

УДК 591.11: 547.466

ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В РАЗЛИЧНЫХ СТРЕСС-ТЕСТАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ N-УРОНОИЛПРОИЗВОДНЫХ L-ЛЕЙЦИНА И L-ВАЛИНА

Коренюк И.И., Раваева М.Ю., Орехова В.В., Курьянов В.О., Чупахина Т.А.

Аминокислоты выполняют особую роль в обменных реакциях и являются родоначальниками гормонов и биологически активных соединений (полиаминов, креатина, энергетических субстратов) [1]. Большое внимание нейрофизиологов привлекают аминокислоты, обладающие нейромедиаторными свойствами (глицин, глутаминовая кислота, ГАМК), однако и среди аминокислот немедиаторной природы имеются аминокислоты, обладающие нейротропным действием, такие как валин и лейцин. Так, опыты на лабораторных крысах показали, что валин повышает мышечную координацию и понижает чувствительность организма к боли, холоду и жаре [2]. Он применяется в клинике для лечения депрессии в качестве несильного стимулирующего соединения. Известно, что валин помогает предотвратить некоторые неврологические заболевания, а также применяется в коррекции рассеянного склероза, поскольку защищает миелиновую оболочку нервных волокон в спинном и головном мозге [3]. Также известно, что чрезмерно высокий уровень валина может привести к таким симптомам как парестезии (ощущение мурашек на коже) и галлюцинации [4].

Смеси аминокислот, содержащие лейцин используются в клинической практике (для парентерального введения) при стрессовых состояниях, поскольку один из метаболитов лейцина подавляет активность кортизола - гормона, активность которого значительно повышается при стрессах [5].

Валин и лейцин имеют разветвленный углеродный скелет и в связи с этим могут использоваться мышечными и нервными клетками в качестве источника энергии, способствуют регенерации мышечных белков, особенно при состояниях, усиливающих катаболические процессы [6]. Особенностью данных аминокислот является их способность, не изменяясь, проходить через гематоэнцефалический барьер. В связи с этим данные аминокислоты используются в клинике в качестве противошокового средства, а также при токсикозах, заболеваниях печени, анемиях и других заболеваниях [7, 8]. Показано, что валин и лейцин усиливают проникновение в мозг других аминокислот, необходимых для синтеза нейромедиаторов, что приводит к улучшению памяти и концентрации внимания [3].

Такой обширный спектр нейротропных свойств валина и лейцина предполагает широкое использование их в качестве лекарственных препаратов при самых различных заболеваниях. Однако серьезным препятствием остается малая продолжительность эффектов природных аминокислот, что связано с быстрым их

распадом в организме под действием ферментов. Для создания высокоэффективных лекарств на основе аминокислот разрабатываются их синтетические аналоги, которые сохраняют природную активность и обладают высокой устойчивостью к действию протеаз. Такими свойствами могут обладать N-уроноилпроизводные валина и лейцина, такие как N-(1,2:3,4-ди-O-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)-валин (ДАГУ-Вал) и N-(1,2:3,4-ди-O-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)-лейцин (ДАГУ-Лей), однако, их психотропная активность не изучалась. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось исследование психотропной активности данных производных аминокислот в серии экспериментальных моделей стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 200-220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Тестирование проводилось в утреннее время. Соединения растворялись в физиологическом растворе и вводились внутривентриально в объеме 0.2 мл, в дозе 50 мг/кг. Животным контрольной группы таким же образом вводили физиологический раствор в аналогичном объеме.

Изучение поведенческих реакций при действии соединений проводилось в серии экспериментальных моделей стресса «открытое поле» [9], «черно-белая камера» [10], тест «вынужденного плавания» Порсолта [11, 12], тест «подвешивание за хвост» [13].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверным считались различия эффектов тестируемых соединений по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

При проведении экспериментов все биоэтические нормы были соблюдены.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность крыс в тесте «открытое поле» при действии тестируемых производных.

В результате проведенных исследований обнаружено, что в тесте «открытое поле» (табл. 1) ДАГУ-Вал достоверно снижал показатель горизонтальной двигательной активности (ГДА), повышал показатель исследовательской активности (ИА), а уровень дефекации (Деф) значительно не изменялся. При действии свободной аминокислоты валина (Вал) достоверно снижались ГДА, ИА и груминг (Гр), и значительно повышалась Деф. При сравнении действия ДАГУ-Вал и Вал, выявлено, что Вал оказывал более выраженное действие на поведенческие показатели крыс, чем его углеводный конъюгат.

Применение ДАГУ-Лей также приводило к снижению ГДА, вертикальной двигательной активности (ВДА) и Деф, а уровень ИА и Гр значительно повышался. Лейцин (Лей) достоверно снижал ГДА, ВДА, и Деф, а также повышает показатель Гр. Сравнительный анализ эффектов ДАГУ-Лей и Лей, показал, что Лей оказывал более выраженное ингибирующее действие на поведенческие реакции, чем ДАГУ-Лей.

ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В РАЗЛИЧНЫХ СТРЕСС-ТЕСТАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ

Введение (ДАГУ) в дозе 50 мг/кг приводило к снижению ВДА, ИА, Деф и повышению Гр.

Таблица 1.
Поведенческая активность крыс в тесте "открытое поле" при действии
тестируемых соединений ($\bar{x} \pm S \bar{x}$, n=10)

Соединения	Показатели (у.е.)				
	ГДА	ВДА	ИА	ГР	ДЕФ
Контроль	19,5±4,1	6,5±1,1	11,4±1,6	1,6±0,5	1,2±0,7
ДАГУ	21,8±2,8	2,8±1,1**	8,4±1,9*	2,2±0,9*	0,4±0,2**
Вал	6,5±0,9*	0**	8,0±0,4**	0**	3,5±0,5**
ДАГУ-Вал	14,5±3,5**	2,8±0,5	13,8±3,9**	1,0±0,4	1,3±0,5
Лей	8,0±1,7**	0,5±0,3**	11,5±0,9	2,5±0,3	0,0±0,0
ДАГУ-Лей	10,0±2,7*	1,5±1,1**	15,5±1,2	1,0±0,4	0,8±0,2

Примечание: * - уровень достоверности различий по отношению к контролю $p \leq 0,05$;
** - $p \leq 0,01$

Исходя из того, что двигательная активность отражает величину процессов возбуждения ЦНС, а груминг и реакция дефекации в тесте «открытого поля» являются достоверными показателями уровня возбуждения вегетативной нервной системы [14], можно констатировать, что гликоконъюгаты ДАГУ-Вал и ДАГУ-Лей оказывали тормозное действие на нервную систему. Следует указать, что снижение двигательной активности крыс на фоне заметно возросшего груминга, по мнению ряда исследователей [15, 16] свидетельствует о развитии сильного стресса и тревожно-депрессивных изменений поведения. Другие авторы [17, 18] указывают, что подобные изменения поведения возникают при действии различных факторов, таких как гормоны и мозговые пептиды, действие которых направленно на те же механизмы, что и стресс. Кроме того, известно [14, 19], что увеличение двигательной активности в первые часы эксперимента может быть следствием повышенной стрессированности животных, и связано с адаптационными процессами организма. Таким образом, основываясь на интегрированной картине, отражающей не отдельные показатели, а изменение их в комплексе, можно предположить, что ДАГУ-Вал и ДАГУ-Лей способны индуцировать развитие тормозных процессов в нервной системе и уменьшать психоэмоциональное напряжение животных в тесте «открытое поле». В целом, сравнительный анализ действия ДАГУ-Вал и ДАГУ-Лей и соответствующих аминокислот показал более выраженное ингибирующее действие на двигательную активность животных последних. Следовательно, ацилирование исследуемых аминокислот приводит к смягчению ингибирующих эффектов и повышению ноотропных свойств.

Мы полагаем, что тормозное действие ДАГУ-Вал и ДАГУ-Лей вероятно связано с их способностью активировать процессы защитного торможения в ЦНС, в результате чего уменьшается психоэмоциональное напряжение крыс в тесте «открытое поле» и, следовательно, данные соединения оказывают стресспротекторное действие.

Влияние N-уроноилпроизводных на исследовательскую активность крыс в тесте «черно-белая камера».

В данном тесте ДАГУ достоверно уменьшала частоту и время выглядываний в светлый отсек камеры (табл. 2). ДАГУ-Вал и Вал по отношению к контролю уменьшали частоту и время выглядываний и выходов в светлый отсек камеры. Сравнительный анализ эффектов ДАГУ-Вал и Вал показал, что Вал ингибирует исследовательскую активность крыс сильнее, чем его ацилированное производное.

При анализе эффектов тестируемых препаратов в данном тесте подсчитывался коэффициент К отношения числа выходов к общему числу выглядываний и выходов. Для ДАГУ-Вал К оказался равным нулю, для ДАГУ $K=0,06$, в то время как в контроле $K=0,18$ (табл. 2). Применение аналогичного подхода к анализу длительности пребывания в светлом отсеке камеры (число Т) по отношению к общему времени выглядываний и выходов показал, что для ДАГУ-Вал $T=0$, для Вал $T=1$, (контроль $T=0,19$) Следовательно, ацилирование Вал приводит к уменьшению его угнетающего действия на исследовательскую активность животных.

Внутрибрюшинное введение ДАГУ-Лей приводило к снижению частоты и времени выглядываний и повышению частоты и времени выходов в светлый отсек камеры (табл. 2). Интегральный показатель К (отношение числа выходов к общему числу выходов и выглядываний) для ДАГУ-Лей = 0,6, для ДАГУ = 0,06 (для контроля $K=0,18$). Аналогичный показатель времени Т для ДАГУ-Лей = 0,85, для ДАГУ=0,36. При введении как ДАГУ-Лей, так и Лей все крысы продемонстрировали отказ от выходов в светлый отсек камеры. Таким образом, животные после введения Лей демонстрировали большую ингибированность исследовательского поведения, чем после инъекции ДАГУ и ДАГУ-Лей. Следовательно, ацилирование аминокислоты уменьшает её угнетающее действие.

Показатель дефекации, который связан с силой стрессированности животных, при действии аминокислот и их производных не изменялся.

«Черно-белая камера» считается одной из чувствительных моделей острой, «ситуативной» тревожности животных [13], в которой свою активность способно проявить большинство их известных классов анксиотропных препаратов. Крысы обычно предпочитают находиться в темном отсеке, однако анксиолитики увеличивают число выходов и время, проведенное в светлом отсеке, тогда как анксиогенные агенты приводят к обратным эффектам [20]. Поскольку наиболее выраженное увеличение исследовательской активности наблюдалось у крыс, получавших ДАГУ-Лей, можно предположить, что данное соединение является анксиолитиком.

Влияние N-уроноилпроизводных на исследовательскую активность крыс в тесте вынужденного плавания (тест Порсолта)

После введения ДАГУ у животных достоверно уменьшался латентный период (ЛП) первого зависания и увеличивалось количество освобождения от воды, а длительность активного плавания достоверно не изменялась (табл. 3).

ДАГУ-Вал достоверно уменьшал ЛП по сравнению с контролем, увеличивал время активного плавания и количество актов, направленных на освобождение от воды, таких как выпрыгивания, умывания, отряхивания головы (количество выпрыгиваний) (табл. 3). Вал снижал все поведенческие показатели.

Таблица 2.
Поведенческие эффекты соединений в тесте "Черно-белая камера"
($\bar{x} \pm S \bar{x}$, n=10)

Группы	Частота выгладываний	Время выгладываний (с)	Частота выходов	Время выходов (с)	Болюсы	Коэффициент К	Коэффициент Т
Контроль	4,1±0,8	45,2±10,2	0,9±0,3	10,5±5,7	0	0,18	0,19
ДАГУ	1,4±0,2**	4,6±1,1**	0,1±0,1	2,8±2,8	0,4±0,2**	0,06	0,36
Вал	0**	0**	0,5±0,2	8,5±3,2	0	1	1
ДАГУ-Вал	1,0±0,7*	4,6±1,1**	0**	0**	0	0	0
Лей	1,0±0,4**	6,0±2,3**	0**	0**	0	0	0
ДАГУ-Лей	2,5±0,9	22,1±1,4*	1,5±0,8*	26,5±13,9**	0	0,6	0,85

Примечание: * - уровень достоверности различий по отношению к контролю ($p \leq 0,05$); ** - $p \leq 0,01$; К - интегральный показатель отношения числа выходов к общему числу выходов и выгладываний, Т - интегральный показатель отношения продолжительности выходов к общему времени выгладываний и выходов животных в светлый отсек камеры.

При действии ДАГУ-Лей (табл. 3) наблюдалось достоверное уменьшение всех показателей активности крыс по сравнению с контролем. Лей достоверно уменьшал только ЛП. При сравнении эффектов ДАГУ-Лей, ДАГУ и Лей выявлено, что ЛП снижается в ряду ДАГУ-Лей → ДАГУ → Лей, а время активного плавания снижается в ряду ДАГУ → Лей → ДАГУ-Лей.

Данный тест широко используется для выявления антидепрессантных свойств у психотропных препаратов [11-13] и новосинтезированных соединений, в котором стадия иммобильности, или «зависания» традиционно является проявлением «отчаяния». Поскольку практически все антидепрессанты приводят к снижению времени иммобильности у экспериментальных животных [12], мы полагаем, что из ряда тестируемых производных аминокислот только ДАГУ-Вал является антидепрессантом.

Исследование влияния производных аминокислот на поведение крыс в тесте «подвешивание за хвост»

Отметим, что тест основан на наблюдении, что крысы, при их подвешивании за хвост, демонстрируют определенный период иммобильности, по продолжительности которого судят об уровне их тревожности/страха и отчаяния [13].

Введение ДАГУ-Вал, также как и Вал, достоверно ($p \leq 0,05$) снижает время пассивного зависания от 13,7±3,3 в контроле до 4,2±0,6 и 3,5±0,65 соответственно. Следует отметить, что Вал оказывает более выраженное действие, чем ДАГУ-Вал, то есть, ацилирование кислоты незначительно снижает её активность.

Таблица 3.

Показатели активности крыс в тест Порсолта при действии тестируемых соединений ($\bar{x} \pm S \bar{x}$, n=10)

Группы	Тестируемые параметры		
	ЛП, (с)	активное плавание, (с)	число выпрыгиваний
Контроль	88,9±10,6	142,2±11,6	41,9±4,5
ДАГУ	12,2±4,2**	145,2±5,8	61,4±5,7**
Вал	8,0±1,1**	134,5±2,7	30,0±4,2
ДАГУ-Вал	15,8±3,8**	164,8±1,8*	75,0±10,8**
Лей	9,0±0,6**	127,5±10,1	43,0±9,8
ДАГУ-Лей	22,2±15,3**	87,3±34,8*	20,0±6,9*

Примечание: * - уровень достоверности различий по отношению к контролю $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$

При действии ДАГУ-Лей и Лей у животных наблюдается уменьшение времени иммобильности до $8,2 \pm 2,1$ ($p=0,05$) и $7,3 \pm 1,2$ ($p=0,05$) соответственно, причем эффекты ацилированной аминокислоты более выражены.

ДАГУ увеличивает время пассивного зависания крыс до $15,8 \pm 2,9$ ($p \leq 0,05$).

При сравнении эффектов указанных соединений установлено, что ДАГУ-Вал и ДАГУ-Лей оказывают выраженный антидепрессантный эффект, но последний уменьшает уровень депрессии у животных, но в меньшей степени, чем ДАГУ-Вал. Поскольку, данный тест, как и тест Порсолта, моделирует состояние депрессии и тревожности [19, 21], можно предположить, что ДАГУ-Вал обладает низкоселективным антидепрессантным действием, и является эффективным при различных видах и стадиях депрессии.

Из экспериментальных данных следует, что N-уроноилпроизводные валина и лейцина способны изменять поведенческую реакцию крыс на стресс. Рассматривая возможные механизмы психотропного действия соединений можно предположить, что данные производные, проникая через гематоэнцефалический барьер, изменяют функциональное состояние нейронов, что в свою очередь сдвигает баланс возбуждения-торможения нервной системы. Вероятно, тестируемые соединения избирательно действуют на нейроны с определенной эргичностью. В первую очередь это относится к серотонинергическим нейронам, поскольку активность именно этой системы доминирует над другими медиаторными системами у крыс со средней двигательной активностью [22, 23], используемых в наших экспериментах. В пользу этого предположения свидетельствует то, что во-первых, в случае повышения уровня серотонина в структурах головного мозга, увеличивается эмоциональность и угнетается двигательная активность животных [24], что и наблюдалось у животных в тесте «открытое поле». Во-вторых, известно также, что валин препятствует снижению уровня серотонина, а лейцин предотвращает его перепроизводство [4]. Нельзя исключить и влияния этих соединений на дофаминергическую систему, которая, также играет важную роль в регуляции движений [25]. Однако, наличие значительного количества серотониновых

рецепторов на дофаминергических нигростриатных нейронах [26], предполагает опосредованное действие серотонина на дофаминергическую систему, в результате которого осуществляется контроль выделения дофамина в базальных ганглиях, являющихся основным двигательным центром у крыс [19]. Кроме этого, активация и норадренергической системы приводит к угнетению эмоциональной активности животных [24].

Необходимо заметить, что по современным представлениям патогенез тревоги не является результатом дисфункции какой-либо одной нейромедиаторной системы, а отражает возникновение системного регуляторного дисбаланса различных нейромедиаторов на самых разных уровнях структурно-функциональной организации - от молекулярного до уровня целостного мозга [19]. Ключевое место в формировании отмеченного дисбаланса занимает ГАМК-ергическая система. Именно нарушение ГАМК-зависимых процессов в ЦНС опосредуют дисфункцию серотонин-, катехоламин- и пептидергических систем, приобретающих при последующем развитии и прогрессировании тревожных расстройств роль самостоятельных патогенетических механизмов. Таким образом, используемые нами в экспериментах соединения могут влиять на поведение, изменяя соотношения концентраций соответствующих медиаторов в различных отделах головного мозга.

ВЫВОДЫ

1. Тестируемые N-уроноилпроизводные аминокислот оказывают психотропное действие, которое проявляется в изменении поведенческих реакций крыс в экспериментальных моделях стресса.

2. N-(1,2:3,4-ди-O-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)-валин в тесте «открытое поле» оказывает стресспротекторное действие, а в тестах Порсолта и «подвешивание за хвост» проявляет антидепрессантные свойства.

3. N-(1,2:3,4-ди-O-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)-лейцин проявляет стресспротекторные (в тесте «открытое поле») и анксиолитические свойства («черно-белая камера»).

Список литературы

1. Майстер А. Биохимия аминокислот. - М.: Мир, 1961. - 365 с.
2. Лелевич В.В., Селевич М.И., Шейбак В.М. Клиническо-лабораторные аспекты метаболической терапии. - Гродно, 1999. - 242 с.
3. Шейбак В.М. Обмен свободных аминокислот и кофермент А при алкогольной интоксикации. - Гродно, 1998. - 153 с.
4. Hirano N.W. Enzym immunoassay of hyman cytosolic aspartate aminotransferase.// Clinica Chimica Acta. - 1984. - V. 144. - P. 49-57.
5. Dolp R., Ahnefeld F.W., Grunert A., Shmitz E. Clinical studies on free amino acid concentration in plasma. Development of an acid pattern for parenteral nutrition during stress metabolism // Acta chir. scand. - 1979. - V. 145, № 494. - P. 127-129.
6. Swick R.W., Barnstein P.L., Stange J.L. The metabolism of mitochondrial proteins // J. of biological chemistry. - 1969. - V. 240, № 8. - P. 3334-3340.
7. Островский Ю.М. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя. - М.: Наука, 1988. - 263 с.

8. Островский Ю.М., Островский С.Ю. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма. - М.: Наука, 1995. - 280 с.
9. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: «Высшая школа», 1991. - 399 с.
10. Crawley J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. // *Neurosci. Biobehav. Revs.* - 1985. - № 9. - P. 33-44.
11. Porsolt R.D., Pinchon M.Le., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant Treatments // *Nature.* - 1977. - V. 266. - P. 730-732.
12. Porsolt R.D., McArthur R.A., Lenegre A. Psychotropic screening procedures // F. van Haaren. *Methods in Behavioral Pharmacology.* - New York: Elsevier, 1993. - P. 23-51.
13. Greenshaw A.J., Nguyen T.V., Sanger D.J. Animal models for assessing anxiolytic, neuroleptic and antidepressant drug action // A. Boulton, G. Baker, R. Coutts. *Neuromethods.* - Clifton: Humana press, 1988. - P. 379-427.
14. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля // *Журн. высш. нервн. деят.* - 1981. - Т. 31, № 2. - С. 301-307.
15. Калуев А.В. Стресс и груминг. - М.: Авики, 2002. - 146 с.
16. Макаrchук Н.Е., Калуев А.В. Обоняние и поведение. - К.: КСФ, 2000. - 148 с.
17. Dunn A.J., Berridge C.W., Dunsheam P. Behavioural tests: their interpretation and significance in the study of peptide action // *Neuromethods.* - New York: Humana Press, 1987. - P. 229-247.
18. Stone E.A., Manavalan S.J., Zhang Yi, Quartermain D. Beta-adrenoreceptor blockage mimics effects of stress on motor activity in mice // *Neuropsychopharmacol.* - 1995. - Vol. 12, № 1. - P. 65-71.
19. Калуев А.В. Стресс, тревожность и поведение. - К.: Энигма, 1998. - 92 с.
20. Harro J. Measurement of exploratory behavior in rodents // *Methods in Neurosciences (V. 14, Paradigms for the Study of Behavior).* - San Diego, New York: Academic Press, 1993. - P. 359-377.
21. Willner P. Animal models of depression: validity and applications // *Depression and Mania. Advances in Biochemical Psychopharmacology.* - New York: Raven Press, 1995. - P. 19-41.
22. Кругликов Р.И., Герцова В.М., Орлова Н.В. Изменение содержания моноаминов в мозге влияет на реакцию эмоционального резонанса // *Журн. высш. нервн. деят.* - 1995. - Т. 45, № 3. - С. 551-557.
23. Кругликов Р.И., Орлова Н.В., Герцова В.М. Содержание норадреналина и серотонина в симметричных отделах головного мозга крыс в норме, при обучении и введении пептидов // *Журн. высш. нервн. деят.* - 1991. - Т. 41, № 2. - С. 359-363.
24. Кулагин Д.А., Болондинский Б.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке // *Успехи физиологических наук.* - 1986. - № 1. - С. 92-110.
25. Кратин Ю.Г., Сотниченко Т.С. Неспецифические системы мозга. - Л.: Наука, 1997. - 342 с.
26. Sershen H., Hashim A., Lajtha A. Serotonin-mediated striatal dopamine release involves the dopamine uptake sites and the serotonin receptors // *Brain Res. Bull.* - 2000. - Vol. 53, № 3. - P. 535-537.

Поступила в редакцию 05.12.2006 г.