

A 03.00.04
H-194

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ
ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Հ. ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆԻ ԱՆՎԱՆ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՆԱԶԱՐՅԱՆ ՆԱՐԻՆԵ ՍԱՄՎԵԼԻ

ԳԼԽՈՒՂԵՂԻ ԿԵՂԵՎԱԼԻՄՔԻԱԿԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐԻ,
ԱՐՅԱՆ ԵՎ ՈՍԿՐԱԾՈՒԾԻ ԵՆԹԱԲՋՋԱՅԻՆ ՆԻՏՐԵՐԳԻԿ
ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ԽՐՈՆԻԿԱԿԱՆ ՍԹՐԵՍ-ԻՆԴՈՒԿՑՎԱԾ
ԴԵՊՐԵՍԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.04 – “Կենսաքիմիա” մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման աստենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Դ

ԵՐԵՎԱՆ – 2011

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ Г. БУНЯТЯНА

НАЗАРЯН НАРИНЕ САМВЕЛОВНА

СУБКЛЕТОЧНЫЕ НИТРЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОТДЕЛОВ
КОРТИКОЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА, КРОВИ
И КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ХРОНИЧЕСКИМ
СТРЕССОМ ДЕПРЕССИИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – “Биохимия”

ԵՐԵՎԱՆ – 2011


Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ.Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում

Գիտական ղեկավար՝ կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Գ. Ա. Գևորգյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենսաբանական գիտությունների դոկտոր Տ. Կ. Դավթյան
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր Ն. Հ. Բարխուդարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի Մ. Հեթանոս անվան պետական բժշկական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2011 թ. դեկտեմբերի 28-ին, ժամը 14⁰⁰ -ին ՀՀ ԳԱԱ Հ.Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտում գործող 042 մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Պ. Սևակի 5/1):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Հ. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտի գրադարանում և <http://aab.sei.am> կայքում:
Սեղմագիրն առաքվել է 2011 թ. նոյեմբերի 26-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար կենս. գիտությունների թեկնածու, դոցենտ  Հ. Լ. Հայրապետյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии имени Г. Бунятыяна НАН РА

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Г. А. Геворгян

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, Т. К. Давтян
доктор биологических наук Н. А. Бархударян

Ведущая организация: Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци

Защита диссертации состоится 28-го декабря 2011 г. в 14⁰⁰ ч. на заседании специализированного совета 042, действующего в Институте биохимии имени Г. Бунятыяна НАН РА (0014, Ереван, ул. П.Севака 5/1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии и на сайте <http://aab.sei.am>.

Автореферат разослан 26-го ноября 2011 г.

Ученый секретарь специализированного совета, кандидат биологических наук, доцент



Ք. Լ. Այրապետյան

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Согласно статистическим данным ВОЗ к наиболее распространенным психическим заболеваниям относятся депрессия и патологическая тревога, от которых страдает до 25% всего населения мира (Moussavi S. et al., 2007). Хронический стресс (ХС) вызывает значительные нейрохимические, морфологические и функциональные изменения в головном мозге, способствуя развитию депрессии и тревожных расстройств (Jankord R., Nerman J.P., 2008). Множество данных свидетельствует о признаках митохондриальной дисфункции при психических заболеваниях, а также нарушениях психики при “митохондриальных болезнях”, связанных с нарушениями клеточного энергообмена, причем снижение активности различных компонентов дыхательной цепи наблюдается не только в структурах мозга, но и в тромбоцитах и лейкоцитах больных с психическими расстройствами (Сухоруков В.С., 2008; Rezin G.T. et al., 2009). Универсальный биомедиатор оксид азота (NO) является одним из важнейших полифункциональных регуляторов процессов, протекающих в митохондриях (Bolaños J.P., Heales S.J. R., 2010; Guilivi C., 2007). Эндогенная система генерации NO из L-аргинина участвует в патогенезе стресс-индуцированных болезней, включая депрессию (Esh T. et al., 2002; Hoekstra R. et al., 2006). В периферической крови пациентов с большой депрессией выявляются биомаркеры воспаления, включая провоспалительные цитокины, на продукцию которых влияет система NOS/NO, а цитокины, проникая в мозг воздействуют в частности на продукцию NO, посредством чего взаимодействуют практически со всеми вовлеченными в депрессию патофизиологическими участками, в их числе метаболизм нейротрансмиттеров, нейроэндокринные функции и нейрональная пластичность (Licinio J. et al., 1999; Miller A.H. et al., 2009). В плазме пациентов с биполярными аффективными расстройствами повышен уровень нитритов (Yanik M. et al., 2004). При этом антидепрессантное действие хронической обработки литием сопровождается снижением содержания NO и его активных метаболитов в плазме крови (Ghasemi M. et al., 2009). Исследуются возможности использования ингибиторов NO синтазы (NOS) в качестве анксиолитиков и антидепрессантов (Wegener G., Volke V., 2010).

В органах и тканях млекопитающих и человека функционируют основные изоформы NOS: кальций-кальмодулинзависимые конститутивные (сNOS), включая нейрональную (nNOS), участвующую в механизмах нейротрансмиссии и разных сигнальных путях, и эндотелиальную (eNOS), регулирующую сосудистый тон, кровоток и тканевую перфузию, а также и кальций-кальмодулиннезависимая индуцибельная (iNOS), эффекторная молекула врожденной иммунной системы (Alderton W.K. et al., 2001). Недавно открыта митохондриальная NOS, которая в основном представлена сNOS, она участвует в обратимом ингибировании цитохром оксидазы, функционально связана с комплексом I митохондриальной дыхательной

цепи, при инактивировании которого оказывает прооксидантное действие (Lasza Z. et al., 2001; Parihar M.S., et al., 2008).

Тем не менее практически не изучен вклад изоформ NOS в процессы продукции NO внутри клеточных компартментов, а также их связь с субклеточным содержанием субстрата L-аргинина, который наряду с NO, оказывает регулирующее влияние на энергообмен, мембранную проницаемость митохондрий, выход из них кальция в цитозоль - совокупность процессов, участвующих в синаптической пластичности, влияющих на выброс и обратный захват нейротрансмиттеров, которые нарушаются при ХС, вызывая развитие депрессии (Mattson M.P., 2007; Rezin G.T. et al., 2009; Valdez L.B., Boveris A., 2007). Исходя из вышеизложенного, изучение внутриклеточных механизмов, с вовлечением функционально и фармакологически различающихся изоформ NOS и поиск возможностей избирательного воздействия на них является весьма актуальным и может служить одним из подходов к решению проблемы депрессивных расстройств.

Около 30% пациентов с депрессией не испытывают улучшений и после многих вариантов лечения (Rush A.J., 2007). Литий содержится в препаратах с антидепрессантами и антипсихотиками для комбинированной терапии резистентных форм депрессии, и снижает случаи суицида при большой депрессии, биполярных расстройствах и шизофрении (Beaulieu J.-M. et al., 2008; Cipriani A. et al., 2005). Терапевтические, а также токсические эффекты лития опосредуются с вовлечением сигнального пути - глутаматные NMDA рецепторы/NO (Ghasemi M. et al., 2011). В то же время связь между глутаматом, ГАМК и L-аргинином и его метаболитами прослеживается во многих отделах мозга, и глутамат-ГАМКергическая "цепочка контролируется нитрергической системой, которая относится к факторам, вовлеченным в патофизиологию депрессии и действие антидепрессантов (Barbosa L. et al., 2008). Однако хроническое лечение литием депрессии, биполярных расстройств может вызывать интоксикацию, сопровождающуюся персеитирующими ступором, тремором, лихорадкой и олигурией (Ghasemi M. et al., 2011; Guiliani E. et al., 2010). Для предотвращения подобных негативных последствий в целях снижения дозы и повышения эффективности лечения создаются комплексные препараты, к ним относится литиевая соль ГАМК, влияние которой на нитрергическую систему при депрессии представляет биомедицинский интерес.

Цель и задачи исследования. Цель работы изучение субклеточных нитрергических механизмов в отделах кортиколимбической системы головного мозга, крови и костном мозге при индуцированной ХС депрессии, и их фармакокоррекция. Для осуществления вышеуказанной цели были поставлены следующие задачи:

- Исследовать поведенческую активность крыс на модели многофакторного хронического стресса с развитием депрессивноподобного поведения, имитирующего клиническую депрессию;

- В системе мозг-кровь-костный мозг: в отделах кортиколимбической системы головного мозга, префронтальной коре, полосатом теле (стриатуме), гиппокампе и гипоталамусе, а также в тромбоцитах и иммунокомпетентных клетках крови и костном мозге, используя модель индуцированной ХС депрессии, изучить субклеточные сдвиги в метаболическом профиле L-аргинина на основе определения в митохондриальном и цитозольном компартментах
- содержания субстрата NO синтазы, L-аргинина;
- содержания продуктов NO синтазы, NO и его стабильных метаболитов, или активных форм азота и L-цитруллина;
- общей активности кальций-кальмодулинзависимых конститутивных форм NO синтазы (cNOS);
- активности кальций-кальмодулиннезависимой индуцибельной формы NO синтазы (iNOS);
- Изучить влияние литиевой соли ГАМК на исследуемый биохимический паттерн в системе мозг-кровь-костный мозг.

Научная новизна работы. Впервые на ранее разработанной модели многофакторного хронического стресса исследован ряд поведенческих параметров, подтвердивших развитие депрессивноподобного поведения крыс с симптоматикой, подобной клинической депрессии. На основе данной модели изучена активность нитрергической системы в митохондриях и цитозоле клеток в системе головной мозг - кровь - костный мозг. При этом обнаружено, что в отделах кортиколимбической системы мозга хронический стресс вызывает разнонаправленные изменения активности функционально и фармакологически различных форм NO синтазы: устойчивое подавление конститутивных изоформ в цитозоле и активирование iNOS в митохондриях. При индуцированной хроническим стрессом депрессии обнаружено устойчивое возрастание уровня L-аргинина в цитозоле и митохондриях регионов мозга, которое положительно коррелирует с содержанием в них NO и его метаболитов, а также L-цитруллина, сопродукта NO синтазной реакции. Выяснено, что длительная продукция активных форм азота в митохондриях исследуемых регионов мозга обеспечивается исключительно iNOS, и может быть одной из причин нарушения нейрональной пластичности, которая регулируется митохондриями, а также развития нейровоспаления и депрессии. Изучение субклеточного нитрергического ответа в периферической крови и костного мозга показало активирование митохондриальной iNOS в тромбоцитах и иммунокомпетентных клетках крови с одновременным устойчивым подавлением cNOS в цитозоле последних. Обнаружено, что при индуцированной хроническим стрессом депрессии ингибируется активность митохондриальной iNOS в костном мозге. Впервые показано, что обработка субэффективной дозой (в отношении поведенческих эффектов) литиевой соли ГАМК препятствует возрастанию уровня L-аргинина и активированию iNOS в отделах кортиколимбической системы мозга, восстанавливает активность cNOS в цитозоле гипоталамуса и

иммунокомпетентных клеток крови и iNOS в митохондриях костного мозга.

Научно-практическое значение работы. Протестирована новая модель многофакторного хронического стресса, индуцирующего у крыс депрессивноподобное поведение, имитирующее клиническую депрессию. Изучены патогенетические механизмы депрессивных расстройств и показано, что в отделах кортиколимбической системы головного мозга, а также в клетках периферической крови и костном мозге они связаны с нарушениями субклеточного нитрергического ответа, приводящими к митохондриальной дисфункции, нарушениям сигнальной трансдукции в ЦНС и на периферии и отклонениями в поведении. Полученные данные указывают на необходимость исследования в клинике субклеточного паттерна активности изоформ NO синтазы и содержания активных форм азота, L-цитруллина и L-аргинина в тромбоцитах и ИКК крови для мониторинга и ведения больных с депрессивными расстройствами. На основе полученных данных, представляется перспективным исследование эффектов низких доз литиевой соли ГАМК для использования в адьювантной антидепрессантной терапии.

Целесообразно включение вышеизложенной информации в лекционный материал для студентов и аспирантов биологических факультетов, сельскохозяйственной академии, медицинских учебных заведений, курсов усовершенствования врачей.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на NHLBI Mitochondrial Biology Symposium 2011: Advances in Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial-Cytosolic Communications. National Institutes of Health (NIH), Natcher Conference Center, Bethesda, Maryland, May 16-17, 2011, Young scientists' session (FEBS/AAB) 50th Anniversary of the H.Buniatian Institute of Biochemistry NAS RA, Yerevan, Armenia, October 5-8, 2011, IV International Meeting (FEBS/CNRS, AAB, Pede France) "Early Events in Human Pathologies" Yerevan, Armenia, October 12-16, 2011, расширенном заседании ученого совета института биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА (Ереван, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 125 страницах компьютерного набора содержит 8 таблиц и 21 рисунок. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 279 наименований.

Место выполнения работы. Все эксперименты проводились в институте биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали реактивы производства "Sigma Chemical Co" (США): аминоксидин, L-аргинин-HCl, L-валин, ГАМК, дитиотреитол, HEPES, NADPH, FAD, FMN, (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, сульфаниловая кислота, а также N^G-монометил-L-аргинин (NMMA)

("Calbiochem", США), ЭДТА, декстран ("Serva", Германия).

Опыты осуществлялись с соблюдением правил содержания и обращения с животными, изложенных в Директивах Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА. Эксперименты проводили на 2-хмесячных нелинейных белых крысах-самцах массой 100-140 г, которые содержались в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа воды и пищи. Животные были разделены на группы (по 18 животных в группе): контрольная группа - здоровые крысы и три опытные группы: в первой - крысы, подвергнутые воздействию стрессирующих факторов, были декапитированы сразу после 14-дневного ХС; в остальных двух группах крыс декапитировали одновременно через 4 дня после ХС, при этом за 2 дня до декапитации в одной из групп животные получали однократную внутривенную инъекцию (0,3 мл) литиевой соли ГАМК в дозе 0,9 мг/кг, а параллельная группа необработанных стрессированных крыс служила "контролем" для оценки влияния препарата.

Хронический стресс. Ежедневно в течение 14 дней животных подвергали воздействию стрессирующих факторов: 1 день - принудительное плавание (20 мин при 28°C); 2 день - иммобилизационный стресс (2 ч); 3 день - вдыхание паров эфира и холодовой стресс (4 ч при 4°C); 4 день - принудительное плавание (20 мин при 24°C) и иммобилизационный стресс (2 ч); 5 день - холодовой стресс (4 ч при 4°C) и вдыхание паров эфира; 6 день - иммобилизационный стресс (4 ч); 7 день - принудительное плавание (20 мин при 28°C) и холодовой стресс (3 ч при 4°C); 8 день - вдыхание паров эфира; 9 день - иммобилизационный стресс (4 ч) и вдыхание паров эфира; 10 день - холодовой стресс (5 ч при 4°C); 11 день - принудительное плавание (20 мин при 24°C) и вдыхание паров эфира; 12 день - лишение пищи (24 ч) и ортостатический шок (20 мин); 13 день - вдыхание паров эфира и холодовой стресс (5 ч при 4°C); 14 день - иммобилизационный стресс (5 ч).

Поведенческая активность. Определялась в тестах "открытое поле" (ОП) и "приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) (Буреш Я. И др., 1990; Augustsson H., Meyerson B., 2004).

Забор биологического материала. После тестирования на поведенческую активность, крыс декапитировали, обескровливали, извлекали головной мозг и трупчатые кости.

Выделение митохондриальной и цитозольной фракций структур мозга. Животных декапитировали, на льду из головного мозга извлекали ПФК, стриатум, гиппокамп и гипоталамус, и объединенный биоматериал, полученный от шести крыс, гомогенизировали в 10ти кратном объеме 20 mM HEPES буфера, содержащего 0,25 M сахарозу, pH 7,4. Гомогенат центрифугировали на центрифуге К-24 (Германия) при 3000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции, и из полученной надосадочной жидкости последующим центрифугированием при 15000 об/мин 20 мин

при 4°C получали в супернатанте цитозольную фракцию и в осадке - митохондриальную, обогащенную нейронами и глией (Bustamante J. et al., 2007).

Выделение митохондриальной и цитозольной фракций тромбоцитов и иммунокомпетентных клеток (ИКК) крови и костного мозга (КМ). Кровь стабилизировали антикоагулянтом, 5% цитратом натрия (в соотношении 5:1 по объему), смешивали с приготовленным на 0,9 % NaCl 6% декстраном (мол. вес=70000) в соотношении 2:1 по объему, инкубировали 1 ч при 37°C для седиментации эритроцитов, после чего декантировали верхний слой, содержащий ИКК и тромбоциты, который центрифугировали при 1500 об/мин 5 мин при 4°C, получая в осадке ИКК, а в супернатанте обогащенную тромбоцитами плазму. Супернатант центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин при 4°C и осаждали тромбоциты. ИКК и тромбоциты промывали и разводили в 20 мМ HEPES буфере, pH 7.4, содержащем 0,25 М сахарозу. Ядра лейкоцитов осаждали центрифугированием ИКК при 12000 об/мин 10 мин, а ядра тромбоцитов - при 800 об/мин 10 мин, после чего надосадочные жидкости центрифугировали при 11000 об/мин 20 мин и получали цитозольную фракцию ИКК и тромбоцитов в супернатанте и митохондриальную - в осадке.

КМ выделяли из трубчатых костей (бедренной, большой берцовой), гомогенизировали в вышеуказанном буфере и из гомогената осаждали ядра КМ центрифугированием при 800 об/мин 10 мин, полученную надосадочную жидкость центрифугировали при 8500 об/мин 20 мин при 4°C с получением цитозольной фракции КМ в супернатанте и митохондриальной - в осадке.

Определение содержания NO и его стабильных метаболитов. В пробах перед определением осаждали белки, с добавлением 0,5 N NaOH и 10% ZnSO₄ (в пропорции 1:1:1 по объему) и последующим центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин. В супернатантах депротеинизированных проб определяли содержание активных форм азота (АФА), которое выражали в нмоль (NO₂) · мг⁻¹ белка.

Активность NOS определяли по аккумуляции NO и его стабильных метаболитов (окислы азота (NO₂, NO₃, N₂O₄, N₂O₃), нитрозотиолы и т.д.) после долговременной инкубации проб (24 ч, 37° С) в 20 мМ HEPES буфере pH 7,4, содержащем 2 мМ дитиотреитол, 3 мМ MgCl₂·6H₂O в присутствии 5,3 мМ L-аргинина, 0,2 мМ NADPH, 20 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидрибиоптерина, 6 мкМ FAD и 5,5 мкМ FMN. Общую активность NOS определяли при инкубации проб в присутствии 1,7 мМ CaCl₂, активность iNOS - в присутствии 5 мМ ЭДТА (без CaCl₂ в инкубационной среде); активность cNOS вычислялась по разности между общей активностью NOS и активностью iNOS. В параллельных контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 5 мМ N(омега)-мометил-L-аргинина, конкурентного неселективного природного ингибитора NOS. Активность NOS выражали в нмоль (NO₂) · мг⁻¹ белка · 24 ч⁻¹.

Определение содержания L-аргинина осуществляли

модифицированным методом Akamatsy и Watanabe (Akamatsy S., Watanabe T.J., 1961). Супернатанты депротеинизированных проб смешивали с рабочим раствором (смесь растворов: 0,02% 8-оксихинолина в 96%-ном этиловом спирте с 2,5% сульфосалицилата натрия в 0,01 М растворе глицина и 2,5% NaOH, 1:1:1 по объему) и 1% гипобромитом натрия в соотношении 3:1:0.2 по объему и оценивали содержание L-аргинина спектрофотометрически при длине волны 525 нм.

Определение содержания L-цитруллина осуществляли модифицированным методом Moore и Kauffman (Moore R.B., Kauffman, 1970). Супернатанты депротеинизированных проб (осаждение белков осуществляли 10% трихлоруксусной кислотой) в соотношении 1:2 смешивали с рабочим раствором (смесь растворов в пропорции 1:1 по объему: 9,6% H₂SO₄ и реактива (5мМ диацетилмоноксим, 0,9 мМ тиосемикарбазид и 0,025 мМ FeCl₃) нагревали 10 мин в кипящей водяной бане, охлаждали и содержание в них L-цитруллина определяли спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта (Lowry O.H. et al., 1951).

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Specol 211(Германия).

Статистика. Достоверность различий оценивали с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и последующим постдисперсионным анализом Холм-Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5 for Windows. Анализ корреляций проводили на основе расчета коэффициента линейной корреляции Пирсона (r). В качестве критерия достоверности принимали $p < 0.05$.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Исследование поведенческой активности крыс в модели многофакторного хронического стресса

Предварительным тестированием в открытом поле (ОП) и приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) были сформированы опытные группы животных со сходными типологическими характеристиками ориентировочно-исследовательской активности и эмоционального состояния, со "средним" типом поведения (Чумаков В.Н. и др., 2005). Локомоторная активность оценивалась по горизонтальной двигательной активности, ориентировочно-исследовательская и уровень тревожности по вертикальной активности, совокупности показателей груминга (туалетное поведение), количества дефекаций, выходов в открытые рукава, числа свешиваний с открытых рукавов, а также коэффициента риска, который определялся как сумма выходов в открытые рукава и числа свешиваний с открытых рукавов.

Таблица 1. Показатели поведенческой активности крыс в тесте "Открытое поле" при индуцированной хроническим стрессом депрессии.

Группы	Горизонтальная активность (число пересеченных секторов)	Вертикальная активность (число стоек)	Груминг (акты умывания)	Дефекации (число болюсов)
Контроль	16.6 ± 2.8	6.8 ± 0.8	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.5
I. Хронический стресс (14 дней)	1.3 ± 0.4***	1.2 ± 0.3***	1.0 ± 0.2***	2.3 ± 0.4***
II. Постстрессорный период (4 дня)	6.1 ± 1.6*** <i>p</i> '<0.001	1.5 ± 0.4*** <i>p</i> '=0.11	1.5 ± 0.5 <i>p</i> '=0.002	2.8 ± 0.3# <i>p</i> '<0.001

Здесь и в табл. 2 данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n=18$). # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (достоверность отличий по сравнению с контролем); *p*' (достоверность отличий по сравнению с I группой стрессированных крыс).

Таблица 2. Показатели поведенческой активности крыс в приподнятом крестообразном лабиринте при индуцированной хроническим стрессом депрессии.

Группы	В Вертикальная активность (число стоек)	Груминг (акты умывания)	Выходы в открытые рукава	Число оценок "риска"	Выходы во все рукава	Дефекации (число болюсов)
Контроль	6.3 ± 0.5	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.8	4.9 ± 0.7	2.9 ± 0.5	1.5 ± 0.4
I. Хронический стресс (14 дней)	2.3 ± 0.4***	3.3 ± 0.3***	0.2 ± 0.1***	0.5 ± 0.2***	1.0 ± 0.2***	0.3 ± 0.1***
II. Постстрессорный период (4 дня)	2.1 ± 0.2*** <i>p</i> '=0.13	0.25 ± 0.05*** <i>p</i> '<0.001	0.25 ± 0.1*** <i>p</i> '=0.75	0.75 ± 0.3*** <i>p</i> '=0.11	1.2 ± 0.5*** <i>p</i> '=0.16	1.1 ± 0.3*** <i>p</i> '<0.001

Непосредственно после ХС и через 4 дня постстрессорного периода по данным тестирования в ОП и ПКЛ у подопытных крыс по всем показателям наблюдаются моторная и эмоционально-поведенческая заторможенность (табл. 1 и 2). Показатели груминга в тесте ПКЛ на фоне снижения активности вначале возрастают в 1.7 раза, за счет увеличения числа abortированных (прерывающихся на начальных стадиях) реакций, свидетельствуя о повышении уровня тревожности, спустя 4 дня и оно снижается - в 7.6 раза по сравнению с контролем, при этом коэффициент риска снижается почти на порядок. У стрессированных крыс наблюдалась реакция замиранья, видоспецифичное проявление пассивно-оборонительной реакции страха. Сниженная локомоторная активность подобна психомоторной заторможенности человека, падение показателей груминга и стоек указывает на "стойкую потерю интереса", характерные для

симптоматики депрессии, а увеличение тревожности животных имитирует клиническое проявление тревожных расстройств.

3.2. Субклеточные сдвиги содержания L-аргинина и его метаболитов в регионах головного мозга крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК

ХС вызывает изменения в метаболическом профиле L-аргинина в префронтальной коре (ПФК).

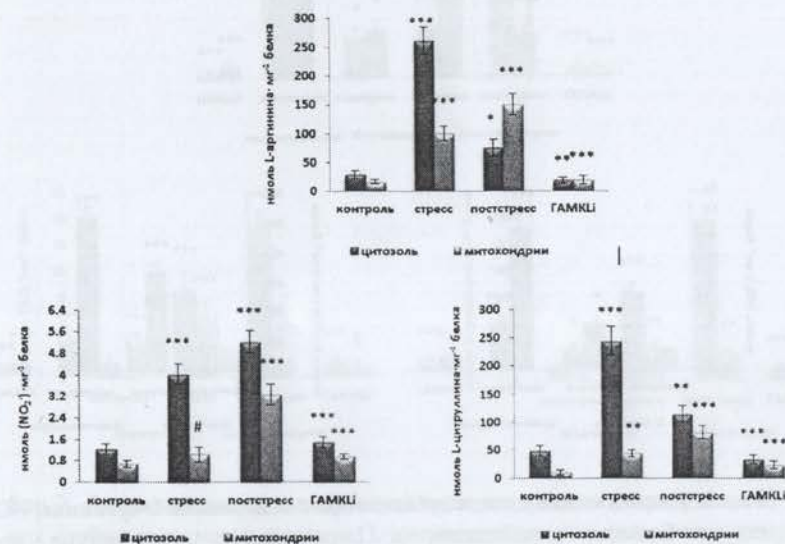


Рис. 1. Динамические сдвиги субклеточного содержания L-аргинина, NO и его стабильных метаболитов и L-цитруллина в ПФК крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность (*p*) параметров, определялась у необработанных крыс по сравнению с контролем, а у крыс, обработанных литиевой солью ГАМК, по сравнению данными, полученными одновременно в отношении необработанных стрессированных животных. Здесь и далее достоверность на графиках представлена следующими обозначениями: # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Сразу после ХС, в ПФК стрессированных животных уровень аргинина возрастает в цитозоле и митохондриях и через 4 дня после ХС, в постстрессорный период (*псп*) содержание аргинина в митохондриях ПФК примерно в 9 раз выше контроля, а в цитозоле, и после снижения в 2.6 раза превосходит норму (рис. 1). Содержание АФА увеличивается и в *псп*

возрастает в 4.2-, и 4.9 раза в цитозоле и митохондриях соответственно по сравнению с контролем. После ХС, уровень цитруллина в тканях ПФК повышается в 5.1-, и 4.4 раза в цитозоле и митохондриях соответственно по сравнению с контролем, тогда как в *лсп* в цитозоле он снижается, но превышает контроль в 2.4 раза, а в митохондриях выше, чем у интактных крыс в 8.2 раза.

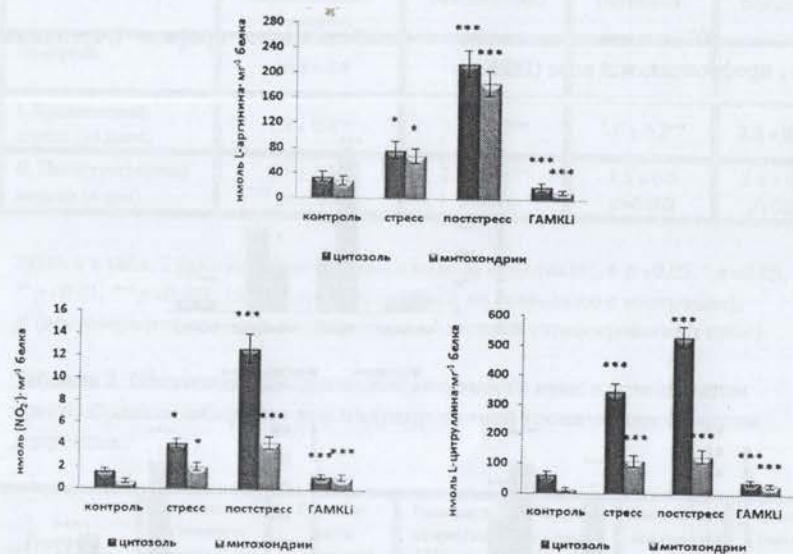


Рис. 2. Динамические сдвиги субклеточного содержания L-аргинина, NO и его стабильных метаболитов и L-цитруллина в стриатуме крыс индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

Через два дня после прекращения стрессирующих процедур, крысам однократно внутрибрюшинно вводили препарат литиевой соли ГАМК в дозе 0.9 мг/кг, которая соответствует субэффективным (в отношении влияния на поведенческие реакции грызунов) дозам лития (1 мг/кг) (Kiyani A. et al., 2011), и почти вдвое ниже дозы ГАМК (2.6 мг/кг), оказывающей антидепрессантное воздействие на крыс, стрессированных в тесте принудительного плавания (Cuang C.Y. et al., 2011). Через 2 дня после введения препарата, то есть спустя 4 дня после ХС, содержание L-аргинина, L-цитруллина и АФА, снижается в исследуемых клеточных компартаментах до контрольных значений (рис. 1).

Как видно из рис. 2, в тканях стриатума содержание аргинина возрастает и в *лсп* в 6.1-, и 6.4 раза в цитозоле и митохондриях соответственно. Одновременно содержание АФА в 7.8-, и 6.5 раза выше нормы в цитозоле и митохондриях соответственно. Уровень цитруллина

также возрастает и в *лсп* в 8.8-, и 10.2 раза в цитозоле и митохондриях соответственно. Однократная обработка литиевой солью ГАМК снижает в исследуемых клеточных компартаментах стриатума уровень аргинина, АФА и цитруллина, нормализуя их, и эти параметры достоверно позитивно коррелируют между собой в цитозоле и митохондриях стриатума.

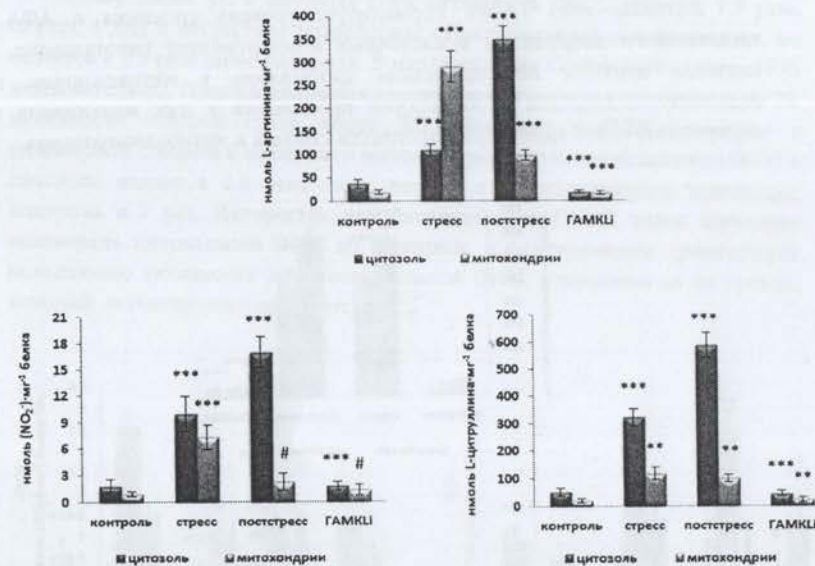


Рис. 3. Динамические сдвиги субклеточного содержания L-аргинина, NO и его стабильных метаболитов и L-цитруллина в гиппокампе крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

На рис. 3 представлены ХС-индуцированные сдвиги в тканях гиппокампа. Содержание L-аргинина повышается в 2.9-, и 15.1 раза в цитозоле и митохондриях соответственно по сравнению с контролем, а спустя 4 дня в цитозоле оно продолжает возрастать, а в митохондриях снижается, но превышает контроль в 9.3-, и 5 раз в цитозоле и митохондриях соответственно. Сразу после ХС, в тканях гиппокампа повышается уровень АФА в 5.5-, и 8.1 раза в цитозоле и митохондриях соответственно, в цитозоле в *лсп* он возрастает в 9.3-, и 2.5 раза по сравнению с контролем, тогда как в митохондриях содержание АФА в основном нормализуется. В гиппокампе в *лсп* содержание цитруллина возрастает в 11.6-, и 4.7 раза в цитозоле и митохондриях соответственно. Литиевая соль ГАМК снижает до нормы содержание аргинина АФА и цитруллина в цитозоле и митохондриях.

В гипоталамусе ХС вызывает устойчивое повышение содержания

аргинина в *псп* его уровень в 9.9-, и 11.1 раза, превосходит норму в цитозоле и митохондриях соответственно (рис. 4). Одновременно повышается содержание АФА, которое в *псп* в 11.2-, и 9.85 раза выше нормы в цитозоле и митохондриях соответственно, а также уровень цитруллина, который в в *псп* в 9.3-, и 14.7 раза превышает контроль в цитозоле и митохондриях соответственно (рис. 4).

Литиевая соль ГАМК нормализует уровень аргинина и АФА, и цитозольного цитруллина в клеточных компартаментах гипоталамуса, не оказывая влияния на содержание цитруллина в митохондриях, по-видимому, вследствие особенностей проявления в них механизмов его внутриклеточного транспорта, процессов синтеза и метаболизирования.

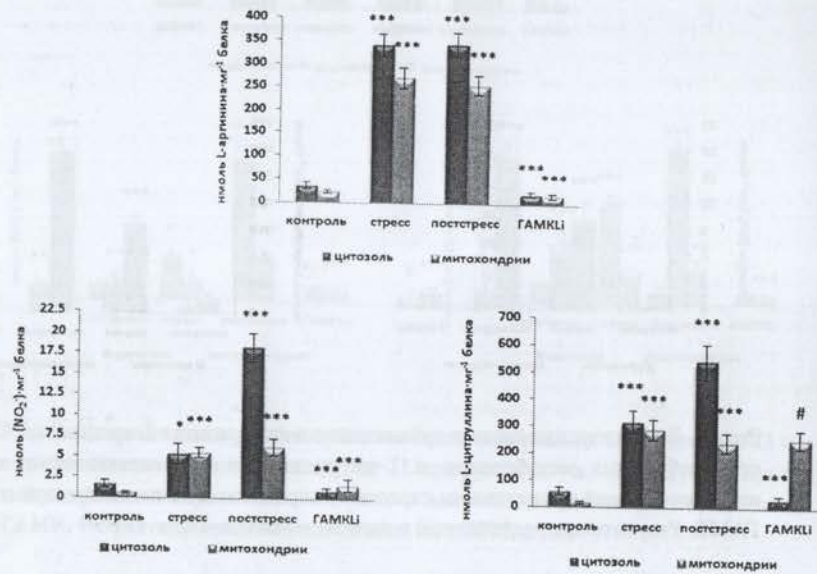


Рис. 4. Динамические сдвиги субклеточного содержания L-аргинина, NO и его стабильных метаболитов и L-цитруллина в гипоталамусе крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $p=18$.

В цитозоле и митохондриях гипоталамуса также как и в клеточных компартаментах остальных отделов мозга наблюдается высокая степень достоверной положительной корреляции между содержанием L-аргинина и АФА и L-аргинина и L-цитруллина, что подтверждает их метаболическую связь и взаимозависимость в нормальных физиологических условиях и при индуцированной ХС депрессии.

3.3. Субклеточные сдвиги активности индуцибельной и конститутивных изоформ синтазы оксида азота в регионах головного мозга при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК

Сразу после ХС в цитозоле ПФК активность cNOS падает в 9.9 раза, спустя 4 дня в отсутствие воздействия стресс-факторов она возрастает, но остается в 2.5 раза ниже контроля. В митохондриях сдвиги активности cNOS незначительны. Противоположная картина наблюдается в отношении iNOS, активность которой сразу после ХС возрастает в ПФК примерно в одинаковой степени в цитозоле и митохондриях, но в *псп* активность iNOS в цитозоле падает в 2.5 раза ниже нормы, а в митохондриях превышает контроль в 7 раз. Интересно, что литиевая соль ГАМК вдвое повышает активность цитозольной iNOS до ее нормы, и одновременно препятствует повышению активности митохондриальной iNOS, удерживая ее на уровне, который детектируется сразу после ХС.

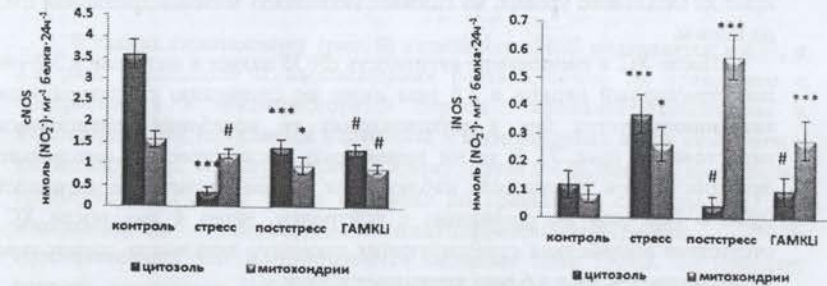


Рис. 5. Динамика изменений субклеточной активности конститутивных изоформ NOS (cNOS) и индуцибельной (iNOS) в префронтальной коре крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $p=18$.

Как видно из рис. 6, в стриатуме сразу после ХС происходит снижение активности cNOS в 2.9- раза в цитозоле по сравнению с интактными крысами; в *псп* активность cNOS в цитозоле возрастает, но остается в ниже нормы, а в митохондриях нормализуется. Сразу после ХС повышается активность iNOS в 1.8-, и 2.2 раза цитозоле и митохондриях соответственно, а в *псп* она возрастает в митохондриях в 4.6 раза по сравнению с контролем, но снижается в цитозоле в 1.5 раза ниже нормы, как это наблюдается в ПФК.

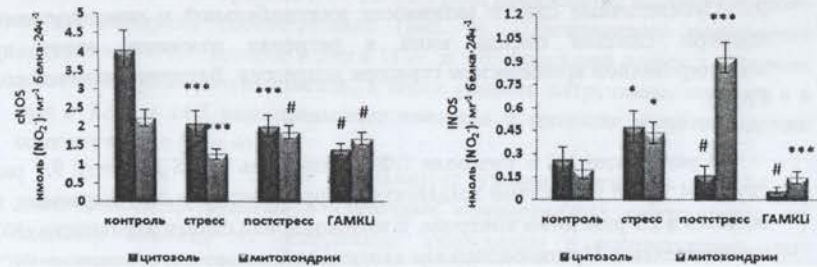


Рис. 6. Динамика изменений субклеточной активности конститутивных изоформ NOS (cNOS) и индуцибельной (iNOS) в стриатуме крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

Литиевая соль ГАМК не оказывает существенного влияния на ХС-индуцированные субклеточные сдвиги активности cNOS в стриатуме и цитозольную iNOS, которая снижается у стрессированных необработанных крыс до базального уровня, но снижает активность митохондриальной iNOS до нормы.

После ХС, в гиппокампе активность cNOS падает в цитозоле в 3.7-, и в постстрессорный период в 2.6 раза ниже по сравнению с контрольными значениями, тогда как в митохондриях ее колебания статистически недостоверны (рис. 7). В то же время сразу после стресса в цитозольной фракции клеток гиппокампа наблюдается резкое возрастание активности iNOS в 32.5 раза по сравнению с контролем, через 4 дня после ХС в отсутствие воздействия стрессирующих процедур активность цитозольной iNOS снижается, но в 4.6 раза превышает норму.

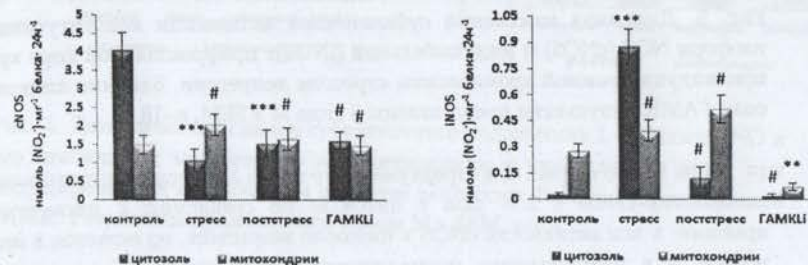


Рис. 7. Динамика изменений субклеточной активности конститутивных изоформ NOS (cNOS) и индуцибельной (iNOS) в гиппокампе крыс при индуцированной ХС депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

В митохондриях гиппокампа колебания активности iNOS проявляются в постстрессорный период. Одноразовая субэффективная доза литиевой

соли ГАМК нормализует в гиппокампе активность iNOS в цитозоле и подавляет ее в митохондриях, вызывая ее падение ниже нормы, но не оказывает воздействия на cNOS.

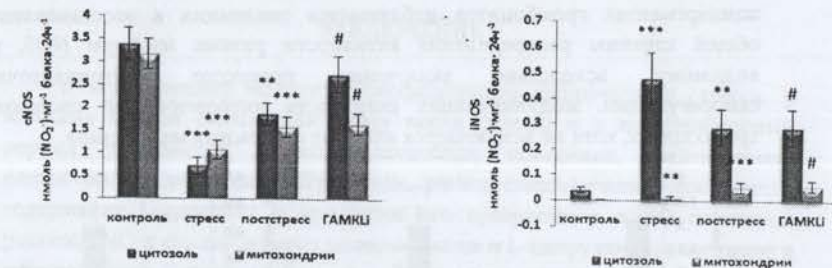


Рис. 8. Динамика изменений субклеточной активности конститутивных изоформ NOS (cNOS) и индуцибельной (iNOS) в гипоталамусе крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

В тканях гипоталамуса (рис. 8) активность cNOS подавляется в 4.7-, и 2.9 раза в цитозоле и митохондриях соответственно по сравнению с контролем, а в постстрессорный период проявляет тенденцию к восстановлению, но остается в цитозоле и митохондриях вдвое ниже, чем у интактных крыс. Одновременно ХС стимулирует iNOS, которая повышается примерно в 12-, и 7 раз в цитозоле по сравнению с контролем, а в митохондриях, вероятно, индуцируется/активируется iNOS. Примечательно, что в гипоталамусе литиевая соль ГАМК не изменяет паттерн активности iNOS и митохондриальной cNOS, но стимулирует активность cNOS в цитозоле с тенденцией к ее восстановлению, свидетельствуя о ее регуляторном влиянии.

3.4. Субклеточные сдвиги содержания L-аргинина и активности нитрергической системы в тромбоцитах и иммунокомпетентных клетках крови и костном мозге при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК

В тромбоцитах крови крыс сразу после ХС уровень аргинина возрастает и в *лсп* в цитозоле и митохондриях он вдвое выше нормы. В цитозоле концентрация АФА в *лсп* превышает контроль примерно в 1.5 раза, в то время как в митохондриях уровень АФА, возросший при ХС в 1.8 раза, в *лсп* снижается до нормы. Содержание цитрулина повышается в цитозоле тромбоцитов только в *лсп* и в 2.5 раза выше контроля, в митохондриях его отклонения от базального уровня недостоверны. Литиевая соль ГАМК нормализует уровень аргинина в митохондриях и цитозоле тромбоцитов, а также содержание АФА и цитрулина в цитозоле,

не влияя на уровень последних в митохондриях.

При ХС в тромбоцитах крови активность сNOS втрое снижается в цитозоле, не изменяясь в митохондриях, тогда как iNOS подавляется в цитозоле, заметно возрастая в митохондриях. В *псп* в клеточных компартаментах тромбоцитов наблюдается тенденция к восстановлению общей картины распределения активности разных изоформ NOS, по-видимому, вследствие включения процессов внутриклеточной саморегуляции, модулирующих активность нитрергической системы в тромбоцитах, хотя не исключается влияние системных механизмов.

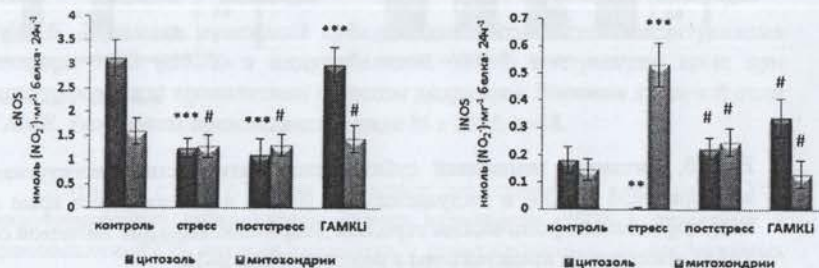


Рис. 9. Динамика изменений субклеточной активности конститутивных изоформ NOS (сNOS) и индуцибельной (iNOS) в иммунокомпетентных клетках крови крыс при индуцированной хроническим стрессом депрессии. Влияние литиевой соли ГАМК. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $p=18$.

В ИКК крови после ХС концентрация аргинина возрастает в цитозоле и митохондриях, но в *псп* нормализуется, также как и уровень АФА в их цитозоле, тогда как в *псп* в митохондриях он вдвое превышает контроль. Влияние литиевой соли ГАМК проявляется лишь в отношении цитозольного содержания АФА и цитруллина, не затрагивая их митохондриальный уровень так же, как это наблюдается в отношении тромбоцитов при изучении субклеточных эффектов препарата.

Как видно из рис. 9, при ХС в цитозоле ИКК крови наблюдается снижение активности сNOS в 2.5- и в *псп* в 2.8 раза ниже контроля, ее изменения в митохондриях ИКК незначительны и не достоверны. Активность iNOS возрастает в митохондриях в 3.6 раза и практически подавляется в цитозоле ИКК, но в *псп* эти сдвиги нивелируются. В КМ ХС не вызывает достоверных сдвигов в содержании АФА, но индуцирует возрастание аргинина и цитруллина в цитозоле и митохондриях, которое сохраняется в *псп* и их уровень нормализуется литиевой солью ГАМК. Изменения интраклеточной активности сNOS незначительны и недостоверны, а в митохондриях активность iNOS снижается в 3.6 раза спустя 4 дня после ХС.

Литиевая соль ГАМК не влияет на активность сNOS, но способствует восстановлению активности iNOS в митохондриях, причем снижает

исходное содержание АФА в цитозоле клеток КМ при их долговременной инкубации, что вновь подтверждает регуляторное влияние препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В используемой модели многофакторного хронического стресса, у молодых самцов белых крыс сразу после стресса и в постстрессорный период развивается депрессивноподобное поведение, имитирующее клиническую депрессию. При этом регион-специфически повышается содержание L-аргинина и продуктов его превращения в NO синтазной реакции, NO и его стабильных интермедиатов и L-цитруллина, в цитозоле и митохондриях префронтальной коры, стриатума, гиппокампа и гипоталамуса. Эти изменения ассоциируются с устойчивым повышением активности iNOS в митохондриях вышеуказанных отделов мозга, а также в цитозоле гиппокампа и гипоталамуса. iNOS/NO опосредует вызванное хроническим стрессом снижение общей активности сNOS, выявленное в цитозоле всех исследуемых отделов мозга, а также митохондриях гипоталамуса. Аргинин-зависимое активирование iNOS в митохондриях тромбоцитов и ИКК крови, сопровождается подавлением сNOS в цитозоле ИКК, влияя на регуляцию ГГАС и выработку цитокинов. В то же время в митохондриях костного мозга подавляется iNOS, отвечающая за антипролиферативный тон и антиоксидантную активность, что снижает резистентность клеток. Следствием изменений активности изоформ NOS в системе мозг-кровь-костный мозг является дисфункция митохондрий, нарушение нейротрансмиссии и гемодинамики, которые вовлекаются в патогенетические механизмы депрессии и тревожных расстройств. Постстрессорная одноразовая обработка литиевой солью ГАМК препятствует возрастанию уровня L-аргинина и активированию iNOS в отделах кортиколимбической системы мозга, восстанавливает активность сNOS в цитозоле гипоталамуса и ИКК крови и iNOS в митохондриях КМ, оказывая позитивный модулирующий эффект, что открывает перспективы использования препарата в адьювантной антидепрессантной терапии.

ВЫВОДЫ

Многофакторный хронический стресс индуцирует депрессивноподобное поведение крыс и в постстрессорный период

1. содержание L-аргинина, активных форм азота и L-цитруллина возрастает в цитозоле и митохондриях префронтальной коры, стриатума, гиппокампа и гипоталамуса.
2. активность iNOS возрастает в митохондриях префронтальной коры, стриатума, гиппокампа и гипоталамуса и цитозоле гиппокампа и гипоталамуса, одновременно снижаясь в цитозоле префронтальной коры и стриатума.
3. активность sNOS падает в цитозоле префронтальной коры, стриатума, гиппокампа и гипоталамуса, в митохондриях ее изменения незначительны, за исключением митохондрий гипоталамуса, в которых она снижается вдвое.
4. между активностью iNOS и содержанием L-цитруллина в митохондриях исследуемых регионов мозга наблюдается высокая степень положительной корреляции.
5. содержание L-аргинина, активных форм азота и L-цитруллина положительно коррелирует с активностью iNOS в митохондриях тромбоцитов и иммунокомпетентных клеток крови.
6. выявлено устойчивое снижение активности sNOS в цитозоле иммунокомпетентных клеток крови, после кратковременного стресс-индуцированного активирования iNOS в митохондриях.
7. активность iNOS снижается в митохондриях костного мозга с одновременным повышением содержания L-аргинина и L-цитруллина в цитозоле и митохондриях.
8. одноразовая обработка литиевой солью ГАМК препятствует устойчивому возрастанию содержания L-аргинина и iNOS-зависимому активированию нитрергического ответа в митохондриях отделов кортиколимбической системы мозга, восстанавливает активности sNOS в цитозоле гипоталамуса и иммунокомпетентных клеток крови и iNOS в митохондриях костного мозга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Н.С. Назарян, Н.О. Мовсесян, Н.Х. Алчуджян, О.А. Мовсесян, А.Г. Геворкян, Р.Л. Айрапетян, Г.А. Геворкян. Депрессивноподобное состояние и сдвиги в содержании аргинина и его метаболитов в тромбоцитах и иммунокомпетентных клетках крови крыс в циркадианной модели хронического стресса. Мед. наука Армении НАН РА, 2011, т. LI, N 1, с. 62–74.
2. Н.С. Назарян. Региональные сдвиги эндогенной продукции оксида азота в цитозоле и митохондриях тканей головного мозга крыс при депрессивноподобном состоянии, индуцированном хроническим стрессом. Мед. наука Армении НАН РА, 2011, т. LI, N 2, с. 21–33.
3. Н.С. Назарян, С.А. Казарян, Н.О. Мовсесян, Н.Х. Алчуджян, О.А. Мовсесян, Р.Л. Айрапетян, К.А. Барсегян, Г.А. Геворкян. Влияние литиевой соли ГАМК на субклеточный метаболический профиль L-аргинина в гиппокампе и гипоталамусе крыс при хроническом стрессе. Вопр. Теор. Клин. Мед. (МЗ РА) 2011, т. 14, N 5 (65), с. 62–67.
4. Nazaryan N.S., Movsesyan N.H., Alchujyan N.Kh., Movsesyan H.A., Kevorkian G.A. Balance between cytosolic and mitochondrial levels of L-arginine and its metabolites is compromised in the brain of rats at chronic stress-induced depression model. NHLBI Mitochondrial Biology Symposium 2011: Advances in Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial-Cytosolic Communications. National Institutes of Health (NIH), Natcher Conference Center, Bethesda, Maryland, May16-17, 2011, P11, p. 41.
5. N.S. Nazaryan, N.H. Movsesyan, N. Kh. Alchujyan, H.A. Movsesyan, A.G. Guevorkian, H.L. Hairapetyan, G.A. Kevorkian. Region-specific nitric oxide production in cytosolic and mitochondrial compartments of the rat brain tissues following chronic stress-induced depression-like behavior. Biopolymers & Cell, 2011, v. 27, N 5, p. 394–397.

ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

ՆԱԶԱՐՅԱՆ ՆԱԴԻՆԵ ՄԱՍՎԵԼԻ
ԳԼՆՈՒՂԵՂԻ ԿԵՂԵՎԱԼԻՄԲԻՄԿԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐԻ,
ԱՐՅԱՆ ԵՎ ՈՍԿՐԱԾՈՒԾԻ ԵՆԹԱԲՋՋԱՅԻՆ ՆՏՐԵՐԳԻԿ
ՍԵՆԱՆԻՋՍՆԵՐԸ ԽՐՈՆԻԿԱԿԱՆ ՍԹՐԵՍ-ԻՆՖԼԱՄԻԿՑԿԱԾ
ԴԵՊՐԵՍԻՎԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Հանգուցային բառեր՝ ազոտի օքսիդի սինթազ, արգինին, բջջապլազմա, գլխուղեղ, իմունակումպետենտ բջիջներ, խրոնիկական սթրես, միտոքոնդրիումներ, թրոմբոցիտներ, ընկճվածություն, ցիտրուլին

Բազմագործոն խրոնիկական սթրեսի մոդելը անշարժացման, պարտադրված լողի, եթերի գոլորշիների, սննդազրկման, օրթոստատիկ և ցրտային սթրես օգտագործմամբ կիրառվել է առնետների մոտ ընկճվածություն առաջացնելու համար: Սթրեսից անմիջապես հետո և 4 օր անց՝ ետսթրեսային շրջանում, բաց դաշտի և բարձրադիր խաչաձև լարիքիներուսի տեստերի միջոցով հետազոտվել է կենդանիների վարքային ակտիվությունը: Դիտվել է մարդու հոգեշարժական արգելակմանը համանման առնետների տեղաշարժման անկում, կանգերի և գրումինգի (լվացվելը և այլն) գործողությունների նվազեցում, որը համարժեք է մարդու մոտ կայուն "հետաքրքրության անկմանը": Գրումինգի անավարտ գործողությունների աճն ու ռիսկի գործակցի խիստ նվազեցումը, ինչպես նաև առնետների անզգայնալը հաստատում են նրանց տագնապայի վիճակը, որը նման է մարդու տագնապային խանգարումներին:

Առնետների մոտ խրոնիկական սթրես-ինդուկցված վարքային ընկճվածությունը ընդհանուր առմամբ նման է կլինիկայում դրսևորվող դեպրեսիային: Այն զուգակցվում է L-արգինինի, L-ցիտրուլինի և ազոտի օքսիդի (NO) և NO-ի կայուն ածանցյալների՝ ազոտի ակտիվ միացությունների մակարդակի աճով գլխուղեղի կեղևի նախակենտրոնական շրջանի, գոլավոր մարմնի, հիպոկամպի և հիպոթալամուսի բջջապլազմայում ու միտոքոնդրիումներում: Միաժամանակ L-արգինինի քանակի աճին զուգընթաց խթանվում է կալցիումկալմոդուլին ռչկայալ ինդուկցվող NO սինթազի իզոնի (iNOS) ակտիվությունը ուղեղի կեղևայինբիական բոլոր հատվածների միտոքոնդրիումներում, հիպոկամպի և հիպոթալամուսի բջջապլազմայում: Իր հերթին iNOS-ը մասնակցում է արգինինի մակարդակի աճին՝ արգինազի միտոքոնդրիումային և ցիտոզոլային իզոնների արգելակմամբ, քանի որ N^G-հիդրօքսի-L-արգինինը, որն առաջանում է NOS-ի ռեակցիայի ընթացքում հանդիսանում է արգինազի հզոր արգելակիչ: Խրոնիկական սթրեսի պայմաններում խթանվում է թթվածնի ակտիվ միացությունների սինթեզը, որոնք փոխազդում են NO-ի հետ՝ առաջացնելով ակտիվ օքսիդանտ պերօքսիտիտրիտ, որը ներգրավվում է հյուսվածքների օքսիդատիվ քայքայման մեջ:

Դիտվում է նաև կալցիումկալմոդուլին կախյալ կոնստիտուտիվ

cNOS-ի իզոնների ընդհանուր ակտիվության արգելակում գլխուղեղի հատվածների բջջապլազմայում, ինչպես նաև հիպոթալամուսի միտոքոնդրիումներում: Գլխուղեղի այլ հատվածներում միտոքոնդրիումային cNOS-ի փոփոխությունները աննշան են: iNOS/NO համակարգի խթանման և NO-ի գերգոյացման հետևանքով գլխուղեղի կեղևայինբիական համակարգի հատվածներում ճնշվում է cNOS-ի ակտիվությունը և խախտվում միտոքոնդրիումների ֆունկցիան, որն իրեն հերթին անդրադառնում է էներգիայի փոխանակման, նեյրոտրանսմիտերների սինթեզի, անջատման և ետկլանման, ինչպես նաև գլխուղեղի հեմոդինամիկայի վրա՝ ընդգրկվելով խրոնիկական սթրես-ինդուկցված դեպրեսիայի մեխանիզմների մեջ:

Ետսթրեսային շրջանում արյան իմունակումպետենտ բջիջների և թրոմբոցիտների միտոքոնդրիումներում պայմանավորված iNOS-ի ակտիվացմամբ աճում է L-արգինինի, L-ցիտրուլինի և ազոտի ակտիվ միացությունների պարունակությունը: Միաժամանակ իմունակումպետենտ բջիջների բջջապլազմայում արգելակում է cNOS-ի ակտիվությունը: Այդ փոփոխությունները ներգրավվում են իմունասուպրեսիայի մեխանիզմների մեջ և ազդում ենթատեսաթումբ-մակուղեղ-ադրենալային համակարգի հորմոնների և ցիտոկինների արտազատման վրա: Խրոնիկական սթրեսի ժամանակ ոսկրածուծի միտոքոնդրիումներում զգալիորեն ընկճվում է iNOS-ի ակտիվությունը: Այդ պատճառով նվազում է iNOS-ի հակաօքսիդանտային և հակապրոլիֆերատիվ ակտիվության անկմամբ պայմանավորված ոսկրածուծի բջիջների դիմադրողականությունը:

Ետսթրեսային շրջանում առնետներին միանվազ գամա-ամինակարազաթթվի լիթումային աղի ներքոլայնային ներարկումը կանխարգելում է iNOS-ի խթանումը և L-արգինինի, L-ցիտրուլինի և ազոտի ակտիվ միացությունների մակարդակի աճը կեղևայինբիական ուղեղի բջջային բաղադրամասերում: Պրեպարատի ներարկումը վերականգնում է cNOS-ի ակտիվությունը հիպոթալամուսի և իմունակումպետենտ բջիջներ բջջապլազմայում և iNOS-ի ակտիվությունը ոսկրածուծի միտոքոնդրիումների մեջ: Այսպիսով, նախադրյալներ են ստեղծվում գամա-ամինակարազաթթվի լիթումային աղը լրացուցիչ կիրառելու համար հակադեպրեսիայի հետ միասին:

Ստացված արդյունքները կարևորում են NOS-ի տարբեր ձևերի ազդեցության առանձնահատկությունները խրոնիկական սթրես-ինդուկցված դեպրեսիայի/տագնապի զարգացման մեխանիզմներում և բուժման ժամանակ:

NAZARYAN NARINE SAMVELI
SUBCELLULAR NITRERGIC MECHANISMS OF CORTICOLIMBIC BRAIN
REGIONS, BLOOD AND BONE MARROW IN CHRONIC STRESS-INDUCED
DEPRESSION

Key words: L-arginine, L-citrulline, chronic stress, depression, corticolimbic brain, immunocompetent cells, bone marrow, nitric oxide synthase, platelet

SUMMARY

In chronic unpredicted stress model variety of stressors (forced swimming, food deprivation, ether inhalation, cold, restraint, and orthostatic stress) were randomly applied to young male rats at the appropriate time points of circadian rhythm to induce a depression-like behavior for 2 weeks. Immediately after CS and four days later (post-stress period) behavioral activity of rats was assessed by testing in open field and an elevated plus-maze. Chronic stress is followed by reduced locomotor activity of rats, which mimics human psychomotor retardation, whereas decreased numbers of rearing and grooming indicate a "refractory loss of interest" in the clinical situation of depression. A risk assessment shows a drop of the risk coefficient, aborted acts of grooming and freezing are also observed and associated with the rats' anxiety mimicking human anxiety.

Depression-like behavior of rats was accompanied by subsequent elevation the L-arginine, and L-citrulline and nitric oxide (NO) and its stable metabolites, so called reactive nitrogen species amounts in cytosol and mitochondria of the prefrontal cortex, striatum, hippocampus, and hypothalamus as compared to control. High positive correlations between above mentioned parameters are determined in the brain cell compartments studied indicating an activation of L-arginine NO pathway. We have found a persistent up-regulation the calcium-calmodulin-independent inducible NO synthase isoform (iNOS) in mitochondria of all the brain regions studied and in cytosol of the hippocampus, and hypothalamus of rats subjected to chronic stress. Chronic stress-induced substantial lasting elevation of the L-arginine levels in the mitochondrial and cytosolic compartments facilitates the activation of iNOS, a high-output form strongly dependent on the presence of L-arginine, which availability may become a rate-limiting step in the iNOS activity. In turn, the first intermediate in NO biosynthesis, N^G-hydroxy-L-arginine is a potent inhibitor of arginase isoforms and cause a decrease in their activity in both mitochondria and cytosol there through elevating the L-arginine amounts. Thus, chronic stress-induced activation of the iNOS appears to be contributed to an overproduction of the reactive nitrogen species observed in the brain cell compartments. The iNOS can produce NO for prolonged periods and a deleterious effect of excessive NO in the tissues is mediated by a potent oxidant, peroxynitrite that is readily formed from superoxide and NO produced together during the stress.

Down-regulation of the calcium-calmodulin-dependent constitutive NOS isoform (cNOS) is observed in cytosol of all the brain regions studied and in mitochondria of the hypothalamus following chronic stress-induced depression-like behavior of rats. It should be noted that in the rest of brain regions the mitochondrial cNOS was not significantly changed. Elevated concentrations of the iNOS-derived NO are involved in the inhibition of the cNOS through formation the stable inhibitory nitrosyl species. A sustained increase in the iNOS activity in corticolimbic brain contributed to the cNOS inhibition and mitochondrial dysfunction leading to energy impairment, disturbances in neurotransmission, synthesis, release and reuptake of neurotransmitters and hemodynamics, involved in pathophysiological mechanisms of depression/anxiety.

Chronic stress-induced elevation of L-arginine levels, short-term stimulation of the iNOS in mitochondria of platelet and immunocompetent cells, as well as a sustained down-regulation the cytosolic cNOS in immunocompetent cells are associated with immunosuppression and changes in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and cytokines production. Diminished activity of the iNOS is observed in mitochondria of bone marrow in poststress period. Since, iNOS contributed to antiproliferative tone and antioxidant activity in marrow cells, its down-regulation is associated with a reduction of the cell resistance.

In post-stress period a single intra-peritoneal injection to rats a behaviorally subefficient dose of gamma-aminobutyric acid lithium salt prevents chronic stress-induced activation of the iNOS and an increase in the L-arginine levels and the NOS products in mitochondrial and cytosolic compartments of corticolimbic brain regions. Treatment with GABA lithium salt restores the activities of cytosolic cNOS in hypothalamus and blood immunocompetent cells and mitochondrial iNOS in bone marrow. Modulatory effects of GABA lithium salt on nitregeric response in brain-blood-bone marrow system should be further investigated and will be helpful in adjuvant therapy of depression/anxiety.

Our findings highlight an importance of differing pathological effects driven by the distinct NOS forms when assessing their roles in chronic stress-induced depression/anxiety and therapy of these disorders.

18. 02. 2008