



УДК 547.254.7'233.3.052 : 57.017.4

© 1993 К. В. Мальцев, В. В. Ульяшин,
А. А. Карелин, В. И. Цетлин, С. В. Беляев,
В. Т. Иванов, А. Л. Рылов *, О. Н. Долгов *, В. В. Шерстнев *

НЕЙРОАКТИВНЫЕ КОМПЛЕКСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЦИНКА ИЗ МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

* Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН, Москва

Из кислотного экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота после нескольких хроматографических стадий очистки получена фракция, которая при центральном введении вызывает у крыс индукцию внутривидового агрессивного поведения, характеризующуюся спонтанными агрессивными схватками с одновременным длительным повышением электроболевой агрессии и угнетением хищнического и межсамцовского агрессивного поведения. При внутривенном и внутрибрюшинном введении заметного влияния на агрессивное поведение животных не отмечено. Установлено, что действующим началом этой фракции являются комплексные соединения цинка с различными алифатическими аминами. Аналогичная или более высокая поведенческая активность обнаружена у серии синтетических комплексов цинка с различными лигандами, которые предложено использовать для моделирования некоторых нервно-психических расстройств, связанных с повышенным уровнем агрессивности.

Идентификация веществ, обладающих ярко выраженным воздействием на поведенческие реакции животных, представляют значительный научный и практический интерес. Традиционно принято считать, что подобная регуляция проявлений высшей нервной деятельности в основном связана с нейропептидами, хотя до настоящего момента однозначно не показано наличие ни одного пептидного «коннектора».

В настоящей работе описано выделение биологически активного вещества, действие которого, по данным биологического тестирования, вполне укладывалось в рамки представлений о проявлениях активности подобных «коннекторов».

Необходимым условием для определения наличия любой биологической активности является обогащение исследуемого биологического материала, осуществляемое по какому-либо принципу.

Исходным материалом для выделения нейроактивных веществ служит основная фракция кислотного экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота (к.р.с.). Эта фракция получена в результате экстракции 10% уксусной кислотой предварительно автоклавированного и гомогенизированного мозга к.р.с. и двух последовательных стадий ионообменной хроматографии: на катионообменной смоле КУ-2, а затем на СМ-молселеекте А-25 (рис. 1). При таком способе первичной

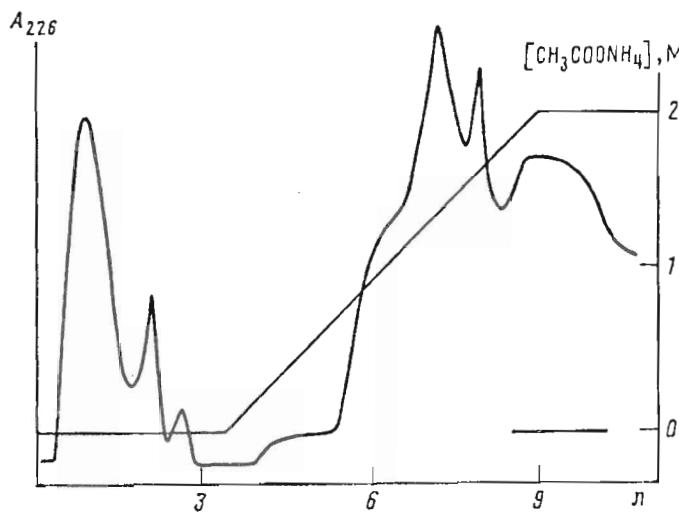


Рис. 1. Ионообменная хроматография на СМ-молселекте фракции мозга к.р.с., полученной после катионообменника КУ-2. Отмечена фракция, обладающая биологической активностью

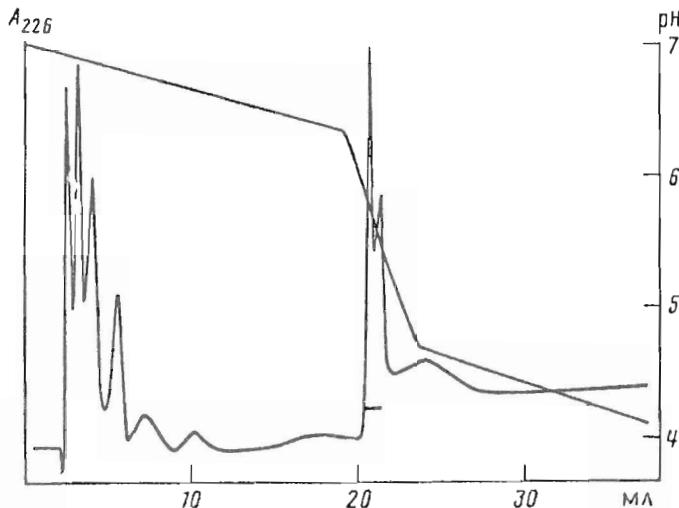


Рис. 2. Хроматографическое разделение биологически активной фракции (рис. 1) на колонке ($4,6 \times 250$ мм) с Silasorb 600, уравновешенным 0,1 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,0), с использованием градиента рН от 7 до 4. Скорость элюции 1 мл/мин. Здесь и на рис. 4, 5 отмечена область элюции биологически активной фракции

очистки биологического материала основную массу полученных веществ составляли сильно основные соединения с молекулярной массой до 10 кДа.

Тестирование биологической активности фракции проводили путем инъектирования их крысам в латеральные желудочки мозга и регистрации вызываемых физиологических проявлений. Исследуемая фракция обладала ярко выраженной агрессотропной активностью. При внутрижелудочковом введении она индуцировала спонтанные агрессивные схватки у 30% подопытных крыс через 12–20 ч после инъекции, регистрировавшиеся на протяжении 4–6 ч, а также вызывала достоверное повышение электроболевой агрессивности и в то же время снижение хищнической и межсамцовой агрессии. Влияние однократной инъекции исследу-

емой фракции на указанные виды агрессивного поведения крыс наблюдалось в течение 3 сут.

Сразу после инъекции у подопытных животных наблюдали гиперкинетические реакции: круговые побежки по камере, а также пилоэрекцию («вздыбливание» шерсти), экзофталм (выпучивание глаз), тахикардию, продолжавшиеся 1,5–2 ч.

Первично развившийся симптомокомплекс сменялся гиподинамическим состоянием, характеризовавшимся вялостью, отсутствием социальных контактов, характерными «сгорблеными» позами. Указанное состояние наблюдалось у животных в течение 10–16 ч, после чего заметных изменений спонтанной двигательной активности не отмечалось.

После предварительного обогащения материала оптимальные дозы, при введении которых наблюдалась весь спектр агрессотропной активности, составляли около 2,5 мг/кг. Введение меньших доз (до 0,5 мг/кг) не приводило к проявлениям спонтанной агрессивности, но значительно повышало активность подопытных животных в teste электроболевой агрессивности. Дозы более 6,0 мг/кг вызывали гибель 100% крыс. Следует отметить, что при тестировании фракций в процессе выделения активного вещества не преследовалась цель установить точную зависимость эффекта от дозы. Такое исследование было осуществлено с использованием конечного продукта очистки (активная фракция, см. рис. 5).

Таким образом, было показано, что низкомолекулярная основная фракция кислотного экстракта гомогената мозга к.р.с. обладает широким спектром агрессотропной активности. Следующей задачей стало выделение активного начала из этого материала.

Для определения молекулярной массы биологически активного вещества использовали ультрафильтрацию. Было показано, что мембрана PM-10 полностью пропускает активное вещество, в то время как мембрана UM-0,5 задерживает большую его часть. Это позволило определить молекулярную массу выделяемого вещества в пределах от 300 до 1000 Да.

Дальнейший анализ первично очищенной активной фракции проводили при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На колонке TSK 2000 SW в 0,1% трифтормукусной кислоте активная фракция элюируется с полным объемом колонки. На колонках Silasorb 600 и Ultrasphere-ODS, т. е. как на прямой, так и на обращенной фазе, в 0,1% трифтормукусной кислоте активная фракция не сорбировалась. Использование градиента pH от 7 до 4 в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере при хроматографии на колонке Silasorb 600 привело к сорбции и значительной очистке активной фракции, однако форма градиента, определяемая природой буфера, не позволила получить достаточное разрешение веществ в области элюции активной фракции (рис. 2). В процессе дальнейшей работы эта хроматографическая операция была введена в качестве одной из предварительных стадий очистки (рис. 3). В результате удалось добиться примерно восьмикратной очистки по весу активной фракции по сравнению с веществом, полученным после хроматографии на СМ-молселе. При биологическом тестировании материала, полученного после хроматографии на силикагеле, на животных действующие дозы составили 0,15–0,2 мг/кг.

В процессе подбора условий дальнейшего выделения активного вещества, при использовании гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25 sf, было достигнуто отделение более высокомолекулярной (пептидной) фракции от собственно агрессотропной фракции [1]. При последующем биологическом тестировании было показано, что совместное введение собственно агрессотропной фракции и пептидной фракции подопытным животным значительно изменяет общую картину поведенческих проявлений и снижает эффективные агрессогенные дозы в 1,5–2 раза. При дальнейшем исследовании из пептидной фракции был выделен ряд новых биологически активных пептидов [2, 3].

Для обессоливания полученной после силикагеля фракции удалось подобрать систему разделения на колонке с биогелем P2 в 0,1 М HCl (рис. 4). В этих

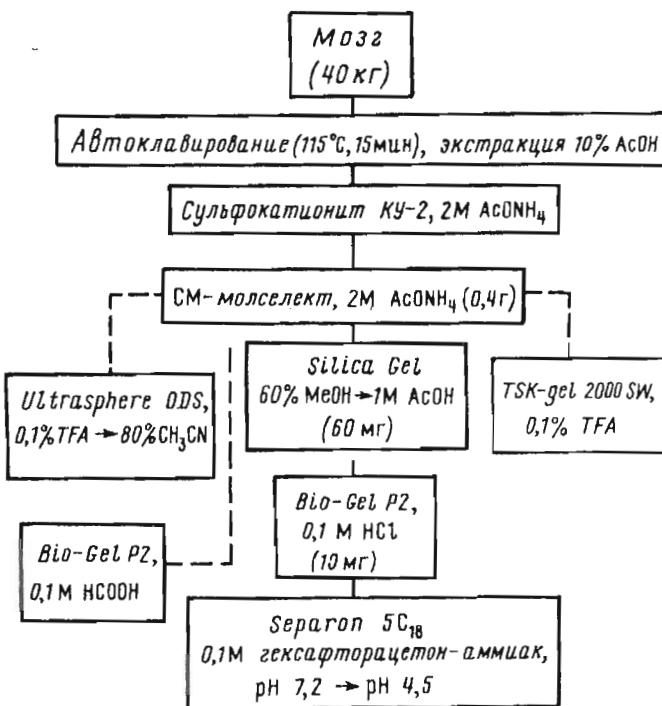


Рис. 3. Схема выделения цинковых комплексов алифатических аминов

условиях фракция элюировалась несколько позже полного объема колонки, что позволило добиться ее обессоливания.

Обессоленная фракция была подвергнута кислотному гидролизу в стандартных условиях аминокислотного анализа (5,7 н. HCl, 110° С, 20 ч). Биологическое тестирование показало, что такая обработка не влияет на проявление активности. Аминокислотным и N-концевым анализом показано отсутствие в активной фракции аминокислот, т. е. доказана непептидная природа активного вещества. Анализ содержания углеводов дал отрицательный результат. Обработка дансиликхоридом также не приводила к инактивации, что указывает на отсутствие способных модифицироваться аминогрупп и гидроксилов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография на колонке Separon C-18 в специально подобранных условиях (рис. 5) позволила получить достаточно очищенную для структурного анализа активную фракцию. Эффективные дозы для очищенного таким образом вещества составляют 0,05—0,1 мг/кг.

Масс-спектрометрия полученной фракции показала отсутствие соединений с молекулярной массой более 100 Да. При подкислении образца 0,1 М HCl были идентифицированы пики веществ, соответствующих по молекулярной массе хлориду цинка с характерным набором изотопов. На основании этих данных был сделан вывод о присутствии в активной фракции ионов цинка.

С помощью ЯМР-спектроскопии было показано наличие в активной фракции третичных аминов различного состава. Эти данные получили подтверждение при использовании хроматомасс-спектрометрии. Были идентифицированы диизопропилметиламин (около 50%), триэтиламин (около 20%) и диметилэтиламин (около 15%), а также другие третичные амины (триметиламин, изопропилдиметиламин, диэтилметиламин).

При внутрижелудочковом введении крысам хлорида или ацетата цинка в дозах 0,5—1,0 мг/кг или же значительных доз (5—10 мг/кг), гидрохлоридов

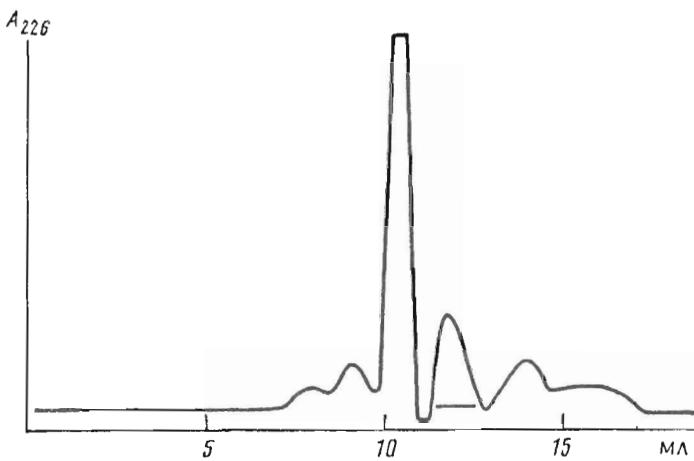


Рис. 4. Гель-хроматография биологически активной фракции на колонке (0,4 × 150 см) с биогелем Р2, уравновешенным 0,1 н. HCl. Скорость элюции 7 мл/ч

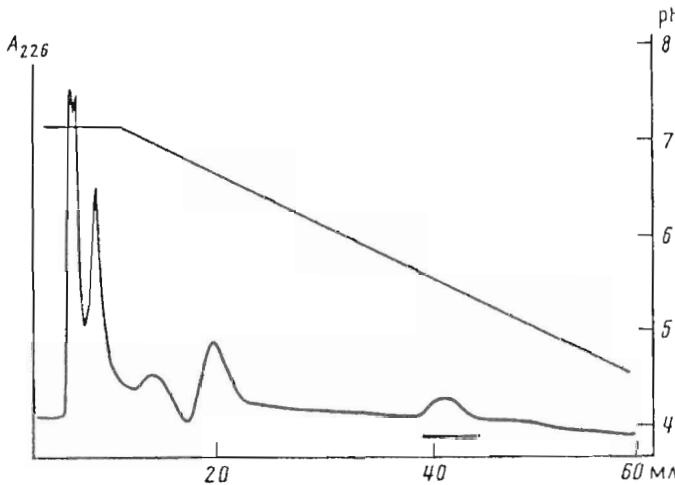
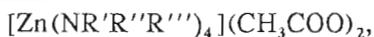


Рис. 5. Высокоэффективная жидкостная хроматография на колонке (3 × 150 мм) с Separon C18, уравновешенным 0,1 М гексафторацетон-аммонийным буфером (рН 7,2) в присутствии 40% метанола, с использованием градиента рН от 7,2 до 4,5. Скорость элюции 0,5 мл/мин

различных третичных аминов не наблюдалось изменений агрессивного поведения подопытных животных ни в одном из использовавшихся тестов.

Комплексное соединение цинка с триметиламином в условиях внутрижелудочкового введения вызывало у крыс симптомокомплекс физиологических реакций (характер и последовательность поведенческих проявлений, их выраженность и продолжительность), сходный с тем, который наблюдался при инъекциях эндогенной активной фракции. Эффективные дозы при этом составляли примерно 0,15—0,25 мг/кг, что несколько больше, чем в случае эндогенной активной фракции (0,05—0,1 мг/кг) (табл. 1).

Таким образом, можно считать, что биологически активное начало представляет собой обычный комплекс цинка с третичными аминами переменного состава с общей формулой



где R', R'' и R''' — алифатические радикалы.

Таблица 1

Уровень спонтанной агрессивности крыс в условных баллах после внутрижелудочных инъекций высокоочищенной агрессогенной фракции из мозга крупного рогатого скота

Вводимые дозы, мг/кг	Количество подопытных животных	Время после инъекции, ч			
		3	24	48	72
Контроль	10	0	0	0	0
0,01	12	0	0	0	0
0,05	12	0	1,1 ± 0,4*	0	0
0,1	15	0	1,9 ± 0,4*	0	0
0,15	15	0	2,2 ± 0,5*	0,3 ± 0,1	0
0,25	15	0	2,3 ± 0,9*	0,5 ± 0,2	0
0,5	15	0	2,8 ± 0,8*	0,9 ± 0,2*	0
0,75	15	0	—	—	—
1,0	15	—	—	—	—

* $P < 0,05$. Прочерк означает гибель всех животных в группе.

Таблица 2

Влияние комплексного соединения цинка с диметилэтиламином при внутрижелудочных инъекциях в дозе 0,15 мг/кг на электроболевую, хищническую и межсамцовую агрессивность крыс

Виды агрессивного поведения	Количество подопытных животных	Интервал времени до момента тестирования, ч		
		1	3	24
Электроболевая агрессивность (в баллах)	22	9,1 ± 3,0	3,6 ± 1,4	39,7 ± 3,5*
Контроль (физ. раствор)	26	21,3 ± 4,5	23,5 ± 6,1	19,9 ± 4,2
Хищническая агрессивность (%) крыс — убийц мышей ко всем тестируемым)	14	0*	0*	14,3
Контроль (физ. раствор)	18	33,3	55,6	88,9
Межсамцовая агрессивность (%) интрудеров, атакующих резидентов ко всем тестируемым)	17	0*	0*	5,9*
Контроль (физ. раствор)	15	26,7	47,7	86,7

* $P < 0,01$.

Подобные синтезированные комплексы цинка с триэтиламином, триметиламином и диметилэтиламином при внутрижелудочковом введении вызывали у крыс индукцию спонтанной агрессивности, близкую той, которая наблюдалась после инъекции эндогенной биологически активной фракции, а также оказывали влияние на другие формы агрессивного поведения (табл. 2).

Были получены также комплексы цинка с рядом веществ различной природы. Некоторые из этих соединений при внутрижелудочных инъекциях вызывали у животных изменения агрессивного поведения, сходные с теми, которые наблюдались после введения комплексных соединений цинка с третичными аминами (табл. 3). Эффективные дозы для таких комплексов варьировали в широком

Таблица 3

Сравнение физиологических эффектов цинковых комплексов различных соединений

Комплексообразующие соединения	Количество подопытных животных	Дозы, вызывающие физиологические эффекты, мг/кг			
		LD ₅₀	Гиперкинезы	Гипокинезы	Индукция агрессивных схваток
Триметиламин	8	0,3	0,1	0,05	0,05
EDTA	6	0,08	—*	—	—
8-Гидроксихинолин	6	0,15	—	—	—
Лизин	8	0,08	0,08	0,05	0,06
Аргинин	8	0,15	0,09	0,07	0,06
Аланин	8	0,08	0,03	0,03	—
Тирозин	6	0,08	—	—	—
Глицин	8	0,08	0,01	0,006	0,01
Глутаминовая кислота	8	0,03	0,005	0,002	0,007
N-Ацетилглюкозамин	6	0,05	0,02	—	—

* Прочерк означает, что после введения вещества эффект не наблюдался.

диапазоне. В частности, для комплекса цинка с глутаминовой кислотой эффективные дозы на порядок ниже, чем в случае природной фракции.

Таким образом, наблюдаемые изменения агрессивного поведения подопытных животных связаны с действием именно цинка в форме комплексного соединения, лиганда в котором играют второстепенную роль.

Присутствие в мозге значительного количества цинка обусловливается его ролью в функционировании ряда специфических металлоферментов, принимающих участие в процессинге белков и пептидов [4]. Однако не доказано существование его в виде эндогенных комплексов с низкомолекулярными соединениями. Учитывая нестабильность комплексов цинка с третичными аминами в кислых условиях выделения (экстракция и ряд хроматографических стадий), в нашем случае также преждевременно утверждать, что идентифицированные в качестве комплексонов третичные амины являются природными лигандаами цинка в мозге. В то же время имеются данные о присутствии и функционально важной роли цинковых комплексов с пептидами в организме [5].

Изучение биологических эффектов как эндогенных, так и экзогенных комплексных соединений цинка представляет практический интерес в связи с возможностью получения с их помощью у животных модельных нейрофизиологических состояний, которые могут быть рассмотрены как экспериментальные эквиваленты некоторых нервно-психических расстройств человека с проявлениями патологической агрессивности и использованы для тестирования вновь создаваемых нейротропных средств депрессирующего действия [6]. Одним из методов моделирования психоэмоциональных расстройств может стать применение нейротропных соединений для создания у подопытных животных устойчивого психического аффективного состояния с проявлениями агрессии. Такое состояние, вызываемое инъекциями животным исследованных цинковых соединений, может быть применено для испытаний новых фармакологических нейротропных препаратов с антиагрессогенным действием.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие приборы: высокоэффективные жидкостные хроматографы фирм Waters (США) и LKB (Швеция), комплекс для жидкостной хроматографии фирмы LKB (Швеция), коллектор фракций 201 Gilson (Франция). Хроматографии обсчитывались при помощи персонального компьютера «Искра 226» (СССР).

Использовали следующие сорбенты и колонки: молселект А25 (СССР), Silasorb (ЧСФР), Bio Gel P2 (Bio-Rad, США), Ultrasphere ODS (Beckman, США), Separon (ЧСФР).

Тестирование биологической активности получаемых фракций и синтетических комплексных соединений цинка проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180—200 г. Для оценки спонтанной агрессивности крыс, вызываемой введением исследуемых фракций и синтетических соединений, применяли балльную систему [6]. Электроболевое, хищническое и межсамцовое агрессивное поведение тестировали по общепринятым методикам [7].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Вилкоксона—Уитни—Манна и критерию Стьюдента с использованием персонального компьютера Apricot (Великобритания) и пакетов программ Microstat и Supercalc 4.

Выделение биологически активной фракции из мозга крупного рогатого скота. Мозг крупного рогатого скота в количестве 40 кг автоклавировали 15 мин при 115° С, затем гомогенизировали ножевым гомогенизатором 5 мин при 12000 об/мин в 10% уксусной кислоте. Гомогенат доводили водой до объема 80—100 л, вносили 10 л катионообменной смолы КУ-2 и инкубировали 2 ч. Отбрасывали на сите гомогенат, а отфильтрованную смолу загружали на стеклянный фильтр и десорбировали вещества 2 М аммоний-ацетатным буфером (рН 5,5). Фильтрат лиофилизовали, растворяли в воде и наносили на колонку с СМ-молселектом А-25 (12 × 60 см). Элюцию проводили 2 М ацетатом аммония (рН 5,5) при скорости 300 мл/ч. Собранные фракции (по 300 мл) лиофилизовали и тестировали на животных [6, 7]. Фракцию, проявляющую биологическую активность, наносили на колонку с силикагелем (3 × 40 см), уравновешенным 0,1 М ацетатом аммония (рН 6,8) в 60% метаноле, а затем элюировали 1 М уксусной кислотой. Лиофилизовали и получали около 0,4 г вещества.

Для ультрафильтрации использовали ячейку и фильтры фирмы Amicon (США). Условия последующих стадий хроматографической очистки даны в подписях к рисункам.

Аминокислотный анализ осуществляли на приборе Durrum-500 (USA) после гидролиза в 5,7 н. HCl (110° С, 24 ч). N-Концевой анализ проводили по методике [8]. Вещества модифицировали дансилхлоридом (Pierce, США) в 0,3 М натрий-карбонатном буфере (рН 9,0) 2 ч при 24° С в темноте и при постоянном перемешивании.

ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker MW-500 (Германия). Для масс-спектрометрии использовали прибор фирмы Kratos (США), хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе Varian (США).

Цинковые комплексы третичных аминов получали по общепринятым методикам, растворяя 3 г гидроокиси цинка в соответствующем амине; 2 мл образующегося раствора доводили 0,1 М аммоний-ацетатным буфером (рН 6,5) до 5 мл и обессоливали на колонке (1 × 90 см) с сефадексом G-15, уравновешенным в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 6,5), после чего лиофилизовали. Получали 50—80 мг вещества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов В. Т., Карелин А. А., Михалева И. И., Васильевский Б. В., Свиридов В. И., Назимов И. В. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 10—11. С. 1271—1311.
2. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Ul'yashin V. V., Karelina E. V., Sudakov K. V., Sherstnev V. V., Dolgov O. N., Klusha V. E., Severin S. E., Jr., Mikeladze D. G. // Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Proceedings of Eleventh American Peptide Symposium July 9—14, 1989, La Jolla, California, USA)/Eds Rivier J. E., Marshall G. R. Leiden: ESCOM, 1990. P. 462—463.
3. Karelina A. A., Karelina E. V., Ul'yashin V. V., Alyonycheva T. N., Alexandrov A. P., Volkova T. M., Tsetlin V. I., Grishin E. V., Ivanov V. T., Dolgov O. N., Nikitin N. P., Pletnikov M. V., Galeva N. N., Sherstnev V. V., Spiglazov V. I., Dimitriadi N. A. // Peptides: Chemistry and Biology (Proceedings of

- Twelfth American Peptide Symposium June 16—21, 1991, Boston, Massachusetts, USA)/Eds Rivier J. E., Marshall G. R. Leiden: ESCOM, 1992. P. 157—158.
4. McGinty J. F., Kanamatsu T., Hong J., Morton J. D., Frederickson C. J.//UCLA Forum Med. Sci. 1988. V. 28 (Nutr. Modulation Neural Funct.). P. 271—287.
 5. Checler F., Barielli H., Kitabgi P., Vincent J.-P.//Biochimie. 1988. V. 70. P. 75—82.
 6. Рылов А. Л., Пак Е. С., Карелин А. А., Ульяшин В. В., Беляев С. В., Козловская М. М., Шерстнев В. В.//Журн. высш. нерв. деятельности им. И. П. Павлова. 1990. Т. 40. С. 783—785.
 7. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П.//Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения/Ред. Батуев А. С. М.: Высш. школа, 1990. С. 1—399.
 8. Левина И. Б., Мурадов Х. Г., Назимов И. В.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 165—171.

Поступила в редакцию
18.I.1993

После доработки
8.IV.1993

K. V. Mal'tsev, V. V. Ul'yashin, A. A. Karel'in, V. I. Tsetlin,
S. V. Belyaev, V. T. Ivanov, A. L. Rylov*, O. N. Dolgov*,
V. V. Sherstnev*

NEUROACTIVE ZINK COMPLEXES FROM BOVINE BRAIN

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;

* P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical
Sciences, Moscow

The fraction obtained from acidic extract of bovine brain homogenate after several steps of chromatographic purification provokes spontaneous aggressive encounters in rats upon intracerebroventricular injection. The simultaneous long-term raising of electric shock-induced aggression with the supressing of muricidal and intraspecies aggressive behaviour has been observed. Intravenous and intraperitoneal injections of this fraction induce no behavioural changes in rats. It has been determined that the fraction consists of complex compounds of zink with various aliphatic amines. A similar or higher behavioural activity has been discovered in series of synthetic complexes of zink with different ligands, that are suggested for use in modelling any nervous and psychiatric disorders connected with an increased aggression level.