

На правах рукописи

Хрусталеv Денис Александрович

Действие дельта-сон индуцирующего пептида при моделировании
дисфункций нейромедиаторных систем мозга крыс Вистар и Август
(экспериментальное исследование)

03.00.04. – биохимия

03.00.25. – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА 2005

Работа выполнена в лаборатории ультраструктуры и цитохимии мозга
ГУ НИИ мозга РАМН

Научные руководители:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Доведова Елизавета Леонтьевна;

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник

Худоевков Рудольф Михайлович.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук Узбекиев Марат Галиевич

доктор биологических наук Башкатова Валентина Германовна

Ведущая организация: НИИ физиологии им. Ухтомского А. А. Санкт-Петербургского Университета.

Защита состоится « » _____ 2005 г. в “ ”

на заседании диссертационного совета Д 212.203.13

при Российском университете дружбы народов

по адресу: 117198, ГСП, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, ГСП, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан “ ” _____ 2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор фармацевтических наук, доцент



Т.П. Лагуткина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Познавание центральных молекулярных механизмов, определяющих формы адаптивного видового и патологического поведения и предрасположенность к заболеваниям ЦНС является актуальной проблемой современной биологии. Представляет интерес изучение взаимоотношения между нейрохимическими и функциональными особенностями нервной системы и поведения индивидуумов с различным типом нервной системы. В последнее время в научных исследованиях приобретает все большее значение использование животных с генетически детерминированными формами поведения. Это позволяет изучать эмоциональные проявления и поведение этих животных в сопоставлении с морфофункциональной и биохимической организацией их мозга, а также изучать компенсаторные механизмы реакций этих животных на внешние воздействия (Башкатова В. Г. и соавт., 2003, 2004; Swerdlow N., Kuczenski R. et al., 2005; Corda M., Piras G., et al., 2005; Amini B., Yang P., et al., 2004).

Среди таких генетически выведенных животных заслуживают внимания крысы Август, которые характеризуются повышенной эмоциональной реактивностью, склонностью к стрессу и особенностями поведения (Судаков К. В., 1981; Полова Н. К., 1995; Войтенко Н. Н., 1998; Коплик Е. В. и соавт., 2004). Крысы Август и Вистар являются удобной моделью для изучения индивидуально-группового различия в поведении, и устойчивости и адаптации к стрессу. Это определяет перспективность сравнительного нейрохимического исследования мозга 2 линий крыс.

Поиск биологически активных веществ, в частности, коротких пептидов, способных регулировать протекание биохимических процессов, является одной из задач нейробиологии и нейрхимии.

Является крайне важным исследование механизмов нормализующего действия регуляторных пептидов на патологические процессы в мозге в условиях экспериментальных моделей. (Гомазков О. А., 1997).

В результате такого подхода становится возможной оценка перспективности дальнейшей работы, направленной на практическое применение пептидных соединений при патологических состояниях ЦНС.

Дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП) в настоящее время относят к эндогенным регуляторным пептидам. ДСИП оказывает модулирующее влияние на метаболические процессы в мозге при разных функциональных состояниях организма. В частности, показаны его антистрессорные и регуляторные эффекты при моделировании гипокинезии, гипероксии, холодовом и эмоциональном стрессе, гипоксии, эпилепсии (Салиева Р. М. и соавт., 1989; Менджеричкий А. М. и соавт., 1991; Коплик Э. В., Судаков К. В., 1997; Ковальзон В. М., 2001; Судаков К. В. и соавт., 2004; Шустанова Т. А. и соавт., 2004; Stanojlovic O. et al., 2004; Popovich I. G. et al., 2004). Выявлено влияние ДСИП на моноаминергические медиаторные системы мозга животных (Монаков М. Ю., Доведова Е. Л., 1998; Shandra A. A., Godlevskii L. S. et al., 1998; Khvatova E. M., Rubanova N. A., et al., 1995).

При моделировании функциональных расстройств особое место занимает амфетамин, способный вызывать у животных дисфункцию дофаминергической системы, выражающуюся в характерном стереотипном поведении («фенаминовая

стереотипия»), являясь сильным психостимулирующим препаратом (Kokinidis L., 1980; Machiyama Y. 1994; Машковский М. Д., 1993).

Считается доказанным участие нейромедиаторов и ферментных систем мозга (например, моноаминоксидазы) в этиологии некоторых неврологических и психических заболеваний (Москвитина Т. А., 1991, Войтенко Н. Н., 1998).

Настоящая работа направлена на изучение механизмов взаимодействия различных медиаторных систем и их взаимосвязи с морфохимической организацией мозга крыс Вистар и Август, отличающихся поведенческими характеристиками в условиях нормы и экспериментальной патологии.

Целью работы явилось изучить регулирующее влияние дельта-сон индуцирующего пептида на нейромедиаторные системы, участвующие в синтезе и распаде дофамина и серотонина, в сенсомоторной коре и хвостом ядре головного мозга крыс Вистар и Август, отличающихся устойчивостью к стрессу, в условиях моделирования дисфункции дофаминергической системы в короткие и длительные сроки путем системного введения амфетамина.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. В сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга контрольных крыс Вистар и Август исследовать активность ферментов, участвующих в синтезе (тирозингидроксилаза) и распаде дофамина (моноаминоксидаза Б), и содержание эндогенного дигидроксифениланина – предшественника дофамина.

2. В сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга интактных крыс Вистар и Август исследовать активность ферментов, участвующих в синтезе (триптофангидроксилаза) и распаде (моноаминоксидаза А) серотонина.

3. Изучить изменения исследуемых биохимических показателей в исследованных структурах мозга крыс Вистар и Август под влиянием амфетамина *in vivo* в течение 60 минут и 3-х недель.

4. Изучить влияние ДСИП *in vivo* на изменения биохимических показателей, возникающих под влиянием амфетамина.

5. Проанализировать направленность изменений дофаминергической и серотонинергической систем мозга крыс Вистар и Август в условиях системного введения амфетамина и действия ДСИП.

6. Провести сравнительный анализ ответных реакций исследованных структур мозга на действие ДСИП и амфетамина на метаболизм серотонина и дофамина.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У крыс Август, склонных к стрессу, активность ферментов, участвующих в синтезе серотонина и дофамина исходно ниже, чем у крыс Вистар, устойчивых к стрессу, что наиболее выражено в хвостом ядре.

2. Системы синтеза серотонина и дофамина в сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга крыс Вистар и Август на воздействие амфетамина реагируют реципрокно, а системы утилизации нейромедиаторов дают одностороннюю реакцию.

3. Введение ДСИП контрольным крысам Вистар и Август снижает активность ферментов дофаминергической системы и повышает активность ферментов серотонинергической системы.

4. ДСИП, вводимый крысам Вистар и Август на фоне действия амфетамина, оказывает регулирующее влияние на показатели обмена серотонина и дофамина.

При этом нормализующее действие пептида в значительной мере проявляется в отношении показателей, претерпевающих наибольшие изменения.

5. ДСИП, вводимый до начала действия амфетамина, оказывает превентивный эффект, предотвращая нарушения обмена исследованных нейромедиаторов, вызванные амфетамином.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В работе установлено, что животные с генетически детерминированной физиологической активностью – крысы Август (эмоционально реактивные и склонные к стрессу), отличаются от крыс Вистар (эмоционально резистентные и устойчивые к стрессу) по показателям обмена серотонина и дофамина в сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга.

Крысы Вистар и Август обнаруживают различные ответные реакции исследованных нейромедиаторных систем под влиянием амфетамина и ДСИП, что свидетельствует о взаимосвязи генетических факторов с особенностями обмена нейромедиаторов в образованиях мозга, различающихся по структуре и функции.

Полученные в работе данные о нормализующем действии ДСИП, как биологически активном соединении, могут быть использованы при проведении исследований в клинических условиях и изучения регуляции функций ЦНС при дофаминовой патологии, в частности, амфетаминовых психозах.

Представленные данные о закономерностях функционирования ферментных систем, связанных с метаболизмом дофамина и серотонина в структурах мозга крыс Вистар и Август, различающихся устойчивостью к стрессу, в норме и при экспериментальных воздействиях выявляют взаимосвязь между особенностями метаболизма мозга, и типом нервной деятельности и поведения.

Апробация работы: материалы диссертации были доложены на IV Международной конференции «Колосовские чтения» (С.-Петербург, 2002), на конференции молодых ученых (Москва, 2002,2003), на Международной конференции «Stress and Behaviour» (С.-Петербург, 2004,2005), на конференции «Механизмы синаптической передачи» (Москва, 2004), на конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005).

Публикации: по теме диссертации опубликовано 16 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 204 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 291 источников, из которых 177 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 27 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на половозрелых крысах-самцах Вистар и Август массой 150-200 грамм. Суммарное количество использованных особей каждой линии крыс – 120.

В каждой серии экспериментов животных делили на следующие группы:

1. Контрольная группа крыс, получавшие 0,9% раствор NaCl в количестве эквивалентным введению препаратов животным других групп. Крысы контрольной группы являлись группой сравнения.

2. 2-ой группе крыс вводили препарат амфетамин (Sigma) в дозе 1,0 мг/кг однократно при воздействии препарата в течение 60 минут или длительно: в течение 21 дня, ежедневно.

3. 3-ей группе крыс вводили амфетамин по схеме, что и животным 2-ой группы, и на этом фоне они получали однократную инъекцию ДСИП в дозе 60 мкг/кг за 30 минут до использования в опыте, в случае длительного введения амфетамина ДСИП вводили после последней инъекции препарата.

4. 4-ей группе крыс вводили однократно ДСИП в той же дозе за 30 минут до введения амфетамина (в случае однократного его введения).

Во всех случаях использовали внутрибрюшинное введение препаратов.

Величины показателей, полученных для экспериментальных животных каждой серии, сравнивали с данными контрольной группы, которые принимали за 100%.

Обработку ткани мозга и выделение фракций митохондрий сенсомоторной коры и хвостатого ядра проводили в холодной камере при 0-4° С.

Субфракции сенсомоторной коры и хвостатого ядра изолировали при помощи дифференциального центрифугирования (Бизольд Д., 1967).

Активность моноаминоксидазы типа А (МАО А) (КФ. 1.4.3.4, моноамин-О₂-оксидоредуктаза, дезаминирующая) определяли в субфракциях сенсомоторной коры и хвостатого ядра спектрофотометрическим методом при длине волны 250 нм (Popov N., Rosler V. et al., 1971) В качестве субстрата использовали серотонин креатинин-сульфат (Sigma) Активность фермента выражали в ΔE_{250} /мг белка.

Активность моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) (КФ. 1.4.3.4, моноамин-О₂-оксидоредуктаза, дезаминирующая) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 450 нм (Горкин В. З., Вережкина И. В., и соавт., 1968) в модификации. В качестве субстрата использовали пара-нитрофенилэтиламин (Россия). Активность фермента выражали в ΔE_{450} /мг белка.

Активность тирозингидроксилазы (ТирГд) (КФ. 1.14.18.1, тирозин 3-монооксигеназа) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 335 нм (Минеева-Вялых М. Ф., 1976) с модификацией. В качестве субстрата использовали L-тирозин (Sigma). Активность фермента выражали в ΔE_{335} /мг белка.

Содержание дигидроксифенилаланина (ДОФА) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 510 нм (Shiman R., Akino M., et al., 1971) с модификациями. Активность фермента выражали в ΔE_{510} /мг белка.

Активность триптофангидроксилазы (ТрпГд) (КФ 1. 13.11.11, монооксигеназа) определяли флуорометрическим методом при excitation – 290 нм, emission 540 нм (Fridman P., Kappelman A. H., et al., 1972). В качестве субстрата использовали L-триптофан (Sigma). Активность фермента выражали в нмолях образующегося триптофана по калибровочной кривой.

Методы определения активностей ТирГд, ТрпГд и содержания ДОФА автором были налажены и внедрены в работу лаборатории впервые.

Содержание белка в суспензии субфракций определяли по методу Лоури (Lowry O. H., Rosenbrough N., et al., 1951), выражали в г ткани и использовали для расчета удельной ферментной активности. Калибровочную кривую строили, используя разведения бычьего сывороточного альбумина (Koch-Light, Англия).

Статистическую обработку данных проводили при помощи параметрического метода критерия Стьюдента и непараметрического критерия U Манна-Уитни. Различия между выборками считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

В таблице 1 представлены экспериментальные материалы, отражающие активность исследованных ферментов в сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга контрольных крыс Вистар и Август.

Таблица 1. Активность ферментов метаболизма дофамина и серотонина в структурах мозга крыс линий Вистар и Август (контроль). ($M \pm m$).

	Вистар		Август	
	Сенсомоторная кора	Хвостатое ядро	Сенсомоторная кора	Хвостатое ядро
ТирГд	1,20 $\pm$ 0,19	2,10 $\pm$ 0,26	1,46 $\pm$ 0,24	1,46 $\pm$ 0,13
МАО Б	0,48 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,06
ДОФА	0,82 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,13	0,67 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,11
ТриГд	1,07 $\pm$ 0,22	4,03 $\pm$ 0,59	0,87 $\pm$ 0,15	2,55 $\pm$ 0,38
МАО А	0,25 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,07

Сравнительный анализ показывает, что активность исследованных ферментов в мозге контрольных крыс Август ниже, чем у крыс Вистар, что свидетельствует об исходных функционально-биохимических особенностях этих животных.

Таким образом, исходя из представленных данных, можно сделать заключение, что крысы линий Август и Вистар, отличающиеся по поведенческим характеристикам, имеют определенные различия и в уровне метаболизма мозга, более выраженные в отношении ключевого фермента синтеза дофамина – ТирГд и ферментов серотонинергической системы.

Представленные материалы демонстрируют морфохимические отличия крыс Август в сравнении с крысами Вистар и выявляют взаимосвязь генетических факторов и типа нервной деятельности с особенностями метаболизма биогенных аминов мозга линейных крыс.

Таким образом, работа на генетически различных крысах Вистар и Август позволила выявить в норме метаболические особенности, которые вероятно во многом определяют индивидуальные признаки поведения животных, и позволяют оценить роль отдельных структур мозга в этих процессах. Это является одним из подходов для выяснения механизмов пластичности мозга и его адаптационных возможностей, особенно при действии неблагоприятных и патологических факторов внешней среды, в зависимости от типа нервной системы, что необходимо учитывать в эксперименте при выборе модели, объекта и условий исследования.

Экспериментальные данные, отражающие эффекты ДСИП на состояние нейромедиаторных систем мозга интактных крыс, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Активность ферментов обмена дофамина и серотонина, содержание ДОФА в структурах мозга крыс Вистар и Август в норме и при краткосрочном (30 мин) действии ДСИП ($M \pm m$; контроль – 100%; * - статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$).

Сенсомоторная кора				
УСЛОВИЯ ОПЫТА ПОКАЗАТЕЛЬ	Вистар		Август	
	контроль	ДСИП	контроль	ДСИП
ТирГд	1,20±0,19 100,0%	1,17±0,17 97,5%	1,46±0,24 100,0%	1,38±0,16 94,5%
ДОФА	0,82±0,11 100,0%	0,69±0,10 97,5%	0,67±0,10 100,0%	0,58±0,08 86,6%
МАО Б	0,48±0,08 100,0%	0,34±0,06 70,8%*	0,38±0,07 100,0%	0,32±0,05 84,2%
ТрпГд	1,07±0,21 100,0%	1,16±0,20 108,4%	0,87±0,15 100,0%	0,91±0,16 104,6%
МАО А	0,25±0,05 100,0%	0,32±0,06 128,0%	0,19±0,06 100,0%	0,28±0,06 147,4%*
Хвостатое ядро				
ТирГд	2,10±0,19 100,0%	1,72±0,23 81,9%	1,46±0,13 100,0%	1,29±0,15 88,4%
ДОФА	0,87±0,13 100,0%	0,62±0,11 71,3%*	0,74±0,11 100,0%	0,57±0,09 77,0%*
МАО Б	0,50±0,07 100,0%	0,41±0,06 82,0%	0,27±0,06 100,0%	0,23±0,04 85,2%
ТрпГд	4,03±0,59 100,0%	4,68±0,37 116,1%	2,55±0,38 100,0%	2,84±0,41 111,4%
МАО А	0,45±0,07 100,0%	0,73±0,09 162,0%*	0,26±0,09 100,0%	0,42±0,09 161,5%*

В целом можно заключить, что механизм действия ДСИП проявляется через активацию серотонинергической и подавление дофаминергической систем, при этом эффекты ДСИП выражены сильнее в системе утилизации серотонина и дофамина и более проявляются в хвостатом ядре обеих линий крыс. Установлено, что активность исследованных нейромедиаторных систем в структурах мозга двух линий крыс изменяется реципрокно. Однако, накопленные в настоящее время факты не позволяют утверждать первичность действия пептида на определенную нейромедиаторную систему.

В таблицах 3 и 4 представлены данные о влиянии ДСИП на активность ферментов обмена биогенных аминов в структурах мозга крыс Вистар и Август до и после краткосрочного действия амфетамина.

Таблица 3. Активность ферментов синтеза и распада дофамина и серотонина в структурах мозга крыс Август в норме и под влиянием ДСИП до и после краткосрочного действия амфетамина ($M \pm m$; контроль – 100%; * - статистически достоверные различия при $p < 0,05$)

Сенсомоторная кора				
Условия опыта Показатель	Контроль	Амфетамин	Амфетамин+ДСИП	ДСИП+Амфетамин
ТирГд	1,46±0,24 100,0%	1,39±0,15 95,2%	1,68±0,13 115,1%	1,50±0,16 102,7%
ДОФА	0,67±0,10 100,0%	0,37±0,09 55,2%*	0,33±0,10 49,3%*	0,49±0,11 73,1%

МАО Б	0,38±0,07 100,0%	0,41±0,05 107,9%	0,36±0,05 94,7%	0,35±0,05 92,1%
ТрпГд	0,87±0,15 100,0%	1,41±0,29 162,1%*	1,18±0,23 135,6%*	1,29±0,14 148,3%*
МАО А	0,19±0,06 100,0%	0,12±0,02 63,2%*	0,19±0,05 100,0%	0,23±0,07 121,1%
Хвостатое ядро				
ТрпГд	1,46±0,13 100,0%	1,06±0,14 72,6%*	1,27±0,17 82,2%	1,20±0,12 87,0%
ДОФА	0,74±0,11 100,0%	0,50±0,09 67,6%*	0,58±0,09 78,3%*	0,62±0,11 83,8%
МАО Б	0,27±0,06 100,0%	0,41±0,07 151,9%*	0,36±0,08 133,3%	0,32±0,06 118,5%
ТрпГд	2,55±0,38 100,0%	3,80±0,37 149,0%*	2,78±0,18 109,0%	2,42±0,26 94,9%
МАО А	0,26±0,09 100,0%	0,17±0,03 65,4%*	0,35±0,08 134,6%	0,34±0,06 130,7%

Таблица 4. Активность ферментов синтеза и распада дофамина и серотонина в структурах мозга крыс Вистар в норме и под влиянием ДСИП до и после краткосрочного действия амфетамина. (М±m; контроль – 100%; * - статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$).

Сенсомоторная кора				
Условия опыта	Контроль	Амфетамин	Амфетамин+ДСИП	ДСИП+Амфетамин
Показатель				
ТрпГд	1,20±0,19 100,0%	1,87±0,26 155,8%*	1,44±0,24 120,0%	1,63±0,23 135,8%*
ДОФА	0,82±0,11 100,0%	0,99±0,16 121,0%*	0,80±0,10 97,7%	0,76±0,11 92,7%
МАО Б	0,48±0,08 100,0%	0,61±0,08 127,1%*	0,49±0,07 102,1%	0,50±0,07 104,2%
ТрпГд	1,07±0,21 100,0%	0,90±0,17 84,1%	1,22±0,20 113,0%	1,21±0,19 112,0%
МАО А	0,25±0,05 100,0%	0,16±0,04 64,0%*	0,19±0,05 76,0%	0,28±0,06 112,0%
Хвостатое ядро				
ТрпГд	2,10±0,26 100,0%	2,11±0,20 100,5%	2,20±0,25 104,8%	1,76±0,19 83,8%
ДОФА	0,87±0,13 100,0%	1,06±0,15 121,8%*	0,63±0,12 72,4%	0,77±0,13 88,5%
МАО Б	0,50±0,07 100,0%	0,56±0,07 112,0%	0,51±0,06 102,0%	0,45±0,05 90,0%
ТрпГд	4,03±0,59 100,0%	2,46±0,29 68,5%*	4,18±0,38 103,7%	3,35±0,32 83,1%
МАО А	0,45±0,07 100,0%	0,36±0,06 80,0%	0,40±0,06 88,9%	0,42±0,05 93,3%

Под влиянием амфетамина активность ТирГд у крыс Август не изменяется в коре и подавляется в хвостатом ядре (72,6%) от контроля, тогда как у крыс Вистар наблюдается повышение активности, значительно в сенсомоторной коре (155,8%). Содержание ДОФА отражает изменения в активности ТирГд в структурах мозга крыс Вистар и Август, вызванные действием амфетамина. Активность МАО Б у крыс Вистар и Август изменяется сходным образом, а именно повышается. Однократная инъекция амфетамина приводит к значимому повышению активности ТрпГд у крыс Август от контроля (162,1% в коре, 149,0% в хвостатом ядре) и ее подавлению у крыс Вистар (84,9% и 68,5%, соответственно). Межлинейные различия метаболизма мозга под влиянием амфетамина главным образом связаны с системой синтеза нейромедиаторов, что может указывать на большую чувствительность исследованных ферментов в мозге стресс-чувствительных крыс Август.

Таким образом, эти данные демонстрируют различия в ответной реакции ферментных систем мозга крыс Вистар и Август, отличающихся поведенческими характеристиками и свидетельствуют о большей чувствительности крыс Август к экспериментальному воздействию.

Можно предположить, что генетическая предрасположенность к стрессу и эмоциональная реактивность крыс Август, сопровождается нарушениями в функционировании нейромедиаторных систем мозга при действии неблагоприятных факторов, в частности амфетамина, при этом происходит перестройка обмена нейромедиаторов как ответная реакция на воздействие.

Однократная инъекция ДСИП на фоне краткосрочного действия амфетамина в основном нормализует исследованные параметры, что наиболее выражено при больших изменениях ферментной активности под влиянием амфетамина. Показана некоторая активация серотонинергической системы под влиянием ДСИП: повышение активности ТрпГд в коре до 135,6% у крыс Август и до 113,0% у крыс Вистар; активация МАО А до 134,6% в хвостатом ядре мозга крыс Август, тогда как в сенсомоторной коре крыс Август и в исследованных структурах крыс Вистар активность МАО А под влиянием ДСИП становится близкой к 100%.

Введение ДСИП способствует нормализации активности исследованных ферментов обмена нейромедиаторов, при этом действие пептида противоположно направлено действию амфетамина. Таким образом, применение ДСИП ведет к купированию эффектов амфетамина.

Введение ДСИП до начала действия амфетамина препятствует развитию нарушений ферментной активности структурах мозга крыс Вистар и Август, т.е. выявлен превентивный эффект ДСИП на исследуемые показатели в, реализующийся путем развития фазы адаптации, которая способствует «подготовке» организма к влиянию неблагоприятных факторов.

Результаты влияния ДСИП на фоне хронического действия амфетамина представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Активность ферментов синтеза и распада дофамина и серотонина в структурах мозга крыс Август в норме и под влиянием ДСИП на фоне длительного действия амфетамина (21 день) ($M \pm m$; контроль – 100%, * - статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$).

Сенсомоторная кора			
Условия опыта Показатель	Контроль	Амфетамин	Амфетамин+ДСИП
ТирГд	1,46±0,10 100,0%	1,17±0,12 80,1%*	1,27±0,16 87,0%
ДОФА	0,67±0,10 100,0%	0,62±0,1 92,5%	0,65±0,10 97,0%
МАО Б	0,42±0,06 100,0%	0,49±0,07 116,7%	0,31±0,04 73,8%
ТрпГд	0,87±0,15 100,0%	1,19±0,17 136,8%*	0,97±0,11 111,5%
МАО А	0,19±0,06 100,0%	0,18±0,07 94,7%	0,23±0,06 121,1%
Хвостатое ядро			
ТирГд	1,46±0,13 100,0%	1,38±0,16 93,2%	1,44±0,19 98,6%
ДОФА	0,74±0,11 100,0%	0,50±0,09 67,6%*	0,71±0,12 96,4%
МАО Б	0,50±0,07 100,0%	0,55±0,06 110,0%	0,38±0,05 76,0%
ТрпГд	2,55±0,38 100,0%	2,90±0,41 113,7%	2,52±0,43 98,8%
МАО А	0,26±0,09 100,0%	0,17±0,05 65,4%*	0,30±0,08 115,4%

Таблица 6. Активность ферментов синтеза и распада дофамина и серотонина в структурах мозга крыс Вистар в норме и под влиянием ДСИП на фоне длительного действия амфетамина. (М±m; контроль – 100%, * - статистически достоверные различия при p<0,05).

Сенсомоторная кора			
Условия опыта Показатель	Контроль	Амфетамин	Амфетамин+ДСИП
ТирГд	1,20±0,19 100,0%	1,32±0,14 110,0%	1,61±0,18 134,2%
ДОФА	0,82±0,11 100,0%	1,07±0,15 130,5%*	1,11±0,25 133,7%
МАО Б	0,48±0,08 100,0%	0,56±0,08 116,7%	0,51±0,06 106,3%
ТрпГд	1,07±0,21 100,0%	0,73±0,22 68,2%*	1,24±0,20 115,9%
МАО А	0,25±0,05 100,0%	0,15±0,03 60,0%*	0,30±0,05 120,0%
Хвостатое ядро			
ТирГд	2,10±0,26 100,0%	2,50±0,26 119,1%	2,29±0,27 109,1%
ДОФА	0,87±0,13 100,0%	1,11±0,17 127,6%*	0,88±0,12 101,2%
МАО Б	0,50±0,07 100,0%	0,52±0,06 104,0%	0,52±0,06 104,0%

ТриГд	4,03±0,59 100,0%	3,11±0,36 77,2%*	4,44±0,48 110,2%
МАО А	0,45±0,07 100,0%	0,28±0,04 62,2%*	0,60±0,09 133,3%*

Длительное действие амфетамина оказывает сходные по направленности изменения в активности исследованных ферментов в структурах мозга крыс Вистар и Август с однократным его влиянием, но не одинаковые по выраженности. У крыс Август активность ТриГд подавляется в сенсомоторной коре до 80,1% и хвостом ядре до 93,2% от контроля, тогда как у крыс Вистар незначительно повышается (110,0% и 119,1%, соответственно). Содержание эндогенного ДОФА в целом отражает направленность изменений активности ТриГд, а именно у крыс Август наблюдается снижение содержания ДОФА до 92,5% с сенсомоторной коре и до 67,6% в хвостом ядре, у крыс Вистар после хронического введения амфетамина содержание ДОФА увеличивается до 130,5% и 127,6% от контроля соответственно. Активность МАО Б изменяется незначительно и однонаправлено у крыс Вистар и Август. Так, у крыс Август активность МАО Б практически не изменяется в сенсомоторной коре и увеличивается до 110,0% в хвостом ядре, а у крыс Вистар возрастает до 116,7% и 104,0% от контроля, соответственно.

Активность ТриГд повышается в структурах мозга крыс Август (136,8% в коре и 113,7% в хвостом ядре, от контроля), а у крыс Вистар подавляется (68,2% и 77,2%, соответственно) при длительном действии амфетамина. Активность МАО А у крыс Август при этом практически не меняется в сенсомоторной коре и статистически достоверно подавляется в хвостом ядре (65,4%), у крыс Вистар подавляется до 60% и 62,2% от контроля соответственно.

Вызванные амфетином нейрохимические изменения в дофаминергической системе реципрокно отражаются и на изменениях метаболизма серотонина. В виду того, что дофамин способен оказывать тоническое тормозное влияние на серотонинергические нейроны, как нами показано при моделировании дисфункции дофаминергической системы при длительном введении амфетамина. Однако, в мозге крыс Август обнаружена активация серотонинергической системы, что, по-видимому, отражает своеобразные взаимоотношения медиаторов.

Из представленных материалов можно сделать заключение, что, видимо, полученные различия в изменении метаболизма нейромедиаторных систем на воздействии амфетином сводятся к неодинаковым ответным реакциям постсинаптических нейронов и резервным возможностям мозга крыс Вистар и Август. Полученные данные о действии амфетамина на ферментные системы обмена нейромедиаторов мозга двух линий крыс, отличающихся поведенческими характеристиками, дают возможность высказать новое представление об ответных реакциях структур мозга на воздействие у животных с разным типом нервной системы.

Однократное введение ДСИП на фоне длительного действия амфетамина оказывает нормализующее влияние на исследуемые показатели. У крыс Август активность ТриГд в коре после действия ДСИП на фоне амфетамина составляет 87,0%, в хвостом ядре – 98,6% от контроля. Содержание ДОФА практически нормализуется в исследованных структурах мозга (97%). Активность МАО Б несколько снижается, составляя 73,8% в коре и 76,0% в хвостом ядре.

Активность ТрпГд под влиянием ДСИП на фоне амфетамина снижается почти до 100%. Активность МАО А после ингибирующего действия амфетамина становится даже несколько выше нормы (121,1% в коре и 115,4% в хвостом ядре).

У крыс Вистар активность ТрпГд и содержание ДОФА под влиянием ДСИП остаются повышенными в коре после активирующего действия амфетамина и нормализуются в хвостом ядре. Активность МАО Б под влиянием ДСИП изменяется незначительно. Активности ТрпГд и МАО А под влиянием ДСИП на фоне амфетамина становятся несколько выше 100% в коре и хвостом ядре мозга крыс Вистар, что, видимо, связано с механизмом действия ДСИП на серотонинергическую систему.

Таким образом, можно заключить, что однократная инъекция ДСИП на фоне моделирования длительной дисфункции нейромедиаторных систем нивелирует действия амфетамина, корректируя и нормализуя измененные параметры.

На основании представленных в работе материалов можно сделать заключение, что нормализующее действие ДСИП выражается в поддержании такого баланса моноаминов, при котором угнетается активность ферментов дофаминергической системы и увеличивается активность серотонинергической системы в стриокортикальных структурах мозга крыс Вистар и Август.

Также следует отметить существенный факт - эффективность ДСИП в сравнительно малой концентрации (60 мкг/кг массы тела). ДСИП способен корректировать стойкие нарушения в функционировании нейромедиаторных систем *in vivo*, вызванные длительным действием амфетамина, что позволяет говорить о данном пептиде, как об активном природном адаптогене. Более того, ДСИП способен в короткие сроки (30 минут) нивелировать влияние амфетамина, путем нормализации активности ферментных систем. Представленные в работе результаты расширяют имеющиеся сведения о роли коротких пептидов, и в частности ДСИП, в процессах регуляции активности моноаминергических систем мозга. Совокупность данных подтверждает точку зрения о том, что регуляторный эффект пептидов может проявляться более ярко в условиях нарушения функционирования ЦНС. Показано, что взаимодействие нейромедиаторных систем вторично обуславливает возникновение характерного дисбаланса нейромедиаторов, что следует учитывать при выборе методов коррекции.

Анализ полученных в работе результатов в сопоставлении с литературными данными дает возможность использовать ДСИП или его производные в качестве лекарственных средств и позволяет рекомендовать ДСИП для испытания в клинике при различных стрессорных и патологических состояниях.

Полученные материалы о действии амфетамина и ДСИП на нейромедиаторный обмен мозга крыс Вистар и Август, отличающихся поведенческими характеристиками и устойчивостью к стрессу, помогают приблизиться к пониманию фундаментальных проблем современной нейробиологии и нейрохимии. Следует учитывать генетико-функциональные факторы, определяющие различия между линиями животных, что может быть особенно важно при использовании фармакологических препаратов и их влияние на организм, как животных, так и человека.

ВЫВОДЫ

1. Животные, отличающиеся поведенческими характеристиками, эмоциональной реактивностью, устойчивостью к стрессу (крысы Вистар и Август), исходно отличаются и показателями обмена биогенных аминов в различных по структуре и функции образованиях мозга.
2. Выявлено, что у intactных крыс Август активность ферментов, участвующих в синтезе и распаде серотонина (триптофангидроксилаза и моноаминоксидаза А) и дофамина (тирозингидроксилаза, моноаминоксидаза Б и содержание эндогенного дигидроксифенилаланина) ниже в сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга, чем у крыс Вистар.
3. Показаны различия в распределении активности исследованных ферментов в корково-подкорковых структурах мозга крыс Вистар и Август, с преобладанием активности в хвостом ядре.
4. Ферментные системы синтеза серотонина и дофамина (гидроксилазы) мозга крыс Вистар и Август при действии амфетамина (60 минут и 21 день) изменяются реципрокно, а ферменты утилизации нейромедиаторов (оксидазы) – однонаправленно.
5. Дельта-сон индуцирующий пептид при краткосрочном действии у intactных животных стимулирует активность ферментов серотонинергической системы и снижает активность ферментов дофаминергической системы и содержание дигидроксифенилаланина в исследованных структурах мозга.
6. Дельта-сон индуцирующий пептид на фоне действия амфетамина оказывает регулирующий эффект на активность ферментов обмена серотонина и дофамина, что в значительной мере проявляется в отношении показателей, претерпевающих наибольшие изменения.
7. Дельта-сон индуцирующий пептид при предварительном его введении оказывает превентивный эффект, предотвращая нарушения ферментных систем метаболизма нейромедиаторов, вызванные действием амфетамина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Монаков М. Ю., Хрусталеv Д. А. Роль морфохимической пластичности коры больших полушарий в генетико-функциональной организации мозга. // Организация и пластичность коры больших полушарий головного мозга: Тез. всерос. конф. - НИИ Мозга РАМН. Москва, 2001.-С. 24.
2. Доведова Е. Л., Хрусталеv Д. А., Данилова И. Е. Морфохимические особенности ферментных систем в образованиях мозга крыс различных линий в норме и при экспериментальном воздействии. // Колосовские чтения – 2002: IV международная конференция по функциональной нейроморфологии. - Санкт-Петербург, 2002.-С.100.
3. Хрусталеv Д. А. Активность ферментных систем в структурах мозга крыс, отличающихся по поведенческим характеристикам. // Сборник тезисов конференции молодых ученых. Институт Высшей Нервной Деятельности РАН.-Москва, 2002.-С. 10

4. Хрусталеv Д. А. Состояние серотонинергической системы мозга крыс Август при экспериментальных воздействиях. // Сборник тезисов конференции молодых ученых. Институт Высшей Нервной Деятельности РАН.-Москва, 2003.-С. 46-47.
5. Хрусталеv Д. А., Данилова И. Е., Доведова Е. Л. Нейрохимическая пластичность структур мозга крыс линий Вистар и Август при экспериментальных воздействиях. // Пластичность и структурно-функциональная взаимосвязь коры и подкорковых образований мозга: Сборник тезисов Всерос. Конф. НИИ мозга РАМН.-Москва, 2003.-С. 102.
6. Доведова Е. Л., Хрусталеv Д. А. Коррекция дельта – сон индуцирующим пептидом действия амфетамина на активность ферментов катаболизма нейромедиаторов в мозге стресс – реактивных крыс линии Август. // Стресс и экстремальные состояния: 2 Международный Симпозиум.-Феодосия, 2003.-С. 176-179.
7. Хрусталеv Д. А. Активность ферментов обмена нейромедиаторов в образованиях мозга крыс с различными поведенческими характеристиками // Рос. Физиол. Журн. Им. И. М. Сеченова. - 2004. - Т. 90, № 8.-С. 285.
8. Доведова Е. Л., Хрусталеv Д. А., Мельникова И. Е. Сравнительный анализ активности ферментных систем в структурах мозга различных линий крыс в условиях экспериментальной патологии // Проблема интеграции функций в физиологии и медицине: Тез. докл. конференции ПЧУЛ. Бизнесфест. – Минск, 2004.-С. 115-116.
9. Khrustalyov D. A., Dovedova E. L., Popova N. S. Functional and biochemical characteristics of Wistar and August strain rats under stress influence. // Stress and Behavior: 8-th multidisciplinary international conference of biological psychiatry J. "Psychopharmacology and biological narcology. - 2004.- № 2-3.-P. 721-722.
10. Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Хрусталеv Д. А. Морфохимическая характеристика структур мозга крыс после воздействия дельта-сон индуцирующего пептида на фоне хронического введения амфетамина. // Ж. Морфология.- 2004. - Т. 125, № 3.-С. 74-77.
11. Доведова Е. Л., Попова Н. С., Хрусталеv Д. А. Активность ферментов синтеза и катаболизма некоторых нейромедиаторов как показатель функционального состояния линейных крыс. // Механизмы синаптической передачи: Тез. докл. Всерос. Конф. – Москва, 2004.-С. 35.
12. Хрусталеv Д. А., Доведова Е. Л., Ещенко Н. Д. Влияние амфетамина на активность ферментов метаболизма нейромедиаторов в структурах головного мозга крыс линий Вистар и Август. // Вестник Санкт-Петербургского Университета. - 2004. - Сер. 3, Вып. 3.-С. 55-59.
13. Хрусталеv Д. А. Влияние амфетамина на ферментную активность синтеза медиаторов мозга крыс. // Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты: Тез. докл. Всерос. Конф. – Москва, 2005.-С.63.
14. Хрусталеv Д. А., Доведова Е. Л. Активность ферментов обмена некоторых биогенных аминов в структурах мозга крыс линии Август при действии пептида дельта-сна. // Нейрохимия. - 2005. - Т. 22, № 1.-С. 44-49.
15. Khrustalyov D. A., Dovedova E. L. Comparison of different amphetamine doses action on the brain metabolism of rats with different behavioural patterns. // Stress

- and Behavior: 9-th multidisciplinary international conference of biological psychiatry. J Psychopharmacology and Biol. Narcology. - 2005. - № 2.-P. 887.
16. Доведова Е.Л., Хрусталева Д.А., Худоерков Р.М. Эффекты ДСИП на активность ферментов обмена биогенных аминов в мозге крыс Вистар и Август // Бюлл. Экспериментальной Биологии и Медицины. -2005 (В печати).

Хрусталева Денис Александрович (Россия)

**«Действие дельта-сон индуцирующего пептида при моделировании дисфункций нейромедиаторных систем мозга крыс Вистар и Август»
(экспериментальное исследование).**

Исследовали на субклеточном уровне влияние *in vivo* дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) на фоне однократного и длительного действия амфетамина в сенсомоторной коре и хвостом ядре мозга крыс Вистар и Август, отличающихся стресс устойчивостью. Изучали состояние нейромедиаторных систем по показателям активности ферментов обмена дофамина (тирозингидроксилаза, моноаминоксидаза Б) и серотонина (триптофангидроксилаза и моноаминоксидаза А), а также содержание эндогенного диоксифенилаланина во фракциях исследованных структур мозга крыс.

Показано, что крысы Вистар и Август исходно отличаются по исследованным показателям. При системном введении амфетамина крысы Вистар и Август обнаружены различные ответные реакции нейромедиаторных систем. Обнаружено, что ДСИП при однократном его применении на фоне действия амфетамина приводит к коррекции исследованных показателей в коре и хвостом ядре мозга линейных крыс, что свидетельствует о возможности практического применения ДСИП как природного регулятора метаболизма ЦНС при заболеваниях дофаминзависимой этиологии.

Denis A. Khrustalyov (Russia)

“Delta-sleep inducing peptide action during the modeling of neurotransmitter systems dysfunction in the brain of Wistar and August rats (experimental research)”

Effects of delta-sleep inducing peptide (DSIP) *in vivo* after short and long-term amphetamine action were investigated on subcellular level in the cortex and caudate nucleus of the brain of Wistar and August rats with different resistance to stress. The state of neurotransmitter systems was evaluated by the measurement of the activities of dopamine (tyrosine hydroxylase, monoaminoxidase B) and serotonin (tryptophan hydroxylase, monoaminoxidase A) metabolizing enzymes, the content of endogenous dioxyphenylalanin in the investigated brain structures was also determined.

It was found that under normal conditions Wistar and August rats differ by the investigated parameters of neurotransmitter metabolism. The results of this comparative neurochemical study demonstrate diverse response reactions of neurotransmitter metabolism in August and Wistar rats' brain on amphetamine. It was shown that a single injection of DSIP after amphetamine administration leads to a correction of the investigated parameters in the cortex and caudate nucleus in both rat strains. These data suggest that DSIP might be considered as a natural regulator of CNS metabolism in dopamine dependent pathology.

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.

Подписано в печать 20.09.05

Тираж 120 экз. Усл. п.л. 1

Печать авторефератов (095) 730-47-74, 778-45-60

№ 17398

РНБ Русский фонд

2006-4

16619