

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОЛИНСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДАЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ РЕТРОГРАДНОЙ АМНЕЗИИ

Г. А. Назарова², Н. Н. Золотов², Н. А. Крупина¹, В. А. Крайнева¹,
Т. Л. Гарибова¹, Т. А. Воронина¹

Исследованы изменения активности пролинспецифических пептидаз во фронтальной коре и гиппокампе при экспериментальной ретроградной амнезии. У одной группы крыс амнезию вызывали однократным введением м-холиноблокатора скополамина, у другой — максимальным электрошоковым воздействием. Амнезирующий эффект оценивали в методике условного рефлекса пассивного избегания. При использованных моделях амнезии активность пролилэндопептидазы достоверно возрастает как в коре, так и в гиппокампе. Активность дипептидилпептидазы IV снижается в коре и остается неизменной в гиппокампе. Пирацетам снижает активность пролилэндопептидазы во фронтальной коре и гиппокампе и не влияет на активность дипептидилпептидазы IV.

Ключевые слова: амнезия, скополамин, максимальный электрошок, пирацетам, пролинспецифические пептидазы, пролилэндопептидаза, дипептидилпептидаза IV

ВВЕДЕНИЕ

Амнезия классифицируется как самостоятельное заболевание (класс R41 согласно МКБ-10), а также как симптом, сопровождающий ряд тяжелых нервно-психических и соматических расстройств (нейродегенеративные заболевания, сосудистые нарушения, травмы, аддиктивные расстройства и др.). В настоящее время различают: ретроградную амнезию; антероградную амнезию и другие амнезии [5]. Проблема изучения патогенеза амнезии и поиска путей ее патогенетической коррекции на сегодняшний день стоит остро, что обусловлено широкой распространенностью этого вида нарушения памяти. По статистике ВОЗ от 5 до 20 % неврологических заболеваний сопровождается амнезией [7].

В соответствии с современными представлениями мнестическая деятельность опосредуется рядом механизмов, в том числе и нейромедиаторных, в число которых входят и нейромодуляторы [2, 9]. Большое внимание уделяется изучению пептидных механизмов в процессах обучения и памяти.

Есть основания считать, что АКТГ и вазопрессин либо их фрагменты, образующиеся в организме в результате расщепления гормонов, не только стимулируют запоминание при введении извне, но и являются эндогенными регуляторами процессов памяти [2, 9].

В регуляции мнестических функций, кроме упомянутых выше вазопрессина и АКТГ, принимают участие ангиотензины, вещество Р, тиролиберин, нейропептид Y и другие [9].

Активность пептидов в организме контролируется различными пептидазами. Даже незначительные нарушения функции этих ферментов могут лежать в основе ряда

патологических состояний ЦНС, к которым относятся и заболевания, связанные с нарушением памяти [8].

Вызывая образование, модификацию и инактивацию нейропептидов, пептидазы контролируют уровень пептидных биорегуляторов, от концентрации которых, по существу, зависит и функция памяти.

В этом плане особый интерес представляют так называемые пролинспецифические пептидазы — ПЭП и ДП-IV, для которых многие нейропептиды, участие которых в механизмах памяти показано, являются субстратами [1, 14, 15].

Известно, что альдегидные ингибиторы ПЭП обладают антиамнестической активностью на моделях скополаминовой амнезии [4, 11].

Однако данных об изменениях активности ПЭП и других пролинспецифических пептидаз, которые могут принимать участие во взаиморегуляции пептидергических и моноаминергических систем мозга, в доступной литературе нет.

Все изложенное указывает на актуальность изучения роли пролинспецифических пептидаз в патогенезе амнезии и при поиске подходов к созданию новых фармакологических средств на основе их ингибиторов.

Целью настоящего исследования явилось изучение активности ПЭП и ДП-IV в структурах мозга крысы при экспериментальной ретроградной амнезии, вызванной однократным введением скополамина и воздействием максимального электрошока, и после фармакологической коррекции ноотропом пирацетамом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 40 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г.

Моделирование ретроградной амнезии. Ретроградную амнезию у крыс вызывали максимальным электрошоковым воздействием (МЭШ) или введением м-холиноблокатора скополамина. Оценку уровня ам-

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва.

² ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

незии проводили в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [3]. Через 30 мин после последнего тестирования животных контрольных и опытных групп декапитировали. Из головного мозга были выделены следующие структуры: фронтальная кора и гиппокамп, в которых определяли активность ПЭП и ДП-IV.

Влияние пирacetам на экспериментальную ретроградную амнезию. Пирacetам (ноотропил, "Polfa", Польша) в дозе 300 мг/кг вводили внутривентриально за 1 ч до эксперимента.

Биохимические методы

Определение активности ферментов мозга. За единицу активности принимали количество фермента, освобождающее 1 мкмоль продукта за 1 мин инкубации. Удельную активность выражали числом миллиединиц (мЕ) на 1 мг белка ферментного препарата.

Флуорометрический метод определения активности ПЭП и ДП-IV. Активность ПЭП и ДП-IV в тканях выделенных структур мозга определяли по гидролизу синтетических флуорогенных субстратов 4-метил-кумарин-7-амида карбобензоксипролина и 4-метил-кумарин-7-амида глицилпролина соответственно [4].

Определение ингибирования пролилэндопептидазы пирacetамом. Ингибиторную активность (K_i) для пирacetам по отношению к ПЭП определяли по методу Иди-Хофсти [15].

Для статистической обработки результатов использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и параметрический *t*-критерий Стьюдента (программа Statistica 6.0) при принятом уровне значимости 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Очищенная хроматографическими методами ПЭП из мозга крыс ингибировалась пирacetамом со значением $K_i = 1,120 \pm 0,005$ мМ.

У крыс контрольной группы после обучения УРПИ латентное время захода в темную камеру составляло $109,6 \pm 12,7$ с. Воздействие МЭШ на крыс опытной группы сразу после обучения УРПИ приводило к достоверному ($p < 0,05$) снижению латентного периода захода в темную камеру через 24 ч после обучения до $36,2 \pm 15,0$ с, то есть вызывало амнезию навыка. Активность ПЭП и ДП-IV во фронтальной коре и гиппокампе крыс при электрошоковой амнезии представлена в табл. 1.

Как видно из таблицы активность ПЭП была повышена как в коре (22 %), так и в гиппокампе (25 %), а активность ДП-IV достоверно снижалась в коре и оставалась без изменений в гиппокампе. При экспериментальной амнезии, вызванной МЭШ, пирacetам (300 мг/кг) снижал активность ПЭП во фронтальной коре и гиппокампе и не влиял на активность ДП-IV.

При моделировании ретроградной амнезии однократным введением скополамина у крыс контрольной группы после обучения УРПИ латентное время захода в темную камеру составляло $155 \pm 24,6$ с через 24 ч после обучения. У опытных крыс введение скополамина вызывало уменьшение латентного периода захода в темную камеру в 7 раз ($22,5 \pm 9,7$ с; $p < 0,05$) через 24 ч после обучения.

Результаты по измерению активности ферментов представлены в табл. 2, из которой видно, что введение скополамина приводит к увеличению активности ПЭП на 20 % во фронтальной коре и на 24 % в гиппокампе.

Введение скополамина на 32 % ($p < 0,01$) снижает активность ДП-IV во фронтальной коре и практически не изменяет в гиппокампе. Пирacetам, так же как и при амнезии, вызванной МЭШ, ингибировал ПЭП во фронтальной коре и гиппокампе и не влиял на активность ДП-IV.

Таким образом, из полученных нами результатов видно, что при экспериментальном моделировании ретроградной амнезии происходят не только изменения активности ПЭП, но и активности ДП-IV. Пирacetам проявляет антиамнестические свойства, снижая в мозге активность ПЭП, слабым неконкурентным ингибитором которой он является.

Полученные нами данные свидетельствуют о непосредственном участии ДП-IV в механизмах памяти. Ранее этому факту имелось только косвенное подтверждение, например, данные о том, что глюкагоноподобный пептид-1, вовлеченный в секрецию инсулина и являющийся субстратом ДП-IV, улучшает ассоциативную и пространственную память у животных [10].

Известно, что ДП-IV принимает участие в регуляции различных физиологических процессов путем отщепления дипептидов от N-конца регуляторных пептидов, включая многие нейропептиды и пептидные гормоны [12].

В последнее время появились данные о том, что ПЭП и ДП-IV могут влиять на функции ЦНС и моду-

Таблица 1. Активность ПЭП и ДП-IV (в мМ) в структурах головного мозга в контроле, после воздействия максимального электрошока и коррекции пирacetамом ($M \pm m$)

Фермент	Фронтальная кора			Гиппокамп		
	Контроль	МЭШ	Пирacetам + МЭШ	Контроль	МЭШ	Пирacetам + МЭШ
ПЭП	$0,442 \pm 0,025$	$0,565 \pm 0,022^*$	$0,468 \pm 0,022$	$0,430 \pm 0,020$	$0,572 \pm 0,029^*$	$0,478 \pm 0,026$
ДП-IV	$0,099 \pm 0,005$	$0,068 \pm 0,003^*$	$0,79 \pm 0,007$	$0,103 \pm 0,010$	$0,097 \pm 0,006$	$0,092 \pm 0,007$

* — $p < 0,01$ по сравнению с контролем в соответствующей структуре мозга ($n = 10$).

Таблица 2. Активность ПЭП и ДП-IV (в мЕ) в структурах головного мозга в контроле, после введения скополамина и коррекции пирацетамом ($M \pm m$)

Фермент	Фронтальная кора			Гиппокамп		
	Контроль	Скополамин	Пирацетам + скополамин	Контроль	Скополамин	Пирацетам + скополамин
ПЭП	0,429 ± 0,025	0,535 ± 0,020*	0,449 ± 0,021	0,395 ± 0,026	0,517 ± 0,024*	0,405 ± 0,026
ДП-IV	0,110 ± 0,010	0,075 ± 0,003*	0,100 ± 0,009	0,107 ± 0,006	0,095 ± 0,004	0,115 ± 0,008

* — $p < 0,01$ по сравнению с контролем в соответствующей структуре мозга ($n = 10$).

лирование мнестическую деятельность также путем воздействия на механизм трансдукции. Так, снижение активности ПЭП усиливает опосредованную субстанцией Р стимуляцию вторичного мессенджера 1,4,5-инозитолтрифосфата [13], а ДП-IV, связываясь с аденозиндезаминазой, регулирует образование инозитола из аденозина [6]. Повышение активности ПЭП при амнезии может приводить к снижению концентрации одного из ее природных субстратов, например, вазопрессина, считающегося основным пептидом памяти [9]. Наблюдаемое нами снижение активности ДП-IV во фронтальной коре при экспериментальной амнезии, возможно, связано со снижением концентрации ее природных субстратов тиролиберина, вещества Р и нейропептида Y, являющихся общими для ДП-IV и ПЭП.

Полученные данные об изменениях активности пролинспецифических пептидаз при экспериментальной ретроградной амнезии могут быть использованы при создании на основе их ингибиторов средств коррекции нарушений памяти.

ВЫВОДЫ

1. При амнезии, вызванной максимальным электрошоком, активность пролилэндопептидазы возрастает в коре и гиппокампе. Активность дипептидилпептидазы IV снижается в коре и остается неизменной в гиппокампе.

2. При амнезии, вызванной однократным введением скополамина, активность пролилэндопептидазы возрастает в коре и гиппокампе, а активность дипептидилпептидазы IV снижается в коре и остается неизменной в гиппокампе.

3. Пирацетам при моделировании ретроградной амнезии, вызванной скополамином или максимальным электрошоком, снижает активность пролилэндопептидазы во фронтальной коре и гиппокампе и не влияет на активность дипептидилпептидазы IV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. П. Алексеев, Н. Н. Золотов, В. Ф. Позднев, В. Н. Орехович, Докл. АН СССР, **245**(4), 1001 – 1005 (1979).
2. Биохимия мозга, И. П. Ашмарин, П. В. Стукалов, Н. Д. Ещенко и др. (ред.), Изд-во СПб. ун-та, СПб. (1999).
3. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва (2000), сс. 153 – 158.
4. Н. Н. Золотов, О. А. Кутепова, В. Ф. Позднев и др., Докл. АН СССР, **317**(1), 234 – 237 (1991).
5. Международная статистическая классификация болезней, Медицина, Москва (2003).
6. В. Aertgeerts, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **575**, 27 – 32 (2006).
7. *Bulletin of the World Health Organization*, WHO, **85** (2007).
8. K. R. Erickson, *West J. Med.*, **152**(2), 159 – 166 (1990).
9. G. L. Kovacs, *J. Int. Fed. Clin. Chem.*, **15**(3), 1 – 6 (2004).
10. J. J. Meier, B. Gallwitz, and M. A. Nauck, *Biodrugs*, **17**, 93 – 102 (2003).
11. T. Nakajima, Y. Ono, A. Kato, J. Maeda, and T. Ohe, *Neuroscience Letters*, **141**, 156 – 160 (1992).
12. A. Sedo and R. Malik, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1550**, 107 – 116 (2001).
13. I. Schultz, B. Gerhartz, A. Neubauer, et al., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5813 – 5820 (2002).
14. G. Vanhoof, F. Goosens, I. De Meester, et al., *The FASEB Journal*, **9**, 736 – 744 (1995).
15. T. Yoshimoto, M. Fischl, R. C. Orłowski, and R. Walter, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3708 – 3716 (1978).

Поступила 19.06.07

CHANGES IN PROLINE-SPECIFIC PEPTIDASE ACTIVITY IN EXPERIMENTAL MODEL OF RETROGRADE AMNESIA

G. A. Nazarova, N. N. Zolotov, N. A. Krupina, V. A. Kraineva, T. L. Garibova, and T. A. Voronina

¹ Zakuov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul.8, Moscow, 125315 Russia;

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

Changes in proline-specific peptidase activity in the frontal cortex and hippocampus were studied using the experimental model of retrograde amnesia in rats. In one group, the amnesia was produced by a single injection of M-cholinergic antagonist scopolamine and the other group received the maximal electroconvulsive stimulation (MES). The amnesic effect was evaluated in passive avoidance test. In the amnesia models under consideration, the activity of prolylendopeptidase was significantly increased in both frontal cortex and hippocampus. The activity of dipeptidyl peptidase IV was significantly decreased in the cortex, whereas in the hippocampus it remained unchanged. Pyracetam inhibited prolylendopeptidase in the cortex and hippocampus, whereas dipeptidyl peptidase IV activity remained unchanged.