

*И. В. Латынова, М. Т. Генгин,
Т. Н. Соллертинская, В. Б. Соловьев, Л. В. Живаева*

ВЛИЯНИЕ СЕМАКСА НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ E В ЛИМБИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРИ ВЫРАБОТКЕ УСЛОВНОГО ПИЩЕДОБЫВАТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА У КРЫС

Аннотация. *Актуальность и цели:* изучение влияния семакса на активность карбоксипептидазы E в гиппокампе и амигдале при выработке условного пищедобывательного рефлекса у крыс. *Материалы и методы.* Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс массой 200–250 г в лаборатории кафедры биохимии Пензенского государственного университета. В первой серии эксперимента исследовали влияние семакса на формирование условного пищедобывательного рефлекса. Во второй серии эксперимента исследовалось влияние семакса на активность карбоксипептидазы E при выработке условного пищедобывательного рефлекса. *Результаты.* Синтетический аналог адренокортикостероидного гормона (АКТГ 4–7) гептапептид семакс обладает ноотропным эффектом, усиливает избирательное влияние на восприятие информации, улучшает консолидацию памяти, повышает способность к обучению, увеличивает адаптационные возможности мозга. Изучено влияние семакса на активность карбоксипептидазы E в гиппокампе и амигдале при выработке условного пищедобывательного рефлекса у крыс. Данный фермент отщепляет остатки аргинина и лизина с C-конца молекул-предшественников биологически активных пептидов. Показано, что семакс вызывает значительные изменения активности карбоксипептидазы E в лимбических структурах мозга в процессе обучения животных. Результаты демонстрируют стимулирующее действие семакса на активность пептидергической системы. Предполагается, что такое изменение может являться одним из механизмов действия изучаемого препарата, через который опосредуется его ноотропный эффект.

Ключевые слова: семакс, гиппокамп, амигдала, карбоксипептидаза E.

*I. V. Latynova, M. T. Gengin,
T. N. Sollertinskaya, V. B. Soloviev, L. V. Zhivaeva*

EFFECT OF SEMAX ON CARBOXYPEPTIDASE E ACTIVITY IN LIMBIC STRUCTURES OF THE BRAIN AT THE DEVELOPMENT OF A CONDITIONED FOOD-PROCURING REFLEX IN RATS

Abstract. Background. The article aims at studying the effect of semax on carboxypeptidase E activity in the hippocampus and amygdala at the development of a conditioned food-procuring reflex in rats. Materials and methods. The experiment was carried out in white nonpedigreed rats of 200-250 gramms in mass in the laboratory of the sub-department of biochemistry at Penza State University. In the first part of the experiment the authors studied the effect of the semax on the conditioned food-procuring reflex formation. In the second part, the researchers studied the effect of the semax on carboxypeptidase E activity at the development of the conditioned food-procuring reflex. Results. The synthetic analogue of the adrenocortico-

tropic hormone (ACTH 4-7) the heptapeptide semax has a nootropic effect; it enhances the selective effect on the perception of information, improves memory consolidation, increases ability to training, enhances the adaptability of the brain. The effect of semax on activity of carboxypeptidase E in the hippocampus and amygdala at the development of the conditioned food-procuring reflex in rats was studied. This enzyme detaches the arginine and lysine from the C-terminus of molecules-precursors of biologically active peptides. It is shown that the semax causes significant changes of the activity of carboxypeptidase E in the limbic structures of the brain in learning animals. The results demonstrate the stimulating effect of semax on the activity of the peptidergic system. It is assumed that such a change can be one of the mechanisms of action of the studied drug, which is mediated through its nootropic effect.

Key words: semax, hippocampus, amygdala, carboxypeptidase E.

Введение

В настоящее время особое внимание уделяется поиску и изучению лекарственных средств ноотропного действия, которые обладают такими важными преимуществами, как высокая активность, малая токсичность, отсутствие побочных эффектов и мягкий модуляторный характер действия [1–3]. Среди таких соединений значительный интерес представляют синтетические аналоги эндогенных нейротропных пептидов.

Одним из таких веществ является гептапептид семакс, представляющий собой синтетический аналог адренотропного гормона (АКТГ4-7). Семакс применяется при различных нарушениях процессов памяти, депрессивных состояниях, сердечно-сосудистой патологии [1, 2, 4]. Пептидный препарат обладает ноотропным эффектом, усиливает избирательное влияние на восприятие информации, улучшает консолидацию памяти, повышает способность к обучению, к тому же увеличивает адаптационные возможности мозга [5, 6].

В многочисленных исследованиях продемонстрирована его способность оказывать стимулирующее действие на мнестические функции мозга, способность положительно влиять на выработку условных рефлексов, особенно в моделях с положительным подкреплением [4, 5].

Однако нейрохимические механизмы фармакологического действия семакса остаются недостаточно изученными.

Как известно, уровень регуляторных пептидов зависит от соотношения скоростей их синтеза и распада. Синтез нейропептидов в виде высокомолекулярных предшественников активируется ферментами их протеолитического процессинга [7, 8]. К таким ферментам относят карбоксипептидазу E (КПЕ), которая отщепляет остатки аргинина и лизина с C-конца неактивной молекулы препропептида [9, 10]. Известно также, что данный фермент может участвовать в начальных стадиях инактивации активных пептидов, содержащих остатки основных аминокислот с C-конца молекулы [10, 11]. КПЕ локализована в секреторных везикулах и вовлекается в процессинг предшественников многих регуляторных, в том числе и тех, через которые опосредуются физиологические эффекты семакса.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего исследования было изучение влияния семакса на активность КПЕ в гиппокампе и амигдале при выработке условного пищевого рефлекса (УПР) у крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс массой 200–250 г в лаборатории кафедры биохимии Пензенского государственного университета. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЭС об использовании животных для экспериментальных исследований.

В первой серии эксперимента исследовали влияние семакса на формирование УПР. Животные были разделены на две группы: контрольную ($n = 6$, выработка УПР), опытную ($n = 6$, выработка УПР на фоне интраназального введения семакса в дозе 250 мкг/кг в течение трех дней).

Во второй серии эксперимента исследовалось влияние семакса на активность КПЕ при выработке УПР. Животные были разделены на три группы:

1) интактные ($n = 6$);

2) контрольную (выработка УПР). Животные данной группы подвергались декапитации в первый день через 0,5 ч после инстилляции ($n = 6$), третий ($n = 6$), пятый ($n = 6$), седьмой день ($n = 6$) выработки условного пищевого рефлекса;

3) опытную (интраназальное введение семакса в дозе 250 мкг/кг). Животные данной группы подвергались декапитации в первый день через 0,5 ч после инстилляции ($n = 6$), третий ($n = 6$), пятый ($n = 6$), седьмой день ($n = 6$) выработки условного пищевого рефлекса.

УПР вырабатывался у животных в условиях экспериментальной камеры, состоящей из двух отсеков: стартового и рабочего, в котором располагались кормушки с пищей с правой и левой стороны. В первый день эксперимента крыс помещали в экспериментальную камеру на 30 мин с целью адаптации и угашения ориентировочно-исследовательской активности. В последующие дни эксперимента крыс с пищевой депривацией в течение 24 ч помещали в стартовый отсек. Через 30–60 с после посадки открывали дверцу стартового отсека. Звуковой сигнал частотой 200 Гц служил условным раздражителем. Условный раздражитель подавался в течение 10 с с интервалом 0,5–1 мин. Регистрировалось время побежки животного из стартового отсека до кормушки, число правильных (возвращается в стартовый отсек) и неправильных побегов (не возвращается в стартовый отсек). В качестве критерия выработки рефлекса выбиралось восемь правильных сочетаний из десяти предъявляемых.

Активность КПЕ в гиппокампе и амигдале на фоне введения пептидов определяли модифицированным методом Fricker и Snyder [12]. Содержание белка определяли по Лоури. Активность фермента рассчитывалась как разность прироста флюоресценции в пробах, не содержащих и содержащих ГЭМЯК, и выражалась в нмоль дансил-фен-ала, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы *Microsoft Excel 2003* и программного пакета *STATISTICA – 6.0*. Сравнение средних значений показателей определяли с использованием *U*-критерия Уилкоксона (Манна – Уитни), *t*-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования скорости формирования УПР у крыс при введении семакса представлены на рис. 1. В опытах установлено, что УПР у интактных животных вырабатывается на седьмой день. Введение пептида способствует более быстрому формированию рефлекса. При введении семакса критерий осуществления правильных реакций составляет 100 % уже к четвертому дню.

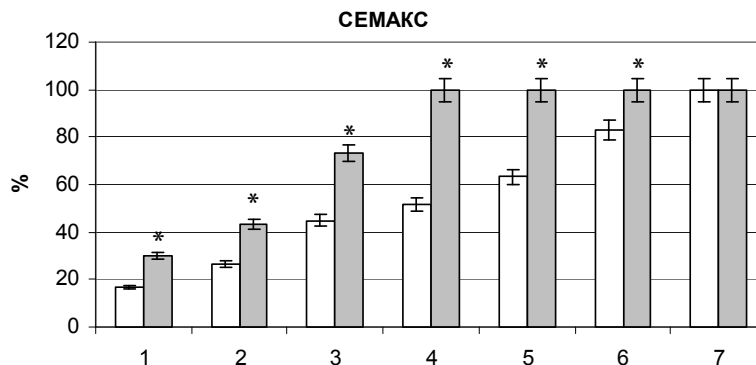


Рис. 1. Скорость формирования УПР у крыс на фоне интраназально введенных пептидов: □ – контрольная группа; ■ – опытная группа; ось абсцисс – дни опыта; ось ординат – критерий выполнения правильных реакций; * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы

Таким образом, введение изучаемого пептида оказывает положительное действие на формирование УПР у крыс. Эти данные в целом согласуются с результатами исследований других авторов [1–4] и свидетельствуют об общеоблегчающем влиянии семакса на процессы высшей нервной деятельности.

Результаты исследования активности КПЕ в гиппокампе и амигдале крыс на этапах выработки УПР представлены на рис. 2.

Установлено достоверное увеличение активности КПЕ при выработке УПР в гиппокампе на 92 % в контрольной группе животных относительно значения нормы. На третий день наблюдалось снижение активности КПЕ на 53 %, на пятые, седьмые сутки – достоверное снижение на 62 % относительно интактных животных.

У крыс, получавших инъекции семакса при выработке УПР, было отмечено снижение активности КПЕ на 30 % в первый день опыта относительно контроля. На третий день обучения активность КПЕ была увеличена практически в два раза по сравнению с контрольной группой. На пятые и седьмые сутки активность фермента не отличалась от таковой у контрольных животных. Активность КПЕ также была выше в первый день обучения на 29 %, в пятый и седьмой день ниже на 49 и 62 % соответственно по сравнению с интактной группой.

Показано, что при выработке УПР активность КПЕ в амигдале контрольных животных увеличивалась в 6,9 раза в первый день обучения по сравнению с нормой. В остальные дни обучения отмечалось снижение активности КПЕ практически в три раза относительно нормы.

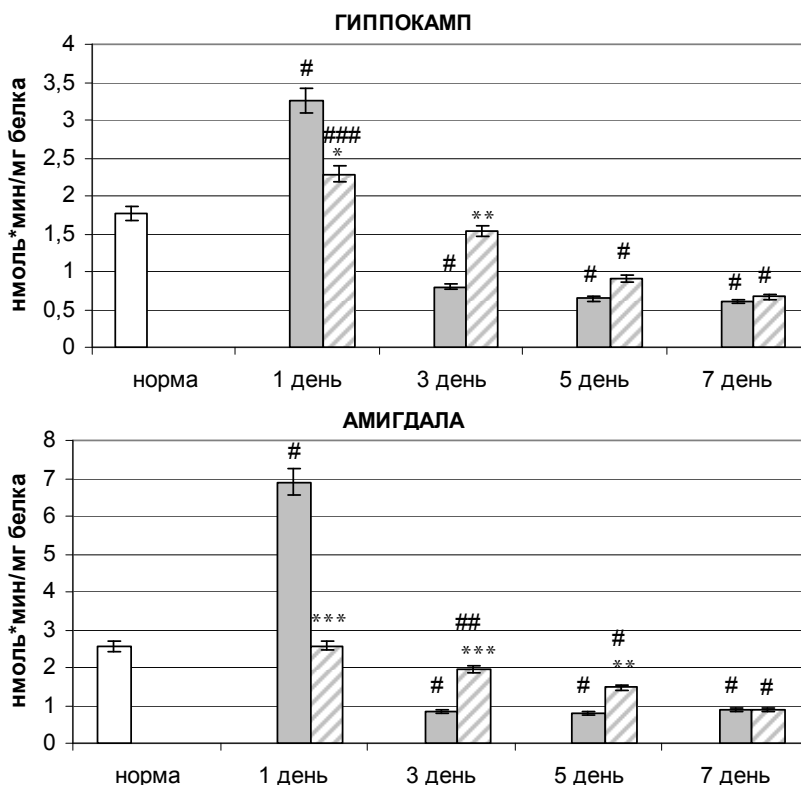


Рис. 2. Изменение активности КПЕ в гиппокампе и амигдале крыс при выработке УПР на фоне интраназального введения семакса (250 мкг/кг): □ – норма; ■ – контрольная группа; ▨ – опытная группа; ось ординат – дни опыта; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ относительно контрольной группы; # – $p < 0,001$; ### – $p < 0,05$ относительно нормы

При введении семакса наблюдалось снижение активности КПЕ в первый день обучения в 2,7 раза относительно контрольной группой. В третий и пятый день опыта активность КПЕ увеличивалась в 2,3 раза и в 1,8 раза соответственно по сравнению с контролем. К тому же активность КПЕ была снижена в третий день на 24 %, в пятый – на 42 % и в седьмой день обучения на 65 % по сравнению с нормой. Однако в первый день опыта активность фермента не отличалась от таковой у интактных животных.

Таким образом, семакс оказывает значительное влияние на изменение активности КПЕ при выработке УПР. Снижение активности фермента в гиппокампе и в случае амигдалы до уровня нормы в первый день обучения, вероятно, свидетельствует о стресс-протективном действии семакса путем уменьшения секреции стресс-пептидов. Повышение уровня стресс-пептидов в гиппокампе, и в особенности амигдале, в первый день обучения у интактных животных может быть связано с мобилизацией резервов, противостоящих стрессу.

После резкого повышения в первый день через двое–четверо суток активность снижалась, но оставалась выше контрольных величин. Повышение активности КПЕ на остальных этапах выработки УПР при введении семакса,

вероятно, связано с активизацией секреции нейропептидов, которые усиливают мотивационную направленность специфических поведенческих ответов на внешние воздействия, что в нашем случае приводит к увеличению избирательности внимания. То есть происходит повышение значимости условных стимулов, связанных с экспериментальной ситуацией, и ослабление внимания к посторонним стимулам, что приводит в итоге к появлению стимулспецифических ответов.

По-видимому, влияние семакса на изменение активности карбоксипептидазы Е не связано с прямым воздействием на фермент. Вероятно, это происходит за счет опосредованного воздействия препарата через различные нейромедиаторные системы [13, 14], повышая, таким образом, способность к обучению.

К настоящему времени имеется большое количество работ, свидетельствующих о подавлении функционирования системы регуляторных пептидов при патологических состояниях [15] и интоксикациях фармакологическими агентами [9, 10]. Таким образом, активизация пептидергической системы через значительное изменение активности КПЕ, фермента, от активности которого зависит уровень биологически активных форм широкого спектра регуляторных пептидов, может опосредовать ноотропный эффект препарата семакс.

Выводы

1. Изменение активности КПЕ при введении семакса на стадиях выработки УПР, возможно, связано с тем, что данный фермент выступает в роли посредника в обеспечении его ноотропных и нейропротективных эффектов.

2. Семакс оказывает стимулирующее действие на активность пептидергической системы, тем самым повышая адаптационную устойчивость организма к факторам внешней среды, что может лежать в основе положительных эффектов препарата на интегративную деятельность мозга.

Список литературы

1. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10 – Семакс / И. П. Ашмарин, В. Н. Незавибацько, Н. Ф. Мясоедов и др. // Журнал высшей нервной деятельности. – 1997. – Т. 47, № 3. – С. 420–430.
2. Эффективность семакса в остром периоде полушарного ишемического инсульта / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, Н. Ф. Мясоедов, В. Н. Незавибацько, Е. Ю. Журавлева, А. В. Ваничкин // Журнал неврологии и психиатрии. – 1997. – 97, № 6. – С. 26–34.
3. **Левицкая, Н. Г.** Меланокортиновая система / Н. Г. Левицкая, А. А. Каменский // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40, № 1. – С. 44–65.
4. Семакс – аналог АКТГ(4-10), когнитивные эффекты / О. В. Долотов, Е. А. Карпенко, Л. С. Иноземцева, Т. С. Середенина, Н. Г. Левицкая, Е. В. Дубинина // Биоорганическая химия. – 2006. – Т. 1117, № 1. – С. 54–60.
5. Формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга; эффекты синтетического аналога АКТГ (4-7) / Д. Н. Силачев, С. И. Шрам, Ф. М. Шакова, Г. А. Романова, Н. Ф. Мясоедов // Журнал высшей нервной деятельности. – 2008. – Т. 58, № 4. – С. 458–466.
6. **Eremin, K. O.** Semax, An ACTH (4-10) analogue with nootropic properties, activates dopaminergic and serotonergic brain systems in rodents / K. O. Eremin,

- V. S. Kudrin, P. Saransaari // *Neurochemical Research*. – 2005. – Т. 30, № 12. – P. 1493–1500.
7. **Pritchard, L. E.** Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways / L. E. Pritchard, A. White // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 148, № 9. – P. 4201–4207.
 8. **Steiner, D. F.** The biosynthesis of biologically active peptides: a perspective / D. F. Steiner // *Peptide Biosynthesis and Processing* / ed. L. D. Fricker. – Boca Raton : CRC Press, 1991. – P. 1–16.
 9. **Вернигора, А. Н.** Исследование активности основных (отщепляющих остатки аргинина и лизина) карбоксипептидаз у крыс разного возраста / А. Н. Вернигора, Н. В. Щетинина М. Т. Генгин // *Биохимия*. – 1996. – Т. 61, № 10. – С. 1848–1856.
 10. **Вернигора, А. Н.** Механизм регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы Н – фермента процессинга нейропептидов / А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин // *Биохимия*. – 1995. – Т. 60, № 12. – С. 1491–1497.
 11. Влияние каптоприла и резерпина на активность некоторых ферментов обмена нейропептидов / М. Т. Генгин, А. Н. Вернигора, Н. Н. Никишин, Н. В. Макеева // *Вопросы медицинской химии*. – 1995. – Т. 41, № 5. – С. 37–39.
 12. **Fricker, L. D.** Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalinne-synthesizing carboxypeptidase / L. D. Fricker, S. H. Snyder // *J. Biol. Chem.* – 1983. – Vol. 258, № 18. – P. 10950–10955.
 13. **Соловьев, В. Б.** Влияние ареколина и атропина на активность карбоксипептидазы Н и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в нервной ткани крыс / В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин // *Биомедицинская химия*. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 201–209.
 14. **Соловьев, В. Б.** Влияние никотина на активность основных карбоксипептидаз в отделах мозга и надпочечниках крыс / В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин // *Нейрохимия*. – 2008. – Т. 25, № 4. – С. 294–298.
 15. **Krieger, D. T.** Brain peptides: what, where and why? / D. T. Krieger // *Science*. – 1983. – V. 222, № 4627. – P. 975–985.

References

1. Ashmarin I. P., Nezavibat'ko V. N., Myasoedov N. F. et al. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti* [Journal of higher nervous activity]. 1997, vol. 47, no. 3, pp. 420–430.
2. Gusev E. I., Skvortsova V. I., Myasoedov N. F., Nezavibat'ko V. N., Zhuravleva E. Yu., Vanichkin A. V. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii* [Journal of neurology and psychiatry]. 1997, vol. 97, no. 6, pp. 26–34.
3. Levitskaya N. G., Kamenskiy A. A. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* [Progress of physiological sciences]. 2009, vol. 40, no. 1, pp. 44–65.
4. Dolotov O. V., Karpenko E. A., Inozemtseva L. S., Seredenina T. S., Levitskaya N. G., Dubinina E. V. *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic chemistry]. 2006, vol. 1117, no. 1, pp. 54–60.
5. Silachev D. N., Shram S. I., Shakova F. M., Romanova G. A., Myasoedov N. F. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti* [Journal of higher nervous activity]. 2008, vol. 58, no. 4, pp. 458–466.
6. Eremin K. O., Kudrin V. S., Saransaari P. *Neurochemical Research*. 2005, vol. 30, no. 12, pp. 1493–1500.
7. Pritchard L. E., White A. *Endocrinology*. 2008, vol. 148, no. 9, pp. 4201–4207.
8. Steiner D. F. *Peptide Biosynthesis and Processing*. Boca Raton: CRC Press, 1991, pp. 1–16.
9. Vernigora A. N., Shchetinina N. V., Gengin M. T. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 1996, vol. 61, no. 10, pp. 1848–1856.
10. Vernigora A. N., Gengin M. T. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 1995, vol. 60, no. 12, pp. 1491–1497.

11. Gengin M. T., Vernigora A. N., Nikishin N. N., Makeeva N. V. *Voprosy meditsinskoy khimii* [Problems of medical chemistry]. 1995, vol. 41, no. 5, pp. 37–39.
 12. Fricker L. D., Snyder S. H. *J. Biol. Chem.* 1983, vol. 258, no. 18, pp. 10950–10955.
 13. Solov'ev V. B., Gengin M. T. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical chemistry]. 2008, vol. 54, no. 2, pp. 201–209.
 14. Solov'ev V. B., Gengin M. T. *NeYROKHIMIYA* [Neurochemistry]. 2008, vol. 25, no. 4, pp. 294–298.
 15. Krieger D. T. *Science*. 1983, vol. 222, no. 4627, pp. 975–985.
-

Латынова Ирина Владимировна

аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: latynovai@mail.ru

Latynova Irina Vladimirovna

Postgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Генгин Михаил Трофимович

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: gengin07@yandex.ru

Gengin Mikhail Trofimovich

Doctor of biological sciences, professor, head of sub-department of biochemistry, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Соллертинская Татьяна Николаевна

доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 144)

E-mail: tns-peptidus@mail.ru

Sollertinskaya Tat'yana Nikolaevna

Doctor of medical sciences, professor, leading researcher, Institute of Developmental Physiology and Biochemistry named after I. M. Sechenov of the Russian Academy of Sciences (144 Maurica Thorez avenue, Saint-Petersburg, Russia)

Соловьев Владимир Борисович

доктор биологических наук, доцент, кафедра биохимии, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: solowew@rambler.ru

Solov'ev Vladimir Borisovich

Doctor of biological sciences, associate professor, sub-department of biochemistry, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Живаева Любовь Владимировна

аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: lyubasha8891@mail.ru

Zhivaeva Lyubov' Vladimirovna

Postgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

УДК 577.151.6

Латынова, И. В.

Влияние семакса на активность карбоксипептидазы E в лимбических структурах мозга при выработке условного пищедобывательного рефлекса у крыс / И. В. Латынова, М. Т. Генгин, Т. Н. Соллертинская, В. Б. Соловьев, Л. В. Живаева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. – № 4 (28). – С. 35–43.