*РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И. М. СЕЧЕНОВА*

*RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY*
*(formerly I. M. Sechenov Physiological Journal)*
*97 · N 11 · 2011*

# ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИППОКАМПА

*© В. Г. Скребицкий, Р. В. Кондратенко, И. С. Поваров, В. И. Деревягин*

Учреждение Российской академии медицинских наук —
Научный центр неврологии РАМН, Россия, 105064, Москва, пер. Обуха, 5,
e-mail: skrebitsky@yahoo.com

В статье представлены результаты изучения физиологических механизмов действия двух нейропептидов, широко используемых в клинической практике в качестве ноотропов и анксиолитиков: ноопепта — пептидного аналога пирацетама и селанка — синтетического аналога пептида тафцина. С помощью метода пэтч-кламп на срезах гиппокампа изучена модуляция спонтанных тормозных ионных токов в пирамидных нейронах при действии исследуемых нейропептидов. Показано, что основным эффектом обоих веществ является увеличение частоты спонтанных тормозных постсинаптических токов (ТПСТ) в пирамидах радиального слоя поля CA1, которое, очевидно, является следствием увеличения частоты разрядов тормозных интернейронов, оканчивающихся на этих клетках (показано только для ноопепта). Следствием увеличения частоты ТПСТ в пирамидных нейронах является усиление тормозного контроля гиппокампом лимбических структур мозга, что в свою очередь, очевидно, лежит в основе анксиолитического эффекта обоих препаратов. Механизмы их ноотропного действия будут предметом наших дальнейших исследований.

*Ключевые слова*: ноопепт, селанк, ноотропы, анксиолитики, гиппокамп, метод пэтч-кламп, ТПСТ, тормозные интернейроны.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 97. № 11. С. 00—00. 2011.

*V. G. Skrebitsky*, *R. V. Kondratenko*, *I. S. Povarov*, *V. I. Dereviagin.* PEPTIDERGIC MODULATION OF THE HIPPOCAMPUS SYNAPTIC ACTIVITY. Research Centre of Neurology of the Russian Acad. Med. Sci., Russia, 105064, Moscow, 5 Per. Obukha, e-mail: skrebitsky@yahoo.com.

Effects of two newly synthesized nootropic and anxiolytic dipeptides: Noopept and Selanx on inhibitory synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal cells were investigated using patch-clamp technique in whole-cell configuration. Bath application of Noopept (1 mM) or Selanx (2 mM) significantly increased the frequency of spike-dependent spontaneous mIPSCs, whereas spike-independent mIPSCs remained unchanged. It was suggested that both peptides mediated their effect sue to activation of inhibitory interneurons terminating on CA1 pyramidal cells. Results of current clamp recording of inhibitory interneurons residing in stratum radiatum confirmed this suggestion, at least for Noonent.

*Key words*: Noopept, Selanx, nootrops, anxiolytic agents, hippocampus, patchclamp technique, IPSC, interneurons.

RUSSIAN PHYSIOLOGICAL JOURNAL. V. 97. N 11. P. 00—00. 2011

Хорошо известно, что эндогенные и экзогенные пептиды служат регуляторами многих функций центральной нервной системы и что одним из мест их приложения является гиппокамп [5—7]. С последним связаны по крайней мере две очень

важные формы деятельности мозга: память и состояние тревоги [6, 13]. Первым, кто выявил роль эндогенных пептидов в регуляции памяти и обучения, был голландский фармаколог D. De Wied [8], показавший, что фрагмент вазопрессина улучшает способность крыс к выработке реакции пассивного избегания. Впоследствии, используя феномен длительной посттетанической потенциации (ДПП) как синаптическую модель памяти, мы показали на срезах гиппокампа, что тот же фрагмент восстанавливает ДПП, нарушенную разными экспериментальными приемами, в частности введением алкоголя [5]. Связь между гиппокампом и состоянием тревоги подтверждается многими физиологическими и морфологическими данными, особенно убедительными из которых является высокая плотность в этой структуре бензодиазепиновых рецепторов [18].

Цель настоящей работы — выявить синаптические механизмы действия двух нейропептидов, обладающих ноотропной и анксиолитической активностью: ноопепта и селанка. Первый из этих пептидов был синтезирован в НИИ фармакологии РАМН как пептидный аналог пирацетама, зарекомендовавшего себя как ноотропный препарат, широко применяемый в неврологической и психиатрической клинике [10, 20]. Дипептид ноопепт сходен с пирацетамом по химической структуре и мнемотропным свойствам, но имеет ряд преимуществ: оказывает действие в значительно меньшей концентрации, лишен побочных эффектов, обладает анксиолитическими свойствами [2, 3, 11, 12, 19]. Селанк — октапептид, селективный анксиолитик, был синтезирован в НИИ молекулярной генетики РАН и хорошо зарекомендовал себя при лечении больных, страдающих различными формами тревожных расстройств [1, 4].

Однако хотя оба препарата одобрены Фармкомитетом и продаются в аптеках, практически ничего не известно о нейрофизиологических механизмах их действия.

В работе было изучено действие этих пептидов на спонтанные тормозные постсинаптические токи (ТПСТ) в пирамидах поля CA1 гиппокампа и на спонтанные разряды тормозных интернейронов.

## МЕТОДИКА

Срезы гиппокампа (300 мкм) вырезались из мозга крыс линии Вистар в возрасте 14—20 дней. Срезы инкубировали при комнатной температуре (22—25 °C), запись осуществляли в камере, где он находились в погруженном состоянии под оптическим контролем. Срезы омывались искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей (мМ): NaCl — 124; KCl — 3; $NaH_2PO_4$ — 1.25; $MgCl_2$ — 2.4, $CaCl_2$ — 2.4; $NaHCO_3$ — 26; глюкоза — 10; pH — 7.4). Для пэтч-кламп регистрации пирамидных нейронов поля CA1 в конфигурации целая клетка использовали боросиликатные стеклянные микропипетки (2MW), заполненные (мМ): KCl — 120; $CaCl_2$ — 0.5; $MgCl_2$ — 2; EGTA — 10; HEPES — 10. Спонтанные тормозные постсинаптические токи (ТПСТ) регистрировали в присутствии блокаторов глутаматергической передачи: AMPA (CNQX , 1 мкМ) и HMDA рецепторов (APV, 1 мкМ). Методика работы со срезами была детально описана нами ранее [14, 15]. После регистрации ТПСТ в контроле (15 мин) в омывающую срез жидкость добавляли исследуемый пептид: ноопепт (1 мкМ) или селанк (2 мкМ) (10 мин), а затем следовал отмыв (10 мин). В некоторых случаях регистрировали также активность интернейронов, локализованных в str. radiatum вблизи границы со str. molecularis. Эти клетки были спонтанно активны и их регистрация осуществлялась в режиме каррент-кламп.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При мембранном потенциале –70 мВ амплитуда спонтанных токов варьировала в широких пределах: от 10—15 до 200—300 пА. Амплитуда токов зависела от мембранного потенциала, токи реверсировали при мембранном потенциале 0 мВ в условиях симметричной концентрации ионов $Cl^-$. Аппликация габазина

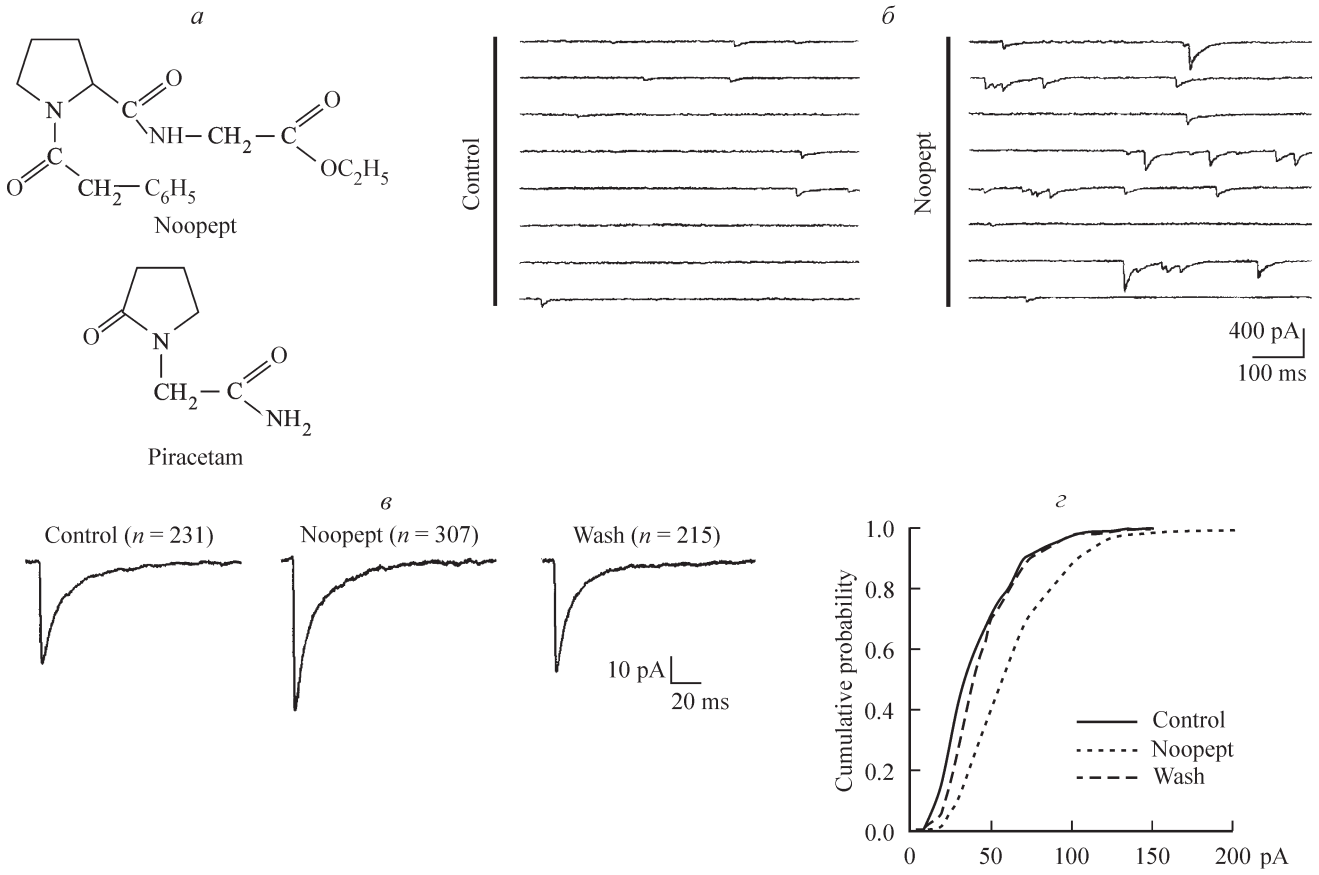
(10 мкМ) — специфического блокатора $ГАМК_A$-рецепторов — почти полностью блокировала эти токи. Все это дает основание считать регистрируемые токи результатом выделения ГАМК из окончаний тормозных интернейронов, т. н. ТПСТ. Средняя амплитуда ТПСТ, регистрируемых в пирамидных нейронах поля CA1, варьировала от 40.81 до 72.75 пА ($n$ = 16). Ноопепт (1 мкМ) значительно увеличивал амплитуду в каждой протестированной клетке ($n$ = 6) (рис. 1, *в*), что хорошо видно на графике распределения кумулятивной вероятности (рис. 1, *г*; $p \leqslant 0.01$, тест Колмогорова—Смирнова). Средняя групповая амплитуда ТПСТ также увеличивалась до 82.63 ± 11.65 пА (рис. 1, *ж*). Типичный пример показывает, что средняя амплитуда ТПСТ увеличивается, тогда как кинетические параметры (время нарастания и спада) остаются неизмененными (рис. 1, *в*). Амплитудная гистограмма (рис. 1, *д*) четко демонстрирует, что увеличение средней групповой амплитуды ТПСТ происходит, главным образом, за счет появления небольшого числа высокоамплитудных (100—350 пА) ТПСТ, тогда как число низкоамплитудных ТПСТ (около 50 пА) существенно не меняется.

Средняя частота ТПСТ также сильно варьировала между пирамидными нейронами (0.49—1.75 Гц; средняя, 1.03 ± 0.10 Гц: $n$ = 16). Аппликация ноопепта вызывала существенное увеличение (в 1.3—2.5 раза) частоты в пяти из шести клеток (рис. 1, *ж*, кривая *1*). При пятиминутной аппликации ноопепта наиболее выраженный эффект регистрировался через 2.5 мин, когда частота возрастала примерно в два с половиной раза и достигала 1.40 ± 0.35 Hz. Эффект ноопепта полностью отмывался через 10 мин после окончания его аппликации.

Селанк также оказывал влияние на ТПСТ в пирамидных нейронах поля CA1. Это влияние может быть охарактеризовано как двухфазное и состоит в следующем. Эффект начинает проявляться через 1.5—3 мин после введения вещества (2 мкМ) в проточную жидкость. Он состоит в подавлении амплитуды ТПСТ в среднем на 10 % (первая фаза) ($n$ = 6). Длительность этой фазы 2—3.5 мин; частота в этот период снижается на 35 % по сравнению с контролем. Затем следует вторая фаза, во время которой частота ТПСТ увеличивается примерно в два раза и превышает контрольный уровень в среднем на 20 %. Амплитуда ТПСТ в этот период тоже увеличивается и возвращается к контрольному уровню, иногда несколько (на 10 %) его превышая. Следует отметить, что кинетические параметры ТПСТ (время нарастания и спада), также как и при действии ноопепта, остаются неизмененными.

Типичный пример действия селанка представлен на рис. 2. Точки на графиках частоты (*А*) и амплитуды (*Б*) представляют собой усреднение соответствующего параметра за 12 с. Период действия вещества отмечен на абсциссе пунктирной линией, а предполагаемая первая фаза его действия жирной линией. На графике *А* видно, что снижение частоты начинается через 3.2 мин, длится 2 мин и переходит в значительное увеличение (в 3—4 раза по сравнению с первой фазой и в данном нейроне на 140—160 % по сравнению с контролем). Амплитуда начинает снижаться примерно через 2 мин и возвращается к контрольному уровню через 5.5 мин.

Чтобы разделить действие веществ на спайк-зависимые и спайк-независимые ТПСТ была проведена серия экспериментов с введением в проточную жидкость тетродотоксина (ТТХ, 1 мкМ), блокирующего проведение возбуждения по аксонам интернейронов, заканчивающихся на пирамидных нейронах. После аппликации ТТХ высокоамплитудные ТПСТ исчезали, и амплитуда оставшихся токов была 47.07 ± 2.70 пА ($n$ = 10) (рис. 3, *а*). Эффект ТТХ указывал на то, что высокоамплитудные ТПСТ вызывались спонтанными потенциалами действия в пресинаптических нейронах (сТПСТ), тогда как ТПСТ, оставшиеся в присутствии ТТХ, были результатом спонтанного выделения медиатора из пресинаптических окончаний: они будут обозначаться миниТПСТ (мТПСТ). Амплитудная гистограмма (рис. 1, *д*) четко показывает, что мТПСТ (менее 50 пА) вносят основной вклад в общее число ТПСТ, в то время как число больших ТТХ-чувствительных ТПСТ значительно меньше.


а
Noopept
Piracetam
б
Control
Noopept
400 pA
100 ms
в
Control (n = 231)
Noopept (n = 307)
Wash (n = 215)
10 pA
20 ms
г
Cumulative probability
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
200 pA
Control
Noopept
Wash

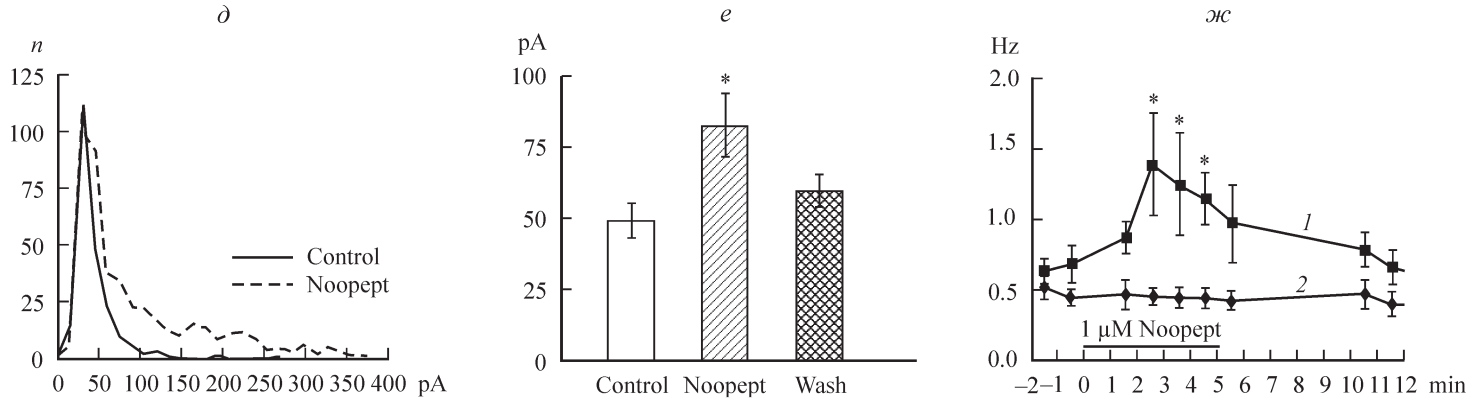



Рис. 1. Действие ноопепта на спонтанные ТПСТ, регистрируемые в пирамидных нейронах поля CA1.

*а* — сопоставление химической структуры ноопепта и пирацетама; *б* — последовательные записи спонтанных ТПСТ перед (Control) и во время действия препарата (Noopept); *в* — спонтанные ТПСТ, усредненные за период 5 мин перед (Control), во время действия (Noopept) и после (Wash) действия вещества. Здесь и на рис. 3, *а* в скобках указано количество суммированных одиночных ТПСТ; *г* — кумулятивная вероятность распределения амплитуды ТПСТ в контроле, во время действия ноопепта и в период отмывания; *д* — амплитудная гистограмма того же нейрона что и на *б*; *е* — усредненная гистограмма действия ноопепта на все зарегистрированные нейроны (средняя ±SEM, $n = 6$); *ж* — действие ноопепта на усредненную (±SEM)) частоту с ТПСТ и м ТПСТ (кривые *1* и *2* соответственно; $n = 6$).

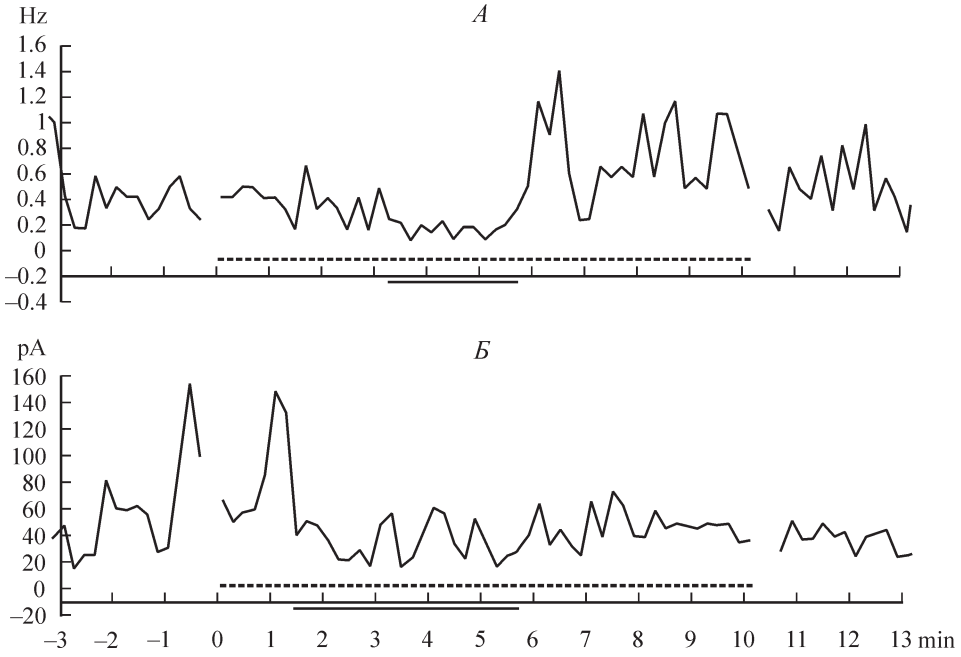



Рис. 2. Действие селанка на частоту (*А*) и амплитуду (*Б*) спонтанных ТПСТ в пирамидах поля CA1.

Каждая точка на кривой — усреднение за 12 с соответствующего параметра. *Пунктирная линия* — период действия селанка, *жирная линия* — предполагаемая первая фаза его действия.

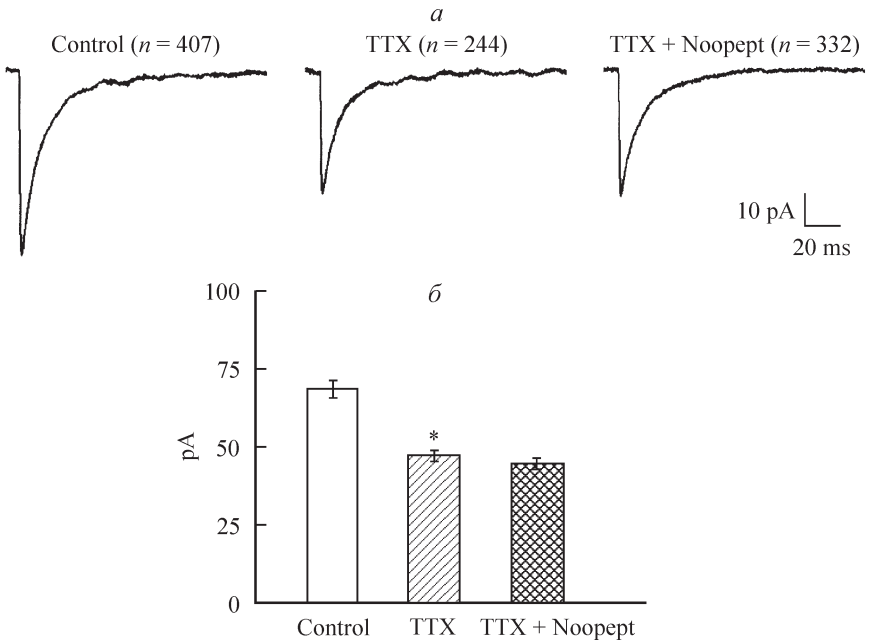



Рис. 3. Отсутствие влияния ноопепта на м ТПСТ, остающиеся после аппликации ТТХ.

*а* — спонтанные ТПСТ, усредненные за период 5 мин в контроле, во время ТТХ аппликации и во время аппликации ТТХ + ноопепт; *б* — усреднение для всех нейронов (среднее ±SEM, *n* = 6).

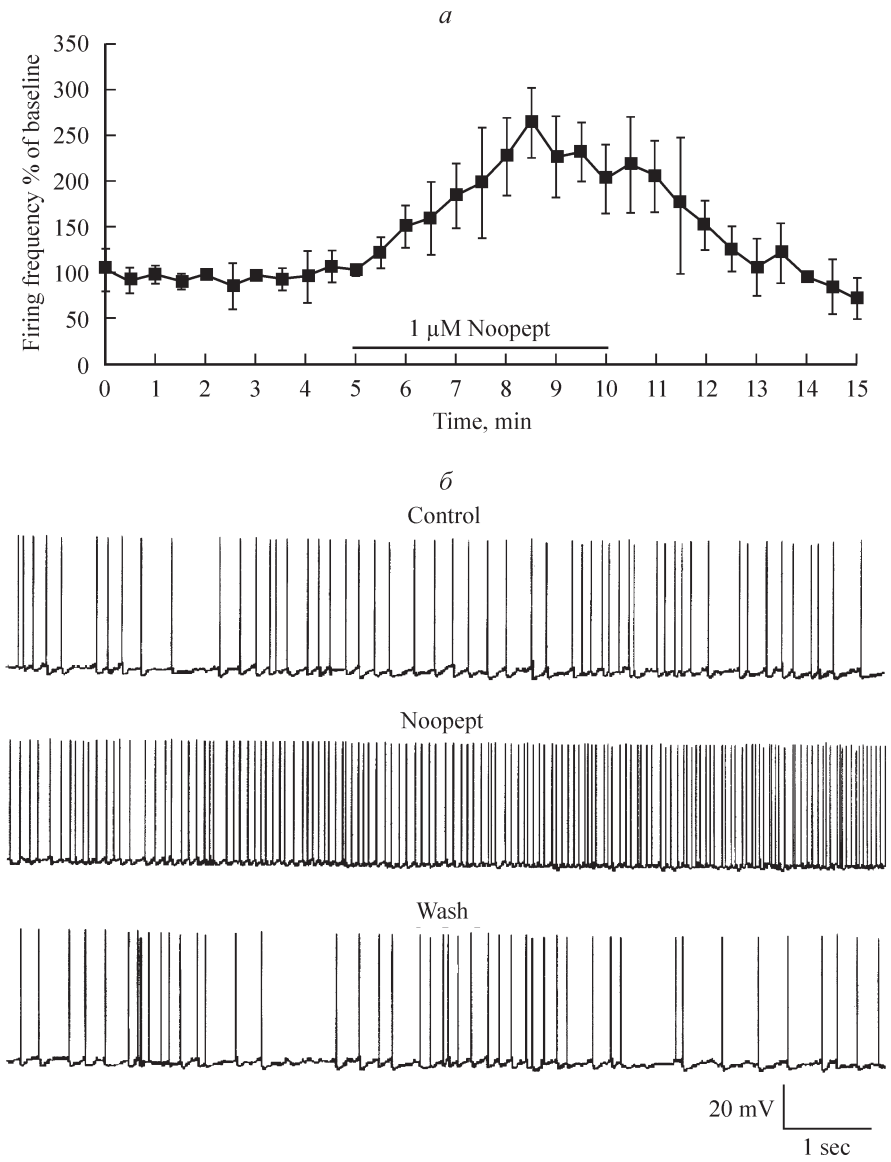



Рис. 4. Возбуждающее действие ноопепта (1 mM) на активность тормозного интернейрона, записанного в current clump в stratum radiatum поля CA1.

*а* — временно́й ход влияния ноопепта на усредненную частоту разрядов (±SEM) пяти клеток; *б* — типичный пример действия ноопепта на частоту разрядов интернейрона.

Эксперименты с изучением действия ноопепта и селанка на ТПСТ на фоне действия ТТХ показали, что ни тот, ни другой пептид не меняют ни частоту, ни амплитуду мТПСТ. Характерный пример для ноопепта представлен на рис. 3, *а*, *б*. Эти результаты указывают на то, что изучаемые пептиды не оказывают свое действие, меняя спонтанный выброс медиатора или воздействуя на ГАМКА-рецепторы. Наиболее вероятным механизмом их действия нам представляется модуляция разрядов тормозных интернейронов, заканчивающихся на пирамидных клетках.

В настоящее время мы проверили эту гипотезу только для ноопепта. Было зарегистрировано 5 спонтанно активных интернейронов, локализованных на границе str. radiatum и str. molecularis. Эти клетки отличались от пирамидных нейронов по форме и электрофизиологическим параметрам. Частота их спонтанных разрядов колебалась от 2.76 до 9.98 Гц; среднее значение 7.29 ± 1.57 Гц.

Было обнаружено, что перфузия ноотропта вызывает быстрое (1—1.5 мин) обратимое увеличение частоты спонтанных потенциалов действия на 269 ± 39 % во всех зарегистрированных клетках. Увеличение частоты разрядов было связано с небольшой (3—5 мВ) деполяризацией мембраны (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании показано, что два изученных нейропептида (ноопепт и селанк) оказывают влияние на активность пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа, формирующих мощный пучок волокон, оканчивающихся на различных лимбических структурах (маммиллярные тела, септум, интраламинарные ядра таламуса). Наиболее выраженная сторона влияния обоих пептидов — увеличение частоты спонтанных ТПСТ, т. е. усиление тормозного влияния гиппокампа на лимбические структуры мозга. Увеличение амплитуды ТПСТ, особенно выраженное для ноопепта, может быть интерпретировано как результат суммации одиночных ТПСТ на постсинаптическом нейроне, вызванное увеличением их частоты. Следует отметить, что эффект селанка, при определенной схожести с таковым для ноопепта, отличается наличием двух фаз действия, из которых первая состоит в подавлении частоты спонтанных ТПСТ.

Было отмечено, что эффекты обоих пептидов снимаются аппликацией тетродотоксина, подавляющего п роведение возбуждения по аксонам тормозных интернейронов. Это заставляет думать, что первичной мишенью действия пептидов являются тормозные интернейроны, оканчивающиеся на пирамидах. Тот факт, что кинетические параметры ТПСТ не меняются под действием пептидов, говорит против возможности вовлечения постсинаптических $ГАМК_A$-рецепторов. Этот вывод находится в соответствии с данными, полученными на изолированных нейронах, свидетельствующими о том, что ноопепт не влияет на ответы на быструю аппликацию ГАМК и глутамата (неопубликованные наблюдения).

В ходе исследования была обнаружена группа интернейронов, локализованных в радиальном слое, частота разрядов которых увеличивается под действием ноопепта, что сопровождается небольшой деполяризацией мембраны. Сходный эффект был ранее обнаружен для двух других нейропептидов: холецистокинина [18] и тиролиберина [9]. В обоих исследованиях было показано, что в основе эффекта лежит блок калиевых каналов утечки, результатом чего является деполяризация мембраны и увеличение частоты разрядов клеток. В данном исследовании не проводился такой анализ для изучаемых пептидов, но планируется это сделать, рассчитывая узнать больше о ионных механизмах из действия и о некоторых различиях в оказываемых ими эффектах.

Ноотропные эффекты фармакологических препаратов связывают, как правило, с модуляцией глутаматергической передачи [17]. Как уже было отмечено выше, мы не обнаружили существенных изменений токов, вызванных аппликацией глутамата, под действием ноотропа. Мы также не обнаружили изменения амплитуды пре- или постсинаптического популяционного спайка, так же как и амплитуды, и длительности ДПП, вызванной стимуляцией коллатералей Шаффера в поле CA1 после аппликации ноотропа [5]. Поэтому мы предполагаем, что более вероятным объяснением действия исследованных пептидов является модуляция тормозной (в большей мере, чем возбуждающей) передачи.

Изученные препараты были любезно предоставлены их разработчиками: ноопепт — д. х. н. Т. А. Гудашевой и проф. Р. У. Островской (НИИ фармакологии РАМН), селанк — акад. Н. Ф. Мясоедовым (НИИ молекулярной генетики РАН). Работа была поддержана грантом РФФИ 11-04-00890 и грантом президента РФ НШ-65727.2010.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *Белозерцев Ф. Ю.*, *Козловский И. И.*, *Семенова Т. П.*, *Козловская М. М.* Влияние нейропептида селанка на выработку адапивного навыка пространственной зрительной ориентировки у крыс с нарушением мнестических функций. Журн. психофармакол. биол. наркол. 9 : 2591—2597. 2009.

[2] *Гудашева Т. А.*, *Островская Р. У.*, *Максимова Ф. В.* и др. О возможной структурно-функциональной связи пирацетама и вазопрессина. Хим. фарм. журн. 3 : 271—275. 1988.

[3] *Гудашева Т. А.*, *Островская Р. У.*, *Трофимов С. С.* и др. Пептидные аналоги пирацетама как лиганды предполагаемых ноотропных рецепторов. Хим. фарм. журн. 11 : 1322—1328. 1985.

[4] *Зозуля А. А.*, *Незнамов Г. Г.*, *Сюняков Т. С.*, *Кост Н. В.*, *Габаева М. В.*, *Соколов О. Ю.*, *Серебрякова Е. В.*, *Сиранчиева О. А.*, *Андрющенко А. В.*, *Телешева Е. С.*, *Сюняков С. А.*, *Смулевич А. Б.*, *Мясоедов Н. Ф.*, *Середенин С. Б.* Эффективность и механизмы действия нового пептидного анксиолитика селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении. Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова. 13 : 201—210. 2008.

[5] *Чепкова А. Н.*, *Капай Н. А.*, *Дореули Н. В.* и др. Влияние амида пироглутамиласпарагина на пластические свойства синаптической передачи в гиппокампе. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 7 : 68—71. 2003.

[6] *Bertoglio L. J.*, *Joka S. R.*, *Guimaraes F. S.* Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. Behav. Brain Res. 175 : 183—188. 2006.

[7] *Chepkova A. N.*, *French P.*, *De Wied D.*, *Ontskul A. H.*, *Ramakers G. M.*, *Skrebitski V. G.*, *Gispen W. H.*, *Urban I. J.* Long-lasting enhancement of synaptic excitability of CA1/subiculum neurons of the rat ventral hippocampus by vasopressin and vasopressin(4—8). Brain Res. 701(1—2) : 255—266. 1995.

[8] *De Wied D.* Neuropeptides in learning and memory processes. Behav Brain Res. 83(1—2) : 83—90. 1997.

[9] *Deng P. Y.*, *Porter J. E.*, *Shin H. S.*, *Lei S.* Thyrotropin-releasing hormone increases GABA release in rat hippocampus. J. Physiol. 577 : 497—511. 2006.

[10] *Giurgea C.* Pharmacology of integrative activity of the brain. Attempt at nootropic concept in psychopharmacology. Actual Pharmacol. (Paris). 25 : 115—156. 1972.

[11] *Gudasheva T. A.*, *Boyko S. S.*, *Ostrovskaya R. U.*, *Voronina T. A.*, *Akparov V. K.*, *Trofimov S. S.*, *Rozantsev G. G.*, *Skoldinov A. P.*, *Zherdev V. P.*, *Seredenin S. B.* The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and its similarity to endogenous neuropeptide cyclo-L-prolylglycine. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 22 : 245—252. 1997.

[12] *Gudasheva T. A.*, *Konstantinopol'skii M. A.*, *Ostrovskaya R. U.*, *Seredenin S. B.* Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. Bull. Exp. Biol. Med. 131 : 464—466. 2001.

[13] *Hughes J.* (ed.). Centrally acting peptides. University Part Press. 1978.

[14] *Kondratenko R. V.*, *Derevyagin V. I.*, *Skrebitsky V. G.* Novel nootropic dipeptide Noopept increases inhibitory synaptic transmission in CA1 pyramidal cells. Neuroscience Letters. 476 : 70—73. 2010.

[15] *Kozhemiakin M. B.*, *Draguhn A.*, *Skrebitsky V. G.* Layer-specific potentiation of evoked IPSCs in rat hippocampal CA1 pyramidal cells by lanthanum. Brain Res. Bull. 64 : 97—101. 2004.

[16] *Lynch G.*, *Gall C. M.* Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. Trends Neurosci. 29 : 554—562. 2006.

[17] *Miller K. K.*, *Hoffer A.*, *Svoboda K. R.*, *Lupica C. R.* Cholecystokinin increases GABA release by inhibiting a resting $K^+$ conductance in hippocampal interneurons. J. Neurosci. 17 : 4994—5003. 1997.

[18] *Mohler H.*, *Richards J. G.* Benzodiazepine receptors in the central nervous system. In: E. Costa (ed.). Te Benzodiazepines: From molecular Biology to Clinical Practice. New York. Raven Press. 1983.

[19] *Ostrovskaya R. U.*, *Gruden M. A.*, *Bobkova N. A.*, *Sewell R. D.*, *Gudasheva T. A.*, *Samokhin A. N.*, *Seredinin S. B.*, *Noppe W.*, *Sherstnev V. V.*, *Morozova-Roche L. A.* The nootropic and neuroprotective proline-containing dipeptide noopept restores spatial memory and increases immunoreactivity to amyloid in an Alzheimer's disease model. J. Psychopharmacol. 21 : 611—619. 2007.

[20] *Winblad B.* Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. CNS Drug Rev. 11 : 169—182. 2005.

Поступила 17 VIII 2011