1184**(12), 354 – 364 (2007).
12. N. M. Richtand, *Neuropsychopharmacology*, **31**(11), 2368 – 2375 (2006).
13. R. P. Sharma, P. G. Janicak, G. Bissette, et al., *Am. J. Psychiatry*, **154**(7), 1019 – 1021 (1997).
14. P. D. Shilling, E. Richelson, and D. Feifel, *Behav. Brain Res.*, **143**(1), 7 – 14 (2003).
15. T. R. Werkman, C. G. Kruse, H. Nievelstein, et al., *Neuroscience*, **95**(2), 417 – 423 (2000).

Поступила 16.04.11

## NEUROTENSIN-LIKE OLIGOPEPTIDES AS POTENTIAL ANTIPSYCHOTICS: EFFECT ON DOPAMINE SYSTEM

N. V. Kost<sup>1</sup>, V. K. Meshavkin<sup>1</sup>, E. Yu. Batishcheva<sup>1</sup>, O. Yu. Sokolov<sup>1</sup>,  
L. A. Andreeva<sup>2</sup>, and N. F. Myasoedov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe shosse 34, Moscow, 115522, Russia

<sup>2</sup> Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182, Russia

According to published data, peptide neurotensin is considered as endogenous antipsychotic agent. A series of oligopeptides have been synthesized based on the proposed active center of neurotensin. These oligopeptides (called neurotensin-like peptides, NLPs) have been studied on behavioral models, in which the functional state of the dopamine system of animals was modified by apomorphine injections. The results of verticalization, stereotypy, and yawning tests revealed NLPs that behave as antagonists of dopamine receptors. Radioligand analysis showed that these peptides compete for specific binding to these receptors with sulpiride, which is a D2-type selective antagonist of dopamine receptors. The high degree of NLPs efficiency manifested in the behavioral tests and radioligand analysis suggests that their antipsychotic action can be mediated by dopamine receptors.

**Key words:** Neurotensin, dopamine receptors, antipsychotics, apomorphine, sulpiride