

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616.858:615.214

УЧАСТИЕ СЕРОТОНИНОВЫХ, ГЛУТАМАТНЫХ И ГАМК-РЕЦЕПТОРОВ В ПРОЯВЛЕНИИ АНТИДЕПРЕССИВНОПОДОБНОГО ЭФФЕКТА ЦИКЛОПРОЛИЛГЛИЦИНА

© 2019 г. А. А. Абдуллина¹, *, Е. В. Васильева¹, Е. А. Кондрахин¹, Г. И. Ковалёв¹, *

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.12.2018 г.

После доработки 07.02.2019 г.

Принята к публикации 11.02.2019 г.

В работе изучено влияние двухнедельного введения пептида циклопролилглицина (ЦПГ) (1 и 2 мг/кг/сутки, в/б) на характеристики связывания серотониновых 5-HT_{2A}-, NMDA-, метаботропных глутаматных mGluII-, ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов в мозге мышей инбредной линии BALB/c в условиях *in vitro* и *ex vivo*. Обнаружено, что ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг/сутки снижает плотность 5-HT_{2A}-рецепторов в стриатуме мышей на 24 и 28% соответственно. Снижение плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе наблюдалось только в дозе 2 мг/кг/сутки и составило 22%. При этом наблюдалось увеличение плотности ГАМК_A-рецепторов во фронтальной коре в дозе 1 мг/кг/сутки на 36% по сравнению с контролем. Двухнедельное введение ЦПГ в обеих дозах не сказывалось на величинах B_{max} mGluII- и ГАМК_B-рецепторов, а также на величинах K_d во всех группах. В радиолигандном анализе *in vitro* ЦПГ не влиял на специфическое связывание меченых лигандов выбранных рецепторов. Полученные данные впервые указывают на функциональное вовлечение 5-HT_{2A}-, NMDA- и ГАМК_A-рецепторов в формирование антидепрессивноподобного эффекта циклопролилглицина у мышей BALB/c.

Ключевые слова: BALB/c, циклопролилглицин, антидепрессивноподобный эффект, серотонин, глутамат, ГАМК, стриатум, гиппокамп, фронтальная кора, 5-HT_{2A}-рецепторы, NMDA-рецепторы, mGluII-рецепторы, ГАМК_A-рецепторы, ГАМК_B-рецепторы, [³H]Кетансерин, [³H]МК-801, [³H]LY354740, [³H]SR-95531, [³H]Баклофен

DOI: 10.1134/S1027813319030026

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразие клинических проявлений депрессии, множественность молекулярных механизмов действия антидепрессантов разных групп свидетельствуют об участии в патогенезе депрессивных расстройств взаимосвязанных нарушений ряда нейрохимических систем. Одной из основных нейромедиаторных систем, задействованных в патогенезе депрессии, является серотонинергическая. Об ее участии в патогенезе депрессии свидетельствуют снижение концентрации серотонина в мозге у больных и ее увеличение при клиническом улучшении, обострение симптомов депрессии при гипотриптофановой диете, снижение плотности транспортеров, осуществляющих обратный захват серотонина, а также нейрорецепторные и генетические исследования. Кроме того, эта система тесно взаимодействует с глутаматер-

гической и ГАМКергической системами, которые также участвуют в развитии депрессивной симптоматики [1].

Установлено, что на фоне депрессивных расстройств наблюдается гиперпродукция глутамата и чрезмерная активация глутаматергической системы, что приводит к эксайтотоксичности и нарушению нейропластичности. Кроме того, антагонисты NMDA- и mGluII-рецепторов проявляют антидепрессивноподобный эффект в животных моделях депрессии, а также повышают активность серотонинергических нейронов в дорсальном ядре шва и увеличивают концентрацию внеклеточного серотонина в префронтальной коре головного мозга у крыс [2].

ГАМК является функциональным антагонистом глутамата и способна ограничивать его возбуждающее действие. При депрессии наблюдается уменьшение концентрации ГАМК в плазме, спинномозговой жидкости и мозге, снижение уровня ГАМК-активных стероидов, нарушается

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская, 8, тел. (495) 601-20-51; e-mail: geo-kovalev@yandex.ru, aliyeabla@mail.ru.

экспрессия генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов [3, 4].

Известно также, что антагонисты ГАМК_B-рецепторов, как и агонисты ГАМК_A-рецепторов оказывают антидепрессивноподобный эффект в экспериментальных моделях депрессии на животных и стимулируют нейрогенез [5, 6].

В качестве эндогенного вещества мозга крыс циклопролилглицин был обнаружен в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в 1996 г. [7], позже это было подтверждено другими исследователями [8]. Изучение фармакологической активности ЦПГ показало наличие у пептида психофармакологической активности [9, 10], а также способность увеличивать содержание BDNF в культуре клеток гиппокампа в опытах *ex vivo* и *in vitro* [11]. Учитывая эти сведения, а также известные факты о роли снижения продукции BDNF в патогенезе депрессии [12], нами были проведены исследования по выявлению возможной антидепрессивноподобной активности ЦПГ. В результате серии экспериментов было обнаружено, что в тесте “Вынужденное плавание” по Порсолту ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг/сутки демонстрирует на инбредных мышцах BALB/c антииммобилизационный эффект, сопоставимый с таковым у антидепрессанта флуоксетина в дозе 10 мг/кг [13]. Однако рецепторные механизмы реализации данного эффекта оставались невыясненными.

Таким образом, целью данной работы стало изучение влияния ЦПГ на характеристики серотониновых 5-HT_{2A}-, NMDA-, метаботропных глутаматных mGluII-, ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов в мозге мышей инбредной линии BALB/c после двухнедельного введения в дозах, эквивалентных по антидепрессивноподобному эффекту.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Исследования проводили на самцах мышей линий BALB/c массой 25–30 г, которых содержали в виварии ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum*, по 10 особей в клетке в течение 1-й недели до начала эксперимента, на стандартной диете при 12-часовом световом режиме. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”. Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”. Животным посредством

внутрибрюшинных инъекций в течение 14 дней один раз в сутки вводили физиологический раствор (контрольная группа — NaCl, 0.9%), либо ЦПГ, растворенный в физрастворе (опытные группы) в дозах 1 и 2 мг/кг/сутки.

После тестирования мышей декапитировали, головной мозг извлекали на лед и выделяли фронтальную кору, стриатум и гиппокамп по общепринятой схеме [14] для проведения радиорецепторного анализа.

Вещества

ЦПГ был синтезирован и предоставлен Отделом химии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова (зав. — член-корр. РАН Т.А. Гудашева). Для изучения рецепторного связывания использовали следующие лиганды: [³H]Кетансерин с удельной активностью 60 Кюри/ммоль (“Perkin Elmer”), [³H]SR-95531 (49.5 Кюри/ммоль, “Perkin Elmer”), [³H](–)Баклофен (49.7 Кюри/ммоль, “Perkin Elmer”), [³H](+)МК-801 (210 Кюри/ммоль) и [³H]LY354740 (42 Кюри/ммоль) были синтезированы профессором, д. х. н. Ю.А. Золотарёвым в ОХФВБ ИМГ РАН (зав. отделом — академик РАН Н.Ф. Мясоедов). Остальные реактивы были приобретены в коммерческих источниках.

5-HT_{2A}-рецепторы

Выделение плазматических мембран с 5-HT_{2A}-рецепторами стриатума. Изучение радиорецепторного связывания с 5-HT_{2A}-рецепторами серотонина проводили по методу Leysen et al. (1982) с модификациями [15]. Мышей BALB/c декапитировали, извлекали стриатум. Выделенные структуры гомогенизировали в 10 мл ледяного (0–4°C) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7.4 при 4°C), используя гомогенизатор Potter S “тефлон-стекло”.

Полученную суспензию центрифугировали при 40000 g в течение 20 мин в ультрацентрифуге “L7-35” (“Beckman Coulter”). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 10 мл инкубационного буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания с [G-³H]-лигандами рецепторов. Инкубационный буфер для связывания с 5-HT_{2A}-подтипом рецепторов стриатума мышей содержал 50 mM Tris-base, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂ · 2H₂O, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O (pH 7.4 при 37°C).

Радиолигандный анализ 5-HT_{2A}-рецепторов. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл или [³H](+)Ketanserin, 250 мкл

буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда (Ketanserin, 1 мМ). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов.

NMDA-рецепторы

Выделение плазматических мембран с NMDA-рецепторами гиппокампа. Выделение плазматических мембран гиппокампа проводили по модифицированным методам [16, 17]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C . В день эксперимента гиппокампы размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон-стекло” в 10 объемах буфера № 1 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, 0.32 М сахароза, pH 7.6). Гомогенат разбавляли 50 объемами буфера № 2 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, pH 7.6) и центрифугировали при 1000 g 10 мин на ультрацентрифуге “Optima L-70K” (“Beckman Coulter”). Супернатант сливали и вновь центрифугировали при 25000 g 20 мин. Для увеличения выхода белка эту операцию проводили дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и центрифугировали при 8000 g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 3 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Tris, 1 мМ Na_4EDTA , pH 7.6) и троекратно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объемах буфера № 2 и однократно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объемах буфера № 2 и замораживали в криопробирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 10 объемах буфера № 2, центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера № 2.

Радиолигандный анализ NMDA-рецепторов. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл $[^3\text{H}](+)\text{MK}-801$, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда $(+)\text{MK}-801$, 1 мМ). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

mGluII-рецепторы

Выделение плазматических мембран с mGluII-рецепторами гиппокампа. Выделение mGluR-рецепторов проводили по методу [18]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C . В день эксперимента ткань мозга размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон-

стекло” в 25 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1). Гомогенат центрифугировали при 48000 g 10 мин. Полученный осадок гомогенизировали в буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1) и инкубировали при 37°C 10 мин, затем центрифугировали при 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера и замораживали в криопробирках при -80°C . В день эксперимента мембраны размораживали и центрифугировали 3 раза в буфере (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl_2 , pH 7.4) 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl_2 , pH 7.4). Концентрация белка в образцах мембран составляла 0.25 мг/мл.

Радиолигандный анализ mGluII-рецепторов. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл $[^3\text{H}]\text{LY 354740}$, 200 или 250 мкл буфера (50 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl_2 , pH 7.4) и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда (глутамат). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч.

ГАМК_A-рецепторы

Выделение плазматических мембран с ГАМК_A-рецепторами коры мозга. Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК_A-рецепторы коры мозга мышей BALB/c проводили по модифицированным методам [19, 20]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C . В день эксперимента фронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон-стекло” в 20 объемах ледяного буфера (0.32 М Сахароза; pH 7.1). Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге “Optima L-70K” (“Beckman Coulter”) в течение 10 мин при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл холодной дистиллированной воды и центрифугировали 8000 g 20 мин. Супернатант и желтый надосадочный слой повторно центрифугировали при 48000 g 20 мин. Осадок суспендировали в 0.05 М Tris-citrate буфере (pH 7.1) и центрифугировали 48000 g 20 мин. Полученную мембранную фракцию замораживали и хранили при -80°C . В день эксперимента мембраны суспендировали в 40 объемах 0.05 М Tris-citrate буфера (pH 7.1) и центрифугировали при 48000 g 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 40 объемах 0.05 М Tris-citrate буфера (pH 7.1) и инкубировали при 24°C в течение 30 мин и снова центрифугировали при 48000 g 20 мин. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере.

Радиолигандный анализ ГАМК_A-рецепторов. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл)

содержала 50 мкл [^3H]SR 95531, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда SR 95531 (габазина), 1 мМ. Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 1 ч.

ГАМК_B-рецепторы

Выделение плазматических мембран с ГАМК_B-рецепторами коры мозга. Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК_B-рецепторы коры мозга мышей BALB/c проводили по модифицированному методу [21, 22]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C. В день эксперимента фронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон-стекло” в 10 объемах ледяного буфера (0.32 М сахараза; pH 7.4). Образовавшийся гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g 20 мин. Затем полученный осадок ресуспендировали в дистиллированной воде и вновь центрифугировали 20 мин при 8000 g. Образовавшийся супернатант и верхний надосадочный слой центрифугировали 20 мин при 48000 g, а осадок ресуспендировали и вновь центрифугировали в 50 мМ Tris-Citrate буфере (pH 7.4) 2 раза по 20 мин при 48000 g, после чего замораживали при -80°C. В день эксперимента мембраны размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 20 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, 2.5 мМ CaCl₂, pH 7.4), затем центрифугировали при 8000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 20 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, 2.5 мМ CaCl₂, pH 7.4) и центрифугировали при 20000 g 20 мин, последнюю процедуру повторяли еще один раз. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере.

Радиолигандный анализ ГАМК_B-рецепторов. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл [^3H](-)Баклофена, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда (-)Баклофена, 1 мМ. Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 мин.

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия

По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/V (“Whatman”), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 ч при комнатной температуре. Каждую пробирку промывали два раза холодным буфером, затем фильтры промывали два раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл

сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г РРО, 0.2 г РОРОР на 1 л толуола). Радиоактивность проб определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR (“Perkin Elmer”) с эффективностью счета 42–46%. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури (1951).

Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad Prism 4 Demo и Statistica 6.0. Результаты представлены в виде “mean $\pm$ S.E.M”.

Обработка и представление результатов

В экспериментах *in vitro* величину IC₅₀ по отношению к связыванию меченых лигандов определяли при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемых соединений в конечных концентрациях в диапазоне 10⁻¹⁰–10⁻⁴ М. Объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Для построения кривых вытеснения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 3-х повторностях.

Результаты экспериментов *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин K_d и $B_{\max}$, отражающих степень сродства рецептора к лиганду (нМ) и количество мест связывания лиганда (фмоль/мг белка), соответственно. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания $B_{\max}$ и K_d измеряли специфическое связывание для 5-HT_{2A}-рецепторов – от 0.625 до 20 нМ, для NMDA-рецепторов в диапазоне концентраций от 1.25 до 20 нМ, для mGluII-рецепторов – от 12.5 до 200 нМ, для ГАМК_A-рецепторов – от 2.5 до 40 нМ, для ГАМК_B-рецепторов – от 2.5 до 20 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 2-х повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В радиолигандном анализе *in vitro* ЦПГ не влиял на специфическое связывание меченых лигандов выбранных рецепторов во всем интервале используемых концентраций, что говорит об отсутствии прямого конкурентного взаимодействия изучаемого соединения с лигандами 5-HT_{2A}-, NMDA-, mGluII-, ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов. Величины IC₅₀ для ЦПГ составили >100 мкмоль/л (табл. 1).

В опытах *ex vivo* различий между контролем и опытными группами в аффинитете (K_d) всех изучаемых типов рецепторов по отношению к их специфическим лигандам выявлено не было. Графики насыщения 5-HT_{2A}-, NMDA-, метаболитных глутаматных mGluII-, ГАМК_A- и

Таблица 1. Потенциал конкурентного взаимодействия ЦПГ с серотониновыми, глутаматными и ГАМК-рецепторами *in vitro* (IC_{50} , мкмоль/л) $m \pm S.E.M.$ ($n = 3$)

Вещества	Рецепторы				
	5-HT _{2A} (стриатум)	NMDA (гиппокамп)	mGluR (гиппокамп)	ГАМК _A (кора мозга)	ГАМК _B (кора мозга)
Лиганд	Кетансерин 0.014 ± 0.008	МК-801 0.007 ± 0.004	LY354740 0.020 ± 0.001	SR-95531 1.45 ± 0.002	Баклофен 1.50 ± 0.002
ЦПГ	>100	>100	>100	>100	>100

Таблица 2. Влияние ЦПГ на характеристики связывания с рецепторами мозга мышей BALB/c *ex vivo* после двухнедельного введения ($m \pm S.E.M.$)

Рецепторы	Вещества					
	Контроль		ЦПГ 1 мг/кг/сутки		ЦПГ 2 мг/кг/сутки	
	B_{max} , фмоль/мг	K_d , нМ	B_{max} , фмоль/мг	K_d , нМ	B_{max} , фмоль/мг	K_d , нМ
5-HT _{2A}	823 ± 69	23.7 ± 3.2	$626 \pm 49^*$	20.0 ± 2.6	$595 \pm 45^*$	21.6 ± 2.7
NMDA	1977 ± 79	2.4 ± 0.3	2024 ± 71	2.0 ± 0.3	$1544 \pm 43^*$	2.4 ± 0.2
mGluR	1615 ± 86	161.7 ± 15.3	1673 ± 78	168.3 ± 13.8	1518 ± 83	181.6 ± 17.0
ГАМК _A	2033 ± 154	13.5 ± 2.4	$2777 \pm 222^*$	13.8 ± 2.6	2213 ± 161	12.7 ± 2.3
ГАМК _B	259 ± 9	34.9 ± 1.7	281 ± 13	45.6 ± 2.9	285 ± 13	44.5 ± 2.8

Примечание: * статистически значимые отличия от контроля (*t*-тест Стьюдента).

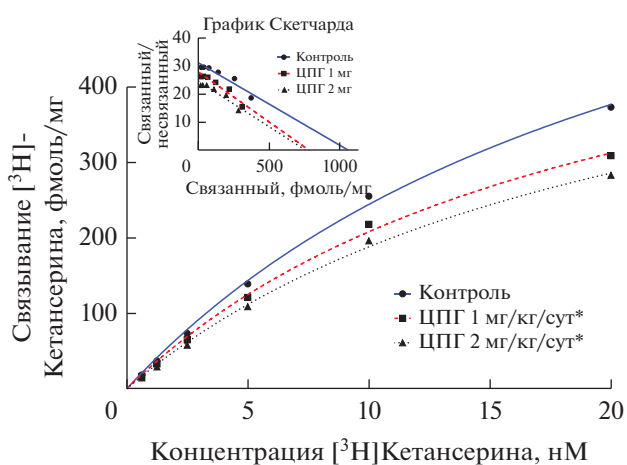
ГАМК_B-рецепторов мозга мышей инбредной линии BALB/c под влиянием двухнедельного введения ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг/сутки, а также результаты их преобразования по Скетчарду представлены на рис. 1–3. Рассчитанные величины характеристик рецепторного связывания K_d и B_{max} для выбранных типов рецепторов – в табл. 2.

Обнаружено, что под влиянием ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг/сутки происходило снижение количества мест связывания (B_{max}) 5-HT_{2A}-рецепторов в стриатуме мышей на 24 и 28% соответственно: $B_{max} = 626 \pm 49$ и 595 ± 45 фмоль/мг против 823 ± 69 фмоль/мг в контроле ($p < 0.05$, *t*-тест Стьюдента) (рис. 1).

Двухнедельное введение ЦПГ в дозе 2 мг/кг/сутки снижало плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе мышей BALB/c на 22% $B_{max} = 1544 \pm 43$ фмоль/мг против 1977 ± 79 фмоль/мг в контроле ($p < 0.05$, *t*-тест Стьюдента), в дозе 1 мг/кг/сутки – никаких изменений не происходило (рис. 2а).

В результате двухнедельного введения ЦПГ в дозе 1 мг/кг/сутки увеличивалась плотность ГАМК_A-рецепторов в коре мышей BALB/c на 36% $B_{max} = 2777 \pm 222$ фмоль/мг против 2033 ± 154 фмоль/мг в контроле ($p < 0.05$, *t*-тест Стьюдента), в дозе 2 мг/кг/сутки эффектов не обнаруживалось (рис. 3а).

Под воздействием ЦПГ в изучаемых дозах эффектов в отношении B_{max} для селективного агониста mGluR-рецепторов [³H]LY354740 и селективного агониста ГАМК_B-рецепторов [³H]-Баклофена не было обнаружено (рис. 2б и 3б).

**Рис. 1.** Влияние циклопролилглицина на связывание [³H]Кетансерина с 5-HT_{2A}-рецепторами стриатума мышей BALB/c (кривая насыщения и график Скетчарда).

Примечание: * статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$; *t*-тест Стьюдента).

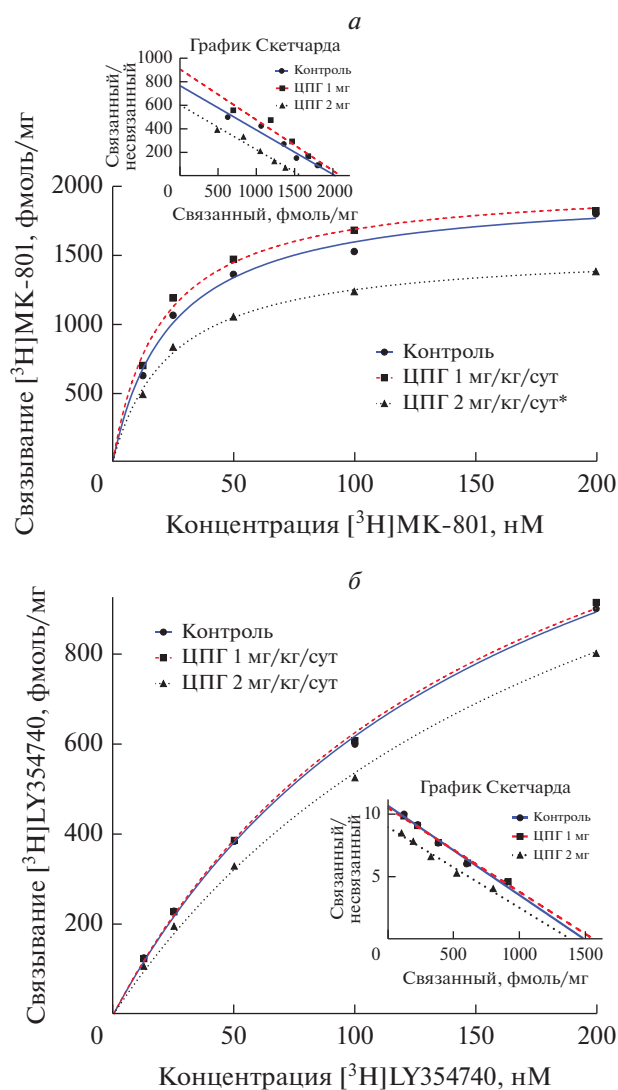


Рис. 2. Влияние циклопролилглицина на связывание $[^3\text{H}](+)\text{MK-801}$ с NMDA-рецепторами (а), $[^3\text{H}]\text{-LY354740}$ с метаботропными глутаматными mGluR-рецепторами (б) гиппокампа мышей BALB/c (кривая насыщения и график Скетчарда).

Примечание: * статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$; t -test Стьюдента).

В большинстве доклинических исследований проявление депрессивноподобного фенотипа связывают с активацией 5-HT_{2A} -рецепторов. Показано, что агонист 5-HT_{2A} -рецепторов DOI увеличивает время иммобилизации мышей в тесте "Вынужденное плавание", а предварительное введение антагониста рецепторов этого подтипа MDL100907 нивелирует этот эффект. Кроме того, снижение экспрессии 5-HT_{2A} -рецепторов, вызванное интрацеребровентрикулярной инъекцией антисмысловых олигонуклеотидов, как и введение антагонистов EMD281014 и MDL100907,

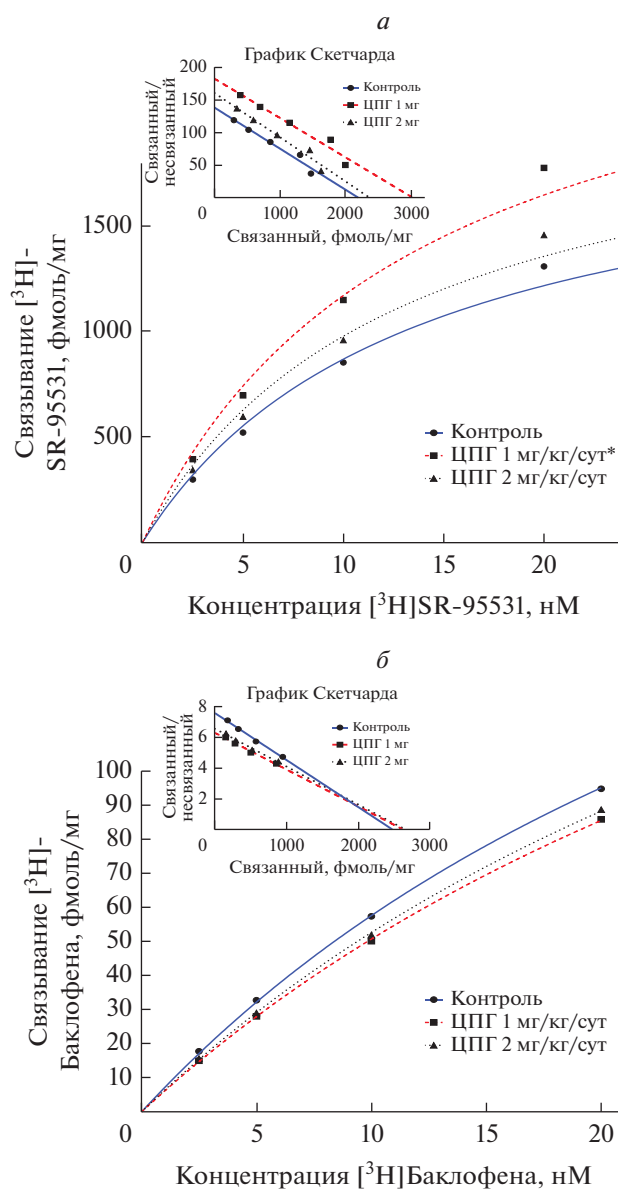


Рис. 3. Влияние циклопролилглицина на связывание $[^3\text{H}]\text{SR-95531}$ с GABA_A -рецепторами (а), $[^3\text{H}]\text{-Bаклофена}$ с GABA_B -рецепторами (б) коры мышей BALB/c (кривая насыщения и график Скетчарда).

Примечание: * статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$; t -test Стьюдента).

уменьшают время иммобилизации грызунов в тесте Порсолта [23].

В ряде клинических исследований было показано, что одновременный прием блокаторов 5-HT_{2A} -рецепторов и селективных ингибиторов обратного захвата серотонина усиливает антидепрессивный эффект последних у пациентов с резистентной депрессией [24]. При посмертных исследованиях у лиц, страдавших депрессией и покончивших жизнь самоубийством, было обнаружено увеличение плотности 5-HT_{2A} -рецепторов в определенных

областях префронтальной коры. Известно также, что большинство антидепрессантов при хроническом применении вызывают десенситизацию и снижение плотности 5-HT_{2A}-рецепторов в мозге крыс [25].

Все вышесказанное указывает на то, что антидепрессивный эффект связан со снижением активности 5-HT_{2A}-рецепторов. Подобная картина наблюдается и в наших результатах: в мозге мышей линии BALB/c, на которых была выявлена антидепрессивноподобная активность ЦПГ, плотность серотониновых рецепторов уменьшалась.

Известно также, что 5-HT_{2A}-рецепторы способны модулировать активность NMDA-рецепторов, а именно активация первых вызывает увеличение активности последних [26], что может приводить к усугублению депрессивной симптоматики.

Большое количество доклинических и клинических исследований показали, что антагонисты NMDA-рецепторов обладают антидепрессивным потенциалом, эффект многих антидепрессантов напрямую связывают с блокадой NMDA-рецепторов [2]. Таким образом, уменьшение количества мест связывания NMDA-рецепторов в мозге мышей BALB/c на фоне снижения 5-HT_{2A}-рецепторов под влиянием ЦПГ в дозе 2 мг/кг/сутки в нашем исследовании не противоречит опубликованным ранее данным.

С помощью ЯМР-спектроскопии было показано, что у пациентов с депрессией концентрация ГАМК в затылочной коре головного мозга была значительно ниже, чем у здоровых людей. Снижение концентрации ГАМК было выражено сильнее у пациентов с меланхолической депрессией. Прием флуоксетина и циталопрама увеличивал концентрацию ГАМК в затылочной области. Кроме того, существуют данные, свидетельствующие о способности ингибиторов обратного захвата норадреналина и серотонина потенцировать ГАМКергическую передачу и синтез нейростероидов [27]. Можно предположить, что эффекты антидепрессантов связаны с активацией ГАМКергической системы. Помимо этого было установлено, что активация 5-HT_{2A}-рецепторов в префронтальной коре запускает внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий к усилению фосфорилирования протеинкиназой C γ 2-субъединицы ГАМК_A-рецептора, что вызывает ослабление ГАМКергического торможения. А дисбаланс возбуждения и торможения, как известно, способен вызвать вторичный дефицит функциональной активности моноаминергических нейронов [28]. Следовательно, эта часть полученных нами данных также не противоречит приведенным выше: у мышей BALB/c под влиянием ЦПГ в дозе 1 мг/кг/сутки происходит увеличение плотности ГАМК_A-рецепторов на фоне снижения 5-HT_{2A}-рецепторов.

Тот факт, что ЦПГ в дозе 2 мг/кг/сутки уменьшает плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе также может быть связан и с увеличением продукции ГАМК, так как последняя является функциональным антагонистом глутамата и способна ограничивать его возбуждающее действие [3].

Таким образом, суммируя полученные результаты нашего пилотного исследования, можно сделать заключение, что 5-HT_{2A}-, NMDA-, ГАМК_A-рецепторы принимают участие в реализации антидепрессивноподобного эффекта ЦПГ. При этом наблюдается различная чувствительность к дозам пептида: изменения плотности ГАМК_A-рецепторов происходят под влиянием ежесуточной дозы ЦПГ 1 мг/кг, плотности NMDA-рецепторов — при дозе ЦПГ 2 мг/кг, тогда как рецепторы серотонина отзываются на действие обеих доз пептида.

ВЫВОДЫ

1. Двухнедельное введение ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг/сутки вызывает снижение плотности 5-HT_{2A}-рецепторов в мозге мышей BALB/c.
2. Двухнедельное введение ЦПГ в дозе 1 мг/кг/сутки приводит к увеличению плотности ГАМК_A-рецепторов в коре мозга мышей линии BALB/c, а в дозе 2 мг/кг/сутки — к уменьшению плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе мышей этой же линии.
3. 5-HT_{2A}-, NMDA- и ГАМК_A-рецепторы принимают участие в реализации антидепрессивноподобного эффекта ЦПГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левчук Л.А., Шмиголь М.В., Иванова С.А. // СВПН. 2012. № 2. С. 75–79.
2. Machado-Vieira R., Henter I.D., Zarate C.A. // Prog. Neurobiol. 2015. V. 152. P. 21–37.
3. Möhler H. // Neuropharmacology. 2012. V. 62. № 1. P. 42–53.
4. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. // Экспер. клин. фармакол. 2011. Т. 74. № 2. С. 47–52.
5. Ghose S., Winter M.K., McCarson K.E., Tamminga C.A., Enna S.J. // Br. J. Pharmacol. 2011. V. 162. № 1. P. 1–17.
6. Smith K.S., Rudolph U. // Neuropharmacology. 2012. V. 62. № 1. P. 54–62.
7. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., Ostrovskaya R.U., Skoldinov S.P., Rozantsev G.G., Voronina T.A., Zherdev V.P., Seredenin S.B. // FEBS Lett. 1996. V. 391. № 1–2. P. 149–152.
8. Tran L.H. US Patent Appl. 2003 / 0109531. 2003.
9. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Бойко С.С., Ковалев Г.И., Воронин М.В., Яркова М.А. // Бюл. экспер. биол. 2002. Т. 133. № 4. С. 417–419.
10. Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. // Бюл. экспер. биол. и мед. 2015. Т. 160. № 11. С. 600–603.

11. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // ДАН. 2016. Т. 469. № 4. С. 492–495.
12. Duman R.S., Voleti B. // Trends Neurosci. 2012. V. 35. № 1. P. 47–56.
13. Ковалёв Г.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // Экспер. клин. фармакол. 2018. Т. 81. № 11. С. 3–6.
14. Glowinski J., Iversen L.L. // J. Neurochem. 1966. V. 13. № 8. P. 655–669.
15. Leysen J.E., Niemegeers C.J. // Mol. Pharmacol. 1982. V. 21. № 2. P. 301–314.
16. Zhou L.M., Gu Z.Q., Costa A.M., Yamada K.A., Manssone P.E. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. V. 280. № 1. P. 422–427.
17. LaPage K.T., Ishmael J.E., Low C.W., Traynelis S.F., Murray T.F. // Neuropharmacology. 2005. V. 49. P. 1–16.
18. Schaffhauser H., Richards J.G., Cartmell J., Chaboz S., Kemp J.A., Klingelschmidt A., Messer J., Stadler H., Woltering T., Mutel V. // Mol. Pharmacol. 1998. V. 53. P. 228–233.
19. Ito Y., Koo Lim D., Hayase Y., Murakoshi Y., Ho I. // Neurochem. Res. 1992. V. 4. P. 307–313.
20. Hawkinson J.E., Acosta-Burrue M., Kimbrought C.L., Goodnough D., Wood P.L. // Eur. J. Pharmacol. 1996. V. 304. P. 141–146.
21. Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L. // Neuropharmacology. 1985. V. 24. № 3. P. 207–10.
22. Szekely A.M., Barbaccia M.L., Costa E. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1987. V. 243. № 1. P. 155–9.
23. Guiard B., Di Giovanni G. // Front. Pharmacol. 2015. V. 6. № 46.
24. Celada P., Puig M., Amargós-Bosch M., Adell A., Artigas F. // J. Psychiatry Neurosci. 2004. V. 29. № 4. P. 252–265.
25. Eison A.S., Mullins U.L. // Behav. Brain Res. 1995. V. 73. № 1–2. P. 177–181.
26. Abernathy K., Chandler L.J., Woodward J.J. // Int. Rev. Neurobiol. 2010. V. 91. P. 289–320.
27. Калыев А.В., Хамм Д.Дж. // Экспер. клин. фармакол. 2004. Т. 67. № 4. С. 71–76.
28. Feng J., Cai X., Zhao J., Yan Z. // J. Neurosci. 2001. V. 21. № 17. P. 6502–6511.

Participation of Serotonin, Glutamate, and GABA Receptors in the Manifestation of Antidepressant-Like Effect of Cyclopropylglycine

A. A. Abdullina^{a, #}, E. V. Vasilyeva^a, E. A. Kondrakhin^a, and G. I. Kovalev^{a, #}

^a*Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: geo-kovalev@yandex.ru, aliyeabla@mail.ru*

Received December 21, 2018;

Revised February 7, 2019;

Accepted February 11, 2019

We studied the effect of two-week-long administration of cyclopropylglycine peptide (CPG) (1 and 2 mg/kg/day, i.p.) on the binding characteristics of serotonin 5-HT_{2A}-, NMDA-, metabotropic glutamate mGluII-, GABA_A- and GABA_B-receptors in the brain of inbred BALB/c mice in vitro and ex vivo. It was found that CPG at doses of 1 and 2 mg/kg/day reduces the density of 5-HT_{2A} receptors in the striatum of mice by 24 and 28%, respectively. A decrease in the density of NMDA receptors in the hippocampus was observed only at a dose of 2 mg/kg/day and was 22%. At the same time, there was an increase in the density of GABA_A receptors in the frontal cortex at a dose of 1 mg/kg/day by 36% compared with the control. The two-week administration of CPG at both doses did not affect B_{max} of mGluII- and GABA_B receptors, as well as K_d in all groups. In the in vitro radioligand assay, the CPG did not affect the specific binding of the labeled ligands of the studied receptors. The obtained data for the first time indicate the functional involvement of 5-HT_{2A}, NMDA and GABA_A receptors in the formation of the antidepressant-like effect of cyclopropylglycine in BALB/c mice.

Keywords: BALB/c, cyclopropylglycine, antidepressant-like effect, serotonin, glutamate, GABA, striatum, hippocampus, frontal cortex, 5-HT_{2A} receptors, NMDA receptors, mGluII receptors, GABA_A receptors, GABA_B receptors, [³H]Ketanserin, [³H]MK-801, [³H]LY354740, [³H]SR-95531, [³H]Baclofen