Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 657-660.

УДК 577.152.342
©Кручинина, Генгин

ВЛИЯНИЕ РЕБОКСЕТИНА НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Е В НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС

А.Д. Кручинина*, М.Т. Генгин

Пензенский государственный университет,
440026, Пенза, ул. Красная, 40; тел.: +7(8412)-54-84-24; эл. почта: .d.kruchinina@mail.ru

Депрессия является одним из наиболее распространённых психических нарушений, в формировании которых могут участвовать компоненты пептидергической системы мозга. В регуляции уровня нейропептидов в различных отделах нервной системы ключевая роль принадлежит карбоксипептидазе Е. В данной работе изучено влияние однократного введения антидепрессанта ребоксетина на активность карбоксипептидазы Е (КПЕ) в отделах мозга и надпочечниках крыс. Инъекция препарата вызывала снижение активности КПЕ в гипофизе через 12 ч, в гипофизе, четверохолмии, продолговатом мозге, гипоталамусе, гиппокампе и амигдале через 24 ч, в гипофизе и стриатуме через 72 ч. В надпочечниках активность исследуемого фермента не изменялась. По-видимому, уменьшение активности КПЕ, вызванное введением ребоксетина, может оказывать влияние на уровень регуляторных пептидов, вовлечённых в патогенез депрессии.

Ключевые слова: депрессия, карбоксипептидаза Е, ребоксетин, моноамины, нервная ткань, регуляторные пептиды

DOI: 10.18097/PBMC20156105657

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия является распространённым психическим расстройством, характеризующимся пониженным настроением, нарушением мышления и заторможенностью двигательных процессов [1]. Несмотря на многочисленные исследования [2], этиология депрессии окончательно не установлена.

Согласно моноаминовой теории, ключевой механизм развития депрессии связан с гипофункцией и дисбалансом между моноаминовыми системами организма: норадренергической, серотонинергической и дофаминергической [3]. Таким образом, терапия антидепрессантами направлена на увеличение концентрации моноаминов в синаптической щели и на потенцирование синаптической передачи [4].

Об участии норадренергической системы в патогенезе депрессии свидетельствует изменение уровня норадреналина в мозге пациентов [5]. Антидепрессантный эффект ребоксетина связывают с ингибированием нейронального захвата норадреналина и повышением его концентрации в синаптической щели. Кроме того, длительное применение ребоксетина приводит к усилению высвобождения дофамина в гиппокампе и префронтальной коре [6], а также к восстановлению уровня нейротрофического фактора мозга, который снижается при хроническом воздействии стресса, приводящем к появлению симптомов депрессии [7].

Таким образом, селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина нашли свое применение при лечении большого депрессивного расстройства [8]. Тем не менее, в ряде других случаев препараты этой группы оказываются неэффективными. Поэтому актуальным остаётся поиск новых подходов к коррекции депрессивного состояния [9, 10].

Норадренергическая нейромедиаторная система имеет тесные функциональные связи с пептидергической системой. Этот факт стимулировал исследования по изучению роли регуляторных пептидов в развитии депрессивноподобного состояния. Однако молекулярные механизмы участия пептидергической системы в развитии депрессии до конца не изучены.

Так, в крови большинства больных депрессией постоянно повышено содержание АКТГ и кортизола, что связывают с усилением синтеза кортикотропин рилизинг-фактора клетками гипоталамуса и нарушением механизма торможения кортизолом работы гипоталамо-гипофизарной системы [11]. Кроме того, имеются данные о сильном стимулирующем влиянии вазопрессина на синтез АКТГ [12]. В связи с этим, ряд авторов

* - адресат для переписки

рассматривают регуляторные пептиды в качестве возможных терапевтических мишеней для лечения психических расстройств [13].

Карбоксипептидаза Е (КПЕ; КФ 3.4.17.10), отщепляющая остатки С-концевых основных аминокислот пептидов [14], играет важную роль в протеолитическом процессинге предшественников биологически активных пептидов. Высокая активность фермента в отделах мозга, характеризующихся значительным содержанием нейропептидов, говорит об участии КПЕ в обмене регуляторных пептидов.

Возникновение депрессивноподобного состояния у мышей с точечной мутацией в гене КПЕ указывает на участие фермента в психоэмоциональной регуляции [15]. Таким образом, направленное изменение активности КПЕ, по-видимому, позволит регулировать уровень нейропептидов, участвующих в развитии того или иного патологического состояния.

Целью данной работы явилось изучение влияния однократного введения ребоксетина на активности КПЕ в отделах мозга и надпочечниках крыс, характеризующихся высоким уровнем регуляторных пептидов.

МЕТОДИКА

Эксперимент проводили на самцах белых беспородных крыс массой 200-250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Ребоксетин вводили в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно в виде раствора с Твин-80 в 0,9% NaCl. Контрольным животным вводили равный объём стерильного раствора 0,9% NaCl с Твин-80.

Животных декапитировали под хлороформным наркозом через 12 ч, 24 ч, 72 ч после введения препарата. На льду извлекали отделы мозга и надпочечники. Ткань гомогенизировали в 50 мМ натрий ацетатном буфере (1:10; масса/объём), содержащем 50 мМ NaCl, pH 5,6. В полученном гомогенате определяли активность КПЕ и содержание белка.

Активность КПЕ определяли флуориметрически модифицированным методом Fricker и Snyder [16, 17] и выражали в нмоль дансил-Фен-Ала, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчёте на 1 мг белка. Количество белка определяли по методу Lowry [18].

Для оценки ингибирующего воздействия ребоксетина на активность КПЕ *in vitro*, гомогенаты тканей инкубировали с ребоксетином в дозировке, соответствующей эксперименту *in vivo*.

Проверку принадлежности распределения признаков к нормальному распределению производили по критерию хи-квадрат [19]. Достоверность отличий между средними определяли с использованием t-критерия Стьюдента [19]. Анализ отсроченного влияния препаратов на активность фермента проводили с использованием дисперсионного анализа. Принадлежность подгрупп животных к разным гомогенным группам оценивали с помощью метода Шеффе. Сравнение значений каждой из подгрупп дисперсионного комплекса проводили по методике Ньюмена-Кейлса [19]. Корреляционный анализ проводили с помощью эмпирического критерия корреляции [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования активности КПЕ в отделах мозга крыс при введении ребоксетина представлены на рисунке.

У контрольной группы животных через 24 ч после инъекции наблюдается повышение активности КПЕ в четверохолмии, продолговатом мозге, гипоталамусе, гиппокампе по отношению к контрольной группе через 12 ч. Внутрибрюшинная инъекция (как стрессовое воздействие на организм животного) вызывает активацию стресс-протекторных систем. При этом в структурах мозга увеличивается содержание опиоидов, вещества Р [20], уровень которых напрямую зависит от активности ферментов их обмена, одним из которых является КПЕ.

После инъекции ребоксетина животным наблюдаются следующие закономерности в изменении активности КПЕ. Через 12 ч после введения препарата активность изучаемого фермента снижалась только в гипофизе на 56% по отношению к контролю. Через 24 ч после инъекции снижение активности КПЕ происходило в гипофизе, четверохолмии, продолговатом мозге, гипоталамусе, гиппокампе, амигдале на 20%, 46%, 66%, 68%, 55%, и 25% соответственно. Через 72 ч после инъекции активность фермента в гипофизе и стриатуме была снижена на 48% и 22%, повышена в гиппокампе и амигдале на 42% и 34% соответственно. Однократное введение препарата не влияло на активность КПЕ в надпочечниках.

При оценке ингибирующего воздействия ребоксетина на активность КПЕ в условиях *in vitro* не было обнаружено отличий по отношению к контролю, что свидетельствует об опосредованном характере воздействия ребоксетина на активность КПЕ.

В первую очередь, введение ребоксетина оказывает влияние на гипофиз – отдел мозга, синтезирующий и секретирующий большой спектр регуляторных пептидов.

Через 2 ч после приёма концентрация ребоксетина в плазме достигает максимума, а период полувыведения составляет 13 ч. [21]. Несмотря на это, наиболее выраженное изменение активности фермента в нервной ткани крыс наблюдается к 24 ч и 72 ч.

При депрессии отмечено повышение уровня АКТГ, кортикотропин рилизинг-фактора, окситоцина и вазопрессина в плазме [22], что, вероятно, вызвано увеличением активности ферментов их обмена. Введение ребоксетина вызывает опосредованное снижение активности КПЕ, и, как следствие, уменьшение уровня регуляторных пептидов, в процессинге которых участвует фермент. Поскольку нейропептиды играют важную роль в регуляции психоэмоционального состояния, при приёме препарата именно изменение их уровня, по-видимому, приводит к уменьшению выраженности симптомов депрессии.

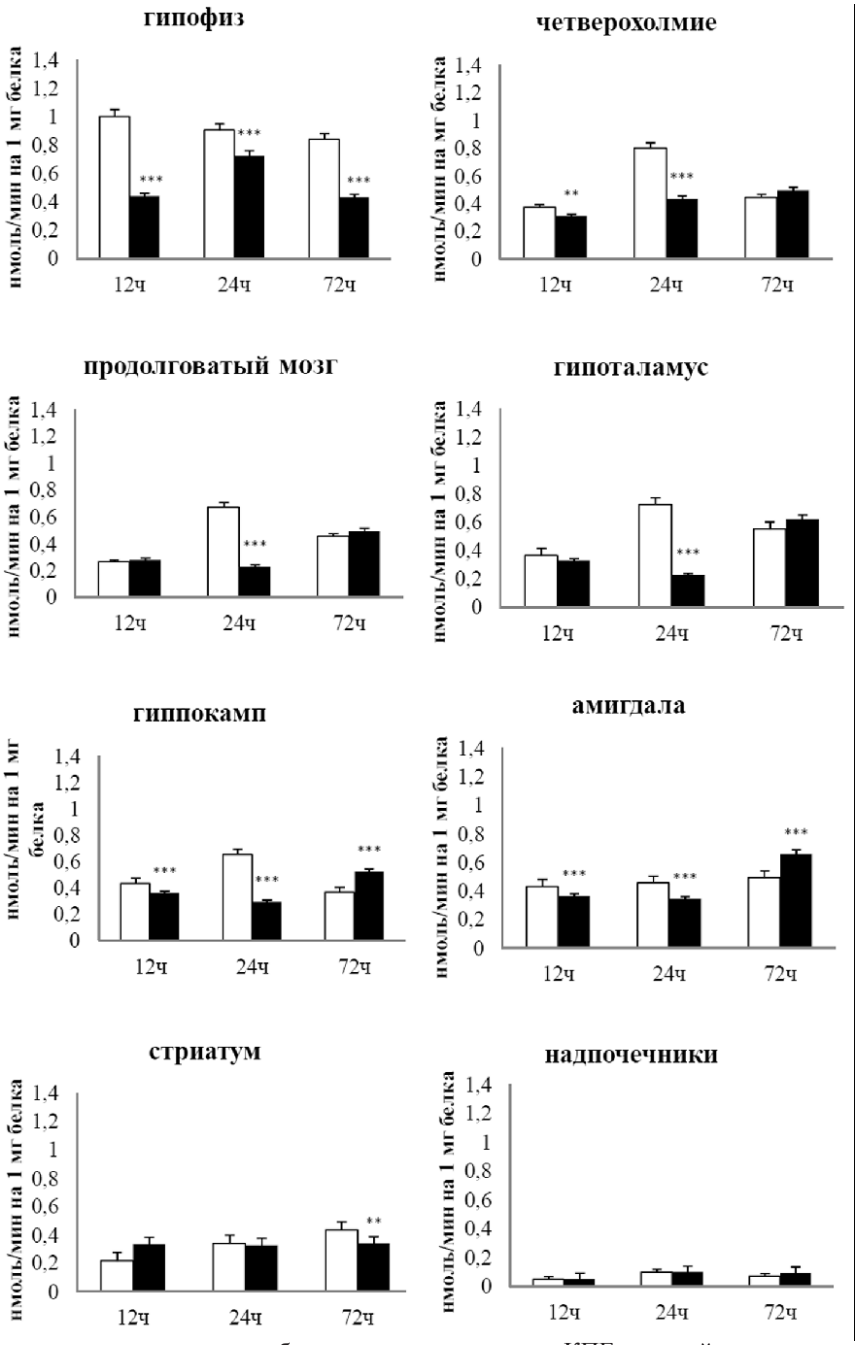

Рисунок. Влияние однократного введения ребоксетина на активность КПЕ при действии в нервной ткани крыс: □ - контроль, ■ - ребоксетин 10 мг/кг. Данные выражены в нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Представлены средние значения (± ошибка средней; n=4-6). Значимость различий: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$ относительно контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникновение симптомов депрессии связывают с изменением уровня регуляторных пептидов в отделах мозга. Уровень нейропептидов зависит от активности ферментов их обмена, одним из которых является КПЕ. Таким образом, направленное изменение активности КПЕ может быть одним из механизмов регуляции уровня биологически активных пептидов, как следствие, уменьшению выраженности симптомов заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Подкорытов В.С., Чайка Ю.Ю.* (2003) Депрессии. Современная терапия, “Торнадо”, Харьков.
2. *Bauer M., Lecrubier Y., Suppes T.* (2008) Eur. Psychiatry, **23**, 169-177.
3. *Hirschfeld R.M.* (2000) J. Clin. Psychiatr., **61**, 4-6.
4. *Humble M.* (2000) Acta Psychiatr. Scand. Suppl., **402**, 28-36.
5. *Delgado P.L., Moreno F.A.* (2000) J. Clin. Psychiatr., **61**, 5-12.

6. *De Bundel D., Femenía T., DuPont C.M., Konradsson-Geuken Å., Feltmann K., Schilström B., Lindskog M.* (2013) Int. J. Neuropsychopharmacol., **16**, 2041-2051.
7. *First M., Gil-Ad I., Taler M., Tarasenko I., Novak N., Weizman A.* (2013) J. Mol. Neurosci., **50**, 88-97.
8. *Sepede G., Corbo M., Fiori F., Martinotti G.* (2012) J. Clin. Ther., **163**, 255-262.
9. *Goldberg J.S., Bell C.E Jr, Pollard D.A.* (2014) Perspect. Medicin. Chem., **3**, 1-8.
10. *Rotzinger S., Lovejoy D.A., Tan L.A.* (2010) Peptides, **31**, 736-756.
11. *Herbert J.* (2013) Psychol. Med., **43**, 449-469.
12. *Zelena D.* (2012) Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem., **12**, 286-303.
13. *Kormos V., Gaszner B.* (2013) Neuropeptides, **47**, 401-419.
14. *Li C., Kim K.* (2009) WormBook, 1-36.
15. *Rodriguiz M., Wilkins J., Creson K., Biswas R., Berezniuk I., Fricker L.D., Fricker A.D., Wetsel C.* (2013) Int. J. Neuropsychopharmacol., **16**, 1-21.
16. *Соловьев В.Б., Генгин М.Т.* (2008) Биомед. химия, **54**, 201-209.
17. *Соловьев В.Б., Генгин М.Т.* (2008) Нейрохимия, **25**, 294-298.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.G., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
19. *Лакин Г.Ф.* (1990) Биометрия, Высш. шк., М.
20. *Drolet G., Dumont E.C., Gosselin I., Kinkead R., Laforest S., Trottier J.F.* (2001) Progr. Neuro-Psych. Biol. Psych., **25**, 729-741.
21. *Dostert P., Benedetti M.S., Poggesi I.* (1997) Eur. Neuropsychopharmacol., **7**, 23-35.
22. *Swaab D.F., Bao A.M., Lucassen P.J.* (2005) Ageing Res. Rev., **4**, 141-194.

Поступила: 03. 12. 2014.

EFFECT OF REBOXETINE ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE E IN THE NERVE TISSUE OF RATS

A.D. Kruchinina, M.T. Gengin

Penza State University,
40 Krasnaya str., Penza, 440026 Russia; tel: +7(8412)-54-84-24; e-mail: a.d.kruchinina@mail.ru

Depression is one of the most common mental disorders, but its etiology is not completely understood. It is assumed that peptidergic system components are involved in the formation of this pathology. Neuropeptides play an important role in the regulation of mental and emotional states. Carboxypeptidase E is a key enzyme of peptide processing; it regulates neuropeptide levels in the various structures of the nervous system. We have studied effects of a single dose of reboxetine on the activity of carboxypeptidase E in various brain regions and the adrenal glands of rats. The reboxetine injection decreased carboxypeptidase E activity in the pituitary gland (12 h after injection), in the pituitary gland, the quadrigeminal bodies, the medulla oblongata, the hypothalamus, the hippocampus and the amygdala (24 h after injection), in the pituitary gland and striatum (72 h after injection). The enzyme activity in adrenal glands remained basically unchanged. Apparently, the decrease of carboxypeptidase E activity may influence the level of regulatory peptides involved in the pathogenesis of depression.

Key words: depression, carboxypeptidase E, reboxetine, monoamines, nerve tissue, regulatory peptides