

На правах рукописи



Кручинина Анастасия Дмитриевна

**ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОГО ЗАХВАТА  
МОНОАМИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА  
РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В ОТДЕЛАХ МОЗГА,  
НАДПОЧЕЧНИКАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС**

03.01.04 – биохимия

2 НОЯ 2016

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук



Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пензенский государственный университет»

**Научный руководитель:**

главный научный сотрудник НИИ  
ФиПИ, профессор кафедры «Общая  
биология и биохимия»  
ФГБОУ ВО ПГУ,  
доктор биологических наук, профессор

Генгин Михаил Трофимович

**Официальные оппоненты:**

главный научный сотрудник  
лаборатории психофармакологии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт фармакологии имени  
В.В. Закусова»,  
доктор биологических наук, профессор

Золотов Николай Николаевич

профессор Академии биологии и  
биотехнологии ФГАОУ ВО «Южный  
федеральный университет»,  
доктор биологических наук, профессор

Менджеричкий Александр Маркович

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится «21» декабря 2016 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте <http://dissovet.rudn.ru/>

Автореферат размещен на сайте <http://dissovet.rudn.ru/> 20 октября 2016 г.

Автореферат разослан «20» 10 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета Д 212.203.39 кандидат  
биологических наук, доцент



Гигани Ольга Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В связи с высокой распространенностью депрессии – психического расстройства, приводящего к нетрудоспособности взрослого населения (Смулевич А.Б., 2001) – и отсутствием эффективных способов лечения внимание исследователей направлено на изучение молекулярных основ данного заболевания. Исследования этиологии и молекулярно-биохимических механизмов развития патологии, а также функциональных изменений в работе нейромедиаторных систем при приёме антидепрессантов необходимы для успешного поиска методов диагностики и способов коррекции данного патологического состояния нервной системы (Белова Е.И., 2006), что является одной из актуальных задач нейрофармакологии.

**Степень разработанности темы.** Согласно моноаминовой теории, дефицит серотонина, норадреналина, дофамина в синаптической щели играет ключевую роль в патогенезе депрессии (Hirschfeld R.M., 2000; Hamon M. 2013), поэтому в медицинской практике для лечения заболевания широко используются препараты, повышающие уровень моноаминов и их метаболитов в мозге (Humble M., 2000; Раевский К.С. 2001; Lopez-Munoz F. 2009). При этом происходит нормализация нарушенных взаимоотношений нейротрансмиттеров, которые считаются ответственными за клинические проявления патологии (Castren E., 2005). Однако молекулярные механизмы антидепрессантного действия селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов до конца не изучены. В настоящее время предполагается мультифакторный генез депрессии и, в том числе, вовлечённость пептидергической системы (Смулевич А.Б., 2001).

Регуляторные пептиды как важнейшие компоненты пептидергической системы оказывают модулирующее воздействие на работу основных систем организма: нервной, иммунной и эндокринной (Гомазков О.А., 2002; Шатаева Л.К., 2003; Болдырев А.А., 2010). Известно, что активная форма регуляторных пептидов образуется из пропептидов в результате

ограниченного протеолиза (Локшина Л.А., 1987; Панченко Л.Ф., 2000; Гомазков О.А., 2002), в конечных стадиях которого принимают участие экзопептидазы, отщепляющие остатки аргинина и лизина с С-конца, в частности карбоксипептидаза Е, лизинкарбоксипептидаза, фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза, и пептидилдипептидаза А, отщепляющая С-концевой дипептид (Stahl S.M., 2008). По-видимому, изменение активности этих ферментов приводит к изменению уровня регуляторных пептидов, в процессинге которых они участвуют.

Через пептидергическую систему могут быть опосредованы большинство физиологических эффектов, возникающих при изменении функционирования моноаминовых систем (Болдырев А.А., 2010). В связи с этим широко обсуждается участие пептидергической системы в механизмах развития депрессии и реализации антидепрессантного эффекта применяемых в клинической практике лекарственных препаратов (Раевский К.С., 2001; Rotzinger S., 2010). В ряде исследований отмечено изменение уровня многих регуляторных пептидов при депрессивных расстройствах и антидепрессантной терапии (Kormos V., 2013). Однако исследования по изучению активности ферментов обмена регуляторных пептидов при этом не проводились.

Исходя из вышеизложенного весьма актуальным представляется изучение влияния селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов на активность ферментов обмена регуляторных пептидов и уровень биологически активных пептидов. Эти исследования позволят выявить возможные молекулярно-биохимические механизмы реализации антидепрессантного эффекта известных лекарственных препаратов, совершенствовать методы диагностики и лечения депрессивных расстройств, что представляет значительный научно-практический интерес.

**Цель исследования:** выяснение роли ферментов обмена регуляторных пептидов КПЕ (КФ 3.4.17.10), ПДПА (КФ 3.4.15.1), ФМСФ-КП, ЛКП (КФ 3.4.17.3) в механизмах взаимодействия моноаминовых и пептидергической

систем при введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать активность ферментов обмена регуляторных пептидов в нервной ткани и сыворотке крови крыс, содержание адренкортикотропного гормона и кортикостерона в сыворотке крови крыс при введении 0,2% Твин-80 в 0,9% NaCl.
2. Изучить влияние флуоксетина (10 мг/кг), ребоксетина (10 мг/кг), бупропиона (20 мг/кг) на активность ферментов обмена регуляторных пептидов в различных отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови.
3. Сравнить динамику изменений активности ферментов обмена регуляторных пептидов в различных отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови в зависимости от времени после введения различных селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов.
4. Изучить активность ферментов при действии аналогичных доз флуоксетина, ребоксетина и бупропиона *in vitro*.

**Научная новизна исследования.** Впервые изучено влияние селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов флуоксетина, ребоксетина, бупропиона на активность карбоксипептидазы E (КФ 3.4.17.10), пептидил-дипептидазы A (КФ 3.4.15.1), лизинкарбоксипептидазы (КФ 3.4.17.3) и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови крыс. Выявлена зависимость изменения активности изучаемых ферментов от типа селективного ингибитора обратного захвата моноаминов, отдела нервной системы и времени после введения. Впервые показано, что в реализацию антидепрессантного эффекта препаратов вовлекаются ферменты обмена регуляторных пептидов.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Полученные данные представляют интерес для понимания механизмов функционирования моноаминовых систем, их взаимодействия с

пептидергической системой и роли ферментов обмена регуляторных пептидов в реализации антидепрессантного эффекта применяемых в медицинской практике лекарственных средств. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых эффективных терапевтических препаратов для коррекции ряда психических заболеваний, таких как депрессия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, наркомания и алкоголизм, при которых нарушения происходят одновременно в комплексе нескольких регуляторных систем (Белова Е.И., 2006).

**Методы исследования.** При проведении исследования содержание АКТГ и кортикостерона в сыворотке крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа. Активность КПЕ и ФМСФ-КП определяли флуориметрическим методом (Fricker L.D., 1982; Генгин М.Т., 2002), активность ПДПА и ЛКП определяли нингидриновым методом (Соловьев В.Б., 2007). Содержание белка определяли методом Лоури (Lowry O.H., 1951). Анализ результатов проводили с использованием методов статистической обработки.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Ферменты обмена регуляторных пептидов – карбоксипептидаза E, фенилметилсульфонилфторидингибируемая-карбоксипептидаза, пептидил-дипептидаза A, лизинкарбоксипептидаза участвуют в механизмах регуляции взаимодействия моноаминовых и пептидергической нейромедиаторных систем.
2. Активность ферментов карбоксипептидазы E, фенилметилсульфонилфторидингибируемой-карбоксипептидазы, пептидил-дипептидазы A, лизинкарбоксипептидазы разнонаправлено изменяется на фоне интраперитонеального введения селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов.
3. Ферменты процессинга регуляторных пептидов принимают участие в реализации антидепрессантного действия флуоксетина, ребоксетина и бупропиона.

4. Активность ферментов обмена регуляторных пептидов служит показателем состояния пептидергической системы и изменяется при психических расстройствах, что диктует необходимость разработки фармакологических препаратов для лечения депрессии, влияющих на активность ферментов.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** Результаты работы были доложены на 18-й Международной Пущинской школе – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, апрель 2014), Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, июнь 2014), III Международной научной конференции «Актуальные проблемы биохимии и клеточной биологии» (Днепропетровск, сентябрь 2015).

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе в 4 изданиях, включенных в список, рекомендованный ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация представлена на 151 страницах машинописного текста, состоит из 6 разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, заключение. Работа иллюстрирована 34 рисунками, 3 таблицами. Список литературы содержит 288 наименований на русском и иностранных языках.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Общая схема исследования**

Исследования проведены на 126 самцах белых беспородных крыс массой 200-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к воде и пище, 12-часовом световом режиме.

Для определения активности КПЕ, ПДПА, ЛКП, ФМСФ-КП в работе использовали следующие группы животных:

1. интактная группа (n=6)

2. контрольная группа – внутрибрюшинное введение 0,2% Твин-80 в 0,9% NaCl. Декапитацию животных данной группы проводили через 12 ч (n=6), 24 ч (n=6), 72 ч (n=6) после однократной инъекции, через 24 ч (n=6) и 72 ч (n=6) после системного введения в течение 14 дней.
3. экспериментальная группа 1 – внутрибрюшинное введение флуоксетина (10 мг/кг) в 0,2 % Твин-80. Декапитацию животных данной группы проводили через 12 ч (n=6), 24 ч (n=6), 72 ч (n=6) после однократной инъекции, через 24 ч (n=6) и 72 ч (n=6) после системного введения в течение 14 дней.
4. экспериментальная группа 2 – внутрибрюшинное введение ребоксетина (10 мг/кг) в 0,2 % Твин-80. Декапитацию животных данной группы проводили через 12 ч (n=6), 24 ч (n=6), 72 ч (n=6) после однократной инъекции, через 24 ч (n=6) и 72 ч (n=6) после системного введения в течение 14 дней.
5. экспериментальная группа 3 – внутрибрюшинное введение бупропиона (20 мг/кг) в 0,2 % Твин-80. Декапитацию животных данной группы проводили через 12 ч (n=6), 24 ч (n=6), 72 ч (n=6) после однократной инъекции, через 24 ч (n=6) и 72 ч (n=6) после системного введения в течение 14 дней.

После декапитации крыс отбирали кровь животного, извлекали мозг и отделяли гипофиз, четверохолмие, продолговатый мозг, гипоталамус, амигдалу, гиппокамп, стриатум и надпочечники. Все операции проводили при +4<sup>0</sup>C. Образцы тканей взвешивали, гомогенизировали в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 5,6), содержащем 50 мМ хлорида натрия, в полученных гомогенатах определяли удельную активность исследуемых ферментов.

## 2. Метод определения активности карбоксипептидазы E

Активность КПЕ определяли флуориметрическим методом по гидролизу дансил-Phe-Ala-Arg при рН=5,6, в качестве ингибитора использовали ГЭМЯК (Fricker L.D., 1982; Генгин М.Т., 2002). Активность



фермента определяли по приросту флуоресценции в пробах, в присутствии и без ГЭМЯК, и выражали в нмоль дансил-Phe-Ala, образовавшегося за 1 минуту инкубации в пересчете на 1 мг белка. Здесь и далее содержание белка определяли методом Лоури (Lowry O.H., 1951).

### **3. Метод определения активности пептидил-дипептидазы А**

Активность пептидил-дипептидазы А определяли нингидриновым методом по гидролизу карбоксибензоил-Gly-Gly-Arg при pH=8,2, в качестве ингибитора использовали каптоприл (Соловьев В.Б., 2007). Активность пептидил-дипептидазы А определяли как разность в оптической плотности проб не содержащих и содержащих каптоприл и выражали в нмоль Gly-Arg, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

### **4. Метод определения активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы**

Активность ФМСФ-КП определяли флуориметрическим методом по гидролизу дансил-Phe-Ala-Arg при pH=5,6, в качестве ингибитора использовали ФМСФ (Генгин М.Т., 2002). Активность фермента определяли как разность прироста флуоресценции в пробах, в присутствии и без ФМСФ, и выражали в нмоль дансил-Phe-Ala, образовавшегося за 1 минуту инкубации в пересчете на 1 мг белка.

### **5. Метод определения активности лизинкарбоксипептидазы**

Активность ЛКП определяли нингидриновым методом по гидролизу гиппурил-Arg при pH=8,2, в присутствии  $Co^{2+}$  в качестве активатора (Соловьев В.Б., 2007). Активность лизинкарбоксипептидазы определяли как разность в оптической плотности проб содержащих и не содержащих  $Co^{2+}$  и выражали в нмоль Arg, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

### **6. Статистическая обработка результатов**

Проверка принадлежности распределения признаков к нормальному распределению производилась по критерию хи-квадрат (Лакин Г.Ф., 1990). Достоверность отличий между средними определяли с использованием t-

критерия Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990). Анализ отсроченного влияния препаратов на активность фермента проводили с использованием дисперсионного анализа. Принадлежность подгрупп животных к разным гомогенным группам оценивали с помощью метода Шеффе (Лакин Г.Ф., 1990). Сравнение значений каждой из подгрупп дисперсионного комплекса проводили по методике Ньюмена-Кейлса (Лакин Г.Ф., 1990).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние интраперитонеального введения 0,2 % Твин-80 на активность ферментов обмена регуляторных пептидов

Поскольку для приготовления растворов для инъекций исследуемые препараты суспендировали в 0,2% Твин-80 в 0,9% NaCl, было изучено его влияние на активность ферментов и полученные данные служили контролем. Исследование показало, что однократное внутрибрюшинное введение 0,2 % Твин-80 в 0,9% NaCl вызывало разнонаправленные изменения активности исследуемых ферментов в различных отделах мозга в зависимости от времени после введения. Отмечено повышение относительно интактной группы активности КПЕ (рисунок 1) в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе; ФМСФ-КП в надпочечниках. Активность пептидил-дипептидазы А (рисунок 2) снижается в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе и амигдале. Установлено также повышение активности пептидил-дипептидазы А и снижение лизинкарбоксипептидазы в сыворотке крови.

Следует отметить, что однократное внутрибрюшинное введение 0,2% Твин-80 в 0,9% NaCl, вероятно, является стрессовым воздействием, приводящим к адаптивным изменениям в организме животного, связанным с активацией стресс-протекторных систем (Вернигора А.Н., 1995). Отмеченное рядом авторов изменение уровня ряда регуляторных пептидов в структурах мозга и плазме крови при стрессе (Бао А.М., 2014) может быть результатом изменения активности ферментов их обмена, в частности КПЕ, ПДПА, ФМСФ-КП и ЛКП.

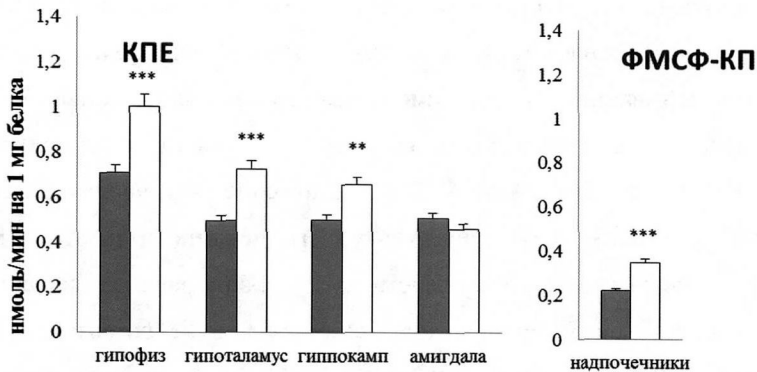


Рисунок 1. Активность карбоксипептидазы E и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы при однократном введении 0,2 % Твин-80 в 0,9% NaCl в отделах мозга и надпочечниках крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка,  $M \pm m$ ,  $n=4-6$ ). Здесь: ■ - интактная группа, □ - контрольная группа. \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$  относительно интактной группы.

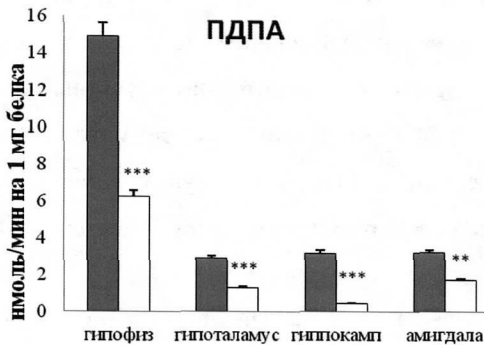


Рисунок 2. Активность пептидил-дипептидазы A при однократном введении 0,2 % Твин-80 в 0,9% NaCl в отделах мозга крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка,  $M \pm m$ ,  $n=4-6$ ). Здесь: ■ - интактная группа, □ - контрольная группа. \*\* -  $p<0,01$ , \*\*\* -  $p<0,001$  относительно интактной группы.

Поскольку исследуемые ферменты участвуют в процессинге регуляторных пептидов, данные изменения активности КПЕ и ФМСФ-КП могут приводить к усилению синтеза и секреции АКТГ и энкефалинов в гипофизе, окситоцина и аргинин-вазопрессина в гипоталамусе, энкефалинов в надпочечниках (Бао, 2014; Мело, 2014). Повышение активности КПЕ в гиппокампе может способствовать увеличению содержания вещества P, холецистокинина и нейротензина в этом отделе (Husum, 2001; Holsboer, 2003; Del Boca, 2012). Таким образом, полученные результаты согласуются с существующими представлениями о молекулярных механизмах

функционирования пептидергической системы в ответных реакциях на стрессовое воздействие, при котором главным эндокринным ответом является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, сопровождающаяся увеличением синтеза и секреции кортиколиберина, АКТГ, кортизола (Бао А.М., 2014). Снижение активности пептидил-дипептидазы А в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе и амигдале можно объяснить ингибирующим воздействием Мет-энкефалина, вещества Р, холецистокинина, окситоцина, аргинин-вазопрессина, нейротензина, уровень которых повышается при стрессе (Kotmos V., 2013). Повышение активности лизинкарбокисептидазы и пептидил-дипептидазы А в сыворотке крови может быть связано с усилением обмена кининов, уровень которых возрастает при стрессе (Яровая Г.А., 2001; Третьякевич З.Н., 2013).

Системное введение 0,2% Твин-80 в 0,9% NaCl в течение 14 дней приводит к увеличению активности КПЕ в гипофизе (через 24 ч), снижению активности пептидил-дипептидазы А относительно интактных животных в гипофизе, гиппокампе (через 24 ч), в гипоталамусе и амигдале (через 72) ч после последней инъекции. Отмечено увеличение активности лизинкарбокисептидазы в сыворотке крови через 72 ч после последней инъекции.

Системное введение 0,2% Твин-80 в 0,9% NaCl в течение 14 дней не вызывает столь выраженных изменений активности исследуемых ферментов и, по-видимому, является хроническим стрессовым воздействием, сопровождающимся адаптивными изменениями в организме животного. Отмечено повышение активности КПЕ в гипофизе, что может свидетельствовать об активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, наблюдаемой при стрессе. Снижение активности пептидил-дипептидазы А также может быть связано с ингибирующим воздействием на исследуемый фермент ряда регуляторных пептидов. Увеличение активности лизинкарбокисептидазы может быть связано с усилением обмена кининов.

## **2. Влияние интраперитонеального введения селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов на активность ферментов обмена регуляторных пептидов**

Рядом авторов было установлено значительное изменение уровня некоторых регуляторных пептидов при действии селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (Schüle, 2007; Zhao, 2013), что может быть связано с изменением активности ферментов их обмена.

Согласно полученным результатам, однократное внутривентральное введение флуоксетина (10 мг/кг), ребоксетина (10 мг/кг), бупропиона (20 мг/кг) вызывало существенное изменение активностей КПЕ, ФМСФ-КП, ПДПА и ЛКП во всех отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови крыс, при этом изменения были длительными, сохраняющимися в течение 72 часов. Отмечена схожая динамика изменений активностей ферментов обмена регуляторных пептидов относительно контрольной группы при введении препаратов, воздействующих на различные нейромедиаторные системы: снижение активности КПЕ и повышение ПДПА в большинстве отделов мозга, снижение активности ФМСФ-КП в надпочечниках, увеличение активностей ПДПА и ЛКП в сыворотке крови.

Данные об изменении активности карбоксипептидазы E представлены на рисунке 3.

Установлено, что однократная инъекция каждого из препаратов через 12 ч вызывала снижение активности КПЕ в гипофизе, введение флуоксетина и бупропиона также приводило к снижению активности в гипоталамусе. Через 24 ч флуоксетин, ребоксетин и бупропион вызывали снижение активности КПЕ в гипоталамусе и гиппокампе. В гипофизе отмечено снижение при введении ребоксетина и бупропиона, увеличение при введении флуоксетина. Через 72 ч каждый из препаратов вызывал увеличение активности КПЕ в гиппокампе. Также введение флуоксетина вызывало повышение активности фермента в надпочечниках.

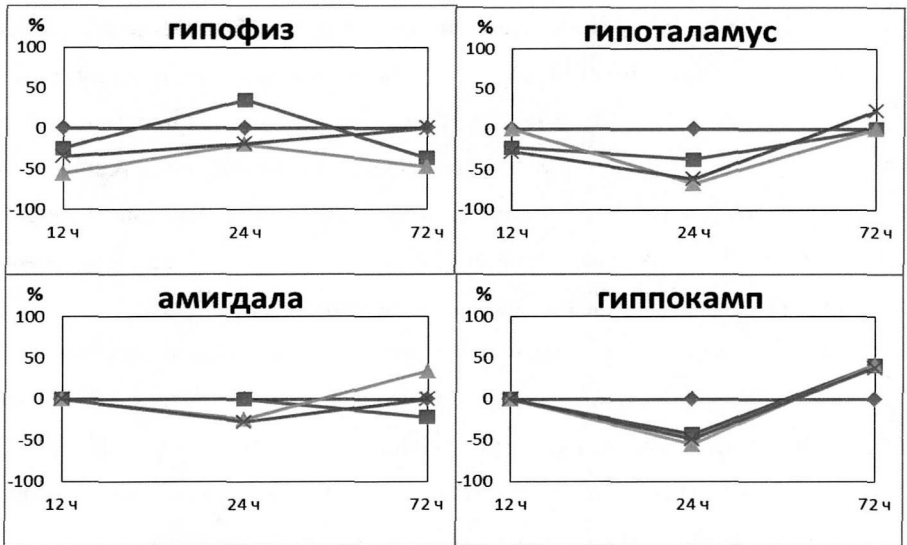


Рисунок 3. Изменение активности карбоксипептидазы E относительно контрольной группы при однократном введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (%; n=4-6). Здесь: □ - контрольная группа, ■ - флуоксетин (10 мг/кг), ● - ребоксетин (10 мг/кг), ▲ - бупропион (20 мг/кг).

По-видимому, снижение активности исследуемого фермента в большинстве отделов мозга приводит к уменьшению скорости синтеза и секреции регуляторных пептидов, вовлеченных в стресс-реакции и патогенез депрессии, что приводит к уменьшению последствий стрессового воздействия. Повышение активности фермента в гипофизе, вероятно, приводит к увеличению содержания вещества P и нейротензина в данном отделе мозга. Антидепрессантный эффект препаратов может быть обусловлен изменением содержания АКТГ, аргинин-вазопрессина, окситоцина, вещества P, энкефалинов и нейротензина. Согласно имеющимся литературным данным, кратковременное введение флуоксетина приводит к активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что подтверждает полученные нами результаты о повышении активности КПЕ в гипофизе и надпочечниках (Gomez F., 2015).

Поскольку ФМСФ-КП, по-видимому, является ключевым ферментом процессинга энкефалинов в надпочечниках (Генгин М.Т., 2002), снижение

его активности (рис. 4) может свидетельствовать об ингибирующем влиянии исследуемых препаратов на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, чем, вероятно, обусловлено уменьшение выраженности симптомов заболевания при приёме антидепрессантов. Увеличение активности фермента после инъекции флуоксетина, по-видимому, является ещё одним доказательством активирующего воздействия препарата на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось.



Рисунок 4. Изменение активности фенилметилсульфонилфтори-ингибируемой карбоксипептидазы относительно контрольной группы при однократном введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (%), n=4-6). Здесь: ■ - контрольная группа, □ - флуоксетин (10 мг/кг), ▲ - ребоксетин (10 мг/кг), \* - бупропион (20 мг/кг).

Введение исследуемых препаратов вызывало увеличение активности пептидил-дипептидазы А в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе (рисунок 5). Повышение активности фермента может приводить к увеличению содержания ангиотензина II, который опосредует активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, приводящую к усилению секреции АКТГ гипофизом и кортиколиберина гипоталамусом, что отмечено при однократном приёме флуоксетина. Повышение активности, вероятно, приводит к увеличению уровня Мет-энкефалина, снижению содержания нейротензина, холецистокинина, вещества Р, аргинин-вазопрессина, окситоцина. По-видимому, именно с изменением уровня регуляторных пептидов в отделах мозга, вовлечённых в развитие депрессии, может быть связана реализация антидепрессантного эффекта препаратов применяемых в медицинской практике.

Системное внутривенное введение флуоксетина (10 мг/кг), ребоксетина (10 мг/кг), бупропиона (20 мг/кг) в течение 14 дней не вызывало значительных изменений активности исследуемых ферментов, что может

быть связано с адаптивными перестройками в организме животного при длительном воздействии внешних факторов. При этом, стоит отметить схожую тенденцию в изменении активности КПЕ, ФМСФ-КП, ПДПА и ЛКП во всех отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови крыс.

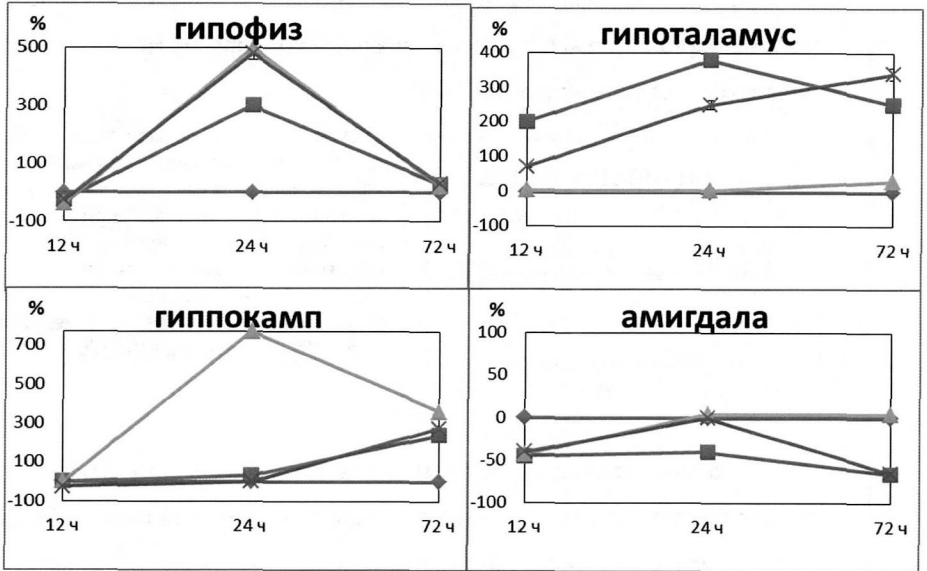


Рисунок 5. Изменение активности пептидил-дипептидазы А относительно контрольной группы при однократном введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (%; n=4-6). Здесь: ■ - контрольная группа, ▣ - флуоксетин (10 мг/кг), ▤ - ребоксетин (10 мг/кг), ▥ - бупропион (20 мг/кг).

Выявлено снижение активности КПЕ (рисунок 6) в гипофизе через 24 ч, увеличение через 72 ч при введении флуоксетина и бупропиона. Снижение активности фермента при введении флуоксетина и ребоксетина отмечено также в амигдале через 72 ч, что, по-видимому, приводило к снижению уровня регуляторных пептидов, участвующих в формировании эмоционального состояния.

Активация фермента в гипофизе, вероятно, способствовала усилению секреции АКТГ, что отмечено при приёме флуоксетина. Системное введение бупропиона приводило к увеличению активности, помимо гипофиза, в гипоталамусе и надпочечниках, что свидетельствует об активации



гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и возможном повышении уровней АКТГ, аргинин-вазопрессина, окситоцина, холецистокинина, вещества P, энкефалинов, нейротензина.

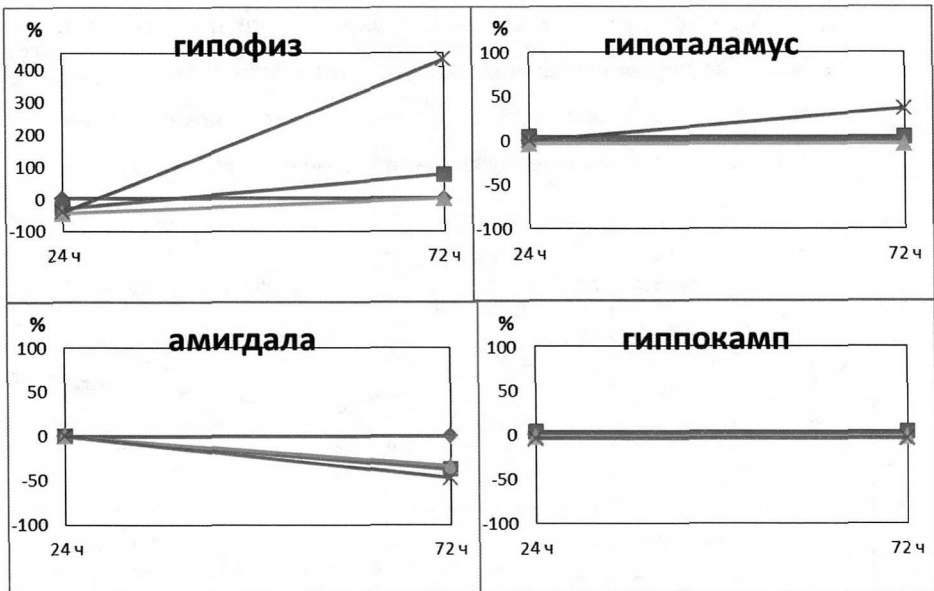


Рисунок 6. Изменение активности карбоксипептидазы E относительно контрольной группы при системном введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (% , n=4-6). Здесь: ■ - контрольная группа, ■ - флуоксетин (10 мг/кг), ■ - ребоксетин (10 мг/кг), ■ - бупропион (20 мг/кг).

Увеличение активности ПДПА (рисунок 7), выявленное практически во всех исследуемых отделах мозга, способствует снижению уровня кининов, и ингибированию высвобождения цитокинов, что также может лежать в основе реализации антидепрессантного эффекта препаратов. Активация В1 кининовых рецепторов инициирует активацию сигнального пути ERK, что приводит к усилению синтеза простагландинов, генерации NO, высвобождения цитокинов, таких как интерлейкин-1 (IL-1), фактор некроза опухоли (TNF $\alpha$ ), наблюдаемому при депрессии (O'Brien S.M., 2007; Miller A.H., 2009).

Повышение активности фермента может приводить к увеличению уровня ангиотензина II, снижению вещества P, холецистокинина,

нейротензина. Снижение активности пептидил-дипептидазы А через 24 ч после инъекции бупропиона может быть результатом ингибирующего воздействия регуляторных пептидов, синтезированных в исследуемых отделах мозга при участии КПЕ. Отмечено уменьшение активности ФМСФ-КП при системном введении флуоксетина, увеличение при введении бупропиона, что также свидетельствует об активирующем воздействии препарата на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось.

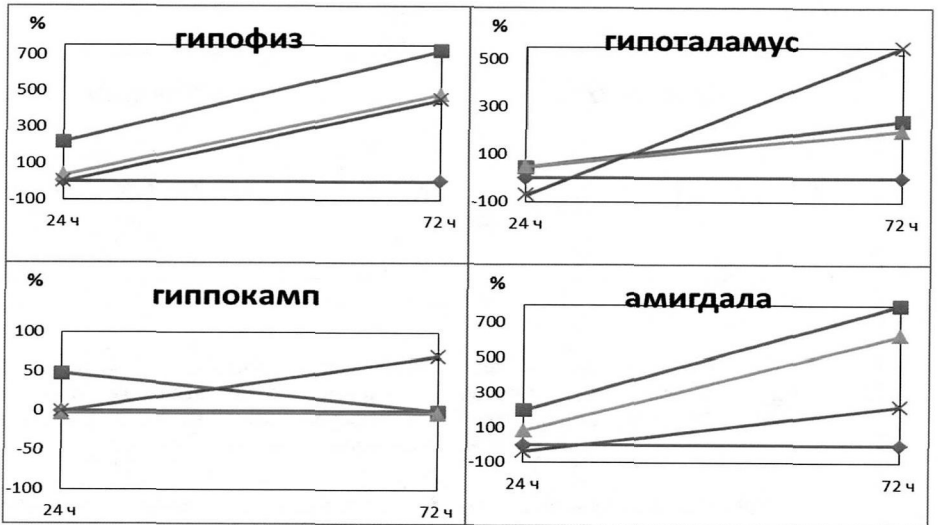


Рисунок 7. Изменение активности пептидил-дипептидазы А относительно контрольной группы при системном введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (%; n=4-6). Здесь: ■ - контрольная группа, ◆ - флуоксетин (10 мг/кг), ▲ - ребоксетин (10 мг/кг), × - бупропион (20 мг/кг)

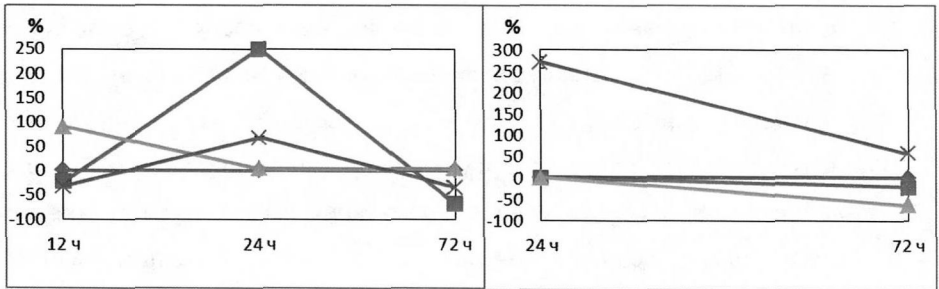
Введение селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов сопровождалось и изменениями активности ПДПА и ЛКП в сыворотке крови (рисунок 8).

Так, однократное внутрибрюшинное введение флуоксетина (10 мг/кг), ребоксетина (10 мг/кг), бупропиона (20 мг/кг) вызывало увеличение активности лизинкарбоксипептидазы и пептидил-дипептидазы А, что, по-

видимому, приводило к усилению обмена кининов и предотвращению гиперпродукции цитокинов путём ингибирования сигнального пути ERK.

Системное же введение флуоксетина и ребоксетина вызывало снижение активности лизинкарбокисептидазы и пептидил-дипептидазы А, бупропиона – повышение, что, вероятно, приводило к уменьшению уровня ангиотензина II, оказывающее ингибирующее воздействие на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, играющую важную роль в контроле эмоционального состояния.

А)



В)

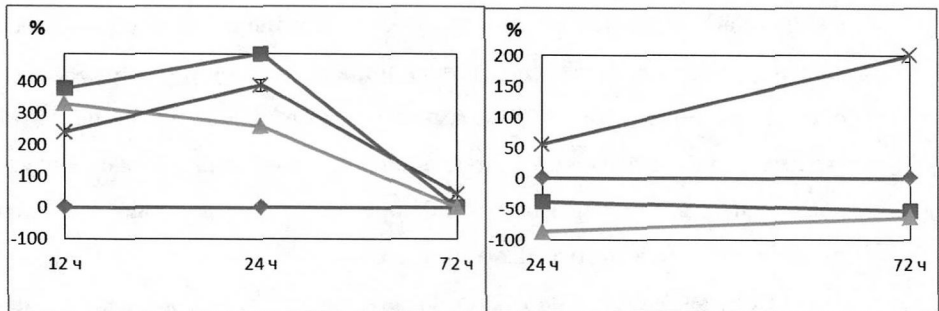


Рисунок 8. Изменение активности лизинкарбокисептидазы (А) и пептидил-дипептидазы А (В) в сыворотке крови относительно контрольной группы при однократном и системном введении селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов (%; n=4-6). Здесь: ■ - контрольная группа, ■- флуоксетин (10 мг/кг), ■ - ребоксетин (10 мг/кг), ■ - бупропион (20 мг/кг)

Исследование активности КПЕ, ПДПА, ФМСФ-КП, ЛКП при действии аналогичных доз флуоксетина, ребоксетина и бупропиона *in vitro* показало

отсутствие непосредственного влияния фармакологических препаратов на активность исследуемых ферментов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о регулирующем воздействии селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов на активности КПЕ, ЛКП, ПДПА и ФМСФ-КП, изменение которых может сказываться на уровнях регуляторных пептидов в мозге и плазме крови. Несмотря на то, что в работе исследовалось воздействие препаратов, влияющих на уровень различных моноаминов, была обнаружена схожая динамика изменения активности ферментов обмена регуляторных пептидов. Вероятно, это еще раз доказывает координирующую роль пептидергической системы в функционировании моноаминовых систем. По-видимому, именно изменение содержания ряда регуляторных пептидов может быть в основе появления симптомов депрессивных расстройств, а нормализация их уровней может приводить к уменьшению выраженности симптомов заболевания. Биологически активные пептиды оказывают модулирующее действие на функционирование других нейромедиаторных систем, изменяя уровень моноаминов и цитокинов, влияя на активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, они также могут быть вовлечены в механизмы антидепрессантного действия селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов.

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Установлено, что интраперитонеальная инъекция является стрессовым воздействием, приводящим к активации стресс-протекторных систем организма, что сопровождается повышением уровней АКТГ и кортикостерона в сыворотке крови, увеличением активности карбоксипептидазы E в гипофизе и гипоталамусе, фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в

надпочечниках, снижением активности пептидил-дипептидазы А практически во всех отделах мозга.

2. Выявлены изменения активности исследуемых ферментов при введении флуоксетина, ребоксетина и бупропиона, что свидетельствует об их роли связующего звена в механизмах взаимодействия посредством регуляторных пептидов моноаминовых и пептидергической систем и участии в реализации антидепрессантного эффекта препаратов.

3. Показана схожая динамика изменений активности ферментов на фоне введения различных селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов: снижение активности карбоксипептидазы Е и повышение пептидил-дипептидазы А в большинстве отделов мозга, снижение активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в надпочечниках, увеличение активностей пептидил-дипептидазы А и лизинкарбоксипептидазы в сыворотке крови.

4. Выявлено отсутствие изменений активности исследуемых ферментов *in vitro* при действии аналогичных доз селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. *Кручинина, А.Д.* Влияние ребоксетина на активность карбоксипептидазы Е в нервной ткани крыс / А.Д. Кручинина, М.Т. Генгин // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 5. – С. 657-660.
2. *Кручинина, А.Д.* Влияние однократного введения флуоксетина на активность карбоксипептидазы Е в нервной ткани крыс / А.Д. Кручинина, М.Т. Генгин // Нейрохимия. – 2015. – Т. 32, № 4. – С. 307-311.
3. *Кручинина, А.Д.* Активность пептидил-дипептидазы А в отделах мозга крыс при однократном введении флуоксетина / А.Д. Кручинина // Вестник Московского городского педагогического университета. Серия: "Естественные науки". – 2015. – № 4 (20). – С. 85-91.

4. **Кручинина, А.Д.** Активность пептидил-дипептидазы А в мозге крыс при однократном введении ребоксетина / А.Д. Кручинина, С.С. Гамзин, М.Т. Генгин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2015. – № 3 (35). – С. 15-22.
5. **Кручинина, А.Д.** Активность пептидил-дипептидазы А и лизинкарбокисептидазы в сыворотке крови крыс при однократном введении ребоксетина / А.Д. Кручинина // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2015. – № 2 (10). – С. 94-100.
6. **Кручинина, А.Д.** Влияние флуоксетина на активность фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбокисептидазы в надпочечниках крыс / А.Д. Кручинина, С.С. Гамзин // Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. – 2014. – Т. 4, № 8. – С. 155-157.
7. **Кручинина, А.Д.** Влияние ребоксетина на активность фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбокисептидазы в надпочечниках крыс / А.Д. Кручинина, С.С. Гамзин // Актуальные проблемы современной науки в 21 веке. – 2014. – С. 18-19.
8. **Кручинина, А.Д.** Активность фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбокисептидазы при однократном введении селективных ингибиторов обратного нейронального захвата / А.Д. Кручинина, О.М. Григорьева, М.Т. Генгин // Теоретические и прикладные аспекты современной науки. – 2015. – № 7-1. – С. 124-126.
9. **Кручинина, А.Д.** Влияние флуоксетина на активность пептидил-дипептидазы А в сыворотке крови крыс // А.Д. Кручинина // Современные тенденции развития науки и технологий. – 2015. – № 2-1. – С. 62-64.
10. Гамзин, С.С. Влияние пираретама на активность карбокисептидазы Е в нервной ткани крыс / С.С. Гамзин, А.Д. Кручинина, О.М. Григорьева // Материалы 18-й Международная Пушчинская школа – конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушино, 2014. – С. 139.

11. *Кручинина, А.Д.* Влияние флуоксетина на активность карбоксипептидазы E в нервной ткани крыс / А.Д. Кручинина, С.С. Гамзин, О.М. Григорьева // Материалы 18-й Международная Пушкинская школа – конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушкино, 2014. – С. 145.
12. Гамзин, С.С. Активность карбоксипептидазы E в отделах мозга крыс при действии пирacetama / С.С. Гамзин, *А.Д. Кручинина*, О.М. Григорьева // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». – Санкт-Петербург, 2014. – С. 39.
13. *Кручинина, А.Д.* Влияние флуоксетина на активность карбоксипептидазы E в отделах мозга крыс / А.Д. Кручинина, С.С. Гамзин, О.М. Григорьева // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». – Санкт-Петербург, 2014. – С. 80.
14. *Кручинина, А.Д.* Влияние ребоксетина на активность пептидил-дипептидазы A в сыворотке крови крыс / А.Д. Кручинина, С.С. Гамзин, М.Т. Генгин // Материалы III Международной научной конференции «Актуальные проблемы биохимии и клеточной биологии». – Днепропетровск, 2015. – С. 130.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ERK – extracellular signal-regulated kinase

АКТГ – адренокортикотропный гормон

ГЭМЯК – гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота

КПЕ – карбоксипептидаза E

ПДПА – пептидил-дипептидаза A

ФМСФ - фенилметилсульфонилфторид

ФМСФ-КП – фенилметилсульфонилфторид – ингибируемая карбоксипептидаза

**ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОГО ЗАХВАТА  
МОНОАМИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ  
ПЕПТИДОВ В ОТДЕЛАХ МОЗГА, НАДПОЧЕЧНИКАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
КРЫС**

Кручинина Анастасия Дмитриевна  
(Россия)

Депрессия является одним из наиболее распространенных психических расстройств и характеризуется снижением настроения, нарушением мышления и двигательной заторможенностью, но этиология заболевания до конца не установлена. Предполагается, что компоненты пептидергической системы принимают участие в формировании патологии. Симптомы депрессии возникают при изменении уровня ряда нейропептидов в различных структурах мозга, которые играют важную роль в регуляции психоэмоционального состояния. Изменение ферментативной активности может быть одним из механизмов регуляции уровня биологически активных пептидов. Карбоксипептидаза E, лизинкарбоксипептидаза, фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза, и пептидил-дипептидаза A являются ключевыми ферментами процессинга пептидов. Исследование направлено на изучение изменений активности этих ферментов в отделах мозга, надпочечниках и сыворотке крови крыс после введения антидепрессантов флуоксетина, ребоксетина и бупропиона. Результаты представляют интерес для понимания механизмов функционирования моноаминовых систем, их взаимодействия с пептидергической системой и роли ферментов в реализации антидепрессантного эффекта лекарственных средств. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых эффективных терапевтических препаратов для коррекции психических заболеваний, таких как депрессия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, наркомания и алкоголизм.

**EFFECT OF SELECTIVE MONOAMINE REUPTAKE INHIBITORS ON THE  
ACTIVITY EXCHANGE OF REGULATORY PEPTIDES ENZYMES IN BRAIN  
REGIONS, ADRENAL GLANDS AND BLOOD SERUM OF RATS**

Kruchinina Anastasya Dmitrievna  
(Russia)

Depression is one of the most common mental disorders, characterized by depressed mood, impaired thinking and motor retardation, but the etiology of the disease is not completely established. It is assumed that peptidergic system components are involved in the formation of the pathology. The symptoms of depression occur when the level of some neuropeptides changes in various brain structures, which play an important role in the regulation of mental and emotional states. Change in enzyme activity can be one of the mechanisms for the regulation of the level of biologically active peptides. Carboxypeptidase E, lysine carboxypeptidase, phenylmethylsulfonyl fluoride- inhibited carboxypeptidase and peptidyl-dipeptidase A are the key enzymes of processing peptides. This study aims to examine the changes in the activity of these enzymes brain regions, adrenal glands and blood serum of rats after a single administration of the antidepressants fluoxetine, reboxetine and bupropion. The results are interesting for the understanding of mechanisms of functioning of monoamine systems and their interaction with peptidergic system and the role of enzymes in antidepressant effect of medicaments. The results can be used in the development of new effective therapeutic agents for the correction of mental diseases such as depression, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, drug addiction and alcoholism.



Подписано в печать 20.10.2016  
Заказ № 34  
Тираж - 100 экз.  
Печать цифровая  
Типография "ВУЛЬФПРИНТ"  
ИНН - 704863599  
Адрес - Фрунзенская наб. д. 30 стр. 2  
Тел.: +7(495) 540-53-85  
[www.wolfprint.ru](http://www.wolfprint.ru)