

УДК 616.858

**Электрофизиологическое исследование воздействия
острого стресса и протекторного влияния таурина на
активность нейронов миндалины после острого
иммобилизационного стресса**

**М.А. Даниелян, Дж.С. Саркисян, Е.А. Чавушян,
А.А. Саваян, О.А. Назарян, Н.Н. Мелконян**

*Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: спайковая активность нейронов амигдалы, иммобилизационный стресс, таурин

Причиной стресса могут стать различные неблагоприятные факторы повседневной жизни, связанные с возникновением негативных эмоций. Известно, что стресс может стать причиной возникновения ряда тяжелых заболеваний [8, 10]. Перенасыщенность жизни современного человека стрессорными ситуациями повышает интерес исследователей к острому воздействию на организм стрессовых факторов. Распространённым стрессовым фактором в человеческом обществе является гипокинезия, связанная с малоподвижным образом жизни. Для большинства животных положение на спине не характерно, поэтому привязывание к дощечке спиной вниз вызывает у них сильный психоэмоциональный стресс. Стресс приводит к долговременным изменениям многих показателей, характеризующих функциональное состояние организма на всех его структурных уровнях. Естественным показателем изменений, которые формируются в центральной нервной системе в ответ на стрессорное воздействие, является фоновая импульсная активность (ФИА) нейронов различных структур мозга. В механизмах эмоциональных реакций особое значение имеет гипоталамо-лимбико-ретикулярный комплекс [5, 6]. В этих механизмах важную роль играют ядра миндалевидного (амигдаларного) комплекса [2, 9, 12], откуда исходит мощный пучок волокон, связывающий их с гипоталамусом [1]. В частности, электрическое раздражение ядер миндалевидного комплекса вызывает повышение количества кортикотропина в крови. В электрофизиологических исследованиях показано, что иммобилизационный стресс приводит к значительному изменению ФИА нейронов миндалевидного комплекса [7]. Миндалевидный комплекс как фокус "эмоциональной памяти" характеризуется гиперактивностью и

гипертрофией нервных клеток при посттравматическом стрессовом расстройстве и депрессии [13]. В ответ на эмоциональные стрессоры миндалина может непосредственно стимулировать центральные компоненты системы ответа на стресс и угнетать активность мезокортикальной дофаминергической системы. Таким образом, миндалина активно вовлекается в процессы нейрональных перестроек во время стрессорных воздействий. Поэтому при изучении механизмов, сопутствующих стрессовым реакциям организма, представляется актуальным исследование характера изменений параметров ФИА нейронов миндалевидного комплекса. В стрессовых ситуациях в организме возникает дефицит таурина, и для улучшения сердечно-сосудистой деятельности необходимо его применение, оказывающее, вероятно, модулирующее действие на функциональное состояние организма и способствующее стабилизации деятельности сердечно-сосудистой системы [3]. Таурин, являясь одним из 5 необходимых для мозга аминокислот, по-видимому, возмещает функциональную недостаточность гипоталамуса и других звеньев лимбических структур в стрессовых ситуациях.

В полухронических исследованиях на крысах в норме, спустя 1, 90 дней в условиях острого иммобилизационного стресса (ОИС) и в условиях протекции таурином через 7 дней исследовали изменение соотношения возбудительных и депрессорных постстимульных проявлений активности на тетаническую стимуляцию гиппокампа.

Материал и методы

Микроэлектрофизиологические эксперименты с экстраклеточной регистрацией единичных нейронов амигдалы были проведены на 14 крысах в группах: норма (n=4), спустя 1 день (n=3), 3 месяца после ОИС (n=3) и спустя 7 дней с приёмом таурина (n=4). ОИС вызывали посредством фиксирования животного на спине в течение двух часов. Для изучения влияния таурина на клеточные структуры мозга крыс животным непосредственно после стресса в течение 7 дней каждый день вводили водный раствор таурина (50 мг/кг, в/б). Экстраклеточно были зарегистрированы ФИА и вызванная спайковая активность одиночных нейронов амигдалы при высокочастотной стимуляции (ВЧС) гиппокампа у интактных крыс, после иммобилизации и под воздействием таурина. В остром эксперименте крыс обездвигивали 1% дитилином (25 мг/кг, в/б), фиксировали в стереотаксическом аппарате и переводили на искусственное дыхание. Модель изолированного бодрствующего головного мозга крысы получали перерезкой спинного мозга глазным скальпелем на уровне грудных T2-T3 сегментов под местной 0.5% новокаиновой анестезией. После краниотомии стереотаксически ориентированный [11] раздражающий биполярный электрод вводили в гиппокамп по координатам AP-3.5,

$L \pm 1.5$, $DV + 3.5$ мм, а отводящий стеклянный микроэлектрод с диаметром кончика 1 мкм, заполненный 2М раствором NaCl, погружали в амигдалу по координатам AP-7.5; $L \pm 4.5$; $DV + 5.8$ мм. ВЧС (100 Гц в течение 1 сек) осуществляли посредством прямоугольных толчков тока длительностью 0,05 мс и амплитудой 0,16 - 0,18 мА.

Проводили программный математический анализ одиночной спайковой активности 140 нейронов амигдалы. On-line регистрацию производили на основе программы, обеспечивающей селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации с последующим выводом «растеров» пре- и постстимульного спайкинга от множества нейронов, а также диаграмм усредненной частоты спайков (разработчик В.С. Каменецкий). Импульсный поток после селекции подвергался программному математическому анализу. Для избираемых сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности строили перистимульные (PETH Average) гистограммы, кумулятивные (Cumulative Average) и гистограммы частоты (Frequency Average). Анализ полученных данных производили по специально разработанному алгоритму. Для определения статистической достоверности различий в длительности межспайковых интервалов до и после действия стимула использовался непараметрический критерий проверки однородности двух независимых выборок – двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon-Mann-Whitney test) [4]. Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико, использовалась разновидность указанного теста, учитывающая его асимптотическую нормальность – z-тест. Для большинства выборок спайкинга нейрональной активности имелось статистически значимое изменение как минимум с уровнем значимости 0.05.

Результаты и обсуждение

Анализ импульсной активности отдельных нейронов амигдалы (37 клеток) в норме, в условиях стресса 1- (40 клеток), 90- (30 клеток) дневного и 7- дневного в сочетании с таурином (33 клетки) выявил формирование возбуждательных и депрессорных ответов в одиночных нейронах амигдалы на ВЧС гиппокампа в виде тетанической потенциации (ТП) и тетанической депрессии (ТД), с последующими проявлениями активности в виде посттетанической потенциации (ПТП) и посттетанической депрессии (ПТД). Сравнительная оценка изученных нейронов в аспекте соотношения возбуждательных и депрессорных постстимульных проявлений спайкинга активности, исчисляемых на основе усредненного количества спайков, с пересчётом в межимпульсные интервалы и частоты на примере комплексных усредненных перистимульных гистограмм, привела к следующему заключению (рис. 1). В нейронах амигдалы на ВЧС гиппокампа в норме ТП в однонаправленной постстимульной последовательности ТП ПТП, по

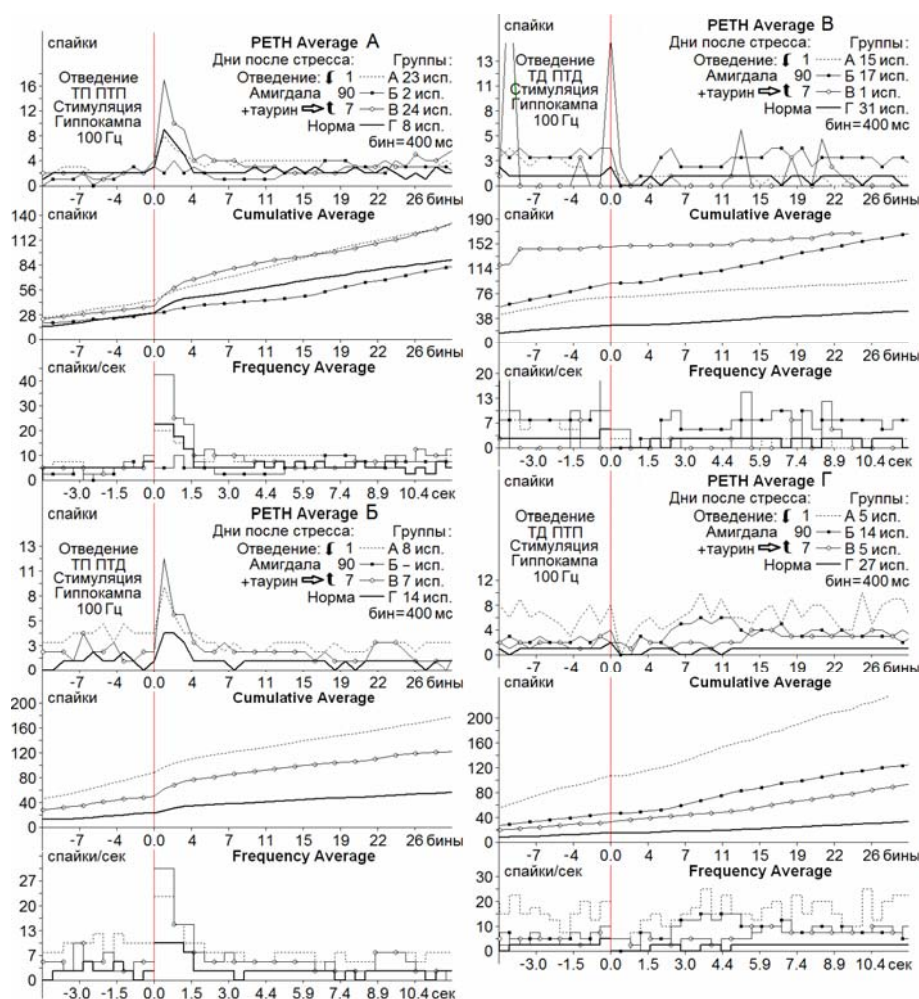


Рис. 1. А-В – комплексные усреднённые перистимульные (PETN Average), кумулятивные (Cumulative Average) и гистограммы частоты (Frequency Average) спайковой активности единичных нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа (А-Г) для тетанических и посттетанических возбуждающих односторонних (А) и возбуждительно-депрессорных (Б), односторонних депрессорных (В), смешанных депрессорно-возбуждающих (Г) реакций в условиях 1-, 90- дневного стресса (группы А и Б соответственно), 7- дневного – в сочетании с таурином (группа В) и в норме (группа Г). Остальные обозначения на рисунке

сравнению с претимульным уровнем ФИА, выявлялась в пределах 3-кратного превышения (рис. 1 А, группа Г), ТП в смешанной возбуждительно-депрессорной – ТП ПТД исчислялась в пределах 3-кратного превышения (рис. 1 Б, группа Г). В условиях 1- дневного стресса ТП нейронов амигдалы в ТП ПТД на ВЧС гиппокампа выявлялась в пределах 2-кратного завышения (рис. 1 А, группа А), ТП в ТП ПТД определялась

порядка 2.25-кратного превышения (рис. 1 Б, группа А), ТД в ТД ПТД достигала занижения уровня 2.25-кратного (рис. 1 В, группа А), ТД в ТД ПТП – в пределах 8-кратного (рис. 1 Г, группа А). После 90- дневного стресса ТП в ТП ПТП нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа выявлялась в пределах 1.33-кратного превышения (рис.1 А, группа Б), ТП ПТД не регистрировались (рис. 1 Б, группа Б), ТД в ТД ПТД нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа достигала занижения в пределах 4-кратного (рис. 1 В, группа Б), ТД в ТД ПТП – снижения порядка также 4-кратного (рис. 1 Г, группа Б), в условиях 7- дневного стресса в сочетании с таурином ТП в ПТП выявлялась в пределах 4.25-кратного превышения (рис. 1 А, группа В), ТП в ТП ПТД – в пределах 6-кратного превышения (рис. 1 Б, группа В), ТД в ТД ПТД достигала занижения в пределах 2.25-кратного (рис. 1 В, группа В), ТД в ТД ПТП – снижения порядка 1-кратного (рис. 1 Г, группа В).

На следующих рис. 2 – 5 представлены перистимульные гистограммы суммы спайков (сверху), построенные на основе «растера» пре- и постстимульных возбудительных и депрессорных проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы при ВЧС гиппокампа (рис. 2) в норме, в условиях ОИС спустя 1 (рис. 3) и 90 дней (рис. 4) и через 7 дней

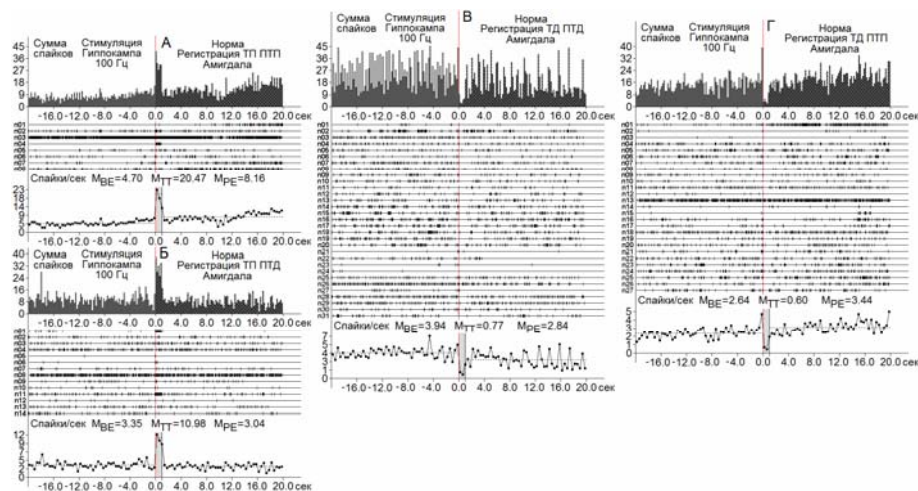


Рис. 2. А-Г – перистимульные гистограммы суммы спайков (сверху), построенные на основе «растера» пре- и постстимульных возбудительных – ТП ПТП (А), депрессорных – ТД ПТД (В) и смешанных ТП ПТД (Б) и ТД ПТП (Г) проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа в норме.

Здесь и на следующих рисунках: снизу – диаграммы усреднённой частоты спайков с указанием средних цифровых значений (М) в реальном времени 20 сек до и после стимуляции для временного отрезка до стимуляции (BE–before event), на время тетанизации (TT– tetanization time) и после стимуляции (PE–post event).

Остальные обозначения на рисунке

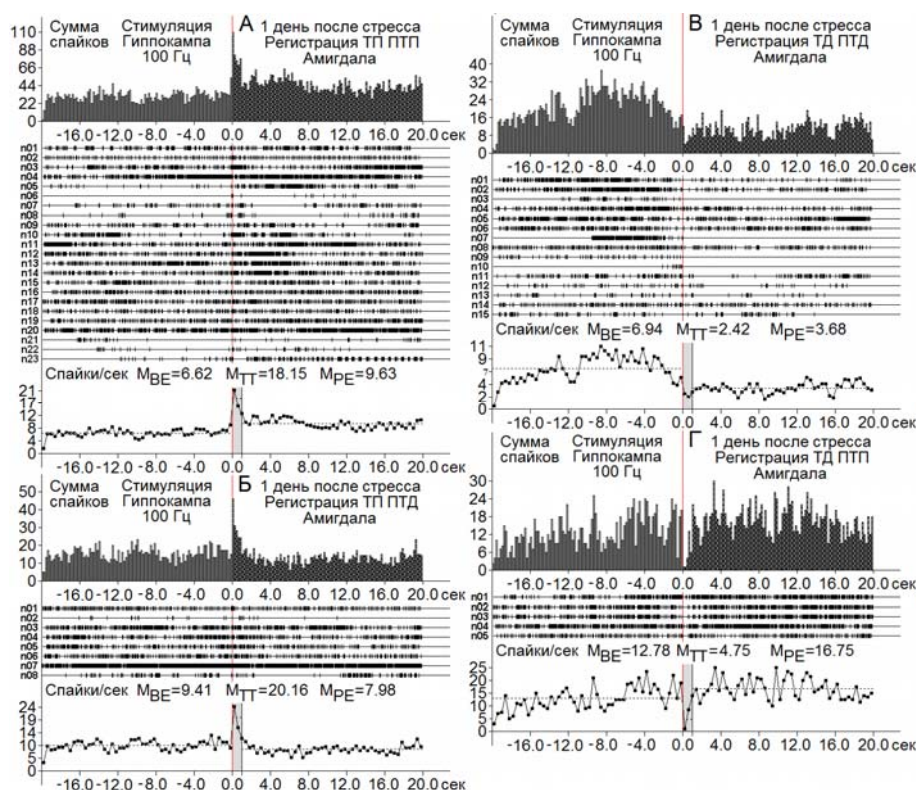


Рис. 3. А-Г – перистимульные гистограммы суммы спайков и диаграммы усреднённой частоты спайков, построенные на основе «растера» пре- и постстимульных возбудительных (А, Б) и депрессорных (В, Г) проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа после 1-дневного стресса

после ОИС с привлечением таурина в качестве протектора (рис. 5). Показаны также диаграммы усредненной частоты спайков (снизу), с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС. В аспекте процентного соотношения количества возбудительных и депрессорных постстимульных проявлений активности в нейронах амигдалы при ВЧС гиппокампа в условиях 1-, 90-дневного стресса и 7-дневного – в сочетании с таурином, по сравнению с нормой, вышеотмеченные данные представлены в виде дисковых диаграмм (рис. 6). В нейронах амигдалы, в сравнении с нормой, после усиления выше нормы тетанического возбуждения к 1-му дню, показано резкое его ослабление на 90-й день, и такое же значительное его усиление при сочетании с таурином (рис. 6 А). Что же касается тетанических депрессорных эффектов, то в амигдале (рис. 6 Б) после 1-го дня испытаний идет более резкое снижение депрессии, на 90-й день, наоборот,

усиление депрессии, но такое же резкое ее снижение при сочетании с таурином на 7-й день стресса. Иными словами, в целом, по сравнению с нормой, в условиях сочетания с таурином к 7-му дню стресса возбуждение резко нарастает и также резко снижается депрессия, что свидетельствует о способности таурина содействовать тенденции восстановления соотношения разнонаправленных постстимульных эффектов.

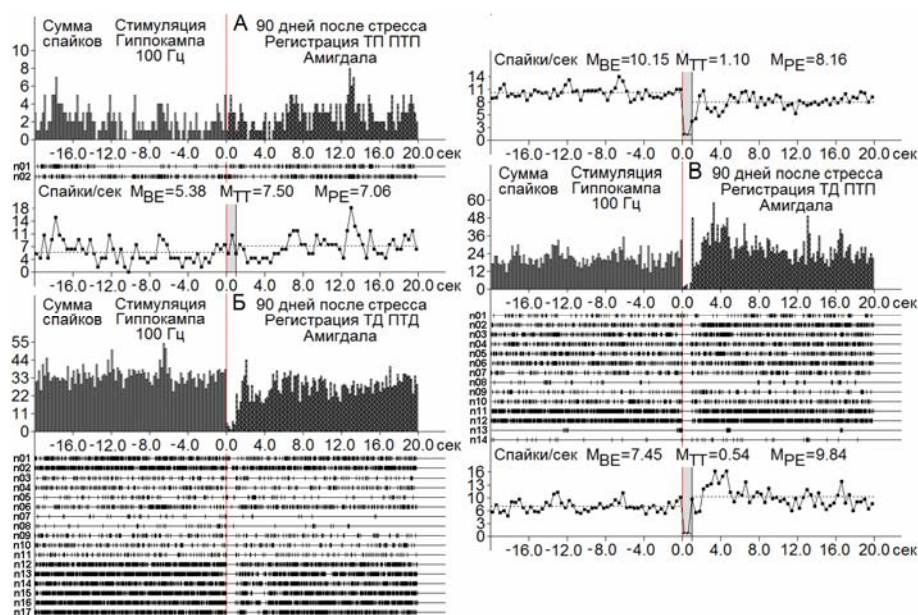


Рис. 4. А-В – перистимульные гистограммы суммы спайков и диаграммы усреднённой частоты спайков на основе «растера» пре- и постстимульных возбуждательных (А) и депрессорных (Б, В) реакций единичных нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа после 90-дневного стресса

С учётом процентного соотношения степени выраженности (по усреднённой частоте) возбуждательных и депрессорных эффектов в одиночных нейронах амигдалы при тетанической стимуляции гиппокампа на 1-й и 90-й дни после стресса и на 7-й день в условиях воздействия таурина, в сравнении с нормой, получены следующие результаты исследования (рис. 7). В нейронах амигдалы к 1-му дню после абсолютного отсутствия постстимульного тетанического возбуждения, в сравнении с нормой, следовало резкое его ослабление на 90-й день, и такое же значительное дальнейшее его усиление при сочетании с таурином (рис. 7 А). В условиях отведения ТП ПТД, в нейронах амигдалы к 1-му дню после стресса и относительного ослабления тетанических возбуждательных эффектов к 1-му дню после стресса и полного их отсутствия на 90-й день, выявлялось значительное их усиление на 7-й день после стресса в сочетании с таурином (рис. 7 Б). Что же касается депрессорных постсти-

мультных реакций, то в условиях регистрации ТД ПТД в нейронах амигдалы, в сравнении с нормой, после ослабления тетанических депрессорных реакций к 1-му дню, отводили мощное их усиление, трёхкратно превышающее норму, на 90-й день, с последующим их ослаблением, но не достигающим нормы, на 7-й день после стресса в сочетании с таурином (рис. 7 В). Наконец, в условиях регистрации ТД ПТП в нейронах амигдалы, отводили, в сравнении с нормой, после несколько меньше двухкратного ослабления тетанических депрессорных эффектов, их наиболее мощное (порядка трехкратного) усиление на 90-й день, но в тех же пределах (трёхкратно) резко ослабленное на 7-й день после стресса в сочетании с таурином (рис. 7 Г).

Таким образом, с учётом процентного соотношения степени выраженности (по усреднённой частоте) возбуждательных и депрессорных эффектов в одиночных нейронах амигдалы на тетаническую стимуляцию гиппокампа получены следующие результаты исследования. В амигдале

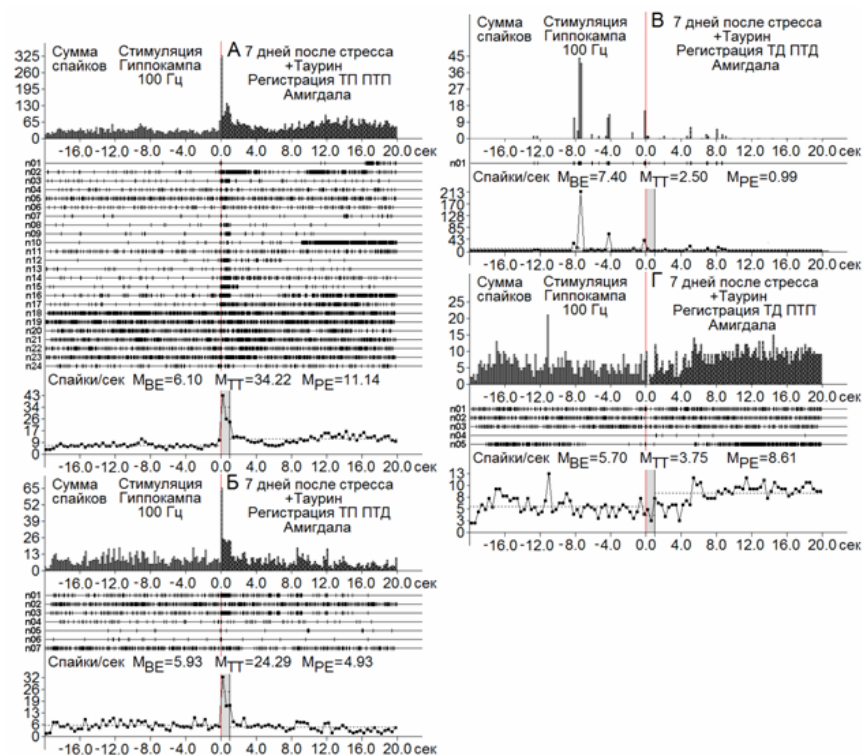


Рис. 5. А-Г – перистимульные гистограммы суммы спайков (сверху) и диаграммы усреднённой частоты спайков (снизу), построенные на основе «крастера» пре- и постстимульных возбуждательных – ТП ПТП и ТП ПТД (А, Б) и депрессорных – ТД ПТД и ТД ПТП (В, Г) проявлений спайковой активности единичных нейронов амигдалы на ВЧС гиппокампа после 7 дней стресса в сочетании с воздействием таурина



Рис. 6. Процентное соотношение количества возбуждательных и депрессорных эффектов в нейронах амигдалы при тетанической стимуляции гиппокампа на 1-й и 90-й дни после ОИС и в условиях протекторного воздействия таурина на 7-й день, в сравнении с нормой

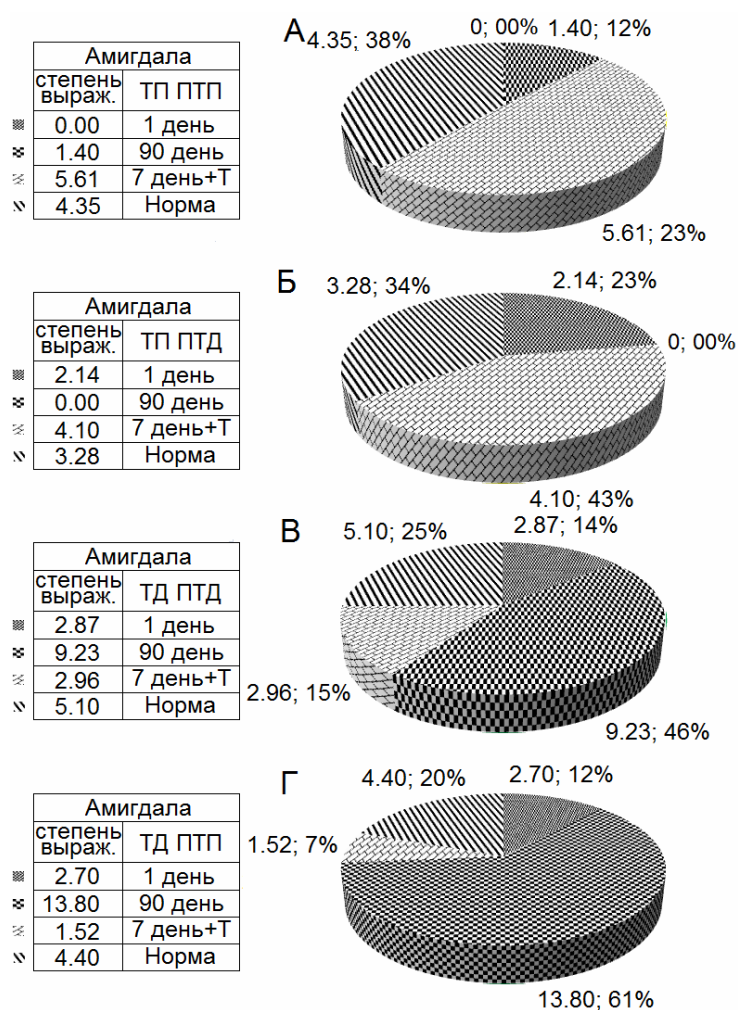


Рис. 7. Процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) возбуждательных и депрессорных эффектов в одиночных нейронах амигдалы при тетанической стимуляции гиппокампа на 1-й и 90-й дни после ОИС и в условиях воздействия таурина на 7-й день, в сравнении с нормой

выявлено мощное, в сравнении с нормой, усиление тетанических возбудительных эффектов на 7-й день после стресса, в условиях сочетания с таурином (рис. 7 А, Б), и мощное усиление тетанических депрессорных эффектов на 90-й день после стресса (рис. 7 В, Г).

Итак, анализ электрофизиологических данных позволяет заключить, что таурин оказывает нейропротекторное воздействие на нейроны миндалевидного комплекса уже на 7-й день при систематическом его введении сразу после стресса, поскольку, в противоположность иммобилизации, под влиянием таурина в нейронах амигдалы отмечается усиление возбудительных и резкое ослабление тормозных эффектов.

Поступила 29.10.14

Սուր սթրեսի և տաուրինի պրոտեկտորային ազդեցության էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտությունը նշային նեյրոնների ակտիվության վրա անշարժացման սուր սթրեսից հետո

**Մ.Ա. Դանիելյան, Ջ.Ս. Սարգսյան, Ե.Ա. Չավուշյան, Ա.Ա. Սավայան,
Օ.Ա. Նազարյան, Ն.Ն. Մելքոնյան**

Ինտակտ առնետների վրա սուր անշարժացնող սթրեսից (ՍԱՍ) 1, 90 օր հետո և տաուրինի ներարկումով ՍԱՍ-ից 7 օր անց գրանցվել է նշաձև կորիզների մեկական նեյրոնների ակտիվությունը ի պատասխան հիպոկամպի բարձր հաճախության գրգռման (ԲՀԳ) օն-լայն ընտրությամբ և ծրագրային մաթեմատիկական անալիզի միջոցով՝ հիմնվելով ճնշիչ և դրդիչ տետանիկ, հետտետանիկ (միկոնոյն ուղղվածության ու խառը) էֆեկտների վրա հայտնաբերվել է հետևյալը. ի պատասխան ԲՀԳ, նշաձև կորիզների նեյրոններում դրդման և ճնշման հետստիմուլային ակտիվության տոկոսային հարաբերության հիման վրա, նորմայի հետ համեմատած ՍԱՍ-ից 1 օր հետո դիտվում է տետանիկ դրդման ուժեղացում նորմայից բարձր, նրա խիստ նվազում 90-րդ օրը և նշանակալի ուժեղացում տաուրինի ներարկման զուգորդման ժամանակ: Ինչ վերաբերում է ճնշիչ հետտետանիկ էֆեկտներին՝ հայտնաբերվել է հետևյալը. ՍԱՍ-ից 1 օր անց նշանաձև կորիզի նեյրոններում հիպոկամպի ԲՀԳ ի պատասխան ցույց է տրվում տետանիկ ճնշման խիստ նվազում, 90-րդ օրը՝ ընդհակառակը խիստ բարձրացում, և նույնպիսի նվազում տաուրինով զուգորդման ժամանակ Այլ խոսքով, նորմայի հետ համեմատած ՍԱՍ-ի տաուրինով զուգորդման 7-րդ օրը խիստ բարձրանում է դրդումը և նվազում է տետանիկ ճնշումը:

մը, ինչը վկայում է տարբեր ուղղվածության հետստիմուլային էֆեկտների վերականգման ժամանակ տաուրինի օժանդակող հատկության մասին: Նշաձև կոմպլեքսի նեյրոնների դրդիչ և ճնշիչ էֆեկտների տոկոսային արտահայտվածության աստիճանով նորմայի համեմատ ՄԱՍ-ի տաուրինով զուգորդման 7-րդ օրը հայտնաբերվել է դրդիչ էֆեկտների բարձրացում և տետանիկ ճնշման խիստ ուժեղացում ՄԱՍ-ի 90-րդ օրը: Այսպիսով, տաուրինն իրականացնում է նեյրոպրոտեկտորային ազդեցություն նշաձև կորիզի նեյրոնների վրա արդեն սթրեսից հետո 7-րդ օրը դրդիչ էֆեկտների ուժեղացմամբ և ճնշիչ էֆեկտների թուլացմամբ:

Electrophysiological study of acute stress action and taurine protective influence on the amygdale neurons activity after acute immobilization stress

**M.A. Danelyan, J.S. Sarkissian, E.A. Chavushyan, A.A. Savayan,
O.A. Nazaryan, N.N. Melkonyan**

In acute experiments on intact Albino rats, 1, 90 days after acute immobilization stress (AIS) and after 7 days of AIS with taurine injection the recording of amygdale single neurons activity in response to high frequency stimulation (HFS) (1s) of hippocampus (Hp) by means of on-line selection and software mathematical analysis, based on depressor and excitatory tetanic and post-tetanic (unidirectional and mixed) effects, we revealed the following: in aspects of percent correlation of excitatory and depressor poststimule activity quantity in amygdale neurons on HFS of Hp, comparatively with norm, 1 day after AIS enhancement of tetanic excitation sharp weakening up the to 90 days and significant enhancement under combination with taurine injection took place above the norm. Relative to depressor poststimule effects we revealed the following: one day after AIS in amygdale neurons at HFS of Hp it was demonstrated a sharp decrease of tetanic depression, contrary to it, a sharp increase on the 90-th day, but the same decrease at conjoining with taurine. In other words, comparing with norm, in conditions of combined with taurine to the 7-th day of AIS abruptly rises the excitation and also reduces tetanic depression that testifies to taurine ability to assist the restoration of differently directed poststimule effects correlation. The percent correlation degree of manifestation of excitatory and depressor effects in amygdale, as compared with norm, has revealed the increase of excitatory effects on the 7-th day of AIS under combination with taurine and power enhancement of tetanic depression on the 90-th day after AIS. Thus taurine renders a neuroprotective action on

amygdale neurons already on the 7-th day after stress by reinforcement of excitatory effects and abrupt weakening of depressor ones.

Литература

1. *Баклаваджян О.Г., Аветисян Э.А. и др.* Нейронная организация амигдало-висцеральной-рефлекторной дуги. Успехи физиол. наук, 1996, т. 27, 3, с. 51-77.
2. *Ильющенок Р.Ю., Гилинский М.А., Лоскутова Л.В. и др.* Миндалевидный комплекс (связи, поведение, память). Новосибирск, 1981.
3. *Нефёдов Л.И.* Таурин (биохимия, фармакология и медицинское применение). 1999.
4. *Орлов А.* Математика случая: Вероятность и статистика – основные факты. Учебное пособие. М., 2004.
5. *Симонов П.В.* Эмоциональный мозг. М., 1981.
6. *Судаков К.В.* Системные механизмы эмоционального стресса. М., 1981.
7. *Ханбабян М.В., Гаспарян М.А., Саркисян Р.Ш., Саакян Н.А.* Сравнительная характеристика спонтанной нейрональной активности латерального и центрального ядер амигдалы при иммобилизационном стрессе. Труды 49-й Конференции профессорско-преподавательского состава Армянского педагогического института. Ереван, 2000.
8. *Цфасман А., Старых И., Егоров П. и др.* Профессиональные аспекты гипертонической болезни. М., 1983.
9. *Чепурнов С.А., Чепурнова Н.Е.* Миндалины и нейропептиды. М., 1985.
10. *Morrison W.E., Hass E.C., Shaffner D.H., Garrett E.S., Fackler J.C.* Noise, stress, and annoyance in a pediatric intensive care unit. Crit. Care Med., 2003. vol. 31(1), p. 113-119.
11. *Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York, 5th ed., 2005.
12. *Roozendaal B., Koollaas J.M., Bohus B.* The role of the central amygdala in stress and adaptation. Acta Physiol. Scand., 1990, 161 Suppl.(640), p. 51-54.
13. *Sheline Y., Gado M.H., Kraemer H.C.* Untreated depression and hippocampal volume loss. Am. J. Psychiatry, 2003, vol. 160, p. 1–3.