



УДК 612.82.821.2

О НЕКОТОРЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПЕПТИДОВ И ИХ АНАЛОГОВ НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

КРУГАНКОВ Р. И., ДИШ Т. И., КОШТОЯНЦ О. Х.,
МАРКАРОВА М. Ю., ПУЗЫРЕВА Т. Г.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва

На фоне системного введения нейропептидов различных семейств изучали холмическую и адренореактивность нейронов сенсорной коры и проницаемость ГЭБ для флуоресцина натрия.

Было выявлено перераспределение доли клеток, реагирующих активирующей, тормозящей и аргативной формами реакций на подводимые к ним АХ и норадреналин на фоне применения различных нейропептидов, что позволяет, в определенной мере, полагать, что неодинаковое влияние на процесс обучения и памяти обусловлено особенностями их действия на хемореактивные свойства мембран церебральных нейронов.

Изучение состояния ГЭБ на фоне действия нейропептидов показало, что защитная функция ГЭБ остается довольно устойчивой под действием нейропептидов, тогда как другие гистогематические барьеры претерпевают определенное изменение.

Многочисленные факты участия нейропептидов (НП) в процессах обучения и памяти выдвигают вопрос о механизмах этого явления. Направления поисков ответов на него вытекают из принципа взаимодействия химических субстратов, участвующих в обеспечении интегративной деятельности головного мозга. Одно из таких направлений состоит в исследовании роли «классических» нейромедиаторов и информационных макромолекул—нуклеиновых кислот и белков—в механизмах влияния НП на обучение и память. К настоящему времени получены убедительные доказательства зависимости поведенческих эффектов НП от состояния моноаминергических систем мозга [1—4]. Имеются указания и о влиянии НП на нейромедиаторные системы [4—7]. Поскольку такое влияние может играть существенную роль в механизмах участия НП в интегративной деятельности мозга, его целенаправленное изучение вызывает большой интерес. Функциональное же состояние нейромедиаторных систем определяется не только соотношением синтеза, секреции и инактивации нейромедиаторов, но и состоянием соответ-

ствующего рецепторного аппарата. Поэтому целесообразны исследования системных введений различных НП на чувствительность церебральных нейронов к «классическим» нейромедиаторам.

Для понимания центральных эффектов системно вводимых НП чрезвычайно существенно учитывать состояние гистематических барьеров в целом и ГЭБ в особенности. В соответствии с этим задача настоящей работы состояла в исследовании влияния системного введения различных НП на чувствительность нейронов сенсомоторной коры крыс к АХ и норадреналину (НА) и на функциональное состояние гистематических барьеров и ГЭБ.

Материалы и методы

Опыты по исследованию НП на хемореактивные свойства нейронов проводили на беспородных белых крысах массой до 250 г, обездвиженных α -тубокурарином. К черепу крепили миниатюрный микроманипулятор с помощью протакрила. 3-ствольный структурированный микроэлектрод погружали на уровень IV—VI слоев коры больших полушарий. Стволы электрода заполняли 3 М раствором NaCl (регистрирующий электрод), 2 М раствором АХ (рН 4) и 0,2 М раствором битартрата НА. Подведение АХ и НА к нейронам осуществляли током фореза при 10—40 нА в течение 30 с; сдерживающий ток не превышал 4—5 нА. Импульсную активность исследуемых нейронов регистрировали в течение 1,5 мин перед подведением АХ и НА, во время их подведения (30 с) и в течение 2 мин после подведения. Для анализа использовали 60-секундные интервалы записи импульсной активности до и после микроионофореза нейромедиаторов. Критерием реакций нейронов на ионофоретическое подведение АХ и НА служило изменение частоты импульсации нейронов не менее чем на 20%. Три исследуемых пептида—дес-глициларгининвазопрессин (ДГ-АВП), циклический аналог энкефалина (ЦАЭ) и представитель экзорфинов—казоморфин—вводили подкожно из расчета 10 мкг на крысу, а четвертый—даларгин—5 мкг. Определение хемореактивных свойств нейронов начиналось через 5 мин после введения пептида и продолжалось до 3 ч.

Флуоресценция натрия в ткани мозга и в крови крыс определяли по методу Утевской [8]. Животным за 10 мин до декапитации внутрибрюшинно вводили 25 мг/кг (5 мг в 1 мл H_2O) флуоресценции натрия. Ткань мозга гомогенизировали с 96° спиртом 15 мин, затем центрифугировали. Критерием проницаемости служило процентное отношение концентрации красителя в вытяжке из ткани мозга к его концентрации в спиртовом экстракте сыворотки одновременно взятой крови. Анализ экстрагируемого из мозга и крови красителя проводили в камере для определения флуоресцирующих веществ, предложенной Владимировым и Литвиновым, которая позволяет измерить содержание флуоресцирующих веществ в биологических жидкостях с точностью до 0,1 мкг.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что влияние НП на нейромедиаторные системы головного мозга может осуществляться путем изменения хемореактивных свойств мембран церебральных нейронов. Так, при системном введении ряда НП—ДГ-АВП, ЦАЭ, даларгина и казоморфина наступали выраженные изменения хемореактивных свойств мембран церебральных нейронов, проявлявшиеся в изменениях соотношений возбуждавшихся, тормозившихся и ареактивных нейронов при микроионофоретическом подведении АХ и НА.

Таблица 1

Влияние системного введения десглицилларгинаиназапрессина, циклического аналога лизина, даларгина и казоморфина на чувствительность нейронов гангвентриальной коры к микроионофоретическому подведению норадреналина (НА) и ацетилхолина (АХ) (относительное количество активирующихся, ареактивных и тормозившихся нейронов, в %)

Медиа-тор	Реакция нейронов на подвидный нейромедиатор	Норма (111)	ДГ-АВП (63)	ЦАЭ (47)	Даларгин (29)	Казоморфин (25)
АХ	активация	42±5	52±7	57±7	55±9	40±10
	отсутствие реакции	24±4	21±5	34±7	17±7	52±10*
	торможение	34±4	27±6	9±4*	28±8	8±6*
НА	активация	41±5	25±6*	49±7	34±9	20±8*
	отсутствие реакции	22±4	35±6	34±7	21±8	65±10*
	торможение	37±5	40±6	17±6*	45±9	15±8*

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано количество опытов * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

При анализе полученных данных (табл. 1) обращает на себя внимание ряд фактов. Это прежде всего изменение хемореактивных свойств мембран церебральных нейронов при системном введении НП. Низкая проницаемость ГЭБ для НП [9—12] выдвигает вопрос о природе как описанного, так и других центральных эффектов НП. К его обсуждению мы вернемся ниже. Здесь же важно подчеркнуть, что вызываемые НП изменения чувствительности кортикальных нейронов к нейромедиаторам, наряду с другими механизмами, могут лежать в основе изменений процессов обучения и памяти. Обращает на себя внимание различия в эффектах различных НП. Как видно из данных табл. 1, одни НП (ДГ-АВП и ЦАЭ) оказывали выраженное влияние как на холино-, так и адреночувствительность кортикальных нейронов, у других НП (даларгин) это влияние было выражено значительно слабее. Помимо этого, разные НП неодинаково изменяли холино- и адренореактивные свойства нейронов. Так, под влиянием ДГ-АВП имело место увеличение доли клеток, реагирующих на подведение АХ повышением частоты импульсации, тогда как при подведении НА наблюдали снижение доли возбуждавшихся клеток и увеличение доли ареактивных нейронов. Возможно, что различия влияния разных НП на обучение и память в значительной мере обусловлены неоднозначностью их эффектов на хе-

морерактивные свойства церебральных нейронов. Вызываемая НП перестройка рецепторного аппарата нейронов, очевидно, связана с изменениями белкового метаболизма. И действительно, как показали ранее проведенные исследования, под влиянием Met- и Leu-энкефалина и ДГ-АВП изменяется синтез белка в ряде церебральных структур. В специальной серии экспериментов с использованием методики цитонинтерферометрии обнаружены достоверные изменения содержания белков в нейронах двигательной коры и гиппокампа. Направленность сдвига содержания белков в нейронах зависела от времени: увеличение содержания белков, через 10 мин после введения ЦАЭ, через 40 мин сменялось снижением их содержания [13].

Под влиянием другого НП—ДГ-АВП, который вводили в дозе 10 мкг на крысу, содержание и синтез РНК в гиппокампе и неокортексе возрастали. Этот эффект был более выражен при функциональной нагрузке (обучение). Одновременно наблюдали количественные изменения фракционного состава ядерных белков, обнаруженные с помощью электрофореза. Это означает, что под влиянием ДГ-АВП активировался генетический аппарат клеточных элементов мозга [14].

Одной из острейших и пока наименее исследованных проблем в механизмах центрального действия НП является выраженность их центральных эффектов с очень низкой проницаемостью ГЭБ для НП. По некоторым данным [5], через ГЭБ проникают доли процента от количества системно введенных НП. В этих условиях объяснение очевидных центральных эффектов оказывается весьма затруднительным. Иногда для этого привлекаются достаточно произвольно предположения о наличии «нейронов-мишеней», о каскадах, усиливающих биохимические реакции и т. д. Между тем, в центральных эффектах системно введенных НП существенную роль могут играть два реальных механизма. Первый из них состоит в том, что процессы обучения и памяти могут регулироваться событиями на периферии. Так, например, изменения содержания адреналина в крови критически влияют на фиксацию временных связей [15]. Вполне вероятно, что, даже не проникая в мозг, НП могут модулировать процессы обучения и памяти за счет периферических эффектов. Второй вероятный механизм состоит в изменениях проницаемости гистогематических барьеров, в том числе ГЭБ, под влиянием системного введения НП. Не проникая в мозг или проникая в него в ничтожных количествах, НП изменяют проницаемость барьера и тем самым могут способствовать или препятствовать проникновению в мозг и в ткани периферических органов различных веществ, влияющих на процессы обучения и памяти. По данным Egimisch и соавт. [16], под влиянием лизин-вазопрессина повышается проницаемость ГЭБ для ряда веществ, в том числе оротовой кислоты, что может способствовать процессу консолидации памяти. В свете этих данных представляется вполне вероятным, что приписываемое вазопрессину благотворное влияние на процесс консолидации в действительности обусловлено оротовой кислотой, проникающей из крови в мозг.

На основе изложенных выше соображений мы исследовали влияние различных НП и их аналогов на защитную функцию ГЭБ, которую оценивали с помощью нейтрального индикатора — флуоресцина натрия. В специальной серии экспериментов перед определением проницаемости ГЭБ проводилась перфузия мозга физиологическим раствором. Данные этой серии экспериментов по направленности наблюдавшихся сдвигов носили такой же характер, как и в экспериментах без перфузии мозга. Результаты этих экспериментов приведены в

Таблица 2

Влияние пептидов на проницаемость ГЭБ для флуоресцина натрия

Группы животных	Головной мозг		Сыворотка крови		Соотношение мозг/кровь (в %)
	содержание краски (в мкг/мг ткани)	%	содержание краски (в мкг/мг ткани)	%	
Контроль (13)	2.21±0.13	100	135.57±8.77	100	1.63±0.15
ДГ-ПОВГ* (11)	1.85±0.11*	83.71*	116.0±10.64	85.63	1.59±0.11
Контроль (9)	2.2±0.21	100	220.75±51.41	100	1.01±0.13
ИОС-1860 (10)	2.42±0.09	108.52	165.4±27.67	75.37	1.45±0.25
Контроль (7)	1.95±0.14	100	159.4±16.38	100	1.22±0.14
Б-эндорфин (7)	1.67±0.27	85.64	125.3±14.40	79.29	1.32±0.12
Контроль (9)	1.41±0.15	100	96.8±7.54	100	1.45±0.10
АКТГ ¹ 7 (14)	1.56±0.05	110.64	101.50±7.20	110.16	1.15±0.11
Контроль (8)	2.27±0.21	100	160.57±19.4	100	1.11±0.11
Даларгин (10)	2.24±0.09	98.67	158.38±12.43	98.64	1.41±0.14

Примечание. * Дес-(9-глицин)-л-фенилаланин-8-орнитин/вазопрессин. В скобках указано количество опытов.

табл. 2. Они свидетельствуют о более выраженном влиянии НП на периферические гистогематические барьеры, чем на собственно ГЭБ. Такой факт сам по себе достаточно примечателен, так как свидетельствует о сравнительно высокой устойчивости защитной функции ГЭБ. Это дает основание предположить, что известное отрицательное влияние некоторых НП на обучение и память в основном обусловлено не проникновением в мозг под их влиянием чужеродных или вредных веществ, а участием иных механизмов, в том числе периферических эффектов НП [15]. В пользу этого вывода в определенной мере свидетельствуют данные о повышении проницаемости периферических гистогематических барьеров, что выражается в снижении концентрации индикатора в крови, обусловленном, очевидно, переходом его из кровяного русла в ткани и органы. Как следует из данных, приведенных в табл. 2, под влиянием ряда НП и их аналогов содержание индикатора в крови снижалось на 15—25%. Вместе с тем, сопоставление изменений содержания индикатора в крови и мозгу (по соотношению мозг/кровь) не дает оснований для заключения о существенном снижении проницаемости ГЭБ. Напротив, тенденция к возрастанию этого соотношения при воздействии некоторых аналогов НП может указывать даже на определенное снижение защитной функции ГЭБ. Отсюда следует, что в слож-

ном комплексном эффекте НП определенное место могут занимать вызываемые НП изменения защитной (а возможно, и регуляторной) функции ГЭБ и периферических гистогематических барьеров. Одним из частичных подтверждений справедливости этого положения могут служить данные о влиянии даларгина на обучение, память и защитную функцию ГЭБ. В специальной серии экспериментов было обнаружено, что интраперитонеальное введение крысам 10 мкг даларгина перед выработкой рефлекса двустороннего избегания практически не влияло на его выработку и сохранение. В то же время под влиянием этого аналога НП защитная функция ГЭБ изменялась лишь незначительно. По-видимому, такое совпадение не случайно, а является выражением функционирования одного из важных механизмов биологического действия НП.

Приведенные данные, наряду с литературными, свидетельствуют о необходимости первоочередного целенаправленного исследования роли гистогематических барьеров в механизмах центрального действия НП. Раскрытие этой роли будет способствовать выяснению одного из важнейших нейрохимических аспектов, лежащих в основе обучения и памяти.

EFFECT OF NEUROPEPTIDES AND THEIR ANALOGS ON THE CHEMOREACTIVE PROPERTIES OF CORTICAL NEURONS AND ON THE HISTOHEMATIC BARRIERS

KRUGLIKOV R. I., DISH T. N., KOSHTOYANTS O. Kh., MARKAROVA M. Yu., PUZYREVA T. G.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, USSR Acad. Med. Sci., Moscow.

On the background of systemic injection of neuropeptides of different families, cholino- and adrenoreactivity of the sensorimotor neurons and permeability of the blood-brain barrier (BBB) to Na-fluorescein have been studied. Redistribution was revealed of the part reacting by activating, inhibitory and areactive form of reaction to applied acetylcholine (ACh) and noradrenaline (NA) against the background of different neuropeptides, this allows, to a certain extent, to consider, that different effects of various neuropeptides on the process of learning and memory are determined by their different actions on chemoreactive properties of cerebral neurons' membranes.

Study of the effect of neuropeptides on BBB showed that protective function of BBB remained rather stable, while other histo-hematic barriers underwent a certain change. Data obtained allow to conclude that negative effect of the administered neuropeptides on learning and memory is basically determined not by the penetration in the brain of a number of biologically active substances under the influence of these neuropeptides, but by other mechanisms, including peripheral effects of neuropeptides.

1. Kovacs G., Bohus B., Versteeg D. H. G.—In: Progress in Brain Research, v. 53, p. 123—140, Amsterdam—N. Y., Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1980.
2. Bohus B., Conti L., Kovacs G., Versteeg D. H. G.—In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C. Ajmone Marsan, A. Matties), v. 9, p. 75—87, Rower Press, 1982.
3. Крутиков Р. И.—В кн.: Фармакология нейропептидов, с. 112—124, Москва, 1982.
4. Крутиков Р. И., Орлова Н. В., Гецова В. М., Мау В. Н. Нейрохимия, т. 1, с. 3—10, 1983.
5. Осиповский С. А., Полесская М. М. Успехи физиол. наук, т. 13, № 4, с. 74—89, 1982.
6. Буласв Е. А., Раковский К. С. Успехи физиол. наук, т. 13, № 2, с. 65—92, 1982.
7. Бакалкин Г. П., Таборко М. П. Бюл. Всесоюз. кардиол. центра АМН СССР, т. 4, № 2, с. 100—105, 1981.
8. Утевская А. Б.—В сб.: Гисто-гематические барьеры и ионизирующая радиация, с. 209, М., Изд-во АН СССР, 1963.
9. Mutsenberg Y., Simmons W. H. Life Sci., v. 32, p. 2611—2623, 1983.
10. Partridge W. M. Ann. Rev. Physiol., v. 43, p. 73—82, 1933.
11. Rappaport S. J., Vler W. A., Pettigrew K. D., Ohno K. Science, v. 207, p. 84—86, 1980.
12. Cernford E. M., Braun L. O., Crane P. D., Oldendorf W. H. Endocrinology, v. 103, № 4, p. 1297—1303, 1978.
13. Мау В. Н., Сизал О. А., Гецова В. М. В сб.: Адаптивные и компенсаторные процессы в головном мозге, с. 147—148, М., Институт мозга ВНИИПЗ, 1986.
14. Крутиков Р. И., Чиппанс Г. Н., Панченкин О. С. Изв. АН Латв. СССР, № 2, с. 81—87, 1986.
15. Gold P. E. Abstracts, v. 11, International neurobiological symposium, Magdeburg, 1985.
16. Ermish A., Landgraf R., Heindol G., Sterba G.—In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C. Ajmone Marsan, N. Matthies), p. 147—152, N. Y., Raven Press, 1983.

Поступил 10. IX 1986