

## **ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА ГАМК<sub>A</sub>-РЕЦЕПТОРНЫЕ СТРУКТУРЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

М.Б. Иванов, В.А. Башарин, Е.Ю. Бонитенко, Б.О. Войтенков,

С.П. Сидоров, И.М. Иванов

СПбМАПО, Исследовательский центр «КОМКОН»

г. Санкт-Петербург

### **РЕФЕРАТ**

Методом фармакологического «зондирования» на мышах произведена оценка влияния дельта-сон индуцирующего пептида на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторный комплекс. *In vivo* показано, что системное применение дельта-сон индуцирующего пептида приводит к модуляции участков связывания лигандов ГАМК/бензодиазепин/ионофор/рецепторного комплекса и модифицирует внутрирецепторные взаимодействия.

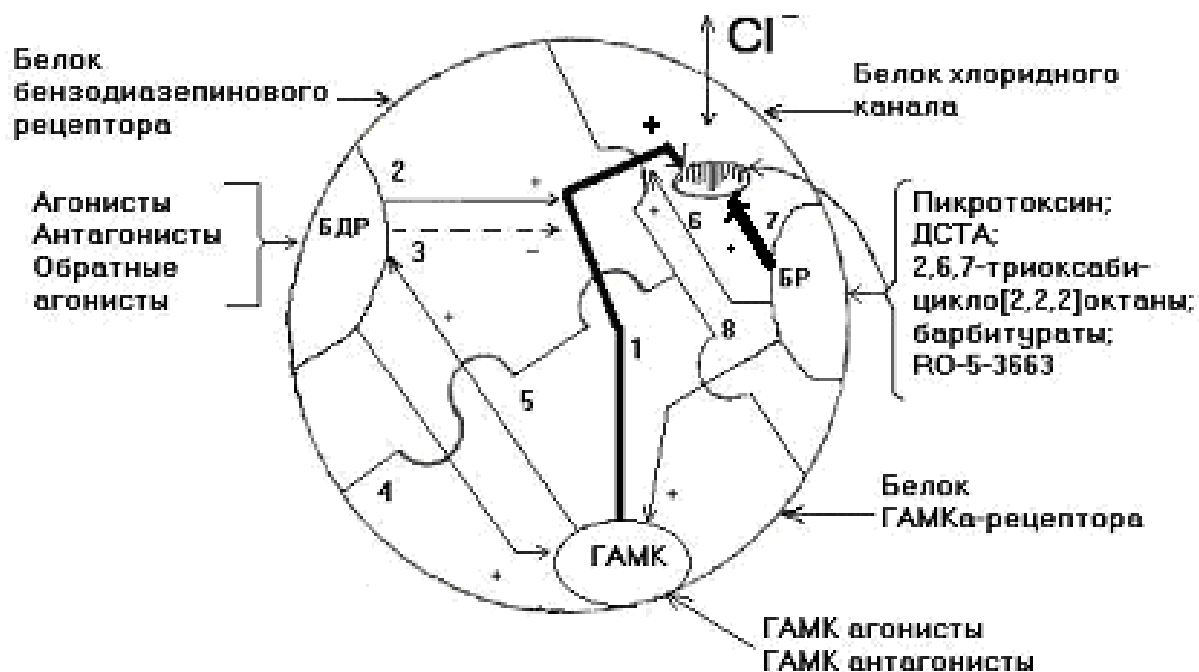
**Ключевые слова:** ДСИП, «Дельтаран», ГАМК<sub>A</sub>-рецептор, нейропротектор, судороги, пептиды.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП) известен с конца 70-х годов XX века как сомногенный гуморальный фактор. Последующие исследования показали полифункциональный характер его действия, свойственный большинству регуляторных пептидов. Однако, молекулярные механизмы выявляемых биологических эффектов до настоящего времени не выяснены и тем более не определены первичные молекулярные мишени действия ДСИП. Влияние ДСИП на двигательную активность, терморегуляцию, уровень нейромедиаторов и нейропептидов, стресс-протективное, адаптогенное и противосудорожное действие (на киндлинговых моделях и при применении эпилептогенов) может быть обусловлено изменением функционального состояния ГАМК-ергической нейромедиаторной системы [Меджеричкий А.М и

др., 1992; Шандра А.А. и др., 1997]. Последняя по современным представлениям является одной из ключевых в регуляции деятельности ЦНС в норме и при развитии патологических процессов, реализующихся на медиаторном и межмедиаторном уровнях [Головко А.И. и др., 1996].

В настоящее время отсутствует единая классификация ГАМК-рецепторов. Предполагается наличие не менее 500 подтипов, среди них наиболее изученными являются ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы. Данный тип рецептора имеет места связывания для бензодиазепинов, барбитуратов, пикротоксина, стероидов и т.д. (Рис.1). Сложность морфо-функциональной организации объясняет нередко встречающиеся в литературе термины «ГАМК-бензодиазепин-ионофорный комплекс», «ГАМК-бензодиазепин-ионофор» и др.



**Рис. 1 Модель ГАМК<sub>A</sub>-рецептора (Haefely W., 1983).**

Внутрирецепторные взаимодействия, по всей вероятности, проявляются в активирующем (1) влиянии ГАМК- и бензодиазепиновых-агонистов на хлор-ионофор, повышая частоту его открываний. При этом бензодиазепиновые-агонисты усиливают (2) собственное влияние ГАМК на хлор-ионофор и увеличивают сродство ГАМК<sub>A</sub>-рецептора к агонистам (4), а последние, в свою очередь, повышают связывание бензодиазепинов (5). Что касается

барбитуратов, связывающихся со специфическим рецептором (БР), то они в низких дозах увеличивают (6) время нахождения ионофора в открытом состоянии (после его активации ГАМК), а в высоких - непосредственно открывают его (7). Они так же повышают (8) сродство ГАМК-рецептора к агонистам, и способствуют связыванию последних с бензодиазепиновым-рецептором.

Методом фармакологического «зондирования» нами было изучено влияние ДСИП на компоненты ГАМК-рецепторно-ионофорного комплекса с целью уточнения механизмов его нейротропного действия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод фармакологического «зондирования», позволяет с высокой долей достоверности выявлять возможные структурно-функциональные участки, ответственные за реализацию нейротропных эффектов, на уровне организма.

Эксперименты выполнены на модели - норборнан-пикротоксинового киндлинга [Головки А.И. и др., 1998]) и генерализованных судорог, вызванных бикикуллином (БКК). Норборнан (2.2-ди(трифторметил)-3,3-дициано-5,6-дихлорнорборнан) - является неконкурентным ГАМК-антагонистом, блокирующим хлорную проводимость нейрональных мембран за счет прочного ковалентного связывания внутри канала с последующим его закупориванием [Гладких В.Д. и др., 1995]. Для формирования киндлинга норборнан использовался в дозе 0,095 мг/кг. Пикротоксин (Sigma, США) - связывается с барбитуратным участком ГАМК<sub>A</sub>-рецептора и за счет аллостерического влияния стабилизирует запортое состояние ионофора, тем самым, уменьшая вероятность нахождения канала ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в открытом состоянии. В экспериментах по изучению процесса формирования норборнанового киндлинга пикротоксин использовался в дозе 4 мг/кг.

Бикикуллин (Sigma, США) - классический конкурентный антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [Sharif N.A., 1985], вводили в дозе 6 мг/кг с целью формирования генерализованной судорожной активности.

Для оценки влияния ДСИП на компоненты ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса в качестве фармакологических «зондов» использовали препараты, лигандные к различным участкам ГАМК/бензодиазепин/ионофор/рецепторного комплекса. Диазепам - агонист бензодиазепинового рецептора, увеличивающий частоту открывания хлор-ионофора ГАМК<sub>A</sub>- рецептора, вводили в дозе 0,5 мг/кг. Фенобарбитал - агонист барбитуратного участка связывания ГАМК-ионофор-рецепторного комплекса, стабилизирующий открытое состояние ионофора, использовался в дозе 4 мг/кг. Мусцимол - агонист участка связывания ГАМК, использовался в дозе 1 мг/кг.

ДСИП вводился внутривенно однократно за 30 мин до пикротоксина и бикикуллина в дозах 300 мкг/кг и 600 мкг/кг. Дельтаран вводился однократно за 30 мин до пикротоксина и бикикуллина в дозах 300 мкг/кг и 600 мкг/кг (по ДСИП).

Все препараты животные получали интраперитонеально в объеме 0,2 мл на 10 г массы тела животного, контрольной группе вводилось эквивалентное количество растворителя.

Опыты были выполнены на 180 белых беспородных мышах-самцах массой 22-25 г. разводки питомника РАМН п. Рапполово. До начала эксперимента животные не менее двух недель содержались на стандартном пищевом рационе вивария. За 24 часа до опытов кормление животных, находившихся на свободном водном режиме, прекращали.

Судорожную активность оценивали по методу Г.Н.Крыжановского и соавторов (1985) и J. Ono et al. (1990) в нашей модификации [Иванов М.Б., 1998]. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Влияние ДСИП и дельтарана на ГАМК-ионофор-рецепторный комплекс оценивали на модели норборнан-пикротоксинового киндлинга (Головко А.И. и

соавторы, 1998) по его способности модифицировать клиническую картину интоксикации.

В первой серии экспериментов было установлено, что ДСИП и дельтаран, введенные через 6 часов после норборнана и за 30 минут до разрешающей дозы пикротоксина, не оказывают влияния на среднее время развития судорожных паттернов у экспериментальных животных (Табл.1). Однако их применение существенно модифицировали клиническую картину интоксикации, что проявлялось в увеличении длительности судорожных паттернов и сокращении межприступных промежутков. Так же было установлено, что между группами получавшими аналогичные дозы ДСИП и дельтарана статистически значимых различий не наблюдалось, в связи с этим в дальнейшем эксперименты проводились только с использованием фармакопейного препарата (дельтарана). Далее по тексту ДСИП и дельтаран рассматриваются как синонимы.

**Таблица 1**

**Влияние ДСИП и дельтарана на течение норборнан-пикротоксинового киндлинга (норборнан 0,095 мг/кг за 6 часов до пикротоксина 4 мг/кг)**

Группы животных (n=6)	Показатели		
	Время наступления судорог (мин)		Время гибели (мин)
	1-2 степени	3-4 степени	
Контроль для ДСИП	10,06±1,22	11,31±1,34	27,07±8,16
ДСИП за 30 мин до пикротоксина в дозе:			
• 300 мкг/кг	11,46±4,51	13,28±7,53	30,38±7,10
• 600 мкг/кг	12,38±1,48	12,53±3,32	29,17±9,35
Контроль для Дельтарана	9,09±1,28	12,27±3,33	26,37±6,41
Дельтаран за 30 мин до пикротоксина в дозе:			
• 300 мкг/кг	9,09±4,14	10,13±5,15	22,46±7,01
• 600 мкг/кг	11,39±6,23	14,34±7,30	26,40±8,30

Во второй серии экспериментов для уточнения характера влияния ДСИП на бензодиазепиновый участок рецепторного комплекса нами в схему

исследований был введен диазепам, как агонист бензодиазепинового участка связывания ГАМК<sub>A</sub>-рецептора.

Установлено, что диазепам оказывал существенное влияние на реализацию судорог при норборнан-пикротоксиновом киндлинге, выражающееся как в увеличении времени до развития судорожных приступов, так и в удлинении межприступных периодов и предотвращении гибели животных (Табл.2). В свою очередь при совместном применении дельтарана и диазепам не было зарегистрировано значимого влияния на противосудорожное действие последнего, а отмечалась лишь тенденция к его усилению, что лишь частично подтверждает данные, полученные R. Yukhananov (1991), о потенцировании ДСИП противосудорожного действия бензодиазепинов. Отсутствие противосудорожного действия у ДСИП, на модели норборнан-пикротоксинового киндлинга, может быть объяснено конформационными изменениями ГАМК-рецептора вследствие необратимой блокады норборнаном хлор-ионного канала.

**Таблица 2**

**Эффекты дельтарана (300 мкг/кг) и диазепам (0,5 мг/кг) на фоне норборнан-пикротоксинового киндлинга (норборнан 0,095 мг/кг за 6 часов до пикротоксина 4 мг/кг)**

Группы животных (n=6)	Показатели		
	Время наступления судорог (мин)		Время гибели (мин)
	1-2 степени	3-4 степени	
Контроль	6,3±1,5	8,9±1,5	17,4±1,8
Дельтаран за 30 мин до пикротоксина	6,5±0,9	11,1±1,2	18,4±4,2
Диазепам за 10 мин до пикротоксина	19,6±3,6*	22,2±4,2*	Животные выжили
Дельтаран за 30 мин и диазепам за 10 мин до пикротоксина	16,6±2,8* **	33,8±4,5* **	Животные выжили

Примечание: \* - различие с контролем достоверно ( $p \leq 0,01$ ), \*\* - различие с группой получавшей дельтаран достоверно ( $p \leq 0,01$ ).

Нами так же было изучено влияние дельтарана на конвульсивное действие бикикуллина - антагониста участка связывания ГАМК. Учитывая сложность морфо-функциональной организации ГАМК-бензодиазепин-ионофор-рецепторного комплекса, совместно с дельтараном животным вводились фармакологические «зонды» – лиганды различных участков ГАМК<sub>A</sub>-рецептора.

В результате проведенных экспериментов установлено, что дельтаран не проявлял антиконвульсивных свойств на фоне судорог вызванных введением бикикуллина, однако несколько усиливал противосудорожные эффекты лиганда бензодиазепинового рецептора - диазепама (Табл.3).

**Таблица 3**

**Эффекты дельтарана (300 мкг/кг) и диазепама (0,5 мг/кг) на фоне введения бикикуллина в дозе 6 мг/кг**

Группы животных (n=12)	Показатели		
	Время наступления Судорог (мин)		Время гибели (мин)
	1-2 степени	3-4 степени	
Контрольная	1,3±0,1	1,6±0,1	3,3±0,4
Дельтаран за 30 мин до бикикуллина	1,5±0,1	1,6±0,1	4,1±0,4
Диазепам за 10 мин до бикикуллина	2,2±0,1*	3,2±0,4*	6,5±0,6*
Дельтаран за 30 мин и диазепам за 10 мин до бикикуллина	2,5±0,3* **	4,1±0,7* **	8,2±1,1* **

Примечание: \* - различие с контролем достоверно ( $p \leq 0,01 - 0,001$ ), \*\* - различие с группой получавшей дельтаран достоверно ( $p \leq 0,01$ ).

Применение дельтарана совместно с агонистом барбитуратного участка связывания ГАМК-бензодиазепин-ионофор-рецепторного комплекса - фенобарбиталом приводило к достоверному ( $p \leq 0,05$ ) усилению противосудорожных эффектов последнего при судорогах вызванных введением бикикуллина (Табл.4).

**Таблица 4**

**Эффекты дельтарана (300 мкг/кг) и фенobarбитала (4 мг/кг) на фоне введения бикикуллина в дозе 6 мг/кг**

Группы животных (n=12)	Показатели		
	Время наступления Судорог (мин)		Время гибели (мин)
	1-2 степени	3-4 степени	
Контрольная	1,4±0,08	1,6±0,1	3,3±0,4
Дельтаран за 30 мин до бикикуллина	1,5±0,1	1,6±0,1	4,1±0,4
Фенobarбитал за 10 мин до бикикуллина	1,6±0,1	2,0±0,2	4,1±0,4
Дельтаран за 30 мин и фенobarбитал за 10 мин до бикикуллина	2,7±0,4* ** ***	3,3±0,4* ** ***	6,5±1,0* ** ***

Примечание: \* - различие с контролем достоверно ( $p \leq 0,005$ ), \*\* - различие с группой получавшей дельтаран достоверно ( $p \leq 0,05 - 0,01$ ), \*\*\* - различие с группой получавшей фенobarбитал достоверно ( $p \leq 0,05 - 0,01$ ).

Для изучения влияния дельтарана на участок связывания ГАМК - ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в схему был введен его агонист – мусцимол. Установлено, что совместное введение ДСИП и мусцимола приводит к возникновению значимых противосудорожных эффектов при судорогах инициированных бикикуллином (Табл.5).

**Таблица 5**

**Эффекты дельтарана (300 мкг/кг) и мусцимола (1 мг/кг) на фоне введения бикикуллина в дозе 6 мг/кг**

Группы животных (n=6)	Показатели		
	Время наступления судорог (мин)		Время гибели (мин)
	1-2 степени	3-4 степени	
Контрольная	1,6±0,2	2,6±0,6	7,4±1,8
Дельтаран за 30 мин до бикикуллина	1,2±0,1	1,7±0,3	4,4±0,6
Мусцимол за 10 мин до бикикуллина	1,3±0,4	2,3±0,3	5,1±1,9
Дельтаран за 30 мин и мусцимол за 10 мин до бикикуллина	2,6±0,2* ** ***	3,0±0,3**	7,4±2,0

Примечание: \* - различие с контролем достоверно ( $p \leq 0,01$ ), \*\* - различие с группой получавшей дельтаран достоверно ( $p \leq 0,05 - 0,01$ ), \*\*\* - различие с группой получавшей мусцимол достоверно ( $p \leq 0,05$ ).



На основании представленных материалов можно говорить о том, что, ДСИП не оказывает самостоятельного противосудорожного действия и не влияет на противосудорожные эффекты бензодиазепинов на модели норборнан-пикротоксинового киндлинга. ДСИП так же не проявляет противосудорожной активности и на модели генерализованных судорог, инициируемых бикикуллином, однако потенцирует эффекты агонистов ГАМК-рецепторно-ионофорного комплекса. Основываясь на полученных результатах можно предположить, что ДСИП оказывает регулирующее влияние на активные участки ГАМК<sub>A</sub>-рецептора. Вероятно ДСИП, наряду с другими регуляторными нейропептидами, выполняет роль вспомогательного полимодального модулирующего элемента химической регуляции с включением пролонгирующих, усиливающих или ингибирующих влияний. Эти модулирующие факторы могут реализовываться, в том числе и на уровне рецептор-лигандного стимула [Гомазков О.А., 2003].

Внутрирецепторные взаимодействия ГАМК-рецепторно-ионофорного ансамбля на фоне применения ДСИП претерпевают значительные изменения. ДСИП модифицирует функциональное состояние компонентов рецепторного комплекса за счет изменения фосфолипидного микроокружения ГАМК<sub>A</sub>-рецептора [Yukhananov R., 1991], в результате чего повышается сродство лигандов к специфическим участкам связывания, что в свою очередь запускает механизмы взаимоусиливающих влияний внутри рецептора. Кроме того, постулируемое рядом авторов повышение содержания ГАМК в зоне рецептирования под действием ДСИП [Менджеричкий А.М., 1992], приводит к активации связывания бензодиазепиновых-агонистов и усилению их влияния на хлор-ионофор. При этом бензодиазепиновые-агонисты сами повышают сродство ГАМК<sub>A</sub>-рецептора к агонистам, а последние повышают связывание бензодиазепинов. Активация участка связывания барбитуратов приводит к стабилизации открытого состояния ионофора после предварительной активации его ГАМК-агонистами, либо к непосредственному открыванию

хлор-ионофора. Помимо этого повышается сродство участков связывания ГАМК и бензодиазепинов на ГАМК-рецепторе к агонистам.

## ВЫВОДЫ

ДСИП (дельтаран) оказывает регулирующее влияние на ГАМК, барбитуратный и бензодиазепиновый участки связывания ГАМК-бензодиазепин-ионофор-рецепторного комплекса, повышая сродство к лигандам и потенцируя их действие. Кроме того, ДСИП, судя по всему, оказывает опосредованное регулирующее влияние на хлор-ионофор, которое может реализовываться как через пептидный участок ГАМК-рецепторно-ионофорного комплекса, так и за счет изменения окружающей его фосфолипидной матрицы.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Гладких В.Д., Колосова Н.А., Лошадкин Н.А. Особенности токсического действия ГАМК-антагонистов "клеточной" структуры норборнанового ряда //Токсикол. вестн. - 1995. -N2.-С.10-14.
- 2 Головки А.И., Головки С.И., Зефиоров С.Ю., Софронов Г.А. Токсикология ГАМК-литиков. - СПб.: "Нива", 1996. - 141 с.
- 3 Головки А.И., Иванов М.Б., Свидерский О.А. и др. Механизмы формирования повышенной судорожной готовности при интоксикации норборнаном//Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1998. - Т.125, N 6. - С. 653-556.
- 4 Гомазков О.А. Нейрохимия ишемических и возрастных патологий мозга /Информационно-аналитическое издание. – М., 2003.- 2000 с.
- 5 Иванов М.Б. Механизмы формирования повышенной судорожной готовности при интоксикации норборнаном // Дисс. ... канд. мед. наук. – СПб, 1998. – 158 с.
- 6 Крыжановский Г.Н., Шандра А.А., Макулькин Р.Ф., Годлевский Л.С. Гиппокамп как детерминантная структура, генерирующая эпилептическую

активность при киндинге. //Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1985. - Т.ХСІХ, N 5. - С. 527-532.

7 Менджерицкий А.М., Кураев Г.А., Михалева И.И., Повилайтите П.Э. Морфометрические доказательства активации аксо-соматических синапсов при введении дельта-сон индуцирующего пептида //Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1992. – Т. 113, N 2. - С. 202-203.

8 Шандра А.А., Годлевский Л.С., Брусенцов А.И. и др. Дельта-сон индуцирующий пептид, его аналоги и серотонинергическая система в развитии противосудорожного действия //Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 1997.- Т.83, №8.- С.39-45

9 Haerfely W. The biological basis of benzodiazepine action // J. Psychoactive Drugs.- 1983.- Vol. 15, № 1-2.- P.19-39

10 Ono J., Vieth R.F., Walson P.D. Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection in rats //Funct. Neurol.-1990.- V.5,N4.-P.345-352.

11 Sharif N.A. Multiple synaptic receptors for neuroactive amino acid transmitters – new vistas // Int.Rev.Neurobiol. – Orlando etc., 1985. – Vol.26. – P.85-150

12 Yukhananov R., Rebrov I., Tennila T. et al. Effect of ethanol and DSIP on the <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> flux in synaptosomal vesicles // Molecular and chemical neuropathology. – 1991.- T.15.- P.235-248