

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

СНИЖЕНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГЛУТАМАТА — ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ОРИГИНАЛЬНОГО АНТИПСИХОТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДИЛЕПТА

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

В ГУ НИИ фармакологии им В. В. Закусова РАМН создан ряд дериватов пролил-тирозина, которые являются, с одной стороны, аналогами β -поворотной структуры активного фрагмента нейротензина (NT₈₋₁₃), а с другой — имитируют структуру атипичного нейролептика сульпирида. Из ряда аналогов на основании высокой нейролептической активности отобрано соединение дилепт (ГЗР-123), представляющее метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина. В данной работе исследовали влияние дилепта на уровень спонтанного и K⁺-стимулированного высвобождения эндогенного глутамата срезами коры большого мозга крыс. Дилепт в концентрациях 10⁻⁵ и 10⁻⁶ М уменьшал стимулированное высвобождение аминокислоты. Описанный эффект может лежать в основе механизма нейропротекторного действия этого нейролептика.

Ключевые слова: пептидомиметик нейротензина, атипичный нейролептик, дилепт, высвобождение глутамата, нейропротекторные свойства

ВВЕДЕНИЕ

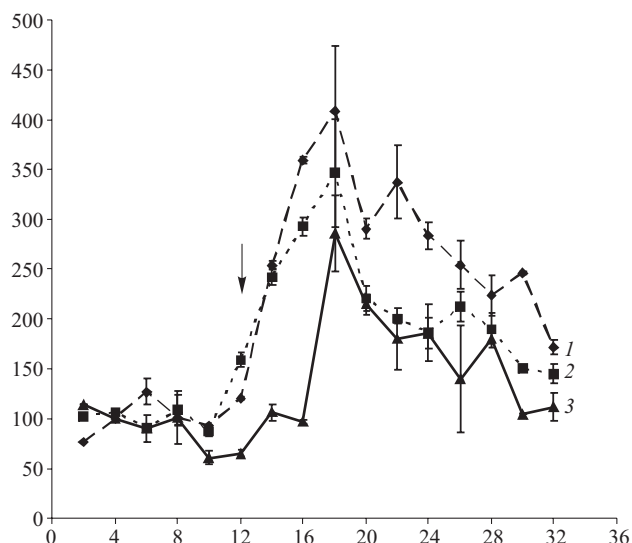
Многочисленными исследованиями последних лет выявлена важная роль эндогенного пептида нейротензина (НТ) в патогенезе шизофрении. Наблюдается четкая корреляция тяжести симптомов шизофрении со степенью гипофункции НТ-системы. Данные о тесной нейроанатомической и функциональной взаимосвязи НТ- и дофамин(ДА)-ергической систем, сходстве профиля фармакологической активности НТ и антипсихотических средств, а также об усилении под действием нейролептиков синтеза и высвобождения НТ позволили выдвинуть гипотезу о роли этого тридекапептида в качестве эндогенного антипсихотика [16]. Фармакологические свойства НТ могли бы найти применение в клинической практике, однако, сложная пептидная структура, обуславливающая низкую биодоступность и неспособность проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), делают невозможным его использование в качестве лекарственного препарата.

Исходя из положения о возможности имитации биологических эффектов сложных эндогенных пептидов простейшими аналогами, воспроизводящими структуру их активного центра и непептидного нейротропного препарата с соответствующей активностью, в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН Т. А. Гудашевой создан ряд соединений, являющихся пепти-

домиметиками β -поворотной структуры активного участка нейротензина (НТ₈₋₁₃) и имеющие структурное сходство с атипичным нейролептиком сульпиридом [2, 13]. Выполнено фармакологическое изучение более чем 30 соединений этого ряда [7, 9], из которых на основании наиболее выраженной нейролептической активности отобран для подробного изучения метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина (ГЗР-123, дилепт). Изучение фармакологических свойств этого соединения выявило наличие у него дофаминонегативной активности, проявляющейся в способности ослаблять апоморфиную вертикализацию, стереотипию, вызванную L-DOPA, устранять нарушения экстраполяционного поведения, вызванные мадопаром [1]. Диапазон эффективных доз дилепта составляет 0,4 – 4 мг/кг. Нейрохимический анализ эффектов препарата выявил его способность избирательно усиливать оборот дофамина (ДА) в *n. accumbens*, что характерно для действия атипичных нейролептиков различной структуры [8].

Известно, что течение шизофрении, особенно в поздней стадии заболевания, сопровождается развитием нейродегенеративных процессов. При этом, если в развитии позитивной симптоматики ведущая роль приписывается гиперактивности дофаминовой системы в сочетании с гипоактивностью глутаматной системы, в появлении нейродегенеративных изменений ведущая роль приписывается чрезмерной активации глутаматергических процессов, ведущей к гибели нейронов коры большого мозга, особенно ее префронтальной

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



Влияние дилепта на высвобождение глутамата срезами коры большого мозга крысы.

По оси ординат — концентрация глутамата, % по отношению к уровню спонтанного высвобождения, по оси абсцисс — время. 1 — контроль, 2 — дилепт 10^{-6} , 3 — дилепт 10^{-5} . Стрелка — введение KCl (45 mM).

льных отделов [12]. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния дилепта на уровень спонтанного и стимулированного высвобождения глутамата срезами коры мозга крыс как одного из возможных механизмов его нейропротекторного эффекта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар (питомник Столбовая РАН) массой 180 – 220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

После наркотизации пентобарбиталом (50 мг/кг внутривенно) крыс декапитировали и извлекали головной мозг. На льду производили иссечение фронтальной коры, затем с помощью вибратора (Lancer Vibratome Series 1000, США) готовили срезы данной структуры мозга толщиной 300 мкм. Полученные срезы помещали в перфузионные камеры объемом 400 мкл. Постоянная скорость потока жидкости через камеры (200 мкл/мин) обеспечивалась с помощью перистальтического насоса фирмы “Zaling” (Польша). Суперфузию срезов мозга проводили при 37 °C в растворе Кребса — Рингера следующего состава: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 26 mM NaHCO_3 , 15 mM HEPES и 10 mM глюкозы [14, 18]. На первом этапе исследований оценивали уровень спонтанного и стимулированного высвобождения глутамата без воздействия препарата. После 40-минутного стабилизационного периода, в течение которого не брали пробы для анализа, собирали шесть двухминутных фракций для последующего измерения уровня спонтанного высвобождения глутамата.

Для изучения стимулированного высвобождения глутамата концентрацию KCl в инкубационной среде увеличивали с 5 mM до 45 mM с эквимолярным снижением концентрации NaCl; далее собирали восемь двухминутных фракций.

На следующем этапе работы исследовали влияние дилепта на уровень спонтанного и стимулированного высвобождения глутамата. С этой целью после 40-минутного стабилизационного периода и сбора шести двухминутных фракций со спонтанным высвобождением глутамата в раствор Кребса-Рингера добавляли пептид в концентрациях 10^{-5} или 10^{-6} M и собирали шесть двухминутных фракций. Затем перфузионную среду заменяли на раствор Кребса — Рингера без дилепта и собирали шесть двухминутных фракций со спонтанным высвобождением глутамата. На последнем этапе в растворе Кребса — Рингера одновременно увеличивали концентрацию KCl до 45 mM и добавляли пептид в концентрациях 10^{-5} или 10^{-6} M; собирали шесть двухминутных фракций. В каждую отобранную пробу с перфузатом добавляли 50 мкл 1 n HClO_4 в пропорции 1:10 от общего объема, замораживали и хранили при температуре -20 °C для последующего измерения концентрации глутамата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором (ВЭЖХ/ФД) [17].

Подвижной фазой служил 0,05 M натрийфосфатный буфер с 0,025 mM ЭДТА и 5 % ацетонитрила. К 25 мкл перфузата добавляли 25 мкл 0,01 мг/мл внутреннего стандарта L-гомосерина в 0,2 n NaOH и 10 мкл о-фталальдегид-сульфитного реактива в 0,1 M боратном буфере (pH 9,5) для дериватизации аминокислот. В качестве стандарта использовали раствор, содержащий глутамат в концентрации 0,2 мг/мл в 0,1 n HClO_4 . После 15 мин инкубации при температуре 37 °C 25 мкл смеси наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкм, $4,6 \times 250$ (объем петли 5 мкл) хроматографа Agilent 1100 (США). Концентрацию глутамата вычисляли при помощи программного обеспечения “Chemstation Agilent” (США); конечный результат выражали в нМ/мг ткани за 2 мин.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Vivotat с использованием непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm S. E. M.$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе результатов полученных исследований показано, что уровень калиевой стимуляции глутамата в контрольных пробах составил 360 % по отношению к спонтанному уровню. Кривая последовательного измерения уровня высвобождения глутамата показана на рисунке. Полученные данные в целом согласуются с результатами других исследований, выполненных в сходных условиях [11, 15].

Дилепт не оказывал влияния на уровень спонтанно высвобождения глутамата. Наряду с этим он существенно снижал K^+ -стимулированное высвобождение глутамата: до 232 % в концентрации 10^{-5} М ($p < 0,05$ в сравнении с уровнем стимулированного высвобождения в контрольных пробах) и до 296 % в концентрации 10^{-6} М (рисунок).

Как показано ранее, дилепт характеризуется своеобразным спектром нейротропной активности [3]. Его отличием от известных нейролептиков (как типичных, так и атипичных) является способность улучшать когнитивные функции. Известно, что нейролептики, по крайней мере фенотиазинового и бутирофенонового рядов, вызывают разобщение дыхательного фосфорилирования и в связи с этим ухудшают выживаемость нейронов в условиях гипоксии [4, 10]. Дилепт, напротив, проявил нейропротекторное действие. В экспериментах с фотоиндуцированной ишемией префронтальной коры показано, что препарат уменьшал площадь ишемического поражения мозга [6], а в опытах на нейрональной культуре повышал выживаемость нейронов, подвергнутых действию токсических концентраций глутамата [5]. Выявленный в настоящей работе эффект снижения препаратом высвобождения глутамата может составить один из механизмов нейропротекторного действия дилепта и обусловить его способность ослаблять процессы нейродегенерации.

ВЫВОДЫ

1. Воспроизведен эффект вызванной калием стимуляции высвобождения глутамата срезами коры головного мозга крыс.

2. Показано, что оригинальный дипептидный миметик нейротензина дилепт вызывает дозо-зависимое снижение стимулированного высвобождения глутамата.

Авторы выражают искреннюю благодарность К. С. Раевскому, М. В. Угрюмову и А. Я. Сапроновой за предоставленную возможность и методическую по-

мощь в проведении экспериментов, а также ценные советы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-48325 а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Бондаренко, *Бюл. exper. биол.*, **11**, 506 – 509 (1990).
2. Т. А. Гудашева, Н. И. Зайцева, *Хим.-фарм. ж.*, **39**(5), 6 – 11, (2005).
3. Р. У. Островская, М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых и др., *Exper. и клин. фармакол.*, **68**(1), 3 – 6 (2005).
4. Н. П. Подосиновичова, В. В. Петров, А. Б. Космачев и др., *Exper. и клин. фармакол.*, **66**(5), 53 – 55 (2003).
5. М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых, Н. А. Бондаренко и др., *Бюл. exper. биол.*, **136**(11), 527 – 531 (2003).
6. М. В. Ретюнская, Ф. М. Шакова, *Основные общепатологические и клинические закономерности развития критических, терминальных и постреанимационных состояний. Принципы их коррекции.*, Москва (2003) сс. 128 – 132.
7. М. В. Ретюнская, *Автореф канд. биол. наук*, Москва (2004).
8. М. В. Ретюнская, В. С. Кудрин, П. М. Клодт и др., *Exper. и клин. фармакол.*, **68**(6), 15 – 18 (2005).
9. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева и др., Пат. № 2091390, Россия (1998).
10. S. Balijepalli, R. S. Kenchappa, M. R. Boyd, and V. Ravindranath, *Neurochem Int*, **38**(5), 425 – 435 (2001).
11. J. A. Davies, L. Johns, and F. A. Jones, *Pharmacopsychiatry*, **36**(1), 84 – 88 (2003).
12. S. I. Deutsch, R. B. Rosse, and B. L. Schwartz, *Clin neuropharmacol*, **24**(1), 43 – 49 (2001).
13. Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, Н. И. Зайцева, et al., *J. Med. Chem.*, **41**, 284 – 290 (1998).
14. R. M. Meredith, B. J. McCabe, et al., *Neuroscience*, **126**, 249 – 256 (2004).
15. F. Moroni, R. Corradetti, F. Casamenti, et al., *Raven press*, New-York (1981), 157 – 160.
16. C. B. Nemeroff, *Biol. Psychiatry*, **15**, 283 – 302 (1980).
17. S. J. Pearson, C. Czudek, and K. Mercer, *J. Neural Transm.*, **86**, 151 – 157 (1991).
18. М. В. Угрюмов, В. И. Мельникова, В. С. Кудрин, and К. С. Раевский, *Neuroscience*, **124**, 629 – 635 (2004).

Поступила 22.01.07

DECREASE IN THE GLUTAMATE RELEASE MAY CONTRIBUTE TO THE NEUROPROTECTIVE ACTION OF THE NOVEL NEUROLEPTIC DRUG DILEPT

K. S. Us, P. M. Klodt, V. S. Kudrin, N. V. Arhipenko, T. A. Gudasheva, and R. U. Ostrovskaya

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

Dilept (GZR-123, N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine methyl ester), designed and synthesized at the Zakusov Institute of Pharmacology, was chosen as one of the most effective compounds from a series of N-acylprolyltyrosine derivatives having common pharmacophores with β -turn of neurotensin (NT₈₋₁₃) and repeating the structure of a nonpeptide prototype, the atypical neuroleptic sulphiride. The aim of this study was to evaluate the effect of dilept on the level of spontaneous and K^+ -stimulated release of glutamate. The experiments were performed *in vitro* on the cortical brain slices of male Wistar rats. Dilept used in concentrations 10^{-5} and 10^{-6} mole/liter did not affect the spontaneous release of glutamate though markedly decreased the K^+ -stimulated release. A decrease in the glutamate release under the action of the neuroleptic could contribute to the neuroprotective activity of dilept.