

УДК 577.112.6+577.175.82+591.512.16

ВЛИЯНИЕ СОЙМОРФИН-5-АМИДА НА ПОВЕДЕНИЕ БЕЛЫХ КРЫС

Е.А. Чеснокова, Н.Ю. Сарычева, В.А. Дубынин,
А.А. Каменский, В.Н. Калихевич*, З.А. Ардемасова*

(кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии
и регуляторных пептидов; e-mail: katyachesn@gmail.com)

В работе впервые исследовано влияние YPFVV-NH₂ (амида природного пептида сойморфина-5, выделенного из белка сои) на поведение крыс. Показано, что эффекты пептида в значительной мере зависят от пола животных. Кроме того, действие пептида зависело от возраста животных и от уровня стрессогенной нагрузки в эксперименте. Основным эффектом сойморфин-5-амида у взрослых крыс стало усиление локомоторной активности у самцов. У детенышей в результате введения пептида отмечалось изменение уровня тревожности — анксиогенное действие в раннем возрасте, изменяющее направленность по мере взросления.

Ключевые слова: сойморфин, локомоторная активность, тревожность.

В конце XX в. была описана особая группа лигандов опиоидных рецепторов, получивших название экзорфины [1]. Это открытие позволило получить новую информацию о влиянии продуктов питания на различные функции организма, в том числе на деятельность нервной системы. Экзорфины — это короткие пептиды, образующиеся в кишечнике при переваривании животных и растительных белков. Они обладают энкефалиноподобной первичной структурой, способны всасываться в кровь целиком, проникать в мозг и связываться с опиатными рецепторами. Сойморфины (экзорфины, происходящие из белка сои β-конглицинина) обнаружены всего несколько лет назад. По структуре сойморфины-5, -6 и -7 более всего сходны с человеческим β-казоморфином-4 (фрагментом казеина материнского молока), поскольку имеют на N-конце молекулы последовательность YPFV. Сойморфины стали первыми опиоидными пептидами растительного происхождения, для которых выявлено специфическое сродство к μ-типу опиоидных рецепторов. Опыты на препаратах подвздошной кишки морской свинки показали, что сойморфины даже в большей степени μ-селективны, чем человеческие β-казоморфины [2]. В литературе действие сойморфинов на физиологию нервной системы человека и животных до сих пор очень мало освещено. Так, в одной из работ показано, что сойморфины обладают анксиолитическим действием при пероральном и внутрибрюшинном введении мышам. Минимальная эффективная доза составила 3 мг/кг внутрибрюшинно [2, 3]. Однако влияние сойморфинов на организм требует более внимательного изучения, поскольку в настоящее время продукты из сои употребляются очень широко. Например, порядка 60% готовых блюд в американских супермаркетах содержат какое-то количество сои. Среди этих продуктов не только соусы, мяс-

ные и молочные изделия, но даже некоторые сорта фруктовых напитков [4]. Сойморфины в заметных количествах образуются при переваривании сои: при расщеплении β-субъединицы β-конглицинина сои панкреатической эластазой *in vitro* сойморфин-5 составляет 9,1% всех продуктов [2]. С учетом того, что сойморфины являются лигандами μ-рецепторов, при употреблении в пищу сои они потенциально могут вызывать различные физиологические эффекты, в том числе и нежелательные. В нашей работе впервые исследована нейротропная активность пентапептида YPFVV-NH₂, амида сойморфина-5. Препарат был синтезирован на химическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета. Конкретной целью представленной работы стало изучение влияния пептида на поведение белых крыс разного пола и возраста.

Материалы и методы

В работе использовано 48 взрослых беспородных белых крыс и 90 детенышей крыс обоего пола. Со взрослыми животными проводили тесты “открытое поле” со сменой освещенности и “приподнятый крестообразный лабиринт” однократно. С детенышами аналогичные эксперименты повторяли несколько раз в разном возрасте: в “открытое поле” их помещали на 21, 28 и 42-й дни жизни; в “приподнятый крестообразный лабиринт” — на 35 и 49-й дни. Сойморфин-5-амид вводили внутрибрюшинно за 20 мин до тестирования в дозе 5 мг/кг. Пептид растворяли в смеси дистиллированной воды и медицинского спирта (соотношение 29:1). Животные контрольной группы получали эквивалентный объем растворителя (2 мл/кг). Установка “открытое поле” представляет собой круглую арену (диаметр 100 см, высота стенок

* Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет, г. Санкт-Петербург.

42 см), над центром которой на высоте 80 см подвешены яркая белая и красная лампы (обе мощностью 60 Вт). Пол арены разделен на 19 равных по площади сегментов двумя concentрическими окружностями и радиальными отрезками прямых. На линиях разметки в полу расположены 13 отверстий (“норки”). Животное помещали в центр арены и визуально по минутно оценивали следующие показатели: горизонтальную активность — пробег (по числу пройденных сегментов поля); вертикальную активность (число стоек); количество радиальных перемещений с пересечением внешней окружности (отходы от стенки арены); количество радиальных перемещений с пересечением внутренней окружности (выходы в центр арены); заглядывания в “норки”; умыкания (груминг). Взрослых животных тестировали в “открытом поле” в течение 5 мин, причем на 4-й мин яркую лампу выключали, оставляя красный свет. Детенышей тестировали в течение 9 мин, выключая яркий свет на 3 мин (с 4-й по 6-ю). Для оценки поведения детенышей в возрасте 21 день использовали установку, отличающуюся от описанной отсутствием “норок”. “Приподнятый крестообразный лабиринт” представляет собой равносторонний крест (длина лучей 50 см, ширина 15 см), два противоположных рукава которого имеют боковые и торцевые стенки высотой 30 см, а оставшиеся два открыты. Открытые рукава освещаются двумя яркими лампами (100 Вт) с высоты 70 см. Животное в начале опыта помещали в освещенный центр установки носом в сторону светлого рукава. Регистрировали следующие параметры поведения (отдельно в закрытых и на открытых рукавах): число стоек; число умыканий; число выглядываний из темного рукава; число выходов на свет и выходов на край светлого рукава; число свешиваний; число переходов через центр лабиринта в направлениях “свет—свет” и “темнота—темнота”. Также отмечали суммарное время на свету и латентный период первого входа в темный отсек. Взрослых животных тестировали в течение 3 мин, детенышей — 9 мин. При статистической обработке данных отличия между экспериментальными группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, ANOVA-метода и непараметрического критерия χ^2 . В каждой из групп было не менее 8 животных. Данные на рисунках представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

У взрослых самцов крыс, получивших пептид, в тесте “открытое поле” оказалась повышена горизонтальная активность (рис. 1, а). Их суммарный пробег составил $72,3 \pm 8,6$ сегментов арены, а контрольной группы — только $53,1 \pm 6,0$ сегментов ($p < 0,05$ по критерию χ^2). Смена освещенности в данном эксперименте дает возможность оценить зависимость поведения животных от уровня стрессогенности обстановки. Выключение яркой лампы, как правило, заметно

смещает соотношение между оборонительной и исследовательской мотивациями в сторону последней; видимыми проявлениями этого являются, в частности, увеличение горизонтальной локомоции и числа стоек. При красном свете, в менее стрессогенной обстановке, увеличение двигательной активности под действием сойморфин-5-амида у взрослых самцов крыс оказалось наиболее выражено: пробег на 4-й мин у животных, получавших пептид, составил 146% от уровня контрольной группы ($p < 0,05$ по критерию Стьюдента). Однако данный эффект был отмечен только у самцов. У подопытной группы самок двигательная активность на фоне введения препарата не изменилась (рис. 1, б): их суммарный пробег составил $95,1 \pm 6,5$ сегментов; у контрольных животных — $93,7 \pm 7,3$ сегмента. В тесте “открытое поле” ни у самцов, ни у самок после применения сойморфин-5-амида не было отмечено достоверных изменений числа стоек, заглядываний в “норки” или умыканий. Такие результаты позволяют сделать вывод о том, что пептид изменяет преимущественно локомоторную актив-

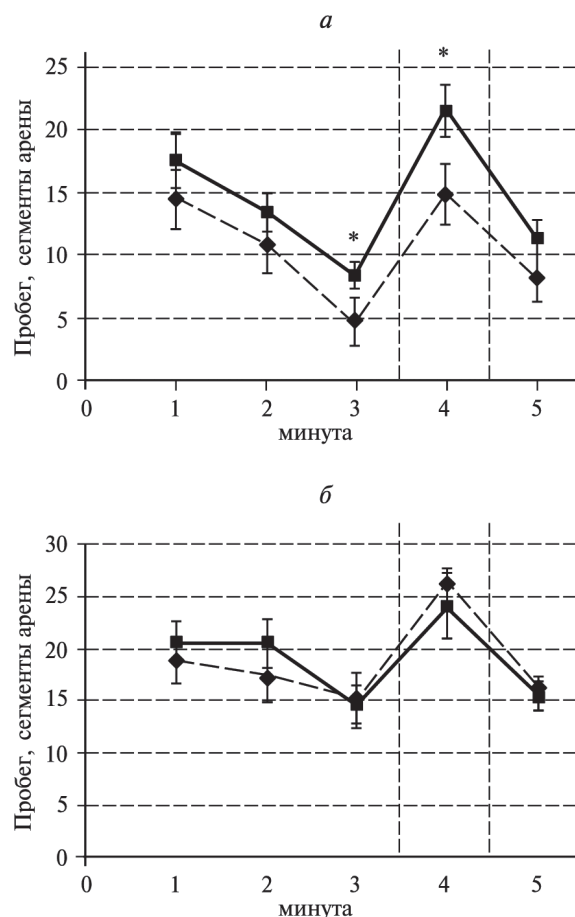


Рис. 1. Динамика изменения горизонтальной двигательной активности в тесте “открытое поле” у самцов (а) и самок (б) крыс. Пунктирная линия — контрольная группа (для самцов $n = 14$, для самок $n = 10$), сплошная линия — в/б введение сойморфин-5-амида в дозе 5 мг/кг (для самцов $n = 14$, для самок $n = 10$). По оси абсцисс — время эксперимента (в минутах), по оси ординат — число пройденных сегментов арены. Пунктирные вертикальные линии отмечают время смены освещенности. * — статистически достоверное ($p < 0,05$ по χ^2) отличие опыта от контроля

ность самцов, не влияя существенно на уровень их ориентировочно-исследовательской мотивации.

В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” основным индикатором уровня тревожности животных является суммарное время пребывания на освещенных участках установки. Чем ниже тревожность подопытной крысы, тем больше у нее окажется число выходов из закрытых рукавов на свет и тем дольше она будет исследовать открытые участки. Важно также и то, как именно крыса их исследует: такие поведенческие паттерны, как выходы в конец открытого рукава или свешивания с его края, можно наблюдать только у животных, у которых мотивация изучить незнакомую обстановку преобладает над страхом открытого пространства и высоты. Эти действия в “приподнятом крестообразном лабиринте” относятся к так называемому поведению риска. Рост выраженности такого поведения свидетельствует о смещении баланса мотиваций в сторону подавления пассивно-оборонительного поведения и усиления исследовательской активности. В данном случае нами были зарегистрированы слабые анксиолитические эффекты сойморфин-5-амида у самцов. Они выражались в увеличении числа свешиваний с центра “лабиринта” ($1,5 \pm 0,4$ свешивания в опытной группе по сравнению с $0,6 \pm 0,2$ в контроле; $p < 0,05$ по критерию Стьюдента). У самок влияние препарата в этом тесте оказалось скорее анксиогенным, но также было выражено достаточно слабо. У крыс подопытной группы количество выходов на открытые лучи составило $0,3 \pm 0,2$, а в контрольной группе — $1,0 \pm 0,4$ ($p < 0,05$, критерий χ^2). Других достоверных изменений поведения взрослых животных в этом тесте отмечено не было.

Гендерная специфика влияний сойморфин-5-амида на показатели поведения взрослых животных согласуется с литературными данными о зависимости эффектов эндорфиноподобных лигандов от пола у грызунов. Известно, что паттерн экспрессии опиоидных рецепторов у самцов и самок крыс одинаков. Основной причиной гендерных различий в данном случае считается модулирующее действие половых гормонов. В частности, есть информация о совместной локализации опиатных рецепторов и рецепторов половых стероидов на одних и тех же нейронах. Это позволяет предположить возможность взаимовлияния соответствующих рецепторных сигналов на субклеточном уровне [5, 6]. Вероятнее всего, связывание сойморфин-5-амида с рецепторами и их последующая активация зависят от концентрации андрогенов и эстрогенов в ликворе животного.

В серии экспериментов с введением сойморфин-5-амида детенышам было показано, что эффекты препарата зависят не только от пола, но и от возраста. Ранее в нашей лаборатории были исследованы некоторые другие пептиды из числа экзорфинов, способных изменять поведение детенышей крыс (при введении в дозе 1–20 мг/кг). Эффекты этих веществ, как правило, зависели от возраста крысят [7]. Пред-

ставленные в этой статье эффекты сойморфин-5-амида также зависели от стадии онтогенеза. При сравнении с влияниями других пептидов эффекты от введения сойморфин-5-амида оказались больше всего схожи с последствиями введения рубисколина-5, фрагмента белка зеленых листьев растений рибулозобифосфат-карбоксилазы/оксигеназы [7]. В нашей работе в опытах с крысятами (возраст 21–42 дней) значимые изменения параметров поведения в тесте “открытое поле” после введения сойморфин-5-амида отмечены только у самок, как и в случае с рубисколином-5 [7]. В возрасте 21 и 28 дней у крысят женского пола, получавших пептид, оказались снижены двигательная и исследовательская активность, что выражалось в уменьшении числа пройденных сегментов и количества стоек (рис. 2). Наиболее явное действие пептида на неполовозрелых самок отмечено на 28-й день жизни: в подопытной группе пробег составил $98,1 \pm 6,3$ сегмента, тогда как в контроле крысы прошли в среднем $135,0 \pm 11,7$ сегментов ($p < 0,01$, тест Стьюдента). Число стоек у самок опыт-

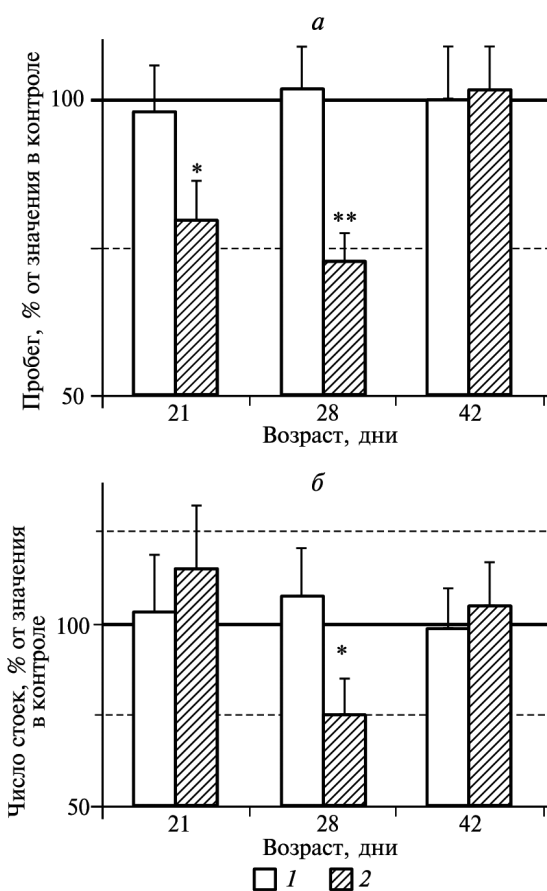


Рис. 2. Гистограммы суммарных показателей поведения в “открытом поле” при тестировании детенышей разного возраста после внутрибрюшинного введения сойморфин-5-амида в дозе 5 мг/кг. 1 — значения для самцов, 2 — для самок. По оси абсцисс — возраст животных. По оси ординат — величина параметра (в процентах от соответствующих контрольных значений): а — пробег; б — число стоек. * — статистически достоверное ($p < 0,05$ по χ^2) отличие опыта от контроля. ** — $p < 0,01$ по χ^2 .

Число животных: в контрольной группе самцов 20, самок 25; в опытной группе самцов 19, самок 26

ной группы в этом возрасте было равно $18,8 \pm 2,3$, а у самок контрольной группы — $24,9 \pm 2,8$ ($p < 0,05$, критерий χ^2). О снижении ориентировочно-исследовательской активности самок под действием сойморфин-5-амида свидетельствует также уменьшение числа отходов от стенки и выходов в центр арены (рис. 3, а). В результате общее число переходов в сторону центра (суммарное число отходов и выходов) у 28-дневных самок после введения пептида составило $5,8 \pm 1,0$ по сравнению с $10,9 \pm 2,1$ в контроле ($p < 0,05$, тест Стьюдента). Напротив, после начала полового созревания (возраст 42 дня), направленность действия сойморфин-5-амида на самок крыс оказывается скорее анксиолитической. Ориентировочно-исследовательская активность у самок опытной группы в этом возрасте была повышена, что выражалось в увеличении числа обследованных “норок” (рис. 3, б). Норковые реакции являются специфическим признаком исследовательского поведения грызунов. В возрасте 42 дней в опытной группе самок число заглядываний в “норки” составило $17,0 \pm 1,7$, а в контроль-

ной — $9,7 \pm 1,0$ ($p < 0,01$, тест Стьюдента). При этом в возрасте 42 дней пептид уже не влияет на горизонтальную и вертикальную двигательную активность самок (как и в случае взрослых крыс, см. выше). Такие изменения направленности эффектов пептида с возрастом могут быть связаны с постепенным созреванием опиоидной медиаторной системы, созреванием других медиаторных систем, структур мозга и эндокринных желез, участвующих в комплексной реакции на стресс, а также с повышением уровня половых гормонов в крови подопытных животных. Постепенное усиление анксиолитических свойств пептида по мере взросления крысят, отмеченное у сойморфин-5-амида, наблюдалось ранее у β -казоморфина-7, но в случае казоморфина эта зависимость была более четко выражена [8].

В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” эффекты пептида меньше зависели от возраста крысят по сравнению с тестом “открытое поле”. Изменение направленности действия сойморфин-5-амида в ходе онтогенеза в этих условиях отмечено только у самцов. У взрослых животных (см. выше) отмечались анксиолитические эффекты пептида у самцов и анксиогенные — у самок, в обоих случаях выраженные достаточно слабо. При тестировании детенышей как на 35-й, так и на 49-й день жизни у животных обоих полов был отмечен анксиогенный характер влияния сойморфин-5-амида. Так, в возрасте 35 дней в подопытной группе самцов число свешиваний за 6—9 мин опыта составило $0,1 \pm 0,1$ по сравнению с $0,7 \pm 0,3$ в контроле ($p < 0,05$, тест χ^2). У 35-дневных самцов, получавших пептид, число выходов на свет за время с 3-й по 9-ю мин опыта равнялось $0,2 \pm 0,1$, а в контрольной группе — $1,0 \pm 0,4$ ($p < 0,05$, критерий χ^2). У самок подопытной группы в возрасте 35 дней суммарное количество стоек на свету составило $0,1 \pm 0,1$ по сравнению с $0,4 \pm 0,2$ в контроле ($p < 0,05$, критерий χ^2). В целом такое действие пептида схоже с эффектами, наблюдавшимися в “открытом поле” в возрасте 21 и 28 дней. В возрасте 49 дней у самцов не было отмечено достоверных изменений поведения в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” под влиянием сойморфин-5-амида. При этом у самок опытной группы в этом тесте в первые три минуты эксперимента было зарегистрировано уменьшение числа выходов на свет ($1,1 \pm 0,2$ по сравнению с $1,8 \pm 0,4$ в контроле, $p < 0,05$ по χ^2) и количества переходов между темными рукавами ($0,2 \pm 0,1$ по сравнению с $0,7 \pm 0,3$ в контроле, $p < 0,05$ по χ^2). Таким образом, направленность эффектов пептида в “открытом поле” в возрасте 42 дней и в “приподнятом крестообразном лабиринте” в 49 дней у самок крыс различна: в первом случае отмечалось анксиолитическое действие сойморфин-5-амида, во втором направленность влияния пептида скорее анксиогенная.

Пол животных в этих экспериментах оказался важным параметром. В частности, влияние фактора “пол” на такой показатель поведения в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (возраст 35 и 49 дней),

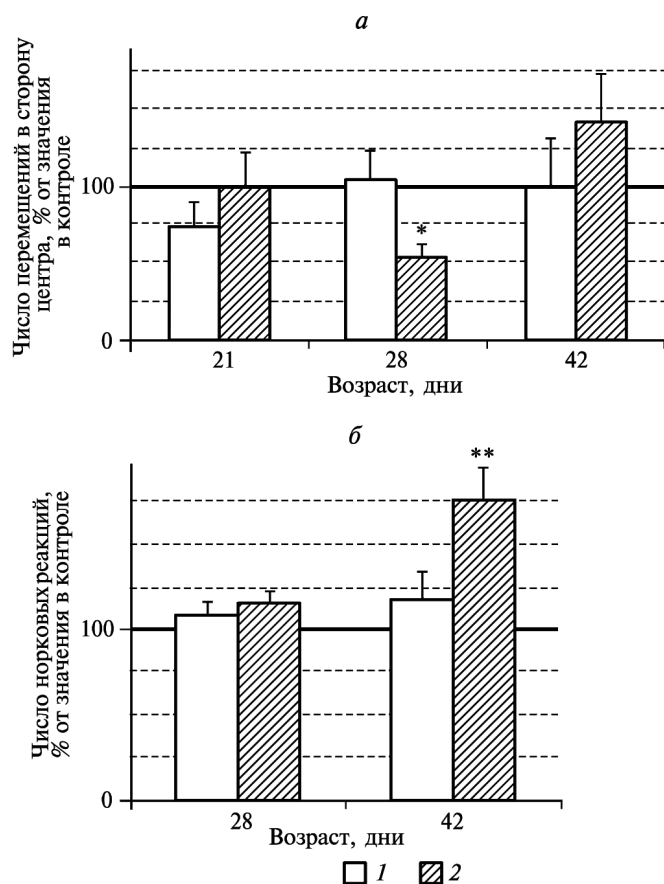


Рис. 3. Гистограммы суммарных показателей в “открытом поле” при тестировании детенышей разного возраста после внутрибрюшинного введения сойморфин-5-амида в дозе 5 мг/кг. 1 — значения для самцов, 2 — для самок. По оси категорий — возраст животных. По оси значений — суммарные показатели (в процентах от соответствующих контрольных значений): а — число перемещений к центру; б — число норковых реакций. Число животных: в контрольной группе самцов 20, самок 25; в опытной группе самцов 19, самок 26. * — статистически достоверное ($p < 0,05$ по χ^2) отличие опыта от контроля. ** — $p < 0,01$ по χ^2

как время, проведенное на свету, установлено с высокой степенью достоверности: $p = 0,002$, $F_{1,167} = 10,18$ (ANOVA). Как можно судить по приведенным выше результатам, эффекты от введения сойморфин-5-амида в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” у одних и тех же животных проявляются по-разному. Принципиальное отличие использованных методов заключается в том, что в “лабиринте” животное имеет возможность спрятаться от яркого света в более комфортном закрытом рукаве, т.е. стрессогенный фактор в этом случае является избегаемым. В условиях избегаемого и неизбегаемого стресса мы наблюдали разнонаправленные эффекты препарата. Это свидетельствует о том, что изученное нами вещество, как и другие опиоидные пептиды, является лишь одним из многочисленных модуляторов в сложной системе реакции на стресс. Обобщая все вышесказанное, можно заключить, что у взрослых самцов крыс при однократном внутрибрюшинном введении сойморфин-5-амид вызывает повышение локомоторной активности. В тесте с неизбегаемым стрессорным фактором пептид при введении крысам в возрасте 21—28 дней не влияет на двигательную и ориентировочную активность самцов, но подавляет аналогичное поведение самок. После начала полового созревания направленность действия пептида на самок изменяется: в возрасте 42 дней пептид увеличивает ориентировочно-исследовательскую активность. У самцов этого же возраста пентапептид YPFVV-NH₂ не влияет на поведение. В условиях избегаемого стресса влияние пептида на самок можно рассматривать как анксиогенное. Так, слабое повышение уровня тревожности под действием пептида отмечено в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” у взрослых самок и у самок в возрасте 35—49 дней. В то же время у самцов зарегистрировано изменение направленности действия пептида с возрастом: у самцов в возрасте 35 дней пептид усиливал тревожность, в 49 дней не влиял на уровень тревожности, а у взрослых самцов проявлял анксиолитическое действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каменский А.А., Дубынин В.А., Ивлева Ю.А. Нейротропная активность опиоидных пептидов пищевого происхождения бета-казоморфинов // Усп. физиол. наук. 2004. Т. 35. № 1. С. 83—101.
2. Ohinata K., Agui Sh., Yoshikawa M. Soymorphins, novel μ opioid peptides, derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. Vol. 71. N 10. P. 2618—2621.
3. Yamada Y., Muraki A., Oie M., Kanegawa N., Oda A., Sawashi Y., Kaneko K., Yoshikawa M., Goto T., Takahashi N., Kawada T., Ohinata K. Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2011. Vol. 302. P. E433—E440.

Выводы

В нашей работе показано, что исследованный пентапептид YPFVV-NH₂ при системном введении проявляет физиологическую активность и способен изменять поведение животных. На основании имеющихся литературных данных можно предположить, что действие пептида связано с активацией центральных μ -рецепторов. Эффекты пептида в значительной мере зависят от пола животных. Гендерные различия в действии сойморфин-5-амида, как и других опиоидных лигандов, могут быть объяснены не столько разницей в распределении опиатных рецепторов в мозге самцов и самок, сколько действием половых гормонов на работу нервной системы на клеточном уровне [6]. Также действие пептида зависит от возраста животных и от уровня стрессогенной нагрузки. Это соответствует результатам, ранее полученным при исследовании эффектов других экзорфинов в нашей лаборатории [1, 7].

У взрослых животных сойморфин-5-амид влияет преимущественно на нейрофизиологические структуры, опосредующие локомоторную активность. У детенышей локомоторная активность изменялась меньше, при этом в результате введения пептида у них отмечались существенные изменения уровня тревожности, изменяющие направленность в процессе полового созревания.

Выявление соответствующих этим изменениям поведения влияний сойморфин-5-амида на конкретные участки головного мозга требует более подробных исследований в будущем. Дальнейший анализ нейротропной активности сойморфинов и прочих экзорфинов, образующихся из белков распространенных пищевых продуктов, является актуальной темой для изучения в связи с ежедневным образованием этих пептидов в организме человека.

* * *

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 12-04-01200-а).

BEHAVIORAL EFFECT OF SOYMORPHIN-5 IN RAT

*E.A. Chesnokova, N.J. Saricheva, V.A. Dubynin, A.A. Kamenskij,
V.N. Kalikhevich, Z.A. Adermasova*

The behavioral effects of YPFVV-NH₂ (an analogue of soymorphin-5, an exorphin derived from soy protein) in rat were investigated for the first time. Rats of different sex and age were tested. It was shown that in adult rats the stimulation of locomotion (in males) was the main effect of peptide injection. In juvenile rats, in turn, the main effect of YPFVV-NH₂ was related to anxiety. Anxiolytic effect superseded anxiogenic effect during puberty. Finally, manifestation of peptide effects depended on animals' stress level.

Key words: *soymorphin, locomotion, anxiety.*

Сведения об авторах

Чеснокова Екатерина Алексеевна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-719-20-28; e-mail: katyachesn@gmail.com

Сарычева Наталия Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-903-229-00-23; e-mail: nsarycheva@gmail.com

Дубынин Вячеслав Альбертович — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: dva-msu@yandex.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Калихевич Виктор Николаевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета СПбГУ. Тел.: 8-812-328-97-88; e-mail: vkalihevich@jand.ru

Ардемасова Зоя Александровна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. кафедры природных соединений химического факультета СПбГУ. Тел.: 8-812-328-97-88; e-mail: ardzoia@yandex.ru