

Влияние пренатального введения амфетамина на генерацию оксида азота в мозге крысят в первые постнатальные дни*

БАШКАТОВА В.Г.
ПАНЧЕНКО Л.Ф.
ВАНИН А.Ф.
РЕЗВАНОВА Д.А.
МОРИС Т.

д.б.н., вед.н.с. ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва
академик РАМН, проф., рук. лаборатории, ФГУ ННЦ наркологии Росздора, Москва
рук. лаборатории, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва
м.н.с., Институт химической физики РАН, Москва
профессор, лаборатория нейрональной пластичности, Университет Монпелье, Франция

Целью данного исследования было изучение роли оксида азота (NO) при пренатальном повреждении мозга, обусловленном воздействием психомоторного стимулятора амфетамина. Эксперименты были выполнены на крысятах-самцах, рожденных от самок, получавших в последнюю четверть беременности амфетамин в дозе 5 мг/кг *in utero*. Контрольную группу составили крысята, полученные от самок крыс, которым вводили в те же сроки беременности физиологический раствор. Генерацию NO в структурах мозга определяли методом электронного парамагнитного резонанса. Установлено, что уровень NO был значительно ниже в мозге крысят, получавших в пренатальный период амфетамин, чем в контрольной группе на первые и вторые постнатальные сутки. В то же время уже к четвертым постнатальным суткам содержание NO в мозге крысят экспериментальной группы не отличалось от такового у контрольных животных. Показано выраженное увеличение уровня NO в коре мозга крысят, подвергнутых воздействию пренатального стресса, вызванного введением амфетамина, по сравнению с таковым в контрольной группе наблюдалось на 30-й постнатальный день. Таким образом, в результате наших исследований впервые показано, что введение амфетамина на поздних сроках беременности, сопровождается значительным увеличением генерации NO в коре мозга крысят в течение первого месяца после рождения. Результаты нашего исследования могут открывать новые пути для разработки коррекции последствий пренатального стресса, вызванного введением психомоторных стимуляторов.

Ключевые слова: пренатальный стресс, амфетамин, оксид азота, перекисное окисление липидов, нейротоксичность

Введение

С каждым годом во всех развитых странах мира увеличивается использование психотропных веществ не по медицинским показаниям [3]. В последние годы эта проблема перестала быть только социальной и медицинской и приобрела важное политическое значение. Известно, что многие психотропные препараты могут вызывать развитие лекарственной и наркоманической зависимости [1]. Особую тревогу вызывают сообщения о стремительном росте числа женщин, употребляющих психотропные вещества различных фармакологических классов в период беременности [5]. Показано, что у детей, рожденных от таких матерей, гораздо чаще наблюдаются серьезные нарушения различных функций организма, в первую очередь со стороны центральной системы [12, 14]. У этих детей уже в раннем возрасте часто наблюдается пониженное усвоение информации, что впоследствии может привести к выраженным нарушениям развития и эмоциональным расстройствам [6, 20, 21]. Однако, несмотря на большую важность данной проблемы для здоровья будущего

поколения, имеющиеся данные о нейробиохимических и патофизиологических последствиях использования психотропных препаратов в период беременности и для матери, и особенно для ребенка недостаточны и во многом противоречивы. В последние годы было высказано предположение, что пренатальное введение психостимулятора кокаина, возможно, вызывает усиление генерации свободных радикалов, что в дальнейшем может приводить к нарушениям памяти у новорожденных крысят [22]. Действительно, показано, что введение *in utero* психомоторных стимуляторов вызывало значительные нарушения обучения у потомства [13, 19]. В ранее выполненных нами исследованиях было показано, что субхроническое введение амфетамина вызывало развитие нейротоксического эффекта и активацию свободнорадикальных процессов, в том числе усиление генерации оксида азота (NO) в ряде структур мозга крыс [2, 9]. В связи с вышеизложенным целью данной работы стало исследование влияния пренатального введения психостимулятора амфетамина на генерацию NO в коре мозга крысят в первые постнатальные дни.

* Работа поддержана грантом РФНФ 07-06-00467а

Материал и методы исследования

Эксперименты были выполнены на самках крыс линии Спрег—Доули массой 250—300 г из питомника Дэпрэ (Франция) совместно с сотрудниками лаборатории нейрональной пластичности Университета г.Монпелье (Франция). D-амфетамин (Sigma) вводили самкам крыс в дозе 5 мг/кг внутривенно (в/в) однократно на 17-, 18-, 19- и 20-й дни беременности. Самкам контрольной группы вводили физиологический раствор хлорида натрия (в/в) по схеме инъекций амфетамина. Животные, предназначенные для воспроизводства, содержались при 12-часовом («день-ночь») цикле и комнатной температуре, имели свободный доступ к воде и пище. До дня родов беременные самки содержались в индивидуальных клетках. День рождения крысят обозначался как 0pd (постнатальный день 0). В каждом помете оставляли не более 10 детенышей. В работе использовали только детенышей-самцов, рожденных в период с декабря по февраль.

Генерацию NO в ткани мозга определяли методом электронного парамагнитного резонанса [4], основанного на использовании в качестве ловушки свободных радикалов диэтилдитиокарбамата (ДЭТК). Последний, взаимодействуя с эндогенным NO и ионами двухвалентного железа Fe^{2+} , ведет к образованию парамагнитных моонитрозильных комплексов железа (МНКЖ-ДЭТК), регистрируемых методом ЭПР. Крысятам обеих экспериментальных групп вводили раствор Na-ДЭТК (500 мг/кг, в/в) и смесь $FeSO_4$ (37,5 мг/кг) с цитратом натрия (165 мг/кг, п/к) за 30 мин до поведенческих экспериментов, по окончании которых животных декапитировали, выделяли быстро на холоду кору мозга, образцы замораживали в жидком азоте. Содержание NO определяли на радиоспектрометре Radiopan (Польша). Образцы ткани для последующих биохимических исследований хранили в жидком азоте.

Данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$ Статистическую обработку результатов проводили с использованием системы ANOVA и непараметрического коэффициента Фридмана для повторных измерений.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения генерации оксида азота в коре мозга новорожденных крысят линии Спрег—Доули в первые дни после рождения представлены в таблице. Установлено, что на 1-е и 2-е постнатальные сутки (1pd и 2pd) уровень NO в коре крысят, рожденных от матерей, получавших инъекции амфетамина *in utero*, была значительно ниже ($F(1,33)=11,53$, $p<0,01$), чем у животных, которым вводили пренатально физиологический раствор (кон-

трольная группа). Однако уже на 4-й постнатальный день (4pd) содержание NO в коре мозга крысят, подвергнутых пренатальному стрессу, вызванному введением амфетамина, не отличалось от значений данного показателя у контрольных животных.

Установлено, что спустя 1 месяц (30pd) после рождения в коре крысят обеих групп уровни продуктов ПОЛ и NO значительно возрастали по сравнению с первыми постнатальными днями (таблица). Следует отметить, что в этот срок содержание NO в коре мозга крысят, перенесших пренатальный стресс, вызванный введением амфетамина, был достоверно выше, чем в контрольной группе животных.

Таблица

Влияние пренатального введения амфетамина на генерацию NO в коре мозга крысят линии Спрег—Доули в первые постнатальные дни (ПНД). Количество животных в каждой группе n=6—8

Группы животных	NO Кора	
	Контроль	Амфетамин
1 pd	1,05±0,12	0,59±0,07*
2 pd	1,25±0,09	0,67±0,16*
3 pd	1,16±0,17	1,29±0,1
30 pd	1,73±0,15	2,71±0,18**
Взрослые крысы (90 дней)	2,23±0,21	3,83±0,28**
Примечание. * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$ — отличие по сравнению с контрольной группой		

В связи с высокой актуальностью проблема изучения механизмов пренатального стресса и его влияния на развитие потомства в настоящее время вызывает пристальный интерес исследователей различных специальностей [6, 25]. В последнее десятилетие накоплен значительный объем данных, свидетельствующих об участии в этих процессах различных нейротрансмиссивных систем мозга [10, 11]. Участие NO в опосредовании многообразных функций ЦНС как в условиях физиологической нормы, так и при воздействии стрессорных факторов различной природы в настоящее время не вызывает сомнения [8, 16, 17, 18, 24]. Вместе с тем, результаты исследований, посвященных возможному участию NO в патогенезе этих состояний, немногочисленны, а имеющиеся в этой области данные недостаточны [17, 27].

Необходимо также отметить, что в рассматриваемых работах использовались, как правило, косвенные приемы, такие, как применение метаболитических предшественников (L-аргинин), доноров NO (нитропруссид натрия и др.) или ингибиторов NO-синтазы [27]. Так, установлено, что пренатальный стресс способен вызывать модификацию активности NO-синтазы в миндалине и среднем мозге крысят [17]. Показано, что острое однократное применение психостимулято-

ра кокаина в низкой дозе не оказывало влияния на содержание цитрулина (сопутствующего продукта NO-синтазы) в гиппокампе мозга крыс, в то время как его повторные инъекции вызывали значительное увеличение образования указанной аминокислоты [7].

В нашей работе было впервые установлено, что содержание NO было уменьшено в мозге крысят обеих исследованных групп в первые постнатальные дни (с 1-го по 4-й) по сравнению с взрослыми животными. Эти результаты хорошо согласуются с данными, которые демонстрируют, что экспрессия NO-синтазы возрастает в мозге крысят в течение 1-й недели их постнатальной жизни [15]. Следует отметить, что в наших экспериментах было показано, что генерация NO была ниже в мозге крысят, перенесших пренатальный стресс, вызванный амфетамином, только в 1-й и 2-й постнатальные дни по сравнению с животными, получавшими только физиологический раствор (контрольная группа). Уже на 4-й постнатальный день этот показатель не отличался у крысят экспериментальной и контрольной групп. Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее данными о повышении экспрессии нейрональной NO-синтазы в коре и гиппокампе мозга крысят на 5- и 29-й постнатальные дни в условиях пренатального введения производного амфетамина — параклорамфетамина [23]. Более того, авторы отмечают выраженную взаимосвязь между истощением серотонинергической системы и увеличением активности NO-синтазы в указанных структурах мозга.

Таким образом, наши наблюдения поддерживают гипотезу, предполагающую тесную взаимосвязь между активностью моноэргических и нитроэргических систем мозга в течение постнатального развития. Полученные нами данные о содержании NO в коре мозга крыс в условиях пренатального стресса, вызванного введением психомоторного стимулятора, являются принципиально новыми и носят приоритетный характер.

Выводы

1. Генерация NO в коре мозга крысят обеих исследуемых групп в первые постнатальные дни (1—2rd) была значительно снижена по сравнению со значениями данного показателя взрослых животных.
2. При введении амфетамина *in utero* наблюдались более низкие уровни NO на 1-й и 2-й постнатальные дни (1 и 2 rd) в коре мозга крысят по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор пренатально.
3. Наши результаты расширяют представления о нейрохимических последствиях модельного пренатального стресса, обусловленного введением амфетамина. Результаты нашего исследования могут открывать

новые пути для разработки коррекции нарушений, наблюдаемых после пренатального введения психостимуляторов.

Список литературы

1. Анохина И.П., Веретинская А.Г., Васильева Г.Н., Овчинников И.В. Биологические механизмы индивидуальной предрасположенности к психоактивным веществам // Физиология человека. — 2000. — №6. — С. 74—81.
2. Башкатова В.Г., Маликова Л.А., Панченко Л.Ф. Механизмы нейротоксического действия амфетаминоподобных психостимуляторов: роль оксида азота // Наркология. — 2004. — №2. — С. 31—38.
3. Иванец Н.Н., Анохина И.П., Стрелец Н.В. Современное состояние проблемы лекарственной зависимости в России // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 1997. — Т. 97(9). — С. 4—10.
4. Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф. Оксид азота образуется через L-аргинин зависимый путь в мозге мышей *in vivo* // Биофизика. — 1994. — Т. 39. — С. 915—918.
5. Москаленко В.Д. Психофизиологическое развитие детей, подвергнутых действию наркотических препаратов в неонатальный период // Журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова. — 2004. — Т. 104. — С. 65—68.
6. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мещеров Ш.К., Стрельцов В.А. Влияние нейрхимического повреждения дофаминергических терминалей в раннем онтогенезе на поведение взрослых крыс // Росс. физиол. ж. — 2003. — Т. 89. — С. 1438—1450.
7. Bagetta G., Rodino P., Arabia A., Massoud R., Paoletti A.M., Nistico R., Passantino L., Preziosi P. Systemic administration of cocaine, given alone or in combination with sensory stimuli, differentially affects L-arginine-nitric oxide metabolism in discrete regions of the brain of rat // Neurosci. Lett. — 1999. — Vol. 14. — P. 153—156.
8. Bashkatova V., Vitskova G., Narkevich V., Vanin A., Mikoyan V., Rayevsky K. Nitric oxide content measured by ESR-spectroscopy in the rat brain is increased during pentylenetetrazole-induced seizures // J. Mol. Neurosci. — 2000. — Vol. 14. — P. 183—190.
9. Bashkatova V., Kraus M., Vanin A., Hornick A., Prast H. Comparative effects of NO-synthase inhibitor and NMDA antagonist on generation of nitric oxide and release of amino acids and acetylcholine in the rat brain elicited by amphetamine neurotoxicity // Ann. NY Acad. Sci. — 2004. — Vol. 1025. — P. 221—230.
10. Fumagalli F., Molteni R., Racagni G., Riva M.A. Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology // Prog. Neurobiol. — 2007. — Vol. 81. — P. 197—217.
11. Herlenius E., Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods // Exp. Neurol. — 2004. — Vol. 190. — Suppl. 1. — S8—21.
12. Henry J.D., Rendell P.G. A review of the impact of pregnancy on memory function // J. Clin. Exp. Neuropsychol. — 2007. — Vol. 29. — P. 793—803.
13. Inman-Wood S.L., Williams M.T., Morford L.L., Vorhees C.V. Effects of prenatal cocaine on Morris and Barnes maze tests of spatial learning and memory in the offspring of C57BL/6 mice // Neurotox. Teratol. — 2000. — Vol. 22. — P. 547—557.
14. Jeng W., Wong A.W., Ting-A-Kee R., Wells P.G. Methamphetamine-enhanced embryonic oxidative DNA damage and neurodevelopmental deficits // Free Radic. Biol. Med. — 2005. — Vol. 39. — P. 317—326.

15. Labuda C., Litwinowicz B., Kowianski P., Spodnik J.H., Luczynska A., Morys J. Developmental changes in nitric oxide synthase protein expression in the rat striatum and cerebral cortex // *Folia Morphol. (Warsz.)*. — 2003. — Vol. 62. — P. 171—174.
16. Meldrum B.S. The role of nitric oxide in ischemic damage // *Adv. Neurol.* — 1996. — Vol. 71. — P. 355—363.
17. Miller S.D., Mueller E., Gifford G.W., Kinsley C.H. Prenatal stress-induced modifications of neuronal nitric oxide synthase in amygdala and medial preoptic area // *Ann. NY Acad. Sci.* — 1999. — Vol. 877. — P. 760—763.
18. Moncada S., Bolanos J.P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration // *J. Neurochem.* — 2006. — Vol. 97. — P. 1676—1689.
19. Nulman I., Rovet J., Altmann D., Bradley C., Einarson T., Koren G. Neurodevelopment of adopted children exposed in utero to cocaine // *Can. Med. Assoc. J.* — 1994. — Vol. 151. — P. 1591—1597.
20. Ren J.Q., Malanga C.J., Tabit E., Kosofsky B.E. Neuropathological consequences of prenatal cocaine exposure in the mouse // *Int. J. Dev. Neurosci.* — 2004. — Vol. 22. — P. 309—320.
21. Slamberova R., Pometlova M., Syllabova L., Mancuskova M. Learning in the place navigation task, not the new-learning task, is altered by prenatal methamphetamine exposure // *Brain Res. Dev. Brain Res.* — 2005. — Vol. 157. — P. 217—219.
22. Szczerbak G., Nowak P., Kostrzewa R.M., Brus R. Maternal lead exposure produces long-term enhancement of dopaminergic reactivity in rat offspring // *Neurochem. Res.* — 2007. — Vol. 32. — P. 1791—1798.
23. Tagliaferro P., Ramos A.J., Lopez-Costa J.J., Lopez E.M., Brusco A. Changes in the postnatal development on nitric oxide system induced by serotonin depletion // *Brain Res. Dev. Brain Res.* — 2003. — Vol. 146. — P. 39—49.
24. Vanin A.F., Bevers L.M., Slama-Schwok A., van Faassen E.E. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2007. — Vol. 64. — P. 96—103.
25. Weinstock M. Gender Differences in the Effects of Prenatal Stress on Brain Development and Behaviour // *Neurochem. Res.* — 2007. — Vol. 32. — P. 1730—1740.
26. Williams J.H., Ross L. Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents: a systematic review // *Eur. Child Adolesc. Psychiatry.* — 2007. — Vol. 16. — P. 243—253.
27. Zhu Z., Li X., Chen W., Zhao Y., Li H., Qing C., Jia N., Bai Z., Liu J. Prenatal stress causes gender-dependent neuronal loss and oxidative stress in rat hippocampus // *J. Neurosci. Res.* — 2004. — Vol. 78. — P. 837—844.

THE EFFECT OF PRENATAL AMPHETAMINE ADMINISTRATION ON NITRIC OXIDE GENERATION IN THE BRAIN OF PUPS DURING POSTNATAL PERIODS

BASHKATOVA V.G.

Dr. Sci., V.V. Zakusov Institute of Pharmacology, RAMS, Moscow

PANCHENKO L.F.

Academician, RAMS, National Research Center Narcology, Ministry of Health, Moscow

VANIN A.F.

Prof., N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, RAS, Moscow

REZVANOVA D.A.

N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, RAS, Moscow

MAURICE T.

Prof., INSERM, University of Montpellier II, Montpellier, France

The aim of our work was to study a role of nitric oxide (NO) in the brain of juvenile rats exposed prenatal stress produced by administration of psychostimulant drug amphetamine (AMPH) in utero. Pregnant Sprague—Dawley rats received a daily intraperitoneal injection of AMPH (5 mg/kg) or saline solution for control dams during last fourth of pregnancy. NO generation was measured using electron paramagnetic resonance technique. NO level was lower in the brain of rat pups received the psychostimulant at postnatal day 1 and 2 as compared with control animals. IUV rats. However, the NO content of AMPH treated pups did not differ from that of the control group at postnatal day 4. It was shown that NO generation was elevated in the cerebral cortex of pups as compared with saline animals received saline in utero only. In conclusion, this observation is the first evidence that in utero AMPH exposure resulted in increases in NO levels in the brain and therefore, in utero AMPH exposure resulted in a significant oxidative stress in basal conditions, that may be related to impaired learning ability in future development.