

БИОХИМИЯ

УДК 61:577.1

АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ E В НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ НООТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Л.В. Алексеева, С.С. Гамзин

Тверская государственная сельскохозяйственная академия, Тверь

Исследована активность карбоксипептидазы E в отделах мозга и надпочечниках крыс после однократного действия пираретама, фенотропила, ноопепта через 0,5 ч, 4 ч, 24 ч и 72 ч после инъекции. Выявлены общие тенденции изменений активности карбоксипептидазы E в условиях краткосрочного режима введения применяемых ноотропных препаратов: в гипофизе максимальная активность наблюдалась через 0,5 ч после инъекции, в продолговатом мозге и надпочечниках – через 24 ч после инъекции. Активность изученного фермента у крыс на фоне введения изучаемых ноотропных препаратов может служить одним из маркерных тестов для выявления возможного нейрорхимического механизма их действия.

***Ключевые слова:** активность карбоксипептидазы E, нервная ткань крыс, пираретам, фенотропил, ноопепт, однократное действие.*

Введение. Рост числа нейродегенеративных и цереброваскулярных заболеваний населения развитых стран обуславливает актуальность изучения фармакотерапии нарушений когнитивной деятельности. Терапевтическая коррекция подобных патологий включает в себя применение препаратов различных групп, одной из которых являются ноотропные лекарственные средства.

Ноотропы – большая группа препаратов, оказывающая нейропротекторное действие, обладающая низкой токсичностью, способных облегчать процессы запоминания и обучения, переключение между разными видами деятельности, улучшающие концентрацию внимания, анализ ситуации и принятия решений, усиливающих мотивацию (Воронина, 2000; Давыдова, 2001).

Изучение потенциальных механизмов действия ноотропов ведется с момента синтеза пираретама – первого препарата с ноотропным действием в 1963 г. Однако, несмотря на почти 40-летнюю историю исследования, окончательные механизмы действия ноотропов к настоящему времени до конца не выявлены. Среди них рассматриваются «мембранная гипотеза», вовлечение холинергической, ГАМКергической, пептидергической медиаторных систем (Семина и др., 2001; Winblad,

2005; Cooke, Bliss, 2006; Malykh, Sadaie, 2010). Имеются данные об участии ряда нейропептидов в организации когнитивных процессов (Коротков, 2003; Андреянова и др., 2007). Механизм реализации эффектов нейропептидов опирается на концепцию регуляторного континуума, характеризующегося наличием межпептидных взаимодействий, при которых эффект действия определенного пептида вызывает каскад изменений уровней других нейропептидов, так же обладающих модулирующим действием (Ашмарин, Каразеева, 1996). В процессинге нейропептидов непосредственное участие принимает карбоксипептидаза E, поэтому исследование ее активности позволяет глубже раскрыть механизмы реализации ноотропных эффектов при действии ноотропных препаратов.

Цель работы – исследовать активность карбоксипептидазы E в нервной ткани крыс после однократного действия пираретама, фенотропила и ноопепта.

Методика. Эксперимент выполнен на 96 самцах белых беспородных крыс возрастом 3 месяца и массой 250-300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария (температура 22-24°C, относительная влажность воздуха 40-50 %) с естественным световым режимом на сбалансированной диете при свободном доступе к воде, удовлетворяющей требованиям «Руководства по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» (Каркищенко, Грачев, 2010). Исследование выполнено в соответствии с Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), и требованиями «Правил лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н.

Для изучения однократного влияния ноотропных лекарственных средств на активность КПЕ пираретам вводили внутривентриально в дозе 300 мг/кг (Назарова и др., 2007), фенотропил в дозе 100 мг/кг (Белоусов, Мухина, 2005), ноопепт в дозе 10 мг/кг (Коваленко и др., 2002). Контрольные животные получали эквивалентный объем физраствора. Крыс выводили из эксперимента через 0,5, 4, 24 и 72 ч после инъекции путем декапитации. После декапитации извлекали гипофиз, четверохолмие, продолговатый мозг, гипоталамус, гиппокамп, амигдалу, стриатум и надпочечники. Ткани погружали в физиологический раствор, охлажденный до 3°C, после чего тщательно очищали их от оболочек и кровеносных сосудов. Активность карбоксипептидазы E определяли методом Supattarone et.al. (1984), белок определяли методом Лоури (Lowry, 1951). Активность КПЕ выражали в нмоль образовавшегося продукта реакции за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью следующих пакетов программ: Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США), Statistica 6,0 (StatSoft, Inc., США) и BioStat 2009 Professional. Достоверность различий между группами определяли с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента (при $p \leq 0,05$) для сравнения средних независимых выборок, с учетом предварительной проверки выборок на нормальность распределения. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p=0,05$ ($P=95\%$).

Результаты и обсуждение. Влияние однократного действия пирецетама показано на рис. 1. Установлено, что активность КПЕ в гипофизе повышалась в 1,3 раза через 0,5 ч после введения пирецетама по сравнению с контрольной группой животных. Через 4 ч активность снизилась в 2,4 раза по сравнению с контролем. По прошествии 24 ч после введения препарата активность исследуемого фермента в гипофизе повысилась в 1,2 раза, а через 72 ч снизилась в 1,49 раза по сравнению с контрольной группой самцов. В четверохолмии активность карбоксипептидазы Е снижалась в 1,4, 2,5 и 1,3 раза по сравнению с контрольной группой через 0,5, 24 и 72 ч соответственно. Через 4 ч после введения пирецетама достоверных отличий активности КПЕ в четверохолмии по сравнению с контролем не наблюдалось.

В продолговатом мозге наблюдалось снижение активности КПЕ в 1,9, 1,2 и 2,5 раза по сравнению с контрольной группой животных через 0,5, 4 и 24 ч соответственно. По истечении 72 ч активность исследуемого фермента в продолговатом мозге была выше в 1,11 раз по сравнению с контрольной группой животных. Активность карбоксипептидазы Е в гипоталамусе снижалась в 2,2 и 1,5 раза по сравнению с контрольной группой самцов через 0,5 и 24 ч соответственно. В гиппокампе активность исследуемого фермента снижалась в 2,2, 1,9 и 1,1 раза через 0,5, 24 и 72 ч соответственно по сравнению с контрольной группой животных.

Активность КПЕ в амигдале была снижена в 2,4, 1,4 раза через 0,5 и 4 ч, а по истечении 24 ч возростала в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой. В стриатуме активность КПЕ была снижена в 3,9, 1,4, 1,7 и 1,7 раза по сравнению с контролем через 0,5, 4, 24 и 72 ч соответственно. В надпочечниках активность исследуемого фермента оказалась сниженной в 3,3, 2,1, 1,3 и 1,5 раза через 0,5, 4, 24 и 72 ч соответственно по сравнению с контрольной группой животных.

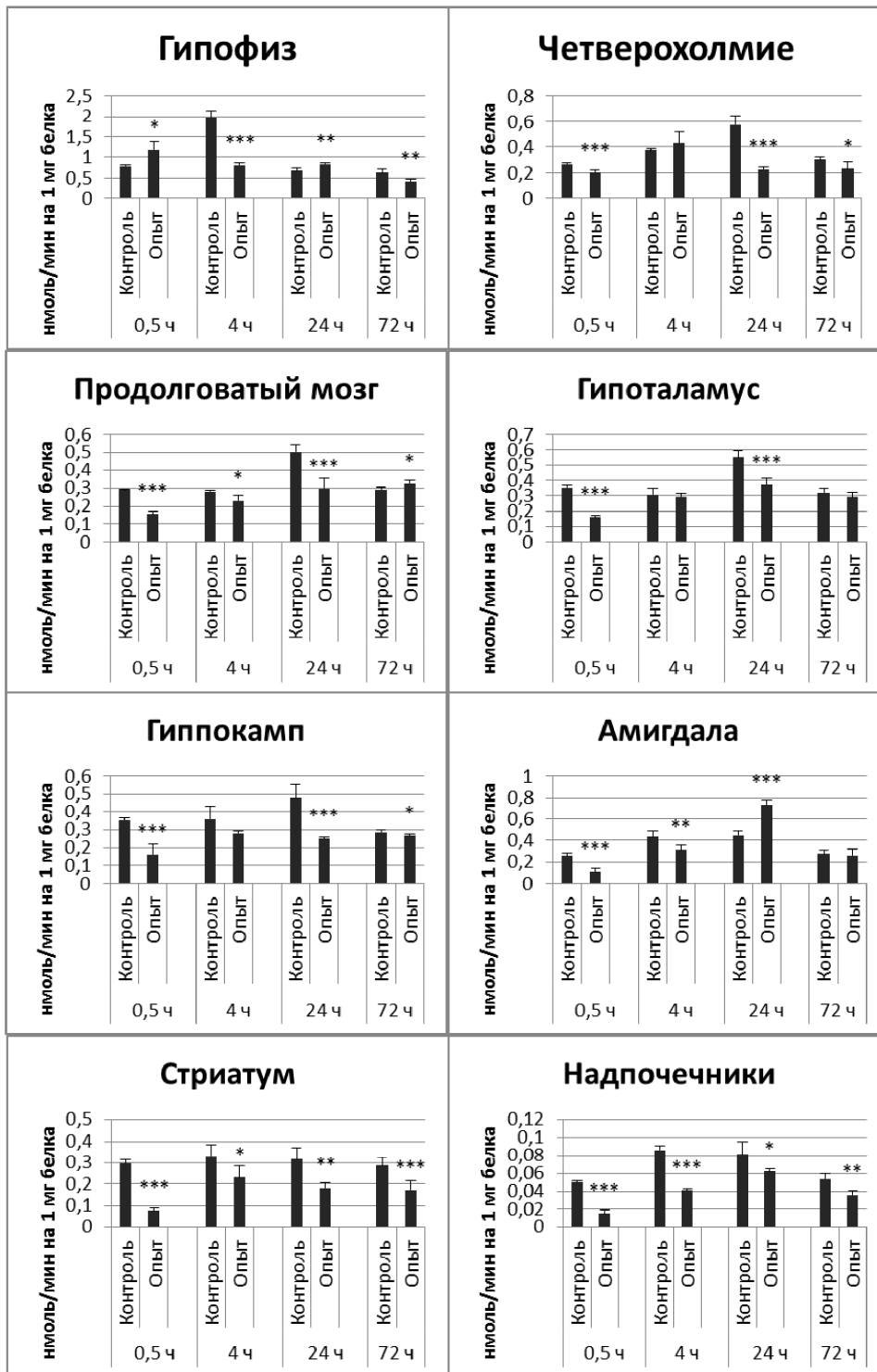


Рис. 1. Активность КПЕ при действии парацетама в нервной ткани крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ относительно контроля)

После однократного введения фенотропила (рис. 2) по сравнению с контрольной группой животных в гипофизе обнаружено повышение активности карбоксипептидазы E в 1,6 раза через 0,5 ч и снижение в 2,5, 1,2 раза через 4 и 24 ч соответственно. В четверохолмии по сравнению с контролем выявлено снижение активности КПЕ через 0,5, 4, 24 и 72 ч в 2,1, 1,1, 1,2 и 1,3 раза соответственно. Продолговатый мозг на однократное введение фенотропила ответил снижением активности КПЕ в 1,9, 1,3 раза через 0,5, 24 ч соответственно и повышением активности исследуемого фермента через 72 ч в 1,1 раза по сравнению с контрольной группой животных. В гипоталамусе выявлено снижение активности КПЕ в 2,5 и 1,5 раза через 0,5 и 24 ч, а так же повышение активности карбоксипептидазы E через 4 часа в 1,8 раза по сравнению с контролем. В гиппокампе обнаружено снижение активности КПЕ после однократного действия фенотропила через 0,5 и 24 ч в 4,9 и 1,8 раза соответственно по сравнению с контрольной группой животных.

Активность карбоксипептидазы E в амигдале после однократного действия фенотропила снижалась в 3,5, 1,9 раза через 0,5 и 24 ч и повышалась в 1,2 раза через 24 ч по сравнению с контрольной группой животных. В стриатуме активность КПЕ по сравнению с контролем была снижена в 2,7, 1,4 и 1,4 раза через 0,5, 4, и 72 ч соответственно. После однократного действия фенотропила активность карбоксипептидазы E в надпочечниках снижалась в 2,6 раза через 0,5 ч и повышалась в 1,3 раза через 24 ч по сравнению с контрольной группой животных.

Активность карбоксипептидазы E после однократного действия ноопепта (рис. 3) повышалась в 1,3 раза через 0,5 ч, снижалась через 4 ч в 3,3 раза по отношению к контрольной группе животных. В четверохолмии активность КПЕ была повышена в 3,7 и 1,6 раза через 0,5 и 4 ч соответственно по отношению к контрольной группе самцов. В продолговатом мозге активность КПЕ снижалась в 1,4 и 1,3 раза через 0,5 и 25 ч соответственно после введения ноопепта по сравнению с контрольной группой. Гипоталамус на введение препарата ответил снижением активности карбоксипептидазы E в 2,1 и 1,4 раза через 0,5 и 24 ч соответственно по сравнению с контрольной группой животных. В гиппокампе активность рассматриваемого фермента оказалась сниженной по сравнению с контрольной группой животных в 1,4 раза через 0,5 и 24 ч.

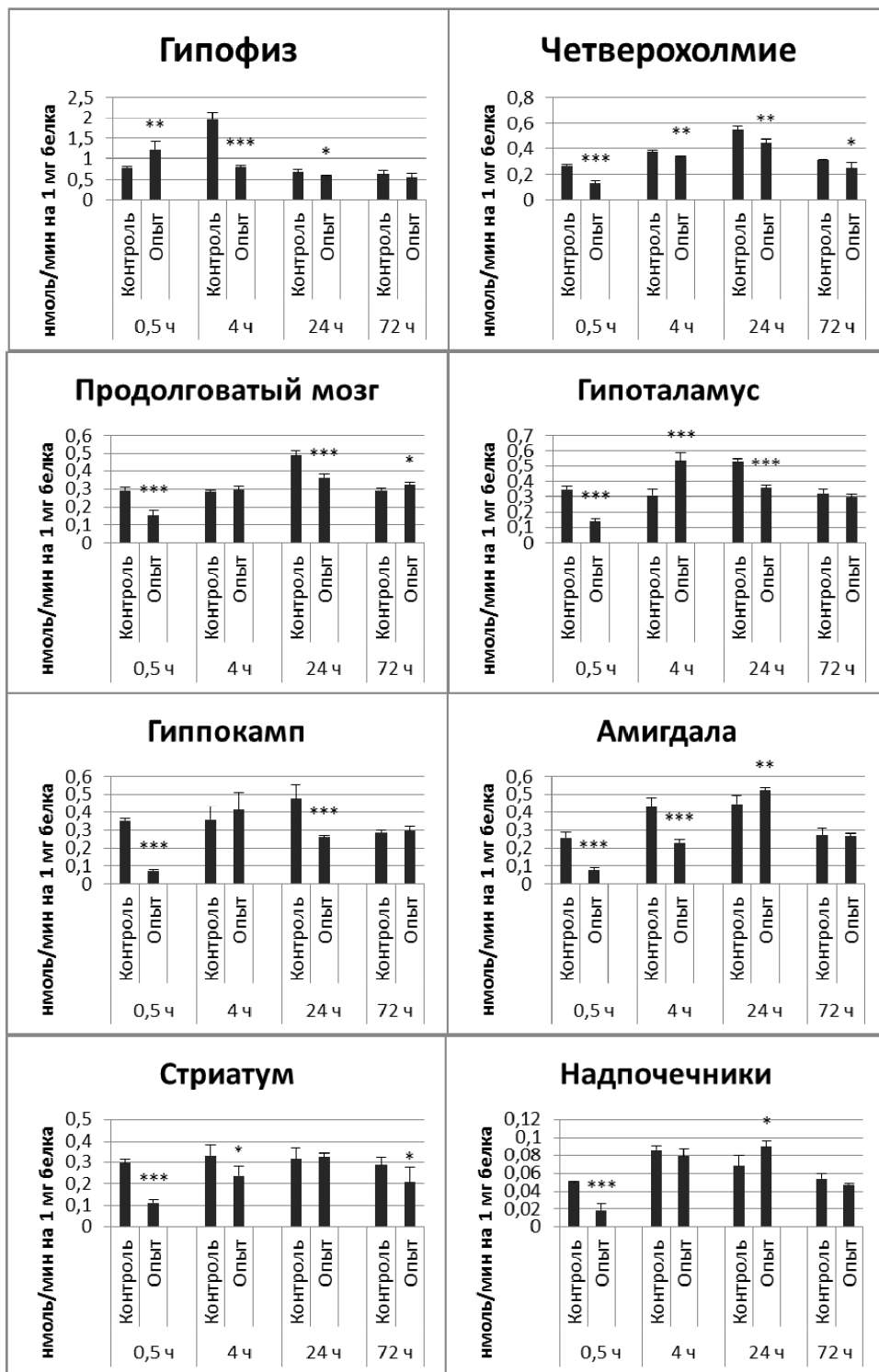


Рис. 2. Активность КПЕ при действии фенотропила в нервной ткани крыс (нмоль/мин на 1 мг белка, образованвшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$;
* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ относительно контроля)

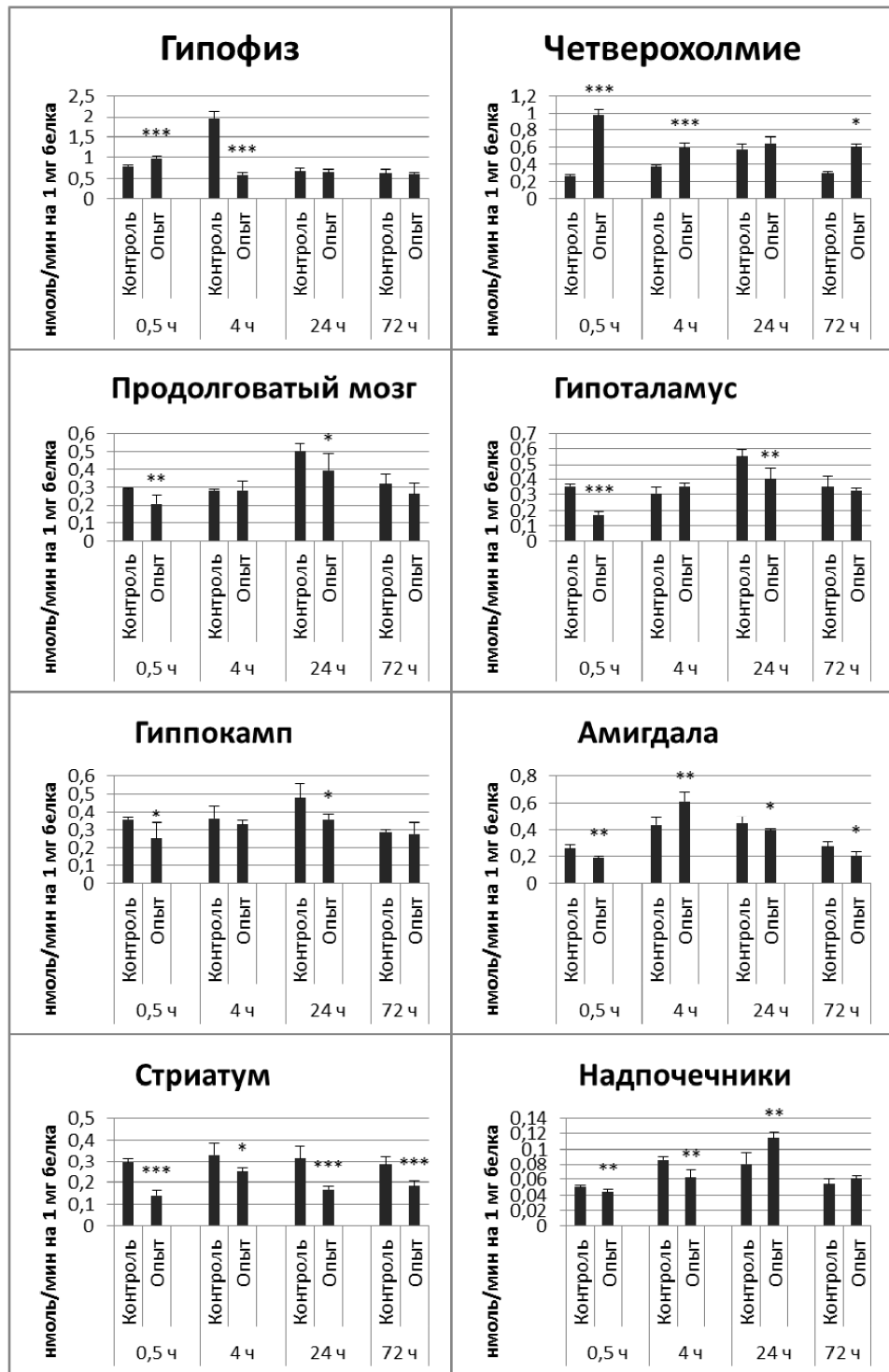


Рис. 3. Активность КПЕ при действии ноопепта в нервной ткани крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ относительно контроля)

Активность КПЕ в амигдале после однократного введения ноопепта снижалась в 1,4, 1,1 и 1,3 раза через 0,5, 24 и 72 ч соответственно и была повышена в 1,4 раза через 4 ч по сравнению с контрольной группой животных. В стриатуме однократное введение препарата вызывало снижение активности КПЕ в 2,1, 1,3, 1,9, 1,6 раза через 0,5, 4, 24 и 72 ч соответственно по сравнению с контрольной группой животных. Надпочечники на однократное введение ноопепта ответили снижением активности КПЕ в 1,1, 1,4 раза через 0,5, 4 ч соответственно и повышением активности карбоксипептидазы Е в 1,4 раза через 24 ч по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, в проведенных исследованиях показано, что активность изученного фермента у крыс на фоне введения изучаемых ноотропных препаратов может служить одним из маркерных тестов для выявления возможного нейрохимического механизма их действия.

Выводы. 1. Максимальная активность карбоксипептидазы Е в нервной ткани крыс после однократного действия исследуемых ноотропных препаратов наблюдалась в гипофизе через 0,5 ч после инъекции: при введении пираретама и ноопепта повышалась в 1,3 раза, по сравнению с контрольной группой животных; фенотропила – в 1,6 раза ($p < 0,05$).

2. Активность карбоксипептидазы Е в надпочечниках крыс после однократного действия исследуемых ноотропных препаратов, по сравнению с контрольной группой животных, наиболее снижалась в надпочечниках через 0,5 ч после инъекции: при введении пираретама – в 3,3 раза, фенотропила – в 2,6 раза, ноопепта – 1,1 раза ($p < 0,05$).

3. Сравнительный анализ изменений активности карбоксипептидазы Е в условиях краткосрочного режима введения применяемых ноотропных препаратов (пираретама, фенотропила, ноопепта) позволил выявить и общие тенденции: в гипофизе максимальная активность наблюдалась через 0,5 ч после инъекции, в продолговатом мозге и надпочечниках – через 24 ч после инъекции.

Список литературы

- Андреянова Е.К., Бичева Е.А., Кондратенкова К.М., Кожушина К.М., Кошарная Р.С., Кулакова И.А., Мосяков А.С., Мишкина А.А., Подгорная О.А., Тимофеева М.В.* 2007. Феномен памяти // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. Т. 6, вып. 4. Режим доступа: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/N-16-tml/debut/debut.htm>
- Ашмарин И.П., Каразеева Е.П.* 1996. Нейропептиды в кн. «Нейрохимия» / под ред. И.П. Ашмарина, П.В. Стукалова. М.: Изд-во института Биомедицинской химии РАМН. С. 296-333.

- Белоусов Ю.Б., Мухина М.А.* 2005. Фенотропил – ноотропный препарат нового поколения// *Качественная клиническая практика.* № 3. С. 1-9.
- Воронина Т.А.* 2000. Гипоксия и память. Особенности эффектов и применения ноотропных препаратов// *Вестник Российской АМН.* № 9. С. 27-34.
- Давыдова И.А.* 2001. Клинико-фармакологические закономерности терапевтического действия препаратов с ноотропными свойствами: дис. ... канд. мед. наук. М. 167 с.
- Каркищенко Н.Н., Грачев С.В.* (ред.). 2010. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях М.: Профиль. 358 с.
- Коваленко Л.П., Смольникова Н.М., Алексеева С.В., Немова Е.П., Сорокина А.В., Мирамедова М.Г., Курапова С.П., Сидорина Е.И., Кулакова А.В., Даугель-Дауге Н.О.* 2002. Доклиническое изучение токсичности ноопепта// *Экспериментальная и клиническая фармакология.* Т. 65. № 1. С. 62-64.
- Коротков С.А.* 2003. Экспериментальное изучение фармакокинетики и биотрансформации нового дипептидного ноотропа ноопепата: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М. 26 с.
- Назарова Г.А., Золотов Н.Н., Крупина Н.А., Крайнева Н.А., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А.* 2007. Изменение активности пролинспецифических пептидаз при экспериментальном моделировании ретроградной амнезии // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* Т. 70. № 6. С. 6-8.
- Семина И.Г., Семина И.И., Азанчеев Н.М., Шиловская Е.В., Тарасова Р.И., Павлов В.А., Ильясов А.В., Федотов В.Д.* 2001. К вопросу о мембранных механизмах действия ноотропных препаратов // *Биологические мембраны.* Т. 18. № 5. С. 363-369.
- Cooke S.F., Bliss T.V.* 2006. Plasticity in the human central nervous system // *Brain.* Vol. 129. P. 1659-1673.
- Lowry O.H.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrought, A.G. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* Vol. 193. № 1. P. 265-275.
- Malykh A.G., Sadaie R.M.* 2010. Piracetam and piracetam-like drugs. From basic science to novel clinical applications to CNS disorders // *Drugs.* Vol. 70(3). P. 287-312.
- Supattapone S., Fricker L.D., Snyder S.H.* 1984. Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, "enkephalin convertase" // *Neurochem.* Vol. 42. № 4. P. 1017-1023.
- Winblad B.* 2005. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses // *CNS Drug Reviews.* Vol. 11. № 2. P. 169-182.

CARBOXYPEPTIDASE E ACTIVITY IN THE NERVE TISSUE OF RATS AFTER THE SINGLE ADMINISTRATION OF NOOTROPS

L.V. Alekseeva, S.S. Gamzin

Tver State Agricultural Academy, Tver

We studied the activity of carboxypeptidase E in the brain and adrenal glands of rats after a single administration of piracetam, phenotropil and noopept in 0,5 hours, 4 hours, 24 hours and 72 hrs after injection. General trends of the activity of carboxypeptidase E were revealed. The highest activity of the enzyme in pituitary gland was recorded in 0.5 hrs after injection; medulla and adrenal glands have responded by the highest activity of the enzyme in 24 hrs after injection. The activity of the enzyme under the administration of the nootropics can serve as one of the marking tests of their possible neurochemical influence.

Keywords: *activity of carboxypeptidase E, nervous tissue of rats, piracetam, phenotropil, noopept, single action.*

Об авторах:

АЛЕКСЕЕВА Людмила Владимировна – доктор биологических наук, профессор кафедры биологии животных, зоотехнии и основ ветеринарии, ФГБОУ ВО «Тверская государственная сельскохозяйственная академия», 170904, Тверь, ул. Маршала Василевского, д. 7, e-mail: alekseeva_lud@mail.ru.

ГАМЗИН Сергей Сергеевич – ассистент кафедры биологии животных, зоотехнии и основ ветеринарии, ФГБОУ ВО «Тверская государственная сельскохозяйственная академия», 170904, Тверь, ул. Маршала Василевского, д. 7, e-mail: s.gamzin@lenta.ru.

Алексева Л.В. Активность карбоксипептидазы E в нервной ткани крыс после однократного введения ноотропных препаратов / Л.В. Алексева, С.С. Гамзин // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2016. № 2. С. 20-29.