

УДК 591.11: 547.466

## ИЗУЧЕНИЕ ПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-ГЛИЦИЛ-ГЛИЦИНА

*Раваева М.Ю., Коренюк И.И., Курьянов В. О., Чупахина Т.А.*

В ЦНС млекопитающих глицин является тормозным нейромедиатором в нейронных сетях спинного и головного мозга и участвует во многих физиологических и патологических процессах [1, 2]. Известно, что высокая полярность молекулы глицина обуславливает его низкую проницаемость через гематоэнцефалический барьер, что является существенным препятствием использования аминокислоты в качестве психотропного средства при системном введении [3, 4]. Для уменьшения полярности и повышения липофильности молекул используются различные пути химической модификации аминокислот, одним из которых является N-ацелирование базовой структуры [3, 5]. В настоящее время синтезирован ряд соединений с низкой полярностью молекул. К таким соединениям можно отнести новый синтезированный гликопептид N-[N-(1,2:3,4-ди-О-изопропилиден-α-D-галактопирануроноил)-глицил-глицин (DAGU-Gly-Gly) [6], который обладает нейротропной активностью [7]. Основываясь на вышеизложенном, можно предполагать что и при системном введении данное соединение проявит психотропную активность. Исходя из этого, целью нашей работы явилось изучение эффектов как DAGU-Gly-Gly, так и его составляющих: гликозидной основы гликопептида 1,2:3,4-ди-О-изопропилиден-α-D-галактопирануроноилурановой кислоты (DAGU) и дипептидного радикала глицил-глицина (Gly-Gly) на поведение крыс в тесте «открытое поле».

### МЕТОДИКА

Влияние соединений на двигательную, исследовательскую активность и эмоциональность животных изучали с помощью теста «открытого поля» [8]. Поле представляло собой прямоугольник 90x110 см, с деревянными стенками и пластиковым полом, на котором был начерчен 21 квадрат. В центре некоторых квадратов располагались фишки, а в 7-ми крайних, граничащих со стенками квадратах, были проделаны отверстия  $d = 8$  мм. Тестирование проводилось при освещенности 90 лк.

Для экспериментов были отобраны крысы со средней двигательной активностью [9], которых разделили на 4 группы по 10 крыс в каждой: первой группе вводили физраствор (плацебо), второй – DAGU-Gly-Gly, третьей – DAGU, а четвертой – Gly-Gly. Исследуемые вещества растворяли в физиологическом растворе и однократно вводили внутривентриально в объеме 0,2 мл (доза 50 мг/кг). Крыс каждой группы тестировали в течение 2 минут до инъекции (фон), а также

через 1.5, 3 и 24 часа после. опыты проводили с 10 до 15 ч дня. В течение всего времени эксперимента крысы имели свободный доступ к воде, а еду получали только в вечернее время после тестирований. Животных содержали в стандартных условиях вивария на общем пищевом рационе.

Исследовались следующие поведенческие феномены: горизонтальная двигательная активность – ГДА (определялась по числу пересеченных квадратов, причем засчитывалось пересечение квадрата в случае перехода его границ обеими задними лапами); вертикальная двигательная активность – ВДА (по числу вертикальных стоек); исследовательская активность – ИА (по числу заглядываний в отверстия и обнюхивания фишек); груминг – Гр (по числу сеансов умываний передними лапками головы); дефекация – Деф (по числу болюсов).

После тестирования каждой крысы в «поле», дно камеры тщательно протирали вначале влажной, а затем сухой салфеткой, без применения каких либо дезинфицирующих и дезодорирующих средств. Это исключало возможность внесения корректив в поведение следующего испытуемого животного.

Статистическую обработку результатов проводили, используя непараметрический критерий Friedman-ANOVA. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  ошибка среднего, а так же % (за 100 % принимались фоновые значения). Статистически значимыми различия считались при  $p < 0,05$ , а при  $p = 0,05$  – считались тенденцией.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

При сопоставлении фоновых показателей поведения крыс с таковыми после инъекции физиологического раствора (плацебо) в тесте «открытое поле» ни достоверных, ни даже тенденций изменений поведенческих показателей не обнаружено (табл.).

После инъекции гликопептида DAGU-Gly-Gly через 1.5, 3 и 24 часа достоверно снижались ГДА и ВДА. Исследовательская активность через 1.5 и 3 ч от момента инъекции была ниже фоновых значений, а через 24 часа достоверно увеличивалась (табл., рис. 1, А). Таким образом, данное соединение в течение суток оказывало угнетающее действие на ГДА и ВДА и кратковременное угнетающее действие на исследовательскую активность.

Число актов груминга через 1.5, 3 и 24 ч после введения препарата достоверно увеличивалось. Количественные показатели дефекации через 1.5 ч после инъекции препарата снизились (табл., рис. 1, А) и оставались примерно на этом же уровне через 3 и 24 ч.

Анализ суточной динамики параметров поведенческих реакций показал, что наиболее выраженный угнетающий двигательную активность эффект регистрировался через 3 ч после инъекции DAGU-Gly-Gly, а максимумы повышения груминга и снижения болюсов наблюдались через 1.5 ч после инъекций.

**ИЗУЧЕНИЕ ПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-ГЛИЦИЛ-ГЛИЦИНА**

**Таблица.** Показатели поведенческой активности крыс в тесте "открытое поле" при действии N-[N-(1,2:3,4-ди-О-изопронилиден-α-D-галактопирануроноил)-глицил-глицина (DAGU-Gly-Gly), глицил-глицина (Gly-Gly), 1,2:3,4-ди-О-изопронилиден-α-D-галактопирануроноилурановой кислоты (DAGU) и физиологического раствора (Placebo).

ПОКАЗАТЕЛИ	ВРЕМЯ	СОЕДИНИЯ			
		DAGU-Gly-Gly	Gly-Gly	DAGU	PLACEBO
Горизонтальная двигательная активность	Фон	21,2±2,8	24±6,5	36± 8,7	20,4 ±4,6
	1,5 ч	3,2± 1,2**	22,6±5,6	21,8± 2,8*	19,5 ±4,1
	3 ч	2 ±0,7**	16,6±3,3*	15,8±2,6**	22,2 ±5
	24 ч	4,8±1,3 **	31,6±5,9	16,4±1,4**	21,9 ±4,1
Вертикальная двигательная активность	Фон	4,4±0,8	8±2,2	6,6±1,3	5,7 ±1,7
	1,5 ч	1,2±0,3**	5,6 ±1,6*	2,8± 1,1*	6,5 ±1,1
	3 ч	0,4±0,1 **	3,6 ±1,4*	2,2 ±1,3**	7,8 ±1,9
	24 ч	1,8±0,1 **	7,6 ±1,3	3,8±1,1	6,9 ±1,9
Исследовательская активность	Фон	6,8±1,2	16,2 ±0,8	11,2±1,3	10,4 ±1,9
	1.5 ч	4,8±0,2**	11±1,9	8,4±1,9	11,4 ±1,6
	3 ч	6,2±0,3 **	12±1,4**	7,6±1,1*	8 ±1,9
	24 ч	7,4±0,4 **	13,4±1,5*	12±0,86	12 ±1,2
Грумминг	Фон	1±0,5	4±1,8	3,4±1,34	1,1 ±0,5
	1,5 ч	2,6±0,7 **	1,6±0,7*	2,2±0,97	1,6 ±0,56
	3 ч	2,2±0,9**	3,8±0,9	1,8±0,9*	1,8 ±0,65
	24 ч	2,4±0,6**	3,4±1,3	2,8±1,1	1,9 ±0,9
Дефекация	Фон	3±0,6	1,6±0,65	0,6±0,4	1,6 ±0,7
	1.5 ч	1±0,2**	0,8±0,5	0,4±0,2	1,2 ±0,75
	3 ч	2±0,6**	0,2±0,1**	0,2±0,1 *	1,7 ±0,86
	24 ч	1,2 ±0,4**	1±0,4*	0,6±0,2	1 ±0,65

Примечание: \*\* – статистически достоверные различия по сравнению с фоном,  $p < 0,05$ ; \* –  $p = 0,05$ .

При раздельном введении двух компонентов гликопептида было установлено следующее (табл.). Как видно из таблицы, при воздействии дипептида Gly-Gly, в отличие от гликопептида, спустя 3 ч от момента инъекции достоверно снижались показатели исследовательской активности и дефекации (табл., рис.1, Б), а остальные поведенческие феномены проявляли только тенденцию ( $p = 0,05$ ) к снижению показателей.

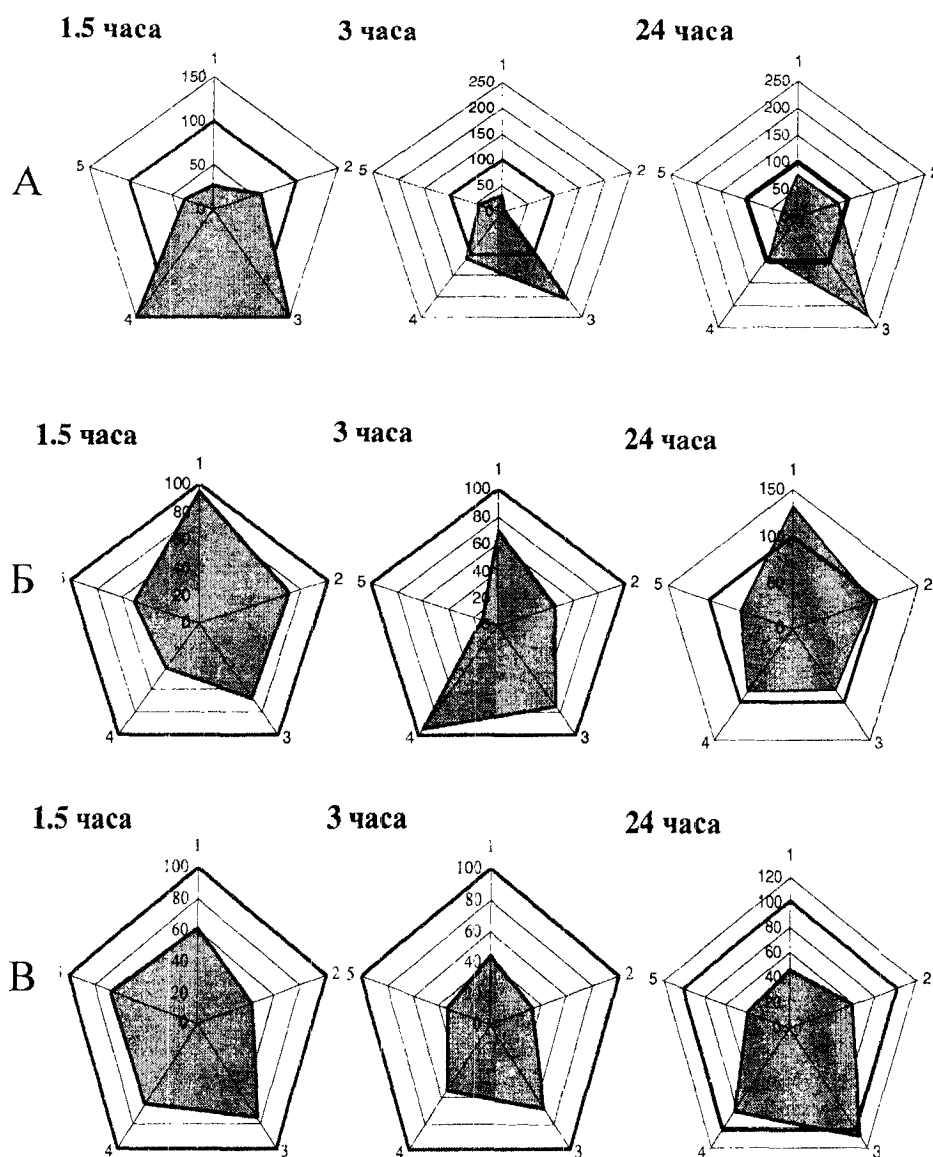


Рис. 1 Динамика относительных (%) показателей поведения крыс при действии гликопептида N-[N-(1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопирануриноил)-глицил-глицина – (DAGU-Gly-Gly) – А, глицил-глицина (Gly-Gly) – Б и 1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопирануриноилоуроновой кислоты (DAGU) – В через 1.5, 3 и 24 ч от момента инъекции.

Примечание: фон – 100 %, выделено жирным, 1 – горизонтальная двигательная активность, 2 – вертикальная двигательная активность, 3 – исследовательская активность, 4 – груминг, 5 – дефекация

## ИЗУЧЕНИЕ ПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-ГЛИЦИЛ-ГЛИЦИНА

После инъекции углеводного фрагмента DAGU в отличие от DAGU-Gly-Gly достоверное снижение ГДА регистрировалось через 3 и 24 ч, а ВДА только через 3 ч после инъекции, а в другие часы измерений наблюдалась только тенденция к снижению двигательной активности ( $p=0,05$ ). Интересно отметить, что только через 3 ч от момента инъекции наблюдалась тенденция к снижению исследовательской активности, актов груминга и дефекации (табл., рис.1, В).

При сравнении эффектов гликопептида DAGU-Gly-Gly с таковыми его фрагментов и плацебо оказалось, что на параметры ГДА и ВДА выраженности угнетающего эффекта, соединения находились в следующем ряду: DAGU-Gly-Gly → DAGU → Gly-Gly.

Количество актов груминга при действии гликопептида в течение всего времени эксперимента было выше фона, а при отдельном воздействии DAGU и Gly-Gly, наоборот, – ниже фона (в первые 3 ч), а затем приближались к фону. Количество болюсов под действием всех соединений снижалось, однако, при действии DAGU-Gly-Gly оно снижалось значительно меньше, чем при изолированном действии DAGU, Gly-Gly и физраствора. Таким образом, можно сказать, что гликопептид DAGU-Gly-Gly оказывало наиболее выраженное действие.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований, гликопептид DAGU-Gly-Gly вызывает выраженные изменения поведенческих реакций крыс: снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, сопровождающееся повышением количества актов груминга и снижением количества болюсов. Исходя из того, что двигательная активность отражает величину процессов возбуждения ЦНС, а груминг и реакция дефекации в тесте «открытого поля» является достоверным показателем уровня возбуждения вегетативной нервной системы [10], можно констатировать, что гликопептид оказывает тормозное действие на нервную систему, следствием чего может быть уменьшение стрессированности животных. Следует указать, что снижение двигательной и исследовательской активности грызунов на фоне заметно возросшего груминга по мнению [11-13] свидетельствует о развитии сильного стресса и тревожно-депрессивных изменений поведения. Однако, эти исследователи не показывают количество дефекаций, являющегося маркером стресса. Другие авторы [14, 15] указывают, что подобные изменения поведения возникают при действии различных факторов, таких как гормоны и мозговые пептиды, действие которых направленно на те же механизмы мозга, что и стресс. Таким образом, основываясь на интегрированной картине, отражающей не отдельные показатели, а изменение их в комплексе, можно предположить, что DAGU-Gly-Gly способен индуцировать развитие тормозных процессов в нервной системе животных и уменьшать психоэмоциональное напряжение животных в тесте «открытое поле».

Анализ динамики показателей поведения животных показал, что максимум угнетения двигательной активности при действии гликопептида наступает через 3 ч, а пики увеличения груминга и снижения дефекации регистрировались через 1.5 ч после инъекции. Исходя из того, что груминг и дефекация являются основными показателями деятельности вегетативной нервной системы [10], можно

предположить, что вегетативная нервная система оказалась более чувствительной к действию гликопептида.

Отсутствие достоверных изменений двигательной активности при инъекции Gly-Gly, по сравнению с гликопептидом и его углеводной основой, не вызывает удивления, так как известно, что аминокислоты с трудом преодолевают гематоэнцефалический барьер [1, 2, 16]. Однако, тенденция к снижению двигательной активности, а также достоверное снижение исследовательской активности и болюсов говорит об активации процессов защитного торможения в ЦНС, что обуславливает антистрессорное и ноотропное действие дипептида. Это согласуется с результатами, полученными другими авторами, которые показали, что, глицин, введенный системно, улучшает обучение крыс навыкам активного избегания [17], устраняет амнезию, вызванную скополамином [18].

Углеводная основа гликопептида DAGU, также как и Gly-Gly, подавляя двигательную активность, и незначительно уменьшая исследовательскую активность, груминг и дефекацию, также проявляет тормозное действие, что может свидетельствовать о его антистрессорном эффекте. Несмотря на однонаправленность угнетающего действия, как гликопептида, так и его фрагментов, выраженность эффектов фрагментов оказалась значительно ниже, чем самого гликопептида DAGU-Gly-Gly. Можно предположить, что DAGU в составе гликопептида потенцировала действие пептидного остатка в результате чего интенсивность эффектов возросла. Нельзя исключить и того, что при поступлении гликопептида в ЦНС, его пептидный фрагмент глицил-глицин отщепляется от углеводной основы и включается в синаптические и метаболические процессы. Такая фармакокинетика предполагается для N-ацилпроизводных аминокислот [16], природа химической связи которых близка к N-ацетилпроизводному, тестированному в нашей работе. Так как глицин, как тормозный нейромедиатор, является агонистом ГАМК [1, 2], можно предположить, что психотропные свойства гликопептида обусловлены его взаимодействием с рецепторами ГАМК. Существующие клинические [19-21] и экспериментальные данные [13, 22-24] показывают, что именно ГАМК может быть связующим звеном в развитии тормозных процессов в ЦНС и проявлении антистрессорного действия.

### **ВЫВОДЫ**

Полученные нами данные косвенно указывают на возможность проникновения через гематоэнцефалический барьер N-[N-(1,2:3,4-ди-O-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопирануроноил)]-глицил-глицина, и способность его активировать процессы защитного торможения в ЦНС, в результате чего уменьшается психоэмоциональное напряжение крыс в тесте «открытое поле».

### **Список литературы**

1. Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. – М.: Медицина, 1986. – 239 с.
2. Хухо Ф. Нейрохимия: Основы и принципы: -Перевод с англ. М: «Мир», 1990. – 386 с.

**ИЗУЧЕНИЕ ПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-ГЛИЦИЛ-ГЛИЦИНА**

3. Керцер С.Л., Баев К.В. Связь между строением кристаллической решетки и биологическим действием некоторых агонистов аминокислотных рецепторов // *Нейрофизиология*. – 1992. – Т. 24, № 1. – С. 44 – 51.
4. Storm-Mathisen J., Ottersen O.P. // *Neurotransmitters and Cortical Function*. – New York. 1988. – P. 39-70.
5. Гаряев А.П., Думпис М.А., Мишин М.А. и др. // *Всероссийский съезд фармакологов, 6-й: Тезисы докладов*. – Ташкент, 1988. – С.82.
6. Кур'янов В.О., Чупахина Т.О., Чирва В.Я. Синтез N-уроноіламіноациламідів // 19 Українська конференція з органічної хімії. Львів, 10 – 14 вересня 2001.: 36. Тез.. С. 239.
7. Раваева М.Ю., Коренюк И. И., Гамма Т.В., Курьянов В.О., Чупахина Т.А. Эффекты воздействия некоторых производных гликопептидов на электрическую активность нейронов моллюска *Helix albescens* Rossm // *Ученые записки ТНУ, серия «Биология»*. – 2003. - Т. 16, №2. - С. 115-123.
8. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. (Bures J., Buresova O., Houston D.P.) *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения (пер. с англ.)*: - М., 1991.
9. Кулагин Д.А., Болондинский Б.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке // *Успехи физиологических наук*. – 1986. – №1. – С. 92-110.
10. Маркель А. Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля // *Журн. выпш. нервн. деятельности*. – 1981. - Т.31, №2. - С. 301-307.
11. Макачук Н.Е., Калуев А.В. *Обоняние и поведение*: Киев: КСФ, 2000. – 148 с.
12. Kalueff A.V. Today and tomorrow of anxiety research // *Stress Behav.* – 2003. – Vol. 8. – P. 145-147.
13. Калуев А.В. *Стресс и груминг*. Москва: Авикс, 2002. – 146 с.
14. Dunn A.J., Berrige C.W., Dunshem P., 1987. Behavioural tests: their interpretation and significance in the study of peptide action. // In: *Neuromethods*. Eds Boulton A., Baker G., Pittman Q.L. Clifton, New York: Humana Press. P. 229-247.
15. Stone E.A., Manavalan S.J., Zhang Yi., Quarterman D., 1995. Beta-adrenoreceptors blockade mimics effects of stress on motor activity in mice // *Neuropsychopharmacol.* - V. 12. - P. 65-71
16. Ковалев Г.В., Васильев С.А., Сажин В.А., Кулешов И.П., Баталина И.Н. Синтез и психофармакологическая активность N-(4-гидрокси-4-метил-3-тетрагидропиранил) производных аминокислот // *Фармак. и токсикология*. – 1990. – Т 53, №1. – С 20-22.
17. Мачула А.И., Наумова В.И., Башнин Ю.И. Системный анализ влияния пирасетама, глицина и N-ацетилглицина на длительное обучение // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 1993. – Т. 56. – С. 55-57.
18. Комиссаров И.В., Лещинская Е.Я. Глицин: новые аспекты нейрофармакологии // *Архив клинической и экспериментальной медицины*. – 1997. – Т.56. – С. 134-137.
19. Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. - М., 1993. – 280 с.
20. Петров В.И., Григорьев И.А., Озеров А.А. и др. // *Тез. докладов Международной конференции "Современные методы биологической терапии психических заболеваний"*. - М., 1994. - С. 48.
21. Петров В.И., Озеров А.А., Григорьев И.А. и др. // *Сб. статей Российской конференции "Пикамилон в современной неврологической и психиатрической практике"*. - М. 1994. - С.44-45.
22. Бондаренко Н.А., Камышева В.А., Минеева М.Ф., Вальдман А.В. Влияние хронического стресса на поведение, соматическое состояние и активность тирозингидроксилазы мозга «эмоциональных» и «неэмоциональных» крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1981. – Т.91, №1. – С. 20-28
23. Калуев А.В. Методологические проблемы и перспективы фармакоэтологии тревожности // *Вестник биологической психиатрии*. – 2003. – №6. – С. 90-95
24. Kopanitsa, M.V., Yakubovska, L.M., Rudenko, O.P., and Krishtal, O.A. Modulation of GABA(A) receptor-mediated currents by benzophenone derivatives in isolated rat Purkinje neurons // *Neuropharmacology*. – 2002. – V.43. – P. 764-777.

*Поступила в редакцию 05.12.2004 г.*