

© Григорчук О.С., Умрюхин П.Е., 2012
УДК 612.82.015

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ
ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ
ВЕНТРОМЕДИАЛЬНОГО ГИПОТАЛАМУСА**

О.С. Григорчук, П.Е. Умрюхин

НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАМН, г. Москва

У крыс Вистар были исследованы реакции 30 нейронов дорсального гиппокампа в условиях стимуляции эмоциогенных отделов вентромедиального гипоталамуса. Подведение пептида, вызывающего дельта-сон, осуществляли микроионофоретически. Показано, что из зарегистрированных нейронов половина отвечала на эту стимуляцию усилением частоты импульсной активности. Большинство этих нейронов принадлежали животным, предрасположенным к стрессу. Крысы, устойчивые к стрессорным нагрузкам, характеризовались отсутствием выраженной реакции нейронов дорсального гиппокампа вслед за стимуляцией вентромедиального гипоталамуса, но пептид дельта-сна увеличил чувствительность этих нейронов к раздражению гипоталамуса.

Ключевые слова: гиппокамп, нейроны, стресс, дельта-сон, гипоталамус.

Изучение механизмов эмоционального стресса, а также поиск путей повышения стресс-резистентности является важной и пока не решенной задачей современной физиологии. В механизмах поведения при психоэмоциональных нагрузках важную роль играют нейропептиды, например: субстанция П, ангиотензин II, брадикинин и многие другие [6, 7, 8]. Особенно детально изучены и отражены в литературе протективные эффекты пептида, вызывающего дельта-сон (ПВДС) [1, 5, 10, 13]. Пептид, вызывающий дельта-сон, повышает выживаемость животных в условиях конфликтных ситуаций, улучшает мозговой кровоток, уменьшает пресорные сосудистые реакции, обладает антиаритмическим и другими эффектами.

Ведущая роль в организации соматовегетативных реакций в конфликтных ситуациях, порождающих эмоциональный стресс, принадлежит лимбико-ретикулярным структурам мозга и гипоталамусу, играющему триггерную (запускающую) роль [12, 15]. При этом в основе

центральных механизмов, определяющих устойчивость к экстремальным воздействиям, в основе центральных механизмов, определяющих устойчивость к экстремальным воздействиям, лежит специфическая организация молекулярных и нейрохимических свойств нейронов эмоциогенных структур [4, 9, 14].

Различные эмоциональные состояния лабораторных животных можно моделировать искусственным путем. В частности, отрицательное эмоциональное состояние возникает в результате стимуляции вентромедиального гипоталамуса (ВМГ), что внешне проявляется реакцией агрессии и избегания.

В связи со сказанным представляет несомненный научный интерес изучение вопроса, в какой степени отражается стимуляция отрицательных эмоциогенных структур гипоталамуса на активности отдельных нейронов лимбических структур головного мозга и оказывает ли специфическое действие на активность этих нейронов в данных условиях пептид дельта-сна.

Материалы и методы

Работа выполнена на 8 крысах-самцах Вистар массой 230-280 г. Животных содержали при комнатной температуре в условиях свободного доступа к пище и воде. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), а также с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, протокол №1 от 03.09.2005 г.).

Предварительно животных тестировали в открытом поле. На основе показателей поведения в открытом поле крысы были разделены на активных, пассивных и занявших промежуточное положение по характеристикам поведения в тесте открытого поля. Для этого использовали коэффициент, представляющий отношение количества пересеченных крысой квадратов открытого поля к сумме латентных движений (ЛП) первого движения и выхода в центр поля.

$$\text{Коэффициент} = \frac{\text{Периферическая амбуляция} + \text{центральная амбуляция}}{\text{ЛП первого движения} + \text{ЛП выхода в центр}}$$

В зависимости от значения коэффициента выделяют 3 группы животных по суммарному ориентировочно-исследовательской активности: активные (высокая СКА 130 ± 9), пассивные (низкая СКА 81 ± 4) и средние (промежуточное значение СКА).

Активные – в популяционном плане прогностически устойчивые к действию эмоциональных нагрузок крысы характеризовались большими значениями коэффициента. Пассивные животные – отличались низкими значениями данного коэффициента и низкой резистентностью функций организма к стрессорным нагрузкам [3].

Затем животным при анестезии хлорагидратом (450 мг/кг внутривенно) вживляли металлический электрод в область вентромедиального гипоталамуса по координатам (AP: -1,2; LP: -1,9; Ventr: -8,6; угол наклона 0 градусов). Контроль попадания осуществлялся через сутки после вживления путем раздражения

структуры в течение секунды серией импульсов тока силой 50-200 мА (порог раздражения уточнялся индивидуально) и продолжительностью каждого прямоугольного стимула 1мс. Критерием попадания в вентромедиальный гипоталамус считалось появление у животного агрессии, вокализации, избегания.

В день эксперимента животных наркотизировали уретаном (2 г/кг внутривенно) и скальпировали. Известно, что уретан вызывает «диссоциативную» анестезию и полностью сохраняет нейрофизиологические свойства нейронов, а также вегетативные рефлексы [11].

Для нивелирования гипотермии в период нахождения животных в наркотизированном состоянии, температуру их тела при помощи резиновой грелки искусственно поддерживали в пределах $37-38^{\circ}\text{C}$. Животных помещали в стереотаксический аппарат Stoelting (USA). В соответствии со стереотаксическими координатами через трепанационное отверстие в мозг вводили стеклянные трехканальные микроэлектроды. Координаты отверстия соответствовали AP: -4 мм, LP: 2 мм. Угол наклона – 10 градусов медиально.

Один канал микроэлектрода заполняли 3М раствором NaCl, второй – раствором пептида, вызывающего дельта сон. Третий канал для микроионофореза заполняли водой для инъекций для контроля или раствором ПВДС. Значение тока при микроионофорезе ПВДС или воды составляло +40 нА, удерживающий ток – 5нА. Для исключения токового эффекта при микроионофоретическом подведении исследуемых веществ использовали компенсационные токи.

Электрод проходил через сенсорную кору мозга, дорсальный гиппокамп. Индифферентный электрод вживляли в носовые пазухи.

Концентрации раствора ПВДС для микроионофореза равнялись 1 мг/мл. Достоверность изменения частоты нейрональной активности считали по критерию Стьюдента (используя программу Statistica 6.0).

Регистрацию нейрональной активности осуществляли экстраклеточно. Положе-

ние кончиков микроэлектродов контролировали на срезах мозга крыс после их декапитации (Paxinos, G., Watson, C., 2004).

Регистрацию нейрональной активности осуществляли в реальном времени с записью на компьютерный диск. Сигнал с усилителя оцифровывали при помощи аналогово-цифрового преобразователя. Для получения частотных гистограмм и паттернов нейрональной активности использовали специальную программу (Умрюхин Е.А., 2000) для выделения спайков по превышению сигнала порогового значения и автоматизированной регистрации и анализа количества спайков в единицу времени, а также для расчета продолжительности межимпульсных интервалов. Каждая эпоха анализа импульсной активности равнялась 2.7 секунды.

Запись нейронов проводилась по стандартной схеме: в начале регистрации 30 секунд записывали фоновую активность, затем проводили электрическое раздражение вентромедиального гипоталамуса током пороговой величины. После записи изменения активности нейронов в ответ на стимуляцию ВМГ (запись производилась в течение 1,5 мин) и двухминутного перерыва, микроионофоретически подводился пептид, вызывающий дельтасон. После этого следовало повторное раздражение структуры с записью активность нейронов головного мозга. (Схема опыта представлена на рисунке 1.)

Для статистического анализа и окончательного представления данных и построения частотных гистограмм использовали программы Statistica 8.0 и Microsoft Excel.

Схема эксперимента



Рис. 1. Схема эксперимента

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных опытов было зарегистрировано 30 нейронов дорсального гиппокампа. После раздражения вентромедиального гипоталамуса и последующего подведения ПВДС в дорсальном гиппокампе были обнаружены три типа реакций.

Нейроны первой группы (14 нейронов) характеризовались усилением активности, по сравнению с фоновой, при первичной стимуляции ВМГ, и снижением частоты импульсной активности при сти-

муляции ВМГ после предварительного подведения ПВДС.

Гистограмма типичного нейрона первой группы представлена на рисунке 2.

Таким образом, у половины зарегистрированных нейронов дорсального гиппокампа сразу после стимуляции отрицательной эмоциогенной зоны гипоталамуса было отмечено усиление частоты импульсации, что подтверждает участие данного отдела гиппокампа в генерации эмоционального напряжения.

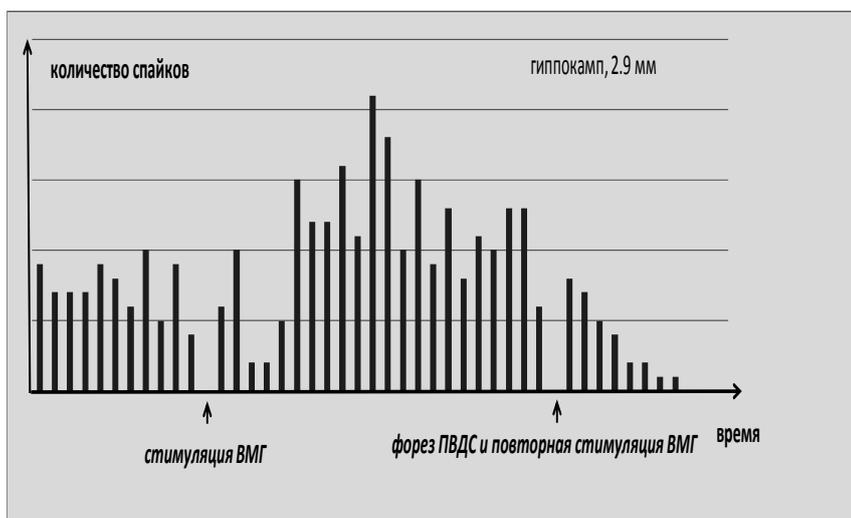


Рис. 2. Частотная гистограмма типичного нейрона первой группы

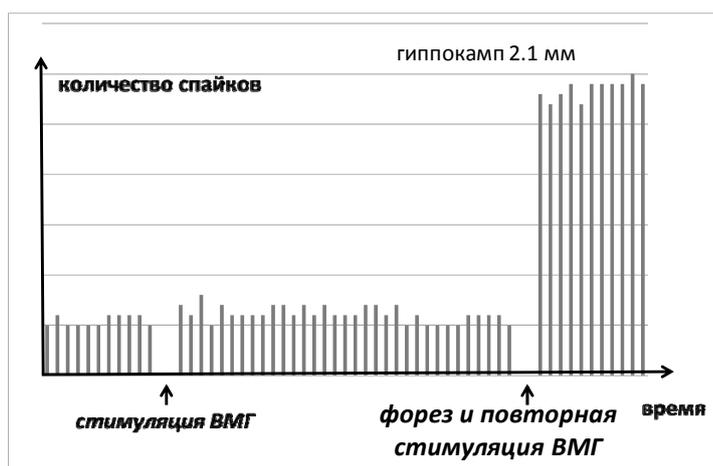


Рис. 3. Частотная гистограмма типичного нейрона второй группы

Нейроны второй группы (12 нейронов) не отвечали на первичную стимуляцию ВМГ, однако увеличивали свою импульсную активность на стимуляцию ВМГ после предварительного подведения пептида, вызывающего дельта-сон.

Гистограмма типичного нейрона второй группы представлена на рисунке 3.

Третья группа нейронов (4 нейрона) характеризовалась отсутствием реакции как на первичную стимуляцию ВМГ, так и на стимуляцию после подведения ПВДС.

Затем были проанализированы типы реакций нейронов дорсального гиппокампа у крыс с различной резистентностью к стрессу. Оказалось, что большинство крыс, нейроны которых попали в первую группу (71%), являлись предрасположенными к стрессу. Во второй группе, напротив, обнаружилась большая часть устойчивых животных (83%). В третьей же группе 50% крыс были устойчивыми и 50% предрасположенными к стрессу.

Таким образом, можно заметить, что у предрасположенных к стрессу животных ПВДС производит эффект, который можно трактовать как протективный, уменьшая возбуждение нейронов дорсального гиппокампа после эмоциогенного раздражения. Устойчивые крысы характеризуются менее выраженной активацией нейронов дорсального гиппокампа в ответ на стимуляцию ВМГ, что может лежать в основе механизма их большей устойчивости. Это совпадает с данными экспрессии раннего гена *c-Fos*, которая косвенно отражает активность нейронов. Согласно этим данным [12] предрасположенные крысы характеризуются более выраженной экспрессией гена *c-Fos* после стрессорной нагрузки.

Выводы

1. Половина нейронов дорсального гиппокампа после стимуляции ВМГ усиливает частоту импульсации.
2. Для крыс предрасположенных к стрессу при раздражении ВМГ характерна активация нейронов дорсального гиппокампа. После подведения ПВДС крысы этой группы не отвечали на последующую стимуляцию ВМГ.
3. Крысы устойчивые к стрессорным нагрузкам характеризовались отсутствием выраженной реакции нейронов дорсального гиппокампа вслед за стимуляцией ВМГ, но ПВДС увеличил чувствительность этих нейронов к раздражению эмоциогенной зоны гипоталамуса.

Литература

1. Дорморфины, пептид DSIP и сон у кроликов / В.М. Ковальзон [и др.] //

Нейрохимия. – 2002. – Т. 19, №4. – С. 288-292.

2. Коплик Е.В. Альбумин крови в механизмах индивидуальной устойчивости крыс к эмоциональному стрессу / Е.В. Коплик, Ю.А. Грызунов, Г.Е. Добрецов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88, № 6. – С. 707-714.
3. Коплик Е.В. Тест открытого поля как прогностический критерий устойчивости крыс Вистар к эмоциональному стрессу / Е.В. Коплик, Р.М. Салиева, А.В. Горбунова // Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 1995. – Т. 45, № 4. – С. 775-781.
4. Пептид, вызывающий дельта-сон, как фактор, повышающий содержание вещества П в гипоталамусе и устойчивость крыс к эмоциональному стрессу / К.В. Судаков [и др.] // Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 1991. – Т. 41, №3. – С. 558-563.
5. Прудченко И.А. Проблема эндогенности пептида дельта-сна / И.А. Прудченко, И.И. Михалева // Успехи совр. биологии. – 1994. – Т. 114, вып. 6. – С. 728.
6. Регуляторные пептиды и ферменты их обмена в молекулярных механизмах развития стресс-реакции / Л.Ф. Панченко [и др.] // Нейрохимия. – 2000. – Т. 17, №2. – С. 83-92.
7. Сравнительное изучение фрагментов тафтсина на показатели условной реакции пассивного избегания / М.М. Козловская [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2001. – №3.
8. Юматов Е.А. Нейромедиаторная интеграция эмоционального возбуждения и механизмы устойчивости к стрессу / Е.А. Юматов // Вестн. Рос. Акад. мед. наук. – 1995. – №11. – С. 9-16.
9. Early-life stress and neurometabolites of the hippocampus / D. Jeremy [et al.] // Brainresearch. – 2010. – Vol. 135, №8. – P. 191-199.
10. Khovanskaya T.P. Neurochemical effects of delta sleep inducing peptide under acute emotional stress / T.P. Khovanskaya, E.V. Koplík // Neuroscience. – 1989. – Vol. 15. – P. 11-19.

11. On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis / M. Herrera-Marschits [et al.] // Journal of Neurochemistry. – 1996. – Vol. 66, №4. – P. 1726-1735.
12. Delta-sleep inducing peptide (DSIP) and ACTH (4-10) analogue influence Fos-induction in the limbic structures of the rat brain under emotional stress / K.V. Sudakov [et al.] // Stress. – 2001. – Vol. 4, № 2. – P. 143-153.
13. Synthetic ACTH analogue Semax displays nootropic-like activity in humans / A.Ya. Kaplan [et al.] // Neurosci. Res. Commun. – 1996. – Vol. 19, №2. – P. 115-123.
14. The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control / Seiji Nishino [et al.] // Neuropeptides. – 2007. – Vol. 41, Is. 3. – P. 117-133.
15. The Psychosocial environment and psychosomatic diseases / L. Levi [et al.] // Proceedings of an international interdisciplinary symposium (Stockholm, April 1970). – London; New York: Oxford University Press, 1971.

DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE AND NEURONAL ACTIVITY IN DORSAL HIPPOCAMPUS AFTER VENTRO-MEDIAL HYPOTHALAMUS STIMULATION

O.S. Grigorchuk, P.E. Umriukhin

In male Wistar rats 30 neurons of dorsal hippocampus were analyzed after stimulation of ventromedial hypothalamus and delta-sleep inducing peptide microiontophoretic application. It was shown that half of those neurons responded to this stimulation by the rise of impulsion frequency. These neurons predominantly belonged to rats predisposed to stress. Resistant to stress rats were characterized by the absence of neuronal activation after hypothalamic stimulation. Delta-sleep inducing peptide application increased sensitivity of their neurons to stimulation of hypothalamus.

Key words: *hippocampus, neurons, stress, delta sleep, the hypothalamus.*

Павел Евгеньевич Умрюхин – д.м.н., старший научный сотрудник НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, профессор кафедры нормальной физиологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова.

125008, г. Москва, Новомихалковский пр., д. 5/2, кв. 32.

Тел.: 8-926-137-57-87.

E-mail: pavelum@mail.ru.

Григорчук О.С. – м.н.с. НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН.

E-mail: prosto-tak05@mail.ru.