

УДК 577.175.852

## СООТНОШЕНИЕ ЭНКЕФАЛИНОВОГО И АНГИОТЕНЗИНОВОГО ПЕПТИДНЫХ ЗВЕНЬЕВ В РЕГУЛЯЦИИ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС

Гомазков О.А., Ростовцев А.П.,  
Панфилов А.Д.

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР,  
Москва

Исследовано участие энкефалиновой системы в реализации агрессивного (мурицидного) поведения крыс в сравнении с эффектами ангиотензина II. Активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы, определяемая в зонах мозга, гипофизе и надпочечниках нормальных и мурицидных крыс с помощью дансил-Phe-Ala-Arg, была увеличена в стриатуме мурицидных крыс и составляла 0,83 нмоль дансил-Phe-Ala/мин · мг белка против 0,62 нмоль дансил-Phe-Ala/мин · мг белка у нормальных крыс. Мурицидная реакция тормозилась антителами к Leu-энкефалину, введенных в боковой желудочек мозга. Одновременное интрацеребральное введение антител к Leu-энкефалину и внутрибрюшинное введение ангиотензина II приводило к меньшему ингибированию мурицидности по сравнению с эффектами веществ, вводимых по отдельности. Можно предположить существование некоего третьего звена, участвующего в регуляции мурицидности, при этом ангиотензиновая и энкефалиновая пептидергические системы выступают в качестве функциональных антиподов, модулирующих действенность этого третьего звена.

\* \* \*

Принято считать, что иерархически выстроенное соотношение определенных систем является одним из ведущих механизмов регуляции функциональных систем организма [1]. Этим обстоятельством в значительной мере может быть объяснен феномен «полифункциональности», когда одни и те же пептиды участвуют в регуляции казалось бы не сопряженных физиологических реакций организма. Для ангиотензина II, например, обнаружено участие в регуляции гемодинамики, питьевой мотивации, содержания  $\text{Na}^+$ , наконец, как было установлено совсем недавно, в регуляции мурицидности — особой формы агрессивного поведения крыс [2—4].

На модели мурицидности может быть рассмотрена еще одна особенность регуляторной функции нейропептидов — сопряженность с системами других пептидов или с «классическими» медиаторами. Предыдущими исследованиями установлена причастность ангиотензина II к регуляции мурицидного поведения. Об этом свидетельствовали: а) пониженная активность ангиотензинпревращающего фермента в ряде отделов мозга у мурицидных животных; б) торможение мурицидного поведения крыс при

интрацеребральном или внутривнутрибрюшинном введении ангиотензина II; в) восстановление мурицидности при введении крысам антисыворотки к этому пептиду [4].

Несмотря на отсутствие информации о непосредственных биохимических звеньях ангиотензиновой и энкефалиновой пептидных систем, множество фактов указывает на их участие в регуляции одних и тех же физиологических актов. Это относится к реализации сердечно-сосудистых ответов, регуляции пищевой и алкогольной мотиваций, стрессобусловленных реакций организма и др. [5]. В данной работе анализируется участие энкефалиновой системы в реализации мурицидного поведения крыс в сравнении с эффектами ангиотензина II.

### Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах массой 180—200 г. Крыс помещали в индивидуальные клетки и содержали на стандартной виварийной диете *ad libitum*. Из общей группы животных при регулярном тестировании производили отбор агрессивных крыс: животное признавалось мурицидным, если в течение 3 мин оно атаковало подсаженную белую мышь, убивая ее укусами в переднюю часть тела. Тестирование и отбор крыс производили в течение 4—5 недель до получения стабильных показателей мурицидности для каждого животного. Критериями агрессивного поведения считали факт мурицидности и латентный период до атаки на мышь с момента ее подсадки.

На мурицидных и контрольных крысах были осуществлены четыре серии экспериментов. В первой серии определяли активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы (ЭОК; КФ 3.4.17.10) в гипофизе, ряде зон мозга и надпочечниках. Выделение зон мозга проводили по методу Glovinsky, Iversen [6]. Ферментативную активность определяли в тканевых гомогенатах с использованием флуорогенного субстрата дансил-Phe-Ala-Arg по методу Fricker, Snider [7] в модификации Ростовцева и соавт. [8].

Во второй серии исследовали влияние специфичных антител к Leu-энкефалину на мурицидное поведение крыс. Фракцию IgG получали аффинной хроматографией на колонке с Protein A-сефарозой из сыворотки крови кролика, иммунизированного конъюгатом Leu-энкефалин-бензохинон-БСА. Антисыворотку и IgG тестировали методом иммуноферментного анализа. Специфичные IgG и IgG, выделенные из нормальной сыворотки крови кролика, вводили в область боковых желудочков мозга с помощью микрошприца (5 мкг белка в 10 мкл физиологического раствора).

В третьей серии исследовали эффект одновременного введения антител к Leu-энкефалину и ангиотензина II. Ангиотензин II вводили внутривнутрибрюшинно в дозе, определенной ранее [4].

Четвертая серия была проведена на крысах, утративших мурицидность или с ослабленной мурицидной реакцией. Животным интрацеребраль-

но вводили [D-Ala<sup>2</sup>,Leu<sup>5</sup>] энкефалин с целью выявления возможной «триггерной» роли пептида в регуляции агрессивного поведения крыс [3].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента и t-критерия Уилкоксона. Для оценки латентного периода до атаки, значительно варьиовавшего по величине у животных с разной степенью агрессивности, использовали критерий знаков.

В работе использованы: ангиотензин II амид (Экспериментальный завод Института органического синтеза АН ЛатвССР), дансил-Phe-Ala-Arg, синтезированный проф. В.Н.Незавибацько (Институт молекулярной генетики АН СССР), [D-Ala<sup>2</sup>,Leu<sup>5</sup>] энкефалин, любезно предоставленный проф. М.И.Титовым (ВКНЦ АМН СССР), Protein A-сефароза («Pharmacia», Швеция); остальные реактивы отечественного производства категории х.ч. Все растворы приготавливали на деионизованной воде (Milli Q, Millipore).

### Результаты исследований

Из данных, представленных на рис.1, видно, что в различных тканях и областях мозга величина У.А. ЭОК не одинакова—максимальная активность характерна для гипофиза, минимальная—для надпочечников. Среди исследованных зон мозга наибольшая активность ЭОК отмечена в полосатом теле—0,62 нмоль дансил-Phe-Ala/мин· мг белка. Именно в этой области мозга было обнаружено значительное и достоверное различие между величинами У.А. ЭОК у нормальных и агрессивных крыс: у последних эта величина составляла 0,83 нмоль дансил-Phe-Ala/мин· мг белка (+34%). Можно полагать, что у мурицидных крыс в стриатуме увеличено образование энкефалина. Из этого следует, что изменение концентрации пептида за счет экзогенного введения или связывания антителами может явиться фактором, модулирующим проявление мурицидности.

При интрацеребральном введении мурицидности крысам специфичных антител, полученных из анти-Leu-энкефалиновой антисыворотки, удалось затормозить проявление агрессивной реакции, что выражалось в «отказе» части животных от мурицидности и в увеличении латентного периода до атаки на жертву у остальных крыс (таблица). При интрацеребральном введении таким же мурицидным крысам физиологического раствора или IgG, выделенных из нормальной сыворотки крови, достоверных изменений латентного периода не было обнаружено. Это указывает на специфичность тормозящего мурицидность влияния анти-Leu-энкефалиновых антител.

Поскольку в предыдущей работе [4] было продемонстрировано тормозящее мурицидность влияние ангиотензина II, проявлявшееся как при центральном, так и при внутрибрюшинном введении пептида, в третьей серии данного исследования изучали эффект сочетанного введения ангио-

тензина II и антител к Leu-энкефалину. При такой постановке экспе-

Таблица

Торможение активной реакции крыс под влиянием антител к Leu энкефалину

Группы животных	Время после введения				
	2	4	6	24	48
Физиологический раствор (n=14)	0/6,7	0/8,0	6,6/3,3	0/2,0	0/2,0
Нормальные IgG (n=16)	25,0/25,5*	25,0/24,1	0/4,0	6,3/4,7	0/2,7
Анти-Leu-энкефалиновые IgG (n=16)	43,8/58,3*	68,8/92,5*	50,0/61,0*	37,5/45,6*	6,3/3,3

**Примечание.** В таблице представлены: % животных, утерявших мурицидность (изменение латентного периода до атаки на мышь). Все вещества вводили интрацеребрально в 10 мкл физиологического раствора на животное. Конечная концентрация IgG составляла 0,5 мг белка/мл. Связывание Leu-энкефалина составляло  $\approx 10^{-7}$  моль/мг белка. Исходная величина латентного периода составляла 1—2 с; \* $p < 0,05$  по отношению к контролю.

римента ставилась задача определения возможной сопряженности механизмов тормозящего действия двух различных пептидных систем. При этом можно было бы ожидать большего торможения мурицидной реакции (аддитивный эффект) или, наоборот, ее меньшего торможения в случае конкурентных взаимоотношений механизмов, реализующих проявление мурицидности. На рис.2 представлены результаты основного опыта (ангиотензин II внутрибрюшинно + антитела к Leu-энкефалину интрацеребрально) и соответствующих контролей: ангиотензин II (внутрибрюшинно) или IgG, выделенные из антисыворотки или нормальной сыворотки (интрацеребрально), в сочетании с внутрибрюшинным введением физиологического раствора.

Опыт подтвердил закономерность тормозящего действия отдельно вводимых ангиотензина II и антител к Leu-энкефалину, а также показал

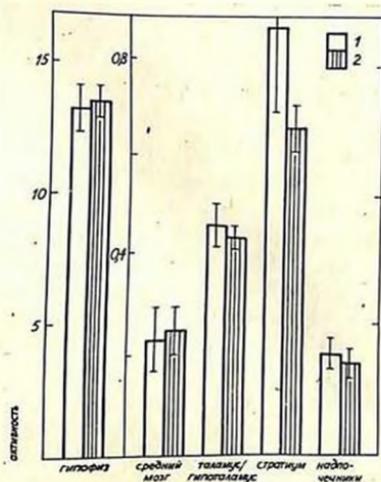


Рис.1. Активность энкефалинообразующей карбоксипептидазы (в нмоль дансил-Phe-Ala/мин/мг белка) в зонах мозга, гипоталамусе и надпочечниках агрессивных (1) и неагрессивных (2) крыс, \*  $p < 0,05$

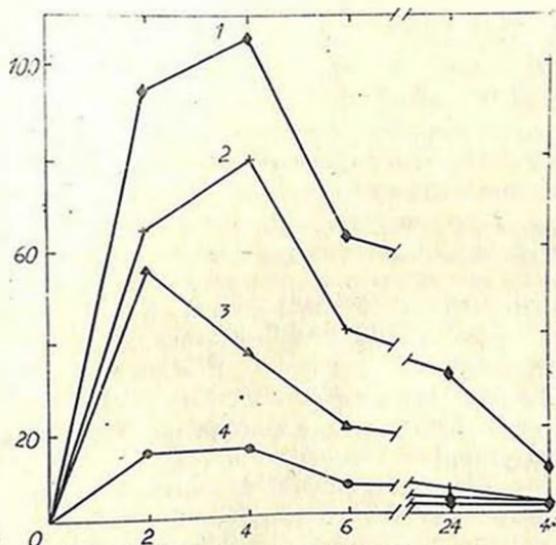


Рис. 2 Торможение агрессивной реакции у мурицидных крыс под действием ангиотензина II и антител к Leu-энкефалину: 1 — ангиотензин II (i.p.), 15 мкг/кг веса в 0,5 мл физиологического раствора (n=7); 2 — IgG, выделенные из антисыворотки к Leu-энкефалину (i.s.v.), 5 мкг белка/животное в 10 мкл физиологического раствора (n=6); 3 — одновременное введение ангиотензина II (i.p.) и специфических IgG (i.s.v.), n=7; 4 — одновременное введение IgG, выделенных из нормальной сыворотки кролика (i.s.v.) и физиологического раствора (i.p.), n=7. По оси абсцисс — время после введения препаратов (ч), по ост ординат — величина латентного периода до атаки на мышь (с)

приводило к восстановлению или усилению мурицидности.

### Обсуждение результатов

Описанные серии опытов свидетельствуют о причастности энкефалинергической системы мозга к регуляции агрессивного (мурицидного) поведения крыс. Такой вывод складывается из следующих фактов: повышенной энкефалинообразующей активности в стриатуме; способности интрацеребрально введенных антител к Leu-энкефалину тормозить проявление агрессивной реакции.

Следует отметить, что проявление мурицидности связано не только

снижение ингибирующего мурицидность действия вводимых одновременно ангиотензина II и специфических антител. Ослабление эффекта заметно как по общей продолжительности проявления мурицидной реакции, так и по величинам латентного периода в момент максимального тормозного действия (через 4ч после введения веществ).

С целью продолжить сопоставление энкефалин- и ангиотензинзависимых механизмов мурицидности в особой серии экспериментов было проведено исследование на крысах, утративших мурицидность или с ослабленной агрессивной реакцией. Ранее был обнаружен феномен восстановления мурицидности при введении крысам антисыворотки к ангиотензину II [4]. В настоящей работе интрацеребральное введение [D-Ala<sup>2</sup>,Leu<sup>5</sup>] энкефалина в дозе 10 мкг/кг не

с пониженным уровнем ангиотензина II в гипоталамусе и среднем мозгу, но и с повышенной выработкой энкефалинов в стриатуме. Увеличение содержания ангиотензина II при экзогенном введении пептида или снижение концентрации Leu-энкефалина при введении соответствующих антител однозначно приводило к угнетению агрессивной реакции мурицидных крыс. Таким образом, можно указать на наличие двух противоположно функционирующих пептидных звеньев, определяющих статус мурицидности: стимулирующего, поддерживающего агрессивность, энкефалинового звена и тормозящего ее—ангиотензинового. Для выявления характера соотношения этих звеньев важным явился эксперимент с одновременным введением мурицидным животным ангиотензина II и антител к Leu-энкефалину. Каждое вещество вводили в дозе, заведомо тормозившей агрессивную реакцию. Как показали эксперименты, отсутствие аддитивности эффекта этих веществ и, наоборот, ослабление тормозящего мурицидность действия каждого из них свидетельствует, на наш взгляд, о конкурентной сопряженности ангиотензиновой и энкефалиновой систем. Тормозящий мурицидность эффект ангиотензина II уменьшен в несколько раз на фоне пониженного под действием специфических антител содержания Leu-энкефалина: вводимого количества IgG достаточно для связывания  $10^{-9}$  моль Leu-энкефалина. И наоборот, ингибирующее действие антител к Leu-энкефалину также выражено меньше на фоне другого ингибитора мурицидности—ангиотензина II.

Исходя из этих построений, можно предположить существование некоего третьего звена (или цепочки звеньев), участвующего в реализации мурицидности как особой формы биологического поведения. Очевидно, ангиотензиновая и энкефалиновая пептидергические системы выступают, согласно приведенным данным, в качестве функциональных антиподов, регулирующих действенность этого третьего звена. При этом соотношение повышенной активности энкефалинового звена и пониженной—ангиотензинового являются функциональной основой статуса мурицидности.

Известны данные об участии ГАМК-ергической, серотониновой и катехоламиновой систем в модулировании мурицидного поведения [9,10]. Учитывая сопряженность центральных физиологических эффектов ангиотензина II и энкефалинов с этими и другими группами медиаторов, можно полагать, что названные пептиды являются элементами целостной регуляторной цепи формирования и поддержки определенных форм агрессивного поведения. Результаты, полученные на модели естественной формы агрессивного поведения, исходящего в своей основе из хищнического поведения, могут представить некоторые общебиологические закономерности нейромимической организации этого состояния. Приведенные результаты подчеркивают также значение уровня активности соответствующих ферментативных систем синтеза и деградации регуляторных пептидов в качестве молекулярной основы регуляции сложных поведенческих актов.

# INTERACTION OF ENKEPHALIN AND ANGIOTENZIN PEPTIDE SYSTEMS IN THE REGULATION OF RAT AGGRESSIVE BEHAVIOUR

Gomazkov O.A., Rostovtsev A.P.,  
Panfilov A.D.

*Institute of Medical Enzymology, USSR  
Academy of Medical Sciences, Moscow*

The role of the enkephalin system in the realization of aggressive behaviour in muricidal (mouse-killing) rats was investigated and compared with effects of angiotensin II. The activity of enkephalin-producing carboxypeptidase (EC 3.4.17.10) was assayed in various brain regions, pituitary and adrenals of normal and muricidal rats. The activity was increased in the striatum of muricidal rats. The muricidal reaction was inhibited by intraventricular (*iv*) injection of IgG prepared from the rabbit anti-[Leu]-enkephalin antiserum. Simultaneous injection of the IgG and intraperitoneal injection of angiotensin II diminished the inhibition of muricidal behaviour as compared with the effects of these substances given individually. We postulate the existence of an intermediate link participating in the control of muricidal behaviour. Angiotensin and enkephalin systems act as functionally opposite entities modulating the activity of this link.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Биохимия, т.51, вып.4, с.531—544, 1986.
2. Gonten D., Lang R., Lehmann E., Unger T. Biochem. Pharmacol., v.33, p.3523—3528, 1984.
3. Гомазков О.А. Вopr.мeд.химии, т.34, N 1, с.12—19, 1988.
4. Панфилов А.Д., Гомазков О.А., Комиссарова Н.В. Нейрохимия, т.6, N3, с.368—375, 1987.
5. Гомазков О.А., Ростовцев А.П., Комиссарова Н.В., Панфилов А.Д., Елистратова И.А., Фомин В.В. Патол.физиология и эксперим.терапия, N5, с.52—57, 1988.
6. Glovinsky I., Iversen L.L. J.Neurochem., v.13, p.655—669, 1966.
7. Fricker L.D., Snyder S.H. J.Biol.Chem., v.258, p.10950—10955, 1983.
8. Ростовцев А.П., Григорьянц О.О., Гомазков О.А. Вopr.мeд.химии, т.34, N1, с.126—129, 1988.
9. Mandel P., Mack G., Kempf E.—In: Psychopharmacology of aggression (ed. M.Sandler), p.95—110, Raven Press, N.Y., 1979.
10. Valzelli L.—In: Psychobiology of aggression and violence, p.123—152, Raven Press, N.Y., 1981.

Поступила 10.11.1988