

На правах рукописи



003064248

КУДРЯВЦЕВА

Татьяна Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДОВ НА АДАПТИВНОЕ И ПОЛОВОЕ
ПОВЕДЕНИЕ САМЦОВ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

14.00.53 - геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

12 ИЮЛ 2007

Санкт-Петербург - 2007

Работа выполнена в отделе биogerонтологии
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии
Северо-Западного отделения РАН

Научный руководитель член-корреспондент РАН, доктор
медицинских наук, профессор
Хавинсон Владимир Хацкелевич

Официальные оппоненты доктор медицинских наук, профессор
Морозов Вячеслав Григорьевич

 доктор биологических наук, профессор
Алексеев Николай Петрович

Ведущее учреждение ГУ Институт физиологии
им И П Павлова РАН

Защита диссертации состоится "___" _____ 2007 г в "___" часов
на заседании диссертационного совета Д 601 001 01 при
Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАН по
адресу 197110, Санкт-Петербург, пр Динамо, д 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского
института биорегуляции и геронтологии СЗО РАН (197110,
Санкт-Петербург, пр Динамо, д 3)

Автореферат разослан "___" _____ 2007 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

Козина Л С

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Одной из приоритетных задач современной геронтологии является профилактика ускоренного старения и возрастной патологии, направленная на увеличение средней продолжительности жизни, сохранение активного долголетия и достижение видового предела жизни человека [Науфlick L , 2000, Andrews G R , 2001, Gutman G M , 2002] Ускоренное старение населения, характерное для большинства развитых стран, обусловлено истощением адаптационных резервов организма, несбалансированным питанием, возрастанием психоэмоционального напряжения и ограничением двигательной активности [Хавинсон В Х , Анисимов В Н , 2003] Снижение адаптивных возможностей организма, активное использование микротоковых технологий, повседневный стресс и неблагоприятная экология являются теми факторами, которые приводят к раннему проявлению сбоев в системе воспроизводства и с возрастом все более способствуют дисфункции репродуктивной системы, особенно ее наиболее уязвимого компонента – половой функции В этих условиях усиление адаптивных возможностей организма может играть важную роль в защите репродуктивной системы

Функционирование гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса находится под модулирующим влиянием нейромедиаторной системы головного мозга и биогенных аминов – дофамина, норадреналина и серотонина В условиях возрастной инволюции репродуктивной системы существенно возрастает значение биогенных аминов У самцов в развитии возрастных нарушений центральных механизмов регуляции половой функции особенно важное место занимают изменения в дофаминергической системе

Существующая научная информация свидетельствует о важной роли эндогенных пептидов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма в ответ на стресс и нарушение гомеостаза При этом пептидная регуляция рассматривается в качестве универсальной при нейроиммуноэндокринных взаимодействиях [Ашмарин И П , Королева С В , 2003]

Достижения последних лет в теоретической и прикладной геронтологии позволили проводить целенаправленную регуляцию возрастных изменений в различных органах и системах организма Учитывая важную физиологическую роль эндогенных пептидов в регуляции процесса старения, представляются перспективными разработка и изучение геропротекторных средств пептидной природы Создание эффективных геропротекторных препаратов становится все более важным также и в связи с расширением спектра неблагоприятных воздействий на организм человека, способствующих раннему развитию возрастной патологии [Хавинсон В Х и соавт , 2005]

Современный период развития медицины характеризуется значительными достижениями в области создания лекарственных средств на основе эндоген-

ных пептидов и их применения в комплексной терапии различных заболеваний, а также коррекции возрастной патологии. При этом главной задачей при разработке новых лекарственных средств на основе пептидов является синтез селективно действующих аналогов природных пептидов, защищенных от быстрой протеолитической деградации [Wieprecht T et al, 1997, Ripka A S, Rich D H, 1998, Perez J J et al, 2002]

Исходя из этого, представляется наиболее приемлемым использование коротких пептидов, имеющих в своем составе от 2 до 10 аминокислотных остатков и характеризующихся более высокой устойчивостью к протеолизу. Они также обладают более широкой биологической активностью (влияние на репродуктивную, нейроэндокринную и иммунную системы, увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных и антистрессорные свойства) по сравнению с их высокомолекулярными предшественниками [Хавинсон В Х, Мыльников С В, 2000, Малинин В В, 2001]. Однако сведения, касающиеся возрастных особенностей влияния коротких пептидов на адаптивное поведение, репродуктивную систему животных, а также механизмов их действия, пока остаются неполными.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось исследование влияния вилона (H-Lys-Glu-OH) и его аналогов на адаптивное и половое поведение у самцов крыс разного возраста.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследования:

- 1 Изучить влияние вилона и его аналогов АВ-9 и АВ-17 на адаптивное поведение самцов крыс разного возраста
- 2 Изучить влияние вилона и его аналогов АВ-9 и АВ-17 на половое поведение самцов крыс разного возраста
- 3 Изучить изменение содержания тропных гормонов гипофиза и тестостерона под влиянием вилона и его аналогов АВ-9 и АВ-17 у самцов крыс с индуцированным нарушением половой функции
- 4 Исследовать изменение нейромедиаторного статуса структур мозга, участвующих в регуляции поведенческих и эндокринных функций, у самцов крыс разного возраста под влиянием дипептидов

Научная новизна работы

Впервые проведен сравнительный анализ влияния вилона и его аналогов, дипептидов АВ-9 и АВ-17, на адаптивное и половое поведение самцов крыс разного возраста, а также самцов с индуцированным нарушением половой функции. Введение малых доз исследуемых дипептидов повышает адаптивные возможности молодых и гемигонадэктомированных животных, а у старых животных способствует выбору наиболее экономичной адаптационной стратегии поведения.

Вилон и его аналоги, введенные в малых дозах, способствуют быстрой нормализации половой функции у молодых самцов крыс в условиях сезонного

снижения половой активности, а также оказывают выраженное стимулирующее влияние на половое поведение старых животных

В условиях индуцированного нарушения половой функции аналог вилона АВ-9 стимулирует половое поведение при однократном введении, а вилон и его аналог АВ-17 – при многократном введении. Вилон и его аналоги усиливают секрецию лютеинизирующего и аденокортикотропного гормонов у гемигонадэктомированных самцов крыс, кроме этого, вилон подавляет выработку пролактина

Вилон и его аналоги влияют на содержание биогенных аминов в структурах мозга, осуществляющих регуляцию адаптивного и полового поведения – гипоталамусе, гиппокампе и амигдале, у самцов крыс разного возраста. Исследуемые дипептиды в гипоталамусе активизируют дофаминергическую систему у молодых животных и нормализуют ее у гемигонадэктомированных. У старых животных аналог вилона АВ-9 стимулирует дофаминергическую систему гипоталамуса и гиппокампа

Практическая ценность работы

Установлено модулирующее влияние вилона и его аналогов на различные составляющие полового поведения молодых самцов крыс при сезонном снижении их половой активности, а также старых животных при возрастном снижении резервных возможностей репродуктивной системы. Изменение полового поведения самцов крыс разного возраста под действием пептидов коррелирует с оптимизацией эндокринного статуса и нейромедиаторного баланса в структурах мозга, отвечающих за реализацию адаптивного и полового поведения животных. Полученные результаты исследования позволяют рассматривать вилон и его аналоги в качестве основы для создания лекарственных средств, предназначенных для оптимизации функций мужской репродуктивной системы

Основные положения, выносимые на защиту

- 1 Вилон и его аналоги АВ-9 и АВ-17 влияют на адаптивное поведение животных, способствуя выбору оптимальной адаптивной стратегии в зависимости от возраста и эндокринного статуса организма
- 2 Исследуемые дипептиды оказывают стимулирующее действие на половое поведение самцов крыс, наиболее выраженное у старых животных и в экспериментальной модели – гемигонадэктомии
- 3 У животных с экспериментально пониженной половой функцией вилон и его аналоги АВ-9 и АВ-17 усиливают выработку гипофизом лютеинизирующего и аденокортикотропного гормонов. Кроме этого, вилон подавляет избыточный синтез пролактина
- 4 Вилон и его аналоги АВ-9 и АВ-17 оказывают влияние на содержание и обмен нейромедиаторов в гипоталамусе, гиппокампе и амигдале – основных

мозговых структурах, участвующих в реализации поведенческих реакций У старых животных аналог вилонца АВ-9 стимулирует дофаминергическую систему гипоталамуса и гиппокампа

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе статья в журнале по перечню Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками, 7 таблицами и состоит из введения, обзора литературы, главы, содержащей материалы и методы исследования, и 2 глав, включающих результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения и выводов Библиографический указатель содержит 277 источников, из них 58 работ отечественных ученых и 219 публикаций зарубежных авторов

Апробация работы

Материалы исследования доложены и обсуждены на II Всероссийском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Санкт-Петербург, 2005), II, III и IV Всероссийских научно-практических конференциях "Общество, государство и медицина для пожилых и инвалидов" (Москва, 2005, 2006, 2007), I и II научно-практической геронтологической конференции с международным участием, посвященной памяти Э С Пушкиной, "Пушковские чтения" (Санкт-Петербург, 2005, 2006), VII Международном симпозиуме "Биологические механизмы старения" (Харьков, Украина, 2006), научно-практической конференции "Актуальные вопросы внутренних болезней" (Санкт-Петербург, 2006), на 4-ом региональном конгрессе "Stress and psychoendocrine changes the life" (Vilnius, Lithuania, 2006), на II Международном конгрессе "Социальная адаптация, поддержка и здоровье пожилых людей в современном мире" (Санкт-Петербург, 2007)

Материалы и методы исследования

В качестве исследуемых дипептидов были выбраны дипептид вилон ($H-Lys-Glu-OH$) и два его структурных аналога, синтезированные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН в лаборатории химии пептидов (зав лабораторией канд хим наук Е И Григорьев) АВ-9 и АВ-17 – дипептиды, в структуре которых для увеличения протектиической устойчивости были использованы пептидные связи между различными функциональными группами боковых радикалов глутаминовой кислоты и лизина

В работе было использовано 368 белых нелинейных крыс, полученных из питомника "Рапполово" Ленинградской области, в том числе 84 молодых половозрелых самца белых нелинейных крыс с массой тела 200–250 г в возрасте 4-5

мес, 56 самцов белых нелинейных крыс с массой тела 460-500 г в возрасте 20 мес, используемых ранее для репродукции в питомнике "Рапполово", 84 предварительно (за 1 мес до начала эксперимента) гемигонадэктомированных (ГГЭ) самца белых нелинейных крыс с массой тела 250-350 г в возрасте 5-6 мес, у которых под эфирным наркозом был удален правый семенник Кроме того, были использованы 144 предварительно (за 1 мес до начала эксперимента) овариоэктомированные самки для исследования полового поведения самцов Всех животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище

Для оценки влияния дипептидов на ориентировочно-исследовательскую активность самцов крыс в тесте "открытое поле" животным однократно внутрибрюшинно вводили исследуемые препараты в дозах 1,0 мкг и 0,1 мкг на крысу в 0,1 мл физиологического раствора Контрольным животным вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме Тестирование проводили через 1 ч и через 3 суток после введения препаратов Установка "открытое поле" представляет собой прямоугольную платформу размером 100x100 см, разделенную на квадраты со сторонами размером 10 см с отверстиями ("норками") в углах квадратов В течение 2 мин после помещения крысы в "открытое поле" регистрировали число пересеченных квадратов (ЧК), количество вертикальных стоек (ВС), число и длительность реакций груминга комфортного (Гк и Гк(с)), число реакций груминга нервного (Гн), число и длительность реакций замирания (Сид и Сид(с)), число болюсов (Б)

Исследование влияния дипептидов на половую активность проводили с использованием молодых самцов крыс в возрасте 4-5 мес со сниженной в осенне-зимний период половой активностью, старых самцов крыс в возрасте 20 мес и гипогонадных самцов в возрасте 5-6 мес с индуцированной патологией половой функции в экспериментальной модели гемигонадэктомии

Для изучения действия вилона и его аналогов на половое поведение (ПП) самцов крыс применяли классическую методику [Agmo A, 1997] В эксперименте использовали нелинейных молодых половозрелых самцов крыс с приобретенным половым опытом, старых самцов (в возрасте 20 мес), используемых ранее для репродукции в питомнике "Рапполово", и гемигонадэктомированных самцов крыс с экспериментально индуцированной низкой половой активностью Животных содержали в комнате с реверсивным освещением (12ч 12ч – день/ночь цикл, свет от 22 00) Учитывая активность крыс в определенные время суток, эксперименты проводили между 14 00 и 17 00 ч Растворы пептидов вводили внутрибрюшинно за 1 ч до тестирования Животным соответствующих контрольных групп вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме

Параметры полового поведения регистрировали до основного опыта с целью определения исходных параметров половой активности каждой крысы Для определения компонентов полового поведения тестируемого самца поме-

шали в испытательную камеру (размером 40x40x30 см) за 5 мин до предъявления сексуально восприимчивой самки Эксперименты по изучению ПП проводили в течение темной фазы цикла и при тусклом красном освещении Рецептивность у предварительно овариоэктомированных самок вызывали последовательными введениями эстрадиолдипропионата (25 мг, за 48 ч до опыта) и прогестерона (500 мкг, за 4 ч до опыта) Проявление рецептивности у самок определяли непосредственно перед тестом по наличию лордозной реакции Компоненты половой активности у самцов регистрировали визуально в течение 15 мин Измеряли латентные периоды и число садок (ЛпС и САД, соответственно), интромиссий (ЛпИ и ИМС) и эякуляций (ЛпЭ и Э), а также были рассчитаны два вторичных параметра период восстановления (ПВ) – время от первой эякуляции до следующей интромиссии, межэякуляторный интервал (МЭИ) – время между первой и второй эякуляторными сессиями Для сравнительного изучения половой активности животных исследуемых групп использовали данные, полученные в течение первой сессии (до первой эякуляции), за исключением компонентов эякуляторной активности Индексы, полученные у животных контрольных групп, или исходные значения у животных подопытных групп до тестирования для большей демонстративности изменений ПП в некоторых случаях принимали за 100 %

Для исследования влияния дипептидов на эндокринную систему самцов крыс в экспериментальной модели гемигонадэктомии после однократного и многократного введения препаратов измеряли уровень гормонов – тестостерона, лютеинизирующего гормона – (ЛГ), фолликулстимулирующего гормона – (ФСГ), пролактина и адренокортикотропного гормона – (АКТГ) в сыворотке крови крыс с помощью тест-наборов для иммуноферментного анализа *in vitro* (DRG – Германия, Adultis – Италия, Вючхимак – Германия, Хема-Медика – Италия-Россия) согласно прилагаемой инструкции

При изучении влияния дипептидов на нейромедиаторный статус структур мозга самцов крыс концентрацию дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина (СТ) и их метаболитов в структурах мозга определяли методом ВЭЖХ на "Beckman System Gold" с электрохимическим детектором LC-4С Через 1 ч после введения дипептидов крыс декапитировали, головной мозг немедленно фиксировали жидким азотом В исследованиях использовали структуры, участвующие в реализации поведенческих реакций – гипоталамус, гиппокамп и амигдалу, которые выделяли при температуре -20°C и хранили в жидком азоте до хроматографического анализа

Выделенные структуры мозга гомогенизировали в охлажденной 0,1 N хлорной кислоте, центрифугировали при 14000 g в течение 7 мин при температуре 4°C . Слой супернатанта фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм (Millipore) Часть супернатанта в объеме 20 мкл вводили в систему HPLC-ED Разделение пиков проходило в хроматографической колонке SphereClone 5 μ ODS 2 (250x4,60 мм) с предколонкой SecurityGuard

(ODS 4 мм x 3 мм) производства "Phenomenex" Аналитическое время пробега пробы в хроматографической колонке составляло 18 мин в изократическом режиме при скорости 1,0 мл/мин Подвижная фаза состояла из цитрат-фосфатного буфера (100 мМ/л NaH_2PO_4 и 125 мМ/л цитрата Na, pH=3,5), ацетонитрила (88 мл/л) и октансульфоновой кислоты (0,18 мМ/л) Работа электрохимического детектора осуществлялась при силе тока 0,5мкА с карбоновым электродом Идентификацию и чистоту хроматографических пиков, а также их количественную оценку осуществляли по отношению к пикам, полученным от стандартов Стандарты для контроля определяемых медиаторов и их метаболитов вводили в систему в начале и конце работы хроматографа Для оценки обмена ДА, НА и СТ в структурах мозга были рассчитаны отношения 3,4-дигидрокси-фенилуксусная кислота (ДОФУК)/ДА, 3-метокси-4-гидроксифенилгликоль (МГФГ)/НА и 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-ГИУК)/СТ от измеренных концентраций этих нейрехимических веществ

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартных программ для персональных компьютеров Применяли специализированные пакеты программ для медико-биологических исследований (Microsoft® Excell 7 0, "Coder" и Origin ANOVA), значимость различий оценивали по t критерию Стьюдента для независимых выборок

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наблюдений в тесте "открытое поле" показали, что ориентировочно-исследовательская активность как старых, так и гемигонадэктомированных животных снижена по сравнению с молодыми самцами крыс

Под действием вилона и его аналога АВ-9 в дозах 0,1 мкг и 1,0 мкг на крысу у молодых животных наблюдалось усиление двигательной активности, причем действие АВ-9 было выражено сильнее ЧК после введения АВ-9 в дозе 0,1 мкг на крысу увеличилось на 47,2% ($p < 0,05$), при этом число ВС возросло на 72,3% ($p < 0,1$) по сравнению с контролем Дипептид АВ-17 этим свойством практически не обладал

У гипогонадных самцов введение вилона и АВ-17 приводило к увеличению локомоторной активности Через 1 ч после введения ГГЭ самцам крыс вилона и АВ-17 в дозе 0,1 мкг на крысу у них наблюдалась повышенная двигательная активность, о чем свидетельствовало увеличение числа пересеченных квадратов по сравнению с контролем на 40,6% ($p < 0,02$) и 37,7% ($p < 0,05$), соответственно У старых животных под влиянием исследованных дипептидов наблюдалось снижение ориентировочно-исследовательской активности, ЧК достоверно уменьшалось на 30-40% по сравнению со старыми животными контрольной группы Следовательно, введение дипептидов способствовало выбору оптимальной адаптивной стратегии в условиях стресса животными различных групп в зависимости от возраста и эндокринного статуса организма (рис 1)

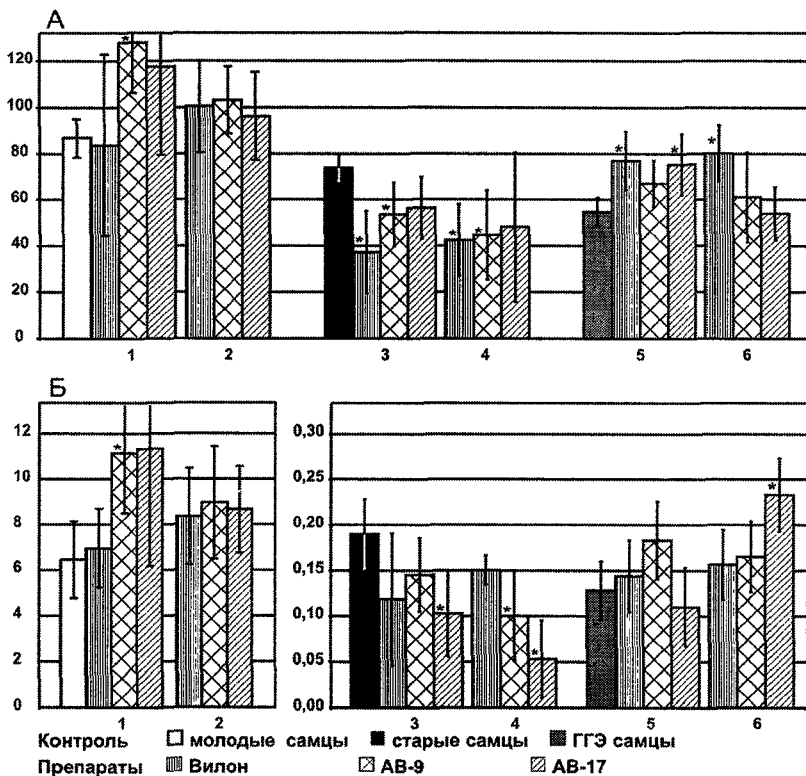


Рис 1 Влияние вилона и его аналогов на адаптивное поведение самцов крыс через 1 ч после введения дипептидов

А – изменение числа пересеченных квадратов,

Б – изменение числа вертикальных стоек,

1 – молодые животные, дипептиды в дозе 0,1 мкг на крысу,

2 – молодые животные, дипептиды в дозе 1,0 мкг на крысу,

3 – старые животные, дипептиды в дозе 0,1 мкг на крысу,

4 – старые животные, дипептиды в дозе 1,0 мкг на крысу,

5 – ГГЭ животные, дипептиды в дозе 0,1 мкг на крысу,

6 – ГГЭ животные, дипептиды в дозе 1,0 мкг на крысу

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателем у самцов крыс соответствующей контрольной группы

Увеличение адаптивных возможностей организма играет важную роль в профилактике ускоренного старения мужской репродуктивной системы и наиболее уязвимого ее компонента – половой функции. При исследовании влияния 18-кратного введения вилона и его аналогов в малых дозах на сниженную в осенне-зимний период половую функцию молодых самцов крыс было показа-

но, что исследуемые дипептиды оказывали стимулирующее влияние на ПП животных по сравнению с исходными значениями. Сравнение параметров ПП, полученных у животных подопытных групп, показало, что сокращение длительности ЛпС, отражающее изменение в мотивационном аспекте ПП, было более выражено у животных, получавших АВ-9 в дозах 0,1 мкг и 1,0 мкг на крысу. Так, после многократного введения АВ-9 в дозе 0,1 мкг на крысу ЛпС сокращался на 88,2-90,6-92,2%, ($p < 0,05$) при 6-12-18-кратном введении, соответственно, по сравнению с исходными значениями (рис 2)

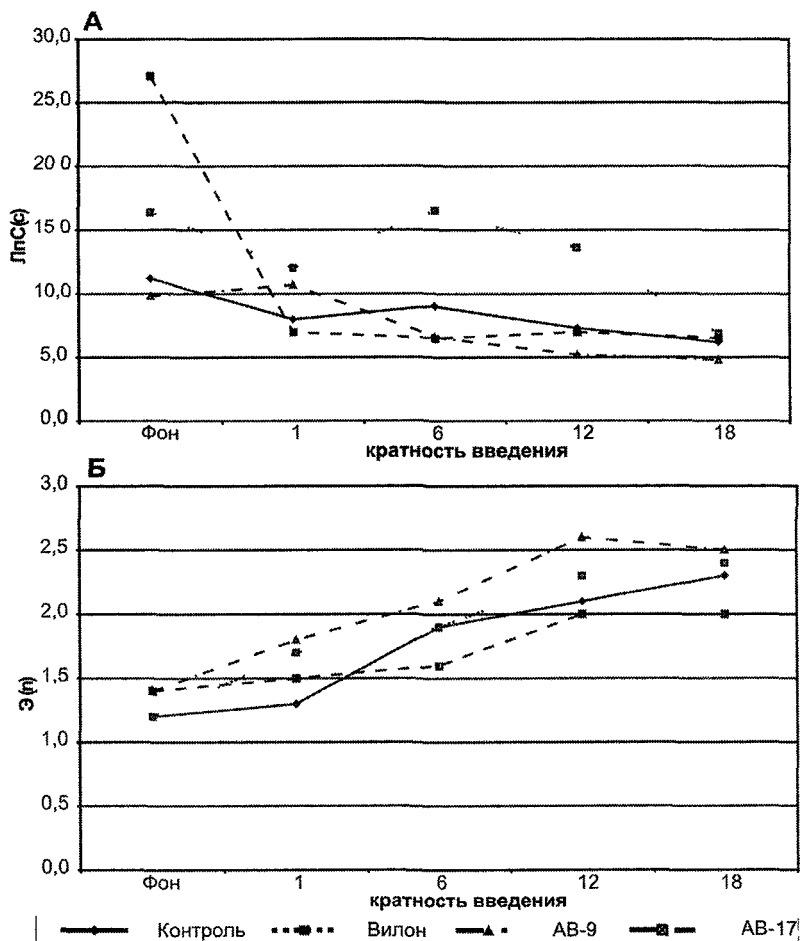


Рис 2 Влияние вилона и его аналогов на половое поведение молодых самцов крыс после многократного введения дипептидов в дозе 0,1 мкг на крысу
 А – изменение латентного периода садки
 Б – изменение числа эякуляций

Максимальное число эякуляций – интегративная характеристика ПП, также отмечалось при использовании АВ-9. Отличительной особенностью этого дипептида было отмеченное при его применении сокращение двух временных параметров ПП периода восстановления и межэякуляторного интервала ПВ после 12- и 18-и введений АВ-9 в дозах 0,1 и 1,0 мкг на крысу сократился на 18,1% ($p < 0,05$) и 18,4% ($p < 0,05$), соответственно, а МЭИ – на 32,6% ($p < 0,05$) и 36,5% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями. При этом действие виллона носило менее выраженный характер, а влияние АВ-17 проявлялось только после 18 инъекций и в ряду исследованных пептидов было минимальным. Следует отметить, что наибольшее влияние на половую функцию молодых самцов крыс исследованные пептиды оказывали после 12-кратного введения.

Целью следующей серии экспериментов было изучение влияния виллона и его аналогов на половое поведение старых самцов крыс. Увеличение возраста негативно сказалось на ПП старых животных. Собственные результаты и данные других исследователей [Гладкова А И, 1994, Smith E R, Davidson J M, 1990] позволяют утверждать, что старение у самцов крыс затрагивает как центральные, так и периферические механизмы регуляции ПП, что приводит к его общему угнетению.

Нами были использованы разные способы введения дипептидов – однократное и многократное. Результаты, полученные при тестировании старых животных после однократного введения дипептидов в дозе 100 мкг на крысу, выявили некоторые различия в их действии на ПП старых самцов. Использование аналога АВ-9 привело к усилению половой активности, выражавшемуся в сокращении латентных периодов садки и интромиссии на 64,7% ($p < 0,05$) и 53,1% ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с показателями старых животных, а также к увеличению числа интромиссий на 40,1% ($p < 0,05$). Следовательно, введение АВ-9 в этой дозе приводило не только к активации ПП старых самцов крыс, но и к усилению их физической выносливости. Введение виллона не оказало стимулирующего влияния на ПП старых самцов крыс, а его аналог АВ-17 в тех же условиях вызвал незначительное угнетение половой активности, проявлявшееся в уменьшении числа эякуляций на 52,1% ($p < 0,05$) и увеличении длительности ПВ на 30,7% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями у старых животных контрольной группы.

Многократное введение дипептидов в дозе 50 мкг также выявило активирующее действие АВ-9 на ПП старых животных. Максимальный эффект проявлялся после 6 инъекций и был более выраженным, чем при однократном введении 100 мкг этого дипептида. ЛпС и ЛпИ сокращались по сравнению с показателями у старых животных контрольной группы на 37,5% ($p < 0,05$) и 60,9% ($p < 0,05$), соответственно, кроме того, возросло количество эякуляций на 41,7% ($p < 0,05$). Виллон не оказывал значимого стимулирующего действия на ПП старых животных во все сроки введения. А использование АВ-17 в дозе 50 мкг только при 18 введениях привело к незна-

чительной стимуляции ПП, выразившейся в сокращении длительности ЛПИ на 15,9% ($p < 0,05$) и ПВ на 21,7% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями у старых животных контрольной группы. Следует отметить, что такое задержанное проявление стимулирующей активности АВ-17 отмечалось и при изучении его действия на ПП молодых животных. Многократное введение всех трех дипептидов позволило предотвратить проявление ускоренной эякуляции, которое отмечалось у старых самцов в контрольной группе. При этом значения ЛпЭ у животных, получавших вилон (320 ± 96 с), и у крыс, получавших АВ-9 (236 ± 100 с), больше соответствовали значению этого показателя, зарегистрированному у молодых животных (283 ± 87 с). Большинство исследователей полагает, что используемые для коррекции ускоренной эякуляции лекарственные препараты (ингибиторы обратного поглощения серотонина, ингибиторы моноаминоксидазы, нейролептики, симпатолитики и ингибиторы фосфодиэстеразы) являются чрезмерной фармакологической нагрузкой на организм пожилых людей [Waldinger M D et al, 2004, Safarnejad M.R, Hosseini S Y, 2006]. По нашему мнению, пептидные биорегуляторы позволяют осуществлять более мягкую коррекцию указанного состояния (рис 3).

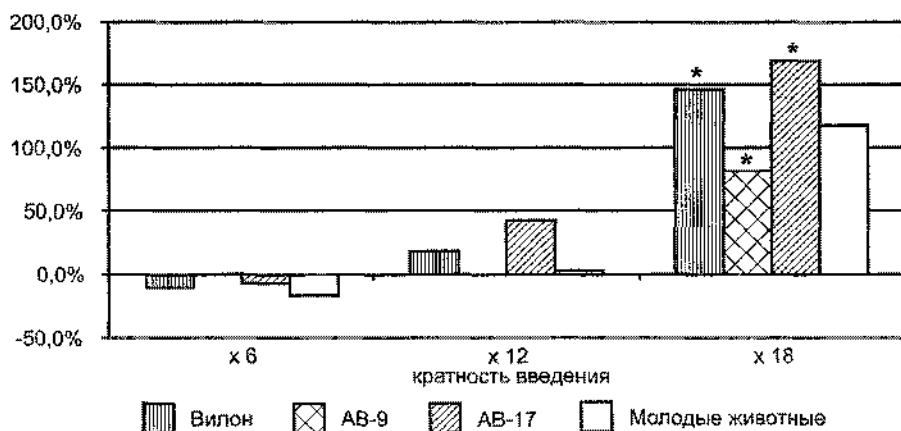


Рис 3 Влияние вилона и его аналогов на латентный период эякуляции у старых самцов крыс после 18-кратного введения пептидов в дозе 50 мкг на крысу (в % от показателя у старых самцов крыс)

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателем у старых самцов крыс контрольной группы

В следующих сериях экспериментов было проведено исследование влияния вилона и его аналогов на ПП животных с индуцированным нарушением функции половой системы вследствие гемигонадэктомии. Известно, что односторонняя гонадэктомия у самцов, как и старение, может

приводить к изменению соотношения уровня половых гормонов в крови и нарушению половой функции у животных. Через месяц после операции содержание тестостерона в крови крыс самцов стабилизируется на уровне 70% от уровня, характерного для молодых животных. При этом структура полового поведения ГГЭ самцов очень близка к структуре полового поведения старых самцов [Eiskus A A et al., 1995]. Именно поэтому гемигонадэктомия была выбрана нами в качестве модели возрастного снижения половой функции у животных.

Изучение динамики изменения параметров ПП у ГГЭ самцов было проведено в двух вариантах: однократное введение пептидов в возрастающей дозе 50-100-250 мкг на крысу и 18-кратное введение пептидов в дозе 50 мкг на животное.

Однократное введение дипептидов вилона и АВ-17 ГГЭ самцам в дозировке 50, 100 и 250 мкг на крысу не способствовало восстановлению половой активности самцов крыс. При введении АВ-9 в дозе 50-100 мкг у подопытных самцов наблюдалось частичное восстановление утраченных функций, причем выраженность эффекта носила дозозависимый характер. При однократном введении самцам крыс АВ-9 в дозе 250 мкг на крысу уровень их половой активности практически не отличался от уровня молодых животных. Количественные параметры – САД и ИМС возросли на 36% ($p < 0,05$) и 45% ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с показателями у ГГЭ самцов контрольной группы (рис. 4).

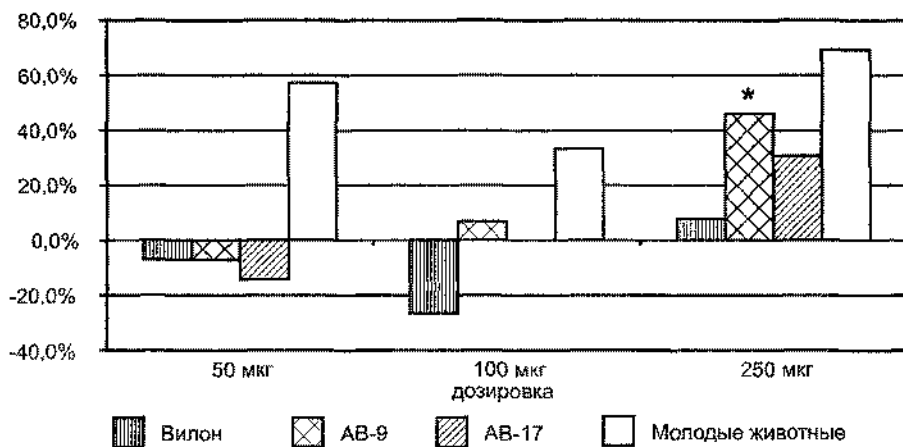


Рис. 4. Влияние вилона и его аналогов на число эякуляций у гемигонадэктомированных самцов крыс после однократного введения дипептидов (в % от показателя у ГГЭ самцов крыс контрольной группы).

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателем у ГГЭ самцов крыс контрольной группы.

Кроме этого, число эякуляций увеличивалось на 46% ($p < 0,05$) и достигало значения $1,9 \pm 0,3$ (у молодых самцов – $2,2 \pm 0,4$) При многократном введении дипептидов ГГЭ самцам крыс более выраженным эффектом на половое поведение обладали вилон и его аналог АВ-17 отмечалось увеличение числа садок, снижение ЛпС и ЛпЭ, сокращение МЭИ и увеличение числа эякуляций – то есть, наблюдалось восстановление половой активности, сниженное в результате гемигонадэктомии. Выраженность эффекта зависела от кратности введения – 12- и 18-кратное для АВ-17 и вилона, соответственно. Дипептид АВ-9 при многократном введении проявлял свою максимальную активность после 12-ой инъекции, причем абсолютные значения показателей, характеризующих ПП подопытных животных, в этом случае были близки к таковым у животных, получавших вилон. Однако при увеличении кратности введения до 18 инъекций стимулирующий эффект этого дипептида уменьшался.

Изучение влияния исследуемых дипептидов на эндокринный статус ГГЭ самцов крыс после однократного введения препаратов в дозе 250 мкг на животное показало, что все исследуемые дипептиды вызывали увеличение сниженного в результате гемигонадэктомии уровня ЛГ в сыворотке крови в 3-4 раза, модулируя содержание этого гормона. Использование дипептидов АВ-9 и АВ-17 приводило к значительному повышению содержания АКТГ в сыворотке крови – уровень гормона превышал аналогичный показатель у контрольных ГГЭ животных в 4 раза, а у контрольных молодых животных – в 2,5 раза. На содержание пролактина и ФСГ введение пептидов в дозе 250 мкг на крысу влияния не оказало, но было отмечено снижение уровня тестостерона на 33,3% ($p < 0,05$) после использования АВ-17.

Как видно из данных таблицы, 18-кратное введение исследуемых дипептидов в дозе 50 мкг на крысу привело к дальнейшему увеличению содержания ЛГ и АКТГ в сыворотке крови ГГЭ животных. На уровень ФСГ исследуемые пептиды влияния не оказали, как и на содержание тестостерона, лишь отмечалось его незначительное снижение при использовании АВ-17 – на 17,3% ($p < 0,05$). Обращает на себя внимание снижение содержания пролактина при использовании АВ-9 на 8,4 % ($p < 0,05$) и более заметное у крыс, получавших вилон – на 30,5% ($p < 0,05$).

Таким образом, введение дипептидов оказало модулирующее влияние на эндокринный статус ГГЭ самцов крыс. Следует особо отметить способность всех изучаемых дипептидов стимулировать выработку ЛГ.

Таблица

Влияние вилона и его аналогов на содержание гормонов в сыворотке крови гемигонадэктомированных самцов крыс после 18-кратного введения дипептидов в дозе 50 мкг на крысу

Группа животных	Содержание гормонов				
	Тестостерон, нмоль/л	ФСГ, МЕд/л	ЛГ, МЕд/л	Пролактин, мМЕд/л	АКТГ, пмоль/л
Молодые + физ р-р	8,2 ± 0,2	6,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2	102,7 ± 6,2	3,0 ± 0,4
ГГЭ + физ р-р	5,7 ± 0,3#	6,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1#	153,1 ± 5,8#	1,9 ± 0,2#
ГГЭ + вилон 50 мкг х 18	5,7 ± 0,3	6,0 ± 0,1	7,6 ± 0,4*	106,4 ± 4,2*	5,1 ± 0,6*
ГГЭ + АВ-9 50 мкг х 18	5,4 ± 0,2	6,1 ± 0,2	5,3 ± 0,2*	140,3 ± 6,2*	18,5 ± 1,2*
ГГЭ + АВ-17 50 мкг х 18	4,7 ± 0,2*	6,8 ± 0,2	4,7 ± 0,2*	168,8 ± 6,2	8,4 ± 0,8*

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателем у ГГЭ самцов крыс контрольной группы,

– $p < 0,05$ по сравнению с показателем у молодых самцов крыс контрольной группы

Как отмечалось многими исследователями, снижение количества ЛГ может являться одной из основных причин возрастной гипоандрогении [Tsai Y F et al , 1997, Veldhuis J D , 2000] Выявленные при многократном введении вилонна и его аналогов изменения эндокринного статуса ГГЭ самцов хорошо коррелируют с возрастанием половой активности, поскольку с увеличением содержания пролактина и снижением уровня АКТГ в крови часто связывается возрастное угасание этой функции [Гладкова А И , 1986, Clark J T , 1995]

С целью изучения возможности воздействия дипептидов на нейромедиаторные системы головного мозга было исследовано влияние вилонна и его аналогов на содержание и обмен биогенных аминов в структурах мозга самцов крыс, участвующих в регуляции поведенческих и эндокринных функций

Гипоталамус является интегративным центром моторных, вегетативных и эндокринных компонентов эмоционального поведения [Симонов П В , 1987], а гипоталамо-гипофизарно-гонадная система играет важную роль в формировании сексуальности [Kula K , 1986] Интегративная роль гипоталамуса осуществляется через функционирование и взаимодействие его нейромедиаторных систем Изменение активности медиаторных систем в гипоталамусе приводит к различным изменениям в поведенческой активности животных Гиппокамп играет важную роль в реализации полового поведения, в мотивации Здесь мотивационное возбуждение для организации текущего поведения сопоставляется с информацией, поступающей из внешней среды, и со следами прошлого опыта Амигдала инициирует организацию поведения, адекватного имеющейся ситуации, посредством влия-

ния на гипоталамус и вегетативную нервную систему, создает этому поведению соответствующее гормональное обеспечение [Симонов П В, 1987]

Проведенный анализ изменений содержания и обмена ДА, НА и СТ в гипоталамусе, гиппокампе и амигдале молодых животных показал, что исследуемые дипептиды дозозависимым образом активизируют дофаминергическую систему гипоталамуса и гиппокампа. Отмечалось значительное (почти двукратное) увеличение содержания ДА в гипоталамусе при использовании дипептидов в дозах как 1,0 мкг, так и 0,1 мкг на крысу. Аналогичное изменение содержания ДА (58,0%, $p < 0,001$) в гиппокампе отмечалось при введении вилона и АВ-17 в дозе 1,0 мкг на крысу. Динамика изменения концентрации ДА в амигдале, в целом, была сходна с таковой в гиппокампе, но носила менее выраженный характер. Следует отметить, что усиление активности дофаминергической системы исследованных мозговых структур было обусловлено значительным снижением содержания основного метаболита дофамина – 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты. Таким образом, уменьшение скорости распада медиатора приводило к увеличению его содержания и усилению поведенческого эффекта (рис 5)

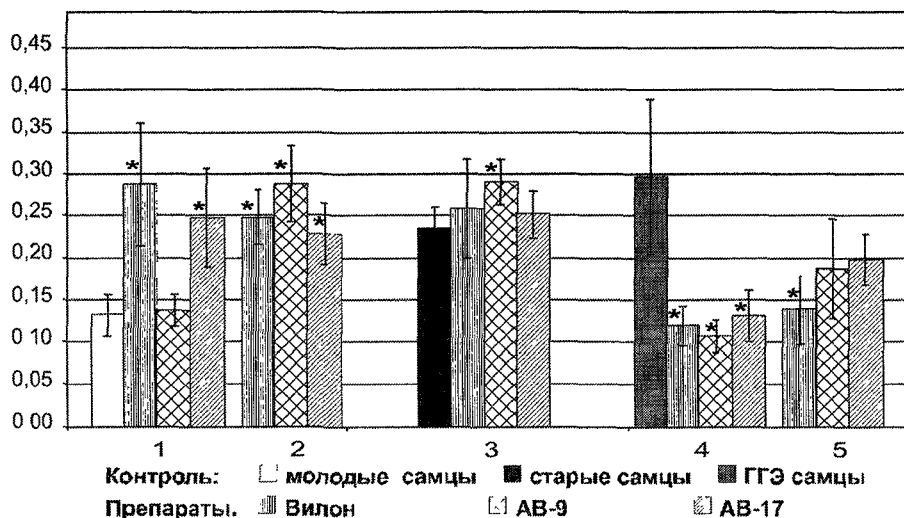


Рис 5 Влияние вилона и его аналогов на содержание дофамина в гипоталамусе самцов крыс

1 – молодые самцы + дипептиды в дозе 1,0 мкг на крысу 18-кратно,

2 – молодые самцы + дипептиды в дозе 0,1 мкг на крысу 18-кратно,

3 – старые самцы + дипептиды в дозе 50 мкг на крысу 18-кратно,

4 – ГГЭ самцы + дипептиды в дозе 250 мкг на крысу однократно,

5 – ГГЭ самцы + дипептиды в дозе 50 мкг на крысу 18-кратно,

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателем у самцов крыс соответствующей контрольной группы

Исследуемые дипептиды не оказали значимого влияния на норадренергическую систему гипоталамуса у молодых самцов крыс

Серотонинергическая система исследованных мозговых структур оказалась более подвержена влиянию двух дипептидов – вилона и АВ-17, АВ-9 вызывал значительно меньшие изменения как в содержании, так и в обмене нейромедиатора 18-кратное введение вилона и АВ-17 в дозе 0,1 мкг на крысу приводило к двукратному увеличению содержания СТ в гипоталамусе. Подобные изменения наблюдались в гиппокампе при введении вилона и АВ-17 в дозе 1,0 мкг на крысу. Обмен СТ в этих структурах был значительно снижен. Аналогичная, но менее выраженная, картина наблюдалась и в амигдале, однако здесь результаты использования АВ-9 в дозе 0,1 мкг на крысу оказались сходными с полученными от введения той же дозировки двух других пептидов.

Стимулирующее влияние АВ-9 на ПП молодых самцов определялось активацией дофаминергической системы гипоталамуса и гиппокампа, приводившей к увеличению содержания ДА за счет снижения его обмена в исследованных структурах. При этом выраженного влияния на серотонинергическую систему исследованных структур выявлено не было. Следует отметить, что если дофамин оказывает, в общем, стимулирующий эффект на мужское половое поведение, то СТ расценивается как ингибирующий медиатор [Waldinger M D, 2004].

В литературе описано возрастное снижение содержания ДА и НА в гипоталамусе и гиппокампе старых животных, при одновременном увеличении количества серотонина [Rodriguez-Gomes A et al, 1995, Miguez J M et al, 1999]. Данные нейрохимического исследования структур мозга у старых животных контрольной группы, в целом, совпадали с описанным в литературе возрастным изменением нейромедиаторного статуса.

Введение аналога АВ-9 в дозе 50 мкг на крысу старым самцам крыс в течение 18 дней приводило к росту содержания ДА в гипоталамусе на 26,3% ($p < 0,05$) за счет снижения его обмена на 36,5% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями у старых животных контрольной группы. Аналогичная динамика наблюдалась в гиппокампе – отмечалось повышение уровня ДА на 24,0% ($p < 0,05$), также обусловленное уменьшением скорости распада медиатора (соотношение ДОФУК/ДА у животных, получавших АВ-9, было минимальным среди трех подопытных групп). Следует отметить, что многократное введение АВ-9 не привело к изменениям в серотонинергической системе гипоталамуса, гиппокампа и амигдалы старых животных.

Длительное введение вилона и его аналога АВ-9 старым самцам крыс оказало нормализующее влияние на уровень НА в гипоталамусе и привело к увеличению содержания нейромедиатора до уровня, наблюдавшегося у молодых животных контрольной группы.

Многократное введение вилона в дозе 50 мкг на крысу старым самцам не оказывало влияния на дофаминергическую систему гипоталамуса, а в гиппокампе приводило к уменьшению содержания этого нейромедиатора на 33,3% ($p < 0,01$) по сравнению со значениями у старых животных контрольной группы. Однако в амигдале только введение вилона приводило к двукратному увеличению содержания ДА за счет аналогичного (в 2 раза) снижения его обмена. Влияние длительного введения дипептида АВ-17 на уровень и обмен медиаторов в амигдале было незначительным.

Таким образом, многократное введение аналога вилона АВ-9 старым самцам крыс оказало позитивное влияние на ДА- и НА-ергические системы гипоталамуса и гиппокампа, что может иметь большое значение в создании эффективных средств для коррекции сопряженных с поражением этих медиаторных систем возрастных нарушений функций различных органов и систем.

Анализ исследования содержания и обмена нейромедиаторов в структурах мозга показал, что все исследуемые пептиды значительно (в 2 раза) снижали повышенный в результате гемигонадэктомии уровень ДА в гипоталамусе. Следует отметить, что уменьшение содержания ДА наиболее выраженное при однократном введении АВ-9 в дозе 250 мкг на крысу – (47,8%, $p < 0,001$) и при 18-кратном введении вилона в дозе 50 мкг на крысу – на 41,8% ($p < 0,001$), происходило путем увеличения его обмена. Также отмечалось значительное снижение уровня НА в гипоталамусе, обусловленное усилением его обмена. Вилон, единственный из всех исследованных дипептидов, приводил к 20,0% ($p < 0,05$) снижению концентрации СТ в гипоталамусе ГГЭ самцов. Согласно литературным данным, именно высокое содержание СТ в преоптической области гипоталамуса приводит к усилению секреции пролактина [Paris M et al , 1987, Markiano M et al , 2002], который при высокой концентрации подавляет центральный дофаминергический контроль ПП [Buvat J et al , 1985].

ВЫВОДЫ

- 1 Вилон и его аналоги АВ-9 и АВ-17 влияют на адаптивное поведение самцов крыс, способствуя выбору оптимальной адаптивной стратегии в зависимости от возраста и эндокринного статуса Вилон и его аналог АВ-9 стимулируют ориентировочно-исследовательскую активность молодых самцов крыс в тесте "открытое поле"
- 2 Вилон и АВ-17 активизируют исходно пониженную локомоторную активность у самцов крыс с индуцированным нарушением половой функции У старых животных исследованные дипептиды снижают двигательную активность, способствуя выбору наиболее экономичной адаптивной стратегии поведения
- 3 Введение вилона и его аналогов АВ-9 и АВ-17 самцам крыс приводит к активизации половой функции У молодых самцов в условиях сезонного снижения половой активности исследуемые дипептиды стимулируют копуляторный и эякуляторный компоненты полового поведения
- 4 У старых самцов крыс АВ-9 при однократном введении активизирует копуляторное поведение, многократное введение вилона и его аналога АВ-9 модулирует временные характеристики полового поведения У гемигонадэктомированных самцов крыс однократное введение АВ-9, а также многократное введение вилона и его аналога АВ-17 нормализуют эякуляторный компонент половой функции
- 5 Вилон и его аналоги АВ-9 и АВ-17 оказывают влияние на эндокринный статус гемигонадэктомированных самцов крыс, повышая содержание ЛГ и АКГГ в сыворотке крови Многократное введение вилона приводит к снижению уровня пролактина
- 6 Вилон и его аналоги АВ-9 и АВ-17 оказывают влияние на содержание и обмен медиаторов в гипоталамусе, гиппокампе и амигдале самцов крыс У молодых животных в гипоталамусе происходит активизация дофаминергической системы
- 7 У гемигонадэктомированных самцов крыс после однократного введения дипептидов наблюдается нормализация повышенного содержания дофамина в гипоталамусе
- 8 У старых животных АВ-9 при многократном введении увеличивает содержание дофамина и норадреналина в гипоталамусе и дофамина – в гиппокампе

Автор выражает глубокую благодарность руководителю отдела нейрофармакологии ГУ НИИЭМ, члену-корреспонденту РАМН, доктору медицинских наук, профессору, Н С Сапронову за предоставление базы для проведения исследований, доктору медицинских наук, профессору Г А Рыжак за помощь в разработке протокола исследования, кандидату медицинских наук А А Байрамову, кандидату медицинских наук О М Ефремову, кандидату биологических наук И Н Зайченко, кандидату химических наук Е И Григорьеву за методическую помощь в проведении экспериментов

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Байрамов А А Нейрохимические аспекты холинергической модуляции полового поведения при иммобилизационном стрессе / А А Байрамов, Т А Кудрявцева, О В Торкунова // Психофармакология и биологическая наркология – 2006 – Т 6. – Вып 1-2 – С 1183-1190
- 2 Влияние вилона на адаптивное поведение самцов крыс / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, А Б Селезнев, Е И Григорьев, Г А Рыжак // II Российский симпозиум по химии и биологии пептидов Тез докл – СПб, 2005 – С 76
- 3 Влияние вилона на половое поведение молодых и старых самцов крыс / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, Е И Григорьев, Г А Рыжак // II Всероссийская научно-практическая конференция "Общество, государство и медицина для пожилых и инвалидов" Тез докл – М, 2005 – С 60-61
- 4 Возможности коррекции возрастных изменений мужской репродуктивной системы короткими пептидами / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, О М Ефремов, А А Байрамов, Г А Рыжак, Е И Григорьев // II Научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием "Пушковские чтения" Тез докл – СПб, 2006 – С 176-177
- 5 Действие вилона на изменение эндокринного статуса и полового поведения самцов крыс при старении / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, Е И Григорьев, Г А Рыжак // I Научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием "Пушковские чтения" Тез докл – СПб, 2005 – С 148-149
- 6 Действие вилона на нейроэндокринный статус и половое поведение старых самцов крыс / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, О М Ефремов, А А Байрамов, Г А Рыжак, Е И Григорьев // Успехи геронтологии – 2006 – Вып 19 – С 97-101

- 7 Действие коротких пептидов на половое поведение и эндокринный статус самцов крыс разного возраста / Т А Кудрявцева, А А Байрамов, О М Ефремов, И Н Зайченко, Г А Рыжак, Е И Григорьев // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции "Общество, государство и медицина для пожилых" – Москва, 2007 – С 57
- 8 Изучение действия вилона на половое поведение молодых и старых крыс / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, О М Ефремов, А А Байрамов, Г А Рыжак, Е И Григорьев // Материалы научно-практической конференции "Актуальные вопросы внутренних болезней" – СПб , 2006 – С 16-17
- 9 Изучение действия вилона на репродуктивную функцию молодых и старых крыс / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, О М Ефремов, А А Байрамов, Г А Рыжак, Е И Григорьев // III Всероссийская научно-практическая конференция "Общество, государство и медицина для пожилых и инвалидов" Тез докл – М , 2006 – С 57
- 10 Коррекция возрастных нарушений репродуктивной системы крыс короткими пептидами / Т А Кудрявцева, И.Н Зайченко, О М Ефремов, А А Байрамов, Г А Рыжак, Е И Григорьев // II Международный конгресс "Социальная адаптация, поддержка и здоровье пожилых людей в современном мире" Тез докл – СПб , 2007 – С 70
- 11 Молекулярные механизмы старения репродуктивной системы / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, О М Ефремов, А А Байрамов, Г А Рыжак, Е И Григорьев // VII Международный симпозиум "Биологические механизмы старения" Тез докл – Харьков (Украина), 2006 – С 15
- 12 Сравнительные аспекты влияния синтетического пептида тимуса на адаптивное поведение молодых и старых крыс / Т А Кудрявцева, И Н Зайченко, А Б Селезнев, Е И Григорьев, Г А Рыжак // Клиническая геронтология – 2005 – С 126
- 13 Пептидное соединение, стимулирующее функцию половой системы / В Х Хавинсон, Е И Григорьев, Т А Кудрявцева, Г А Рыжак Заявка на патент № 2006133214/04 от 07 09 2006 г
- 14 Effects of immobilized stress on sexual behavior of male rats exposed prenatally to cholnolitics / А А Bairamov, О М Efremov, Т А Kudriavtseva, N A Losev, N S Saponov // Abstr ISPNE 4 regional Congress "Stress and psychoendocrine changes the life" – Vilnius (Lithuania), 2006 – P 38-39

Кудрявцева Т.А. Влияние дипептидов на адаптивное и половое поведение самцов крыс разного возраста // Автореф дисс канд биол наук
14 00 53 – СПб , 2007 – 22 с

Подписано в печать 10 05 07
Формат 60x84 ¹/₁₆ Объем 1,0 усл п л
Тираж 100 экз Заказ № 354-07 Бесплатно

Отпечатано с готового оригинал-макета
Типография ООО "Петроград",
Санкт-Петербург, Невский пр 142/1