

УДК 591.3. 591.11. 591.481

МОЗГ – ОДИН ИЗ ИСТОЧНИКОВ СЕРОТОНИНА В КРОВИ У КРЫС В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ¹

© 2009 г. Д. И. Насырова*, Н. А. Уртикова*, А. Я. Сапронова* **, М. В. Угрюмов* **,

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

**Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН
125009 Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 4

E-mail: Anna_Sapronova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.08 г.
Окончательный вариант получен 24.04.08 г.

Работа посвящена проверке гипотезы авторов о том, что до формирования гематоэнцефалического барьера мозг функционирует как эндокринный орган. Мы разработали модель фармакологического выключения синтеза серотонина в мозгу при помощи стереотаксического однократного введения *para*-хлорфенилаланина – ингибитора синтеза серотонина. Экспериментально была подобрана доза ингибитора, вызывающая максимальный эффект в мозгу при отсутствии его влияния на синтез серотонина на периферии. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии оценивали концентрацию серотонина и его метаболитов (5-гидрокситриптофана и 5-гидроксииндолуксусной кислоты) в мозгу, двенадцатиперстной кишке и в крови (отдельно в плазме и тромбоцитах). Показано, что оптимальная доза *para*-хлорфенилаланина (200 мг/кг) вызывает резкое падение уровня серотонина в мозгу (70%), умеренное снижение в плазме (16%) и тромбоцитах (26%) и незначительное снижение – в двенадцатиперстной кишке (12%). Вместе с тем при этой дозе не обнаружено снижения 5-гидрокситриптофана в кишке. Это позволяет полагать, что падение уровня серотонина в крови обусловлено ингибированием его синтеза в мозгу, а снижение концентрации серотонина в двенадцатиперстной кишке – компенсаторным увеличением его выделения в кровь при неизменном уровне синтеза. Таким образом, показано, что развивающийся мозг до закрытия гемато-энцефалического барьера секретирует серотонин в кровь.

Ключевые слова: крыса, мозг, двенадцатиперстная кишка, кровь, серотонин, *para*-хлорфенилаланин.

Серотонин – один из важнейших и функционально значимых физиологически активных веществ (ФАВ). Он синтезируется у взрослых животных в мозгу – в ядрах шва и на периферии – в основном в энтерохромаффинных клетках желудочно-кишечного тракта (Steinbusch, Nieuwenhuys, 1983; Montange, Calas, 1988; Rindi et al., 2004), причем эти два источника разделены гемато-энцефалическим барьером (ГЭБ).

У взрослых животных серотонин играет роль нейротрансмиттера в мозгу и гормона – на периферии. Так, серотонинергическая система мозга

участвует в регуляции циркадных ритмов, нейро-эндокринных функций, моторного, пищевого и разных форм эмоционального поведения, процессов памяти и обучения (Fuller, Clemens, 1981; Weiner et al., 1988; Ugrumov, 1992, 1997; Boutrel et al., 2002). Нарушения в ее работе ведут к развитию тяжелых нервных и нейроэндокринных патологий (Shopsin, Feiner, 1984; Blier, de Montigny, 1999; Vickers, Dourish, 2004; Lowry et al., 2005; Shmitt et al., 2006). Периферическая серотонинергическая система в основном участвует в регуляции сердечно-сосудистой и пищеварительной систем (De Clerck, Janssen, 1990; Hayreh, 1999; MacLean et al., 2000; Yusuf et al., 2003; Eddahibi, Adnot, 2006).

В отличие от взрослых у животных в пренатальном периоде онтогенеза серотонин играет роль морфогенетического фактора, контролирующего развитие как мозга, так и периферических органов (Azmitia et al., 1990; Whitaker-Azmitia, 1993; Lauder, 1993; Ugrumov, 1997; Nebigil et al., 2000; Mirochnik et al., 2005). Более того, недавно в проведенных нашей лабораторией исследованиях

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48829), Российским гуманитарным научным фондом (проект № 06-06-00010А), а также Программами: Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (проект НШ-6352.2006.4), отделения биологических наук РАН “Интегративные механизмы регуляции функций в организме”, фундаментальных исследований РАН “Фундаментальные науки – медицине” и совместно Российского фонда фундаментальных исследований и Национального центра научных исследований Франции (проект № 07-04-92173 НЦНИ).

было показано, что до формирования специфических межнейронных связей и ГЭБ нейроны мозга функционируют как секреторные клетки, выделяя в кровь гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ) и дофамин (Угрюмов, 2004; Ugrumov et al., 2005). Мы предположили, что в этот период развития и другие вещества могут поступать из мозга в кровь, в частности, мы получили косвенные доказательства этого предположения в отношении серотонина (Насырова и др., 2009, в печати).

Цель работы – получить прямые доказательства того, что мозг – эндокринный орган, секретирующий серотонин в кровь до формирования ГЭБ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе ставили следующие задачи: оценить изменение уровня серотонина в крови после выключения синтезирующих его нейронов мозга с использованием микрохирургической модели (декапитация плодов *in utero*); разработать фармакологическую модель подавления синтеза серотонина в мозгу без изменения его синтеза на периферии и оценить изменение уровня серотонина в крови после ингибирования его синтеза в мозгу.

Исследования проведены на крысах Вистар следующего возраста: 18-й и 21-й эмбриональный дни развития (Э18, Э21), 3-и и 4-е сут постнатального развития (П3, П4) – и на беременных самках. Животных всех возрастов дифференцировали по полу по аногенитальному расстоянию. Для получения самок с датированным сроком беременности использовали 3–4-месячных крыс весом 200–250 г, к которым вечером подсаживали самцов, а утром у них брали влагалищные мазки. День обнаружения сперматозоидов в мазке считали 1-м днем беременности. День рождения крысят считали 1-ми постнатальными сут. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде.

Микрохирургическая модель выключения нейронов, синтезирующих серотонин. В этой серии экспериментов использовали 40 плодов от шести беременных самок, которых на 18-й день беременности под пентобарбиталовым наркозом (40 мг/кг веса) подвергали лапаротомии и высвобождали рог матки, пальцами фиксируя голову плода. Затем прошивали стенку матки и плодного пузыря по кругу в области головы плода, через разрез в стенке матки выводили голову плода, после чего, затягивая лигатуру вокруг шеи, голову отделяли от туловища (Jost, 1947). С контрольными плодами никаких манипуляций не проводили. По окончании операции на плодах брюшную полость самки зашивали; плоды находились в организме матери до Э21.

Фармакологическая модель ингибирования синтеза серотонина. В этой серии эксперимен-

тов использовали 184 животных на П3 от 17 пометов, которых разделили на три группы: 1-я – интактные (50 особей); 2-я – контрольные (53 животных), которым однократно вводили 2 мкл 0.9%-ного NaCl; 3-я – опытные (81 животное), которым однократно вводили 200 (100 мкг/мозг) или 300 мг/кг (150 мкг/мозг) *D, L-nara*-хлорфенилаланина (пХФА) (“Sigma”, США), конкурентного ингибитора триптофангидроксилазы – 1-го скоростлимитирующего фермента синтеза серотонина, в 2 мкл 0.9%-ного NaCl.

Крысят под холодовым наркозом фиксировали в стереотаксическом аппарате. Ингибитор вводили с помощью гамилтоновского шприца объемом 10 мкл, зафиксированного на стереотаксическом аппарате, в латеральный желудочек мозга по следующим координатам: 1.4 мм латерально от брегмы, 2.0–2.5 мм в глубь мозга (Ugrumov, Mitskevich, 1980).

Внутрибрюшинное введение пХФА. Внутрибрюшинное введение ингибитора использовали как физиологический контроль ко внутрижелудочковому способу введения. Животных также подразделяли на три указанные выше группы и использовали такие же, как при внутрижелудочковом введении, объемы и дозы вводимых веществ.

Взятие и обработка материала. На 21-й день беременности у самок под нембуталовым наркозом (40 мг/кг веса) выделяли декапитированных и контрольных плодов, у которых собирали кровь из сердца и каудальный фрагмент двенадцатиперстной кишки. Пробы крови объединяли от двух плодов.

Неонатальных крысят (П3) после инъекции пХФА содержали 24 ч в стандартных лабораторных условиях, после чего под нембуталовым наркозом (40 мг/кг веса) выделяли мозг, каудальный фрагмент двенадцатиперстной кишки и собирали кровь из сердца. На пробу приходился материал от одного животного.

Кровь брали из сердца и помещали в пробирку, содержащую 30 мкл 5%-ного раствора ЭДТА и 10 мкл 10%-ного раствора метабисульфита натрия (“Sigma”, США). Чтобы определить содержание серотонина, 5-гидрокситриптофана (5-ГТп) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК), образцы крови центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами. Для разделения тромбоцитов и плазмы проводили повторное 10-минутное центрифугирование при 3000 об/мин.

В каждую пробу плазмы добавляли 1/10 объема 1 N HClO₄ до конечной концентрации 0.1 N, а также 1 нг α-метилсеротонина (АМГТ), внутренний стандарт (“Sigma”, США) в 10 мкл 0.1 N HClO₄. В каждую пробу с тромбоцитами добавляли фиксиро-

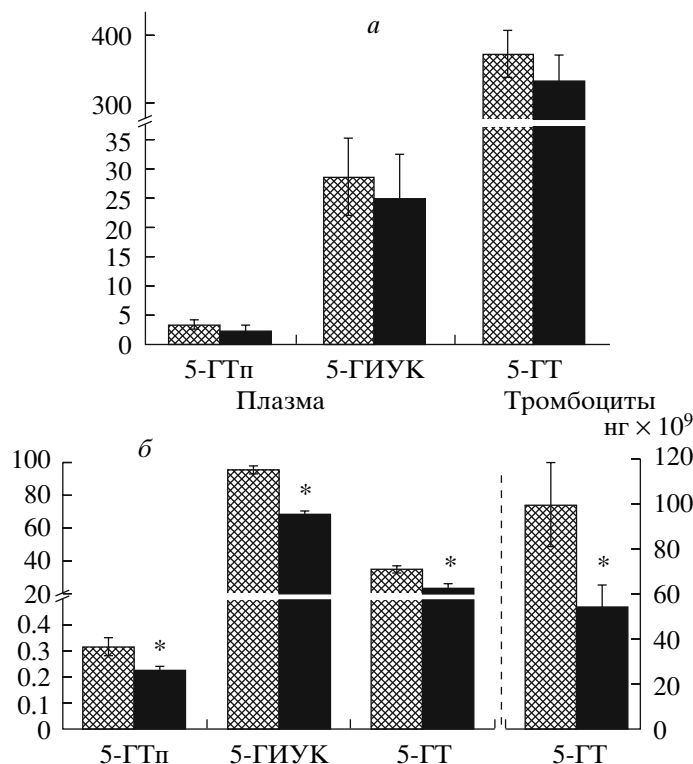


Рис. 1. Концентрация серотонина (5-ГТ), 5-гидрокситриптофана (5-ГТп) и 5-гидроксииндолекусуной кислоты (5-ГИУК) в двенадцатиперстной кишке, нг/мг (а) и в крови, нг/мл (б): плазме и тромбоцитах декапитированных плодов. Здесь и далее: (▨) – контроль, (■) – опыт; * различия достоверны между опытом и контролем, $p < 0.05$.

ванный объем 0.1 N HClO₄, 10 мкл (1 нг) АМГТ и все пробы центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин. Супернатант собирали и хранили при температуре – 80°C.

Для определения концентрации серотонина, 5-ГТп и 5-ГИУК ткани мозга и двенадцатиперстной кишки гомогенизировали при помощи ультразвукового гомогенизатора L-666 (“MSE”, Англия) в 0.1 N HClO₄, добавляли 10 мкл 0.2 N HClO₄, содержащей 1 нг АМГТ, и центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин. Супернатант собирали и хранили при – 80°C.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Для определения серотонина, 5-ГТп и 5-ГИУК использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией (ЭД). После 10-минутного центрифугирования при 1000 об/мин супернатанты исследовали при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ с ЭД на приборе Amperometric detector LC-4В (“Bioanalytical Systems”, США) при электрическом потенциале 850 мВ. Пробы вводили в инжектор (“Raininn”, США) с петлей объемом 20 мкл. Разделение производили на 15-сантиметровой колонке с внутренним диаметром 3 мм и наполнителем нуклеосилом C-18 (5 мкм) (“Элсико”, Россия). По-

движной фазой служил 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0.3 мМ октансульфата натрия, 0.1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (“Sigma”), рН 3.2. Скорость потока 800 мкл/мин обеспечивали с помощью насоса Gilson 307 (Франция). В качестве стандарта использовали свежеприготовленный раствор, содержащий по 100 нг/мг серотонина, 5-ГТп, 5-ГИУК и АМГТ. Пики серотонина и внутреннего стандарта идентифицировали и об- считывали, ориентируясь на время выхода веществ в стандарте, используя программу Мульти-Хром 1.5 (“Ampersand Ltd.”, США). Концентрацию каждого компонента вычисляли путем сравнения величины пика в пробе с величиной пика в стандарте по следующей формуле:

$$C_{5-ГТпроб} = \frac{C_{5-ГТстанд} h_{АМГТстанд}}{h_{станд} h_{АМГТпроб}},$$

где $C_{5-ГТпроб}$, $C_{5-ГТстанд}$ – концентрация серотонина в пробе и стандарте соответственно, $h_{проб}$, $h_{станд}$ – высота пика серотонина в пробе и стандарте соответственно, $h_{АМГТпроб}$, $h_{АМГТстанд}$ – высота пика АМГТ в пробе и стандарте соответственно.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни.

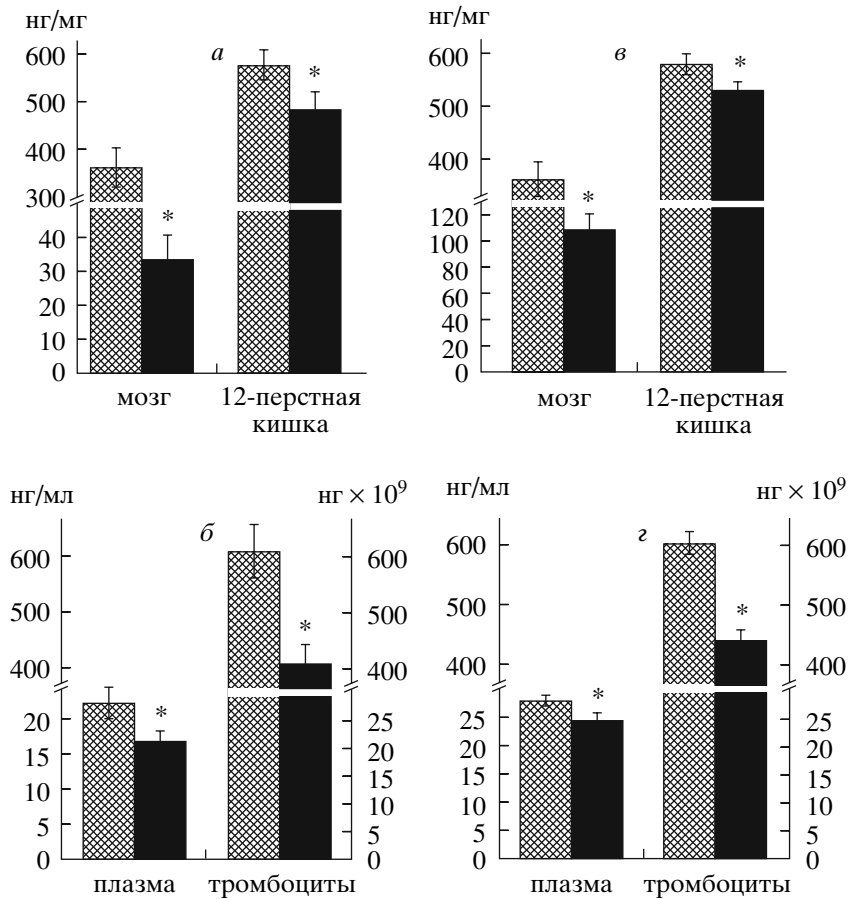


Рис. 2. Концентрация серотонина в мозгу, двенадцатиперстной кишке и в крови после введения *para*-хлорфенилаланина (пХФА) в дозе 300 (а, б) и 200 мг/кг (в, г).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Микрохирургическое выключение синтеза серотонина в мозгу. После декапитации плодов на Э18 к Э21 концентрации серотонина, 5-ГТп и 5-ГИУК в двенадцатиперстной кишке не изменились (рис. 1, а). Концентрация серотонина в плазме крови плодов после декапитации снизилась в 1.5 раза, 5-ГТп и 5-ГИУК – в 1.4 раза. Содержание серотонина в тромбоцитах снизилось в 1.7 раза (рис. 1, б)

Фармакологическое выключение синтеза серотонина в мозгу. Поскольку различий между интактной и контрольной группами животных по уровню серотонина, 5-ГТп и 5-ГИУК в мозгу, двенадцатиперстной кишке и в крови не обнаружено, данные по интактным животным не приведены.

При внутрижелудочковом введении 300 мг/кг пХФА концентрация серотонина в мозгу опытных животных была в 10 раз ниже, чем у контрольных. В двенадцатиперстной кишке наблюдалось достоверное, но менее выраженное сниже-

ние концентрации (в 1.1 раза) серотонина, чем в мозгу (рис. 2, а). В плазме концентрация серотонина снижалась в 1.3 раза, а в тромбоцитах (нг/10⁹ тромбоцитов) – в 1.5 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 2, б).

Концентрация 5-ГТп в мозгу опытных животных была в 5 раз ниже, чем в контрольной группе, тогда как в двенадцатиперстной кишке всего в 2 раза ниже (рис. 3, а). Показано достоверное снижение (в 1.5 раза) концентрации 5-ГТп в плазме и тромбоцитах животных в опыте по сравнению с контролем (рис. 3, б).

В мозгу и двенадцатиперстной кишке животных в опыте наблюдали достоверное снижение концентрации 5-ГИУК в 5.3 и 1.4 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, а). В плазме животных в опыте концентрация 5-ГИУК снизилась по сравнению с контрольной группой в 1.3 раза, а в тромбоцитах – в 1.5 раза (рис. 4, б).

При внутрибрюшинном введении 300 мг/кг пХФА не обнаружено изменений в концентрации

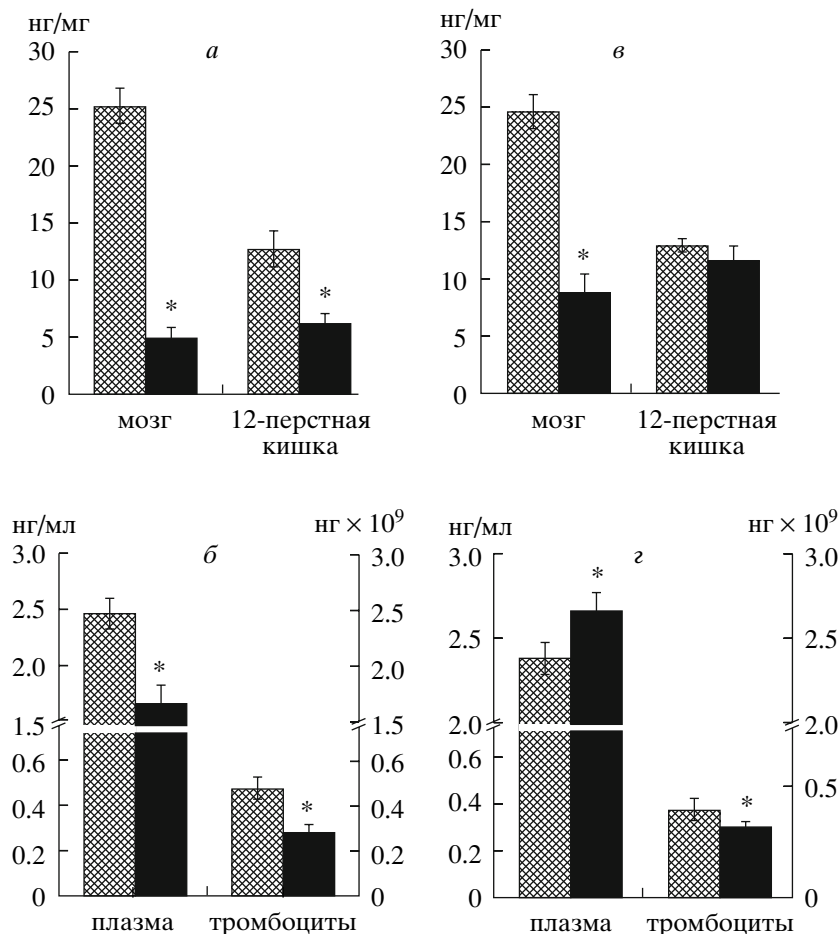


Рис. 3. Концентрация 5-ГТп в мозгу, двенадцатиперстной кишке и в крови после введения пХФА в дозе 300 (а, б) и 200 мг/кг (в, г).

серотонина, 5-ГТп и 5-ГИУК в мозгу, двенадцатиперстной кишке и крови у животных в опыте и контроле (таблица, А).

При внутрижелудочковом введении 200 мг/кг пХФА в мозгу животных в опыте концентрация серотонина падает по сравнению с контрольной группой в 3 раза, а в двенадцатиперстной кишке – в 1.1 раза (рис. 2, в). Концентрация серотонина в плазме животных в опыте снизилась в 1.12, а в тромбоцитах – в 1.3 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 2, г).

В мозгу животных в опыте наблюдали значительное снижение концентрации 5-ГТп – в 4.8 раза, тогда как в двенадцатиперстной кишке она не изменялась (рис. 3, в). В плазме животных в опыте концентрация 5-ГТп падает в 1.1 раза, а его содержание в тромбоцитах – в 1.2 раза (рис. 3, г).

Концентрация 5-ГИУК в мозгу животных в опыте снизилась в 2.6 раза по сравнению с контрольной группой, тогда как в двенадцатиперстной кишке она не изменилась (рис. 4, в). В плазме

крови падение концентрации 5-ГИУК менее выражено – в 1.14 раза, а содержание ее в тромбоцитах снизилось в 1.3 раза (рис. 4, г).

При внутрибрюшинном введении 200 мг/кг пХФА не обнаружено изменений в концентрации серотонина, 5-ГТп и 5-ГИУК в мозгу, двенадцатиперстной кишке и крови у контрольных и опытных животных (таблица, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наша работа является продолжением цикла исследований, посвященных проверке гипотезы о том, что до становления ГЭБ развивающийся мозг функционирует как эндокринный орган (Угрюмов, 2004). Проведенные нами ранее исследования показали, что, по крайней мере, два важнейших с функциональной точки зрения ФАВ – ГРГ и дофамин – поступают из мозга плодов и новорожденных крыс (до формирования ГЭБ) в общую систему циркуляции, таким образом создается концентрация, достаточно высокая для оказания влия-

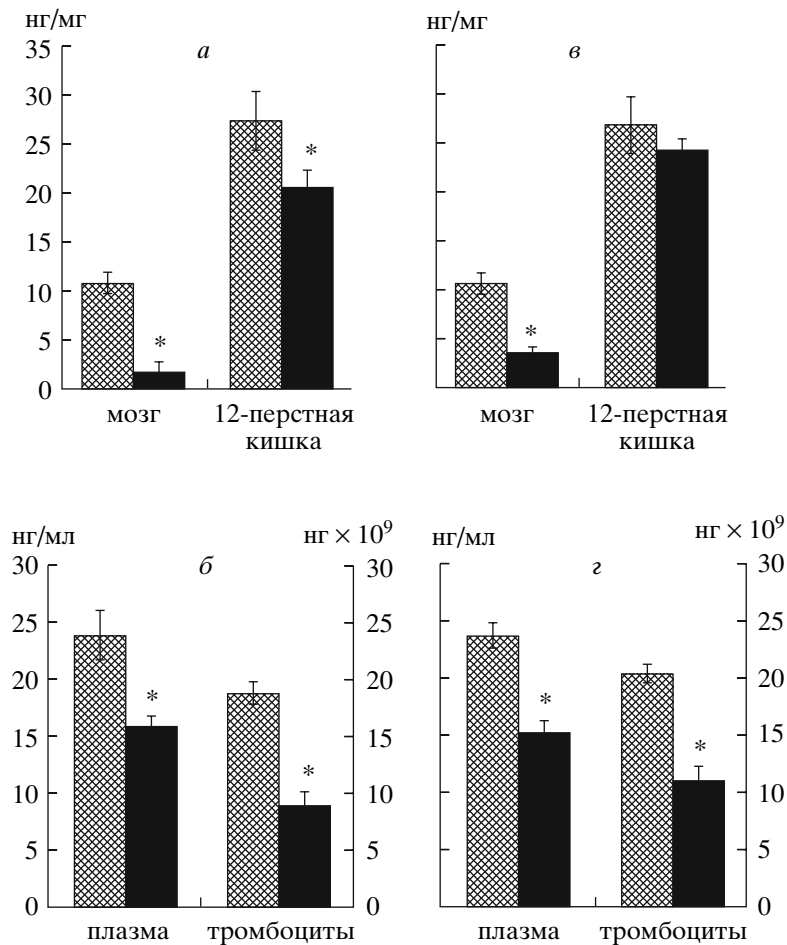


Рис. 4. Концентрация 5-ГИУК в мозгу, двенадцатиперстной кишке и крови после введения пХФА в дозе 300 (а, б) и 200 мг/кг (в, з).

ния на развивающиеся периферические органы (Лаврентьева и др., 2004, 2006).

Наряду с ФАВ, синтезирующимися преимущественно в мозгу и практически отсутствующими в крови (ГРГ, дофамин), существуют и другие, синтезирующиеся в равной степени и в мозгу, и на периферии. К ним в первую очередь относится серотонин. Если во взрослом организме существует серотонин разного происхождения, разделенный ГЭБ, то, согласно нашей гипотезе, в период развития до формирования ГЭБ он смешивается. Отсюда вытекает принципиально важный вопрос: каково соотношение серотонина мозгового и периферического происхождения в общей системе циркуляции развивающегося организма?

Для решения этого вопроса мы сначала использовали экспериментальную модель удаления мозга (декапитацию плодов *in utero*) с последующим определением концентрации серотонина в крови и двенадцатиперстной кишки. Эта экспериментальная модель, разработанная Жостом (Jost,

1947), в 70–80-е гг. прошлого столетия успешно применялась для оценки формирования гипоталамического контроля функций гипофиза (Mitskevich, Rumyantzeva, 1972; Mitskevich, Sapronova, 1982), причем полученные с ее помощью результаты позднее были полностью подтверждены с помощью более селективного методического подхода – пассивной иммунизации к тем или иным нейрогормонам (Daikoku et al., 1981; Lalau et al., 1990; Zakharova et al., 2000).

Показано, что у декапитированных плодов содержание серотонина в плазме и тромбоцитах снижается на 40%, тогда как в двенадцатиперстной кишке оно не изменяется. Это указывает на то, что мозг является важным источником серотонина в крови в указанный период развития, и согласуется с результатами наших предыдущих работ. Так, мы показали, что при удалении *in utero* части среднего и всего переднего мозга плодов крыс уровень ГРГ и дофамина падал на 50% (Лаврентьева и др., 2004, 2006).

Концентрация серотонина и его метаболитов в мозгу, двенадцатиперстной кишке и плазме крови у крыс после системного введения 300 (А) и 200 (Б) мг/кг *para*-хлорфенилаланина

Животные	Концентрация серотонина		
	мозг, нг/г	12-перстная кишка, нг/г	плазма, нг/мл
А			
5-ГТ			
Интактные	361.529 + 17.501	590.752 + 24.147	61.058 + 2.296
Контрольные	359.104 + 12.060	583.420 + 15.388	60.390 + 0.514
Опытные	354.670 + 12.525	581.509 + 13.497	59.365 + 1.793
5-ГТп			
Интактные	24.475 + 0.460	13.423 + 1.185	5.014 + 0.193
Контрольные	23.636 + 0.088	13.362 + 0.409	5.035 + 0.093
Опытные	23.732 + 2.374	12.639 + 2.019	5.131 + 0.610
5-ГИУК			
Интактные	11.701 + 1.194	24.810 + 3.459	50.008 + 0.193
Контрольные	10.769 + 0.183	24.476 + 2.375	48.681 + 2.268
Опытные	10.601 + 0.642	24.204 + 2.478	48.393 + 0.555
Б			
5-ГТ			
Интактные	325.786 + 11.874	590.079 + 19.106	58.773 + 3.501
Контрольные	327.761 + 13.073	587.540 + 19.663	55.783 + 3.111
Опытные	326.666 + 12.185	684.736 + 11.088	56.320 + 2.140
5-ГТп			
Интактные	23.143 + 0.987	13.21 + 0.829	5.140 + 0.193
Контрольные	22.918 + 1.108	12.896 + 0.604	5.335 + 1.083
Опытные	22.015 + 1.479	12.777 + 1.345	5.220 + 1.128
5-ГИУК			
Интактные	10.554 + 0.785	25.313 + 2.555	46.723 + 1.387
Контрольные	10.730 + 0.501	24.211 + 2.026	45.523 + 0.786
Опытные	9.743 + 1.046	24.187 + 1.817	45.122 + 1.130

Однако такая модель является довольно грубой, так как кроме серотонинергической системы выключаются и другие нейрональные системы мозга. Поэтому мы предприняли попытку специфического ингибирования синтеза серотонина в мозгу, чтобы оценить его вклад в общее содержание серотонина в крови. С этой целью необходи-

мо было разработать фармакологическую модель, определив оптимальные способ введения, время действия и концентрацию ингибитора. При этом ингибитор должен оказывать максимальный эффект в мозгу, но даже при незначительной диффузии в кровь не должен влиять на синтез серотонина в периферических органах. Для этого

мы использовали пХФА, конкурентный ингибитор триптофангидроксилазы – скоростьлимитирующего специфического фермента синтеза серотонина в серотонинпродуцирующих клетках (Кое, Wiessman, 1966). Поскольку такую работу проводили впервые, то оптимальные время и дозу пХФА подбирали эмпирически, учитывая, однако, результаты предыдущих работ. Так, ранее было показано, что при системном введении пХФА в дозе 300 мг/кг через 24 ч максимально снижались активность триптофангидроксилазы (на 95%) и уровень серотонина (на 20–30%) в мозгу (Gal et al., 1970; Кое, Weissman, 1966). Однако последующие работы показали, что при однократном внутрибрюшинном введении пХФА в дозе 300 мг/кг его максимальная концентрация через 6 ч после инъекции обнаруживается именно в кишечнике, в то время как в мозгу она в три раза ниже (Jequier et al., 1967). Следовательно, при таком введении ингибитора эффект максимально выражен в кишечнике, а не в мозгу, поэтому в нашей работе использование внутрибрюшинного пути введения пХФА не позволило бы достигнуть поставленной цели. Наиболее удобным нам представлялось ингибирование синтеза серотонина избирательно в мозгу с помощью стереотаксических инъекций пХФА в латеральный желудочек мозга.

Используя литературные данные, выбрали первую дозу пХФА – 300 мг/кг, однако ее пересчитали на вес мозга, который у животных на ПЗ составляет 0.5 г. Таким образом, в боковой желудочек мозга вводили 150 мкг пХФА на животное. Учитывая то, что максимальный эффект при введении пХФА наблюдается через 24 ч после введения (Gal et al., 1970), сбор материала производили спустя 24 ч после инъекции.

При стереотаксическом введении пХФА в боковые желудочки мозга в дозе 300 мг/кг наблюдалось снижение концентрации 5-ГТ в мозгу на 90%, что свидетельствует о проникновении пХФА почти во всю толщу мозга. При введении ингибитора в мозг возможно диффундирование пХФА и попадание в общую систему кровообращения. Действительно, несмотря на многократное разведение пХФА, произошло снижение концентрации 5-ГТ в двенадцатиперстной кишке на 17%, которое может быть обусловлено: 1) воздействием пХФА на уровень синтеза этого моноамина и 2) компенсаторным увеличением выделения 5-ГТ из двенадцатиперстной кишки в ответ на снижение его уровня в общей системе кровообращения.

При этой дозе первое предположение нам представляется более вероятным, так как уровень 5-ГТп является показателем действия пХФА, поскольку его содержание напрямую зависит от активности триптофангидроксилазы.

Снижение концентрации 5-ГТп в двенадцатиперстной кишке на 50% свидетельствует о воздействии ингибитора. Достоверное снижение концентрации в двенадцатиперстной кишке 5-ГИУК – основного метаболита серотонина – также свидетельствует о нарушении синтеза этого моноамина. Следовательно, снижение общего содержания серотонина в крови на 32% вызвано воздействием пХФА и на мозг, и на периферическую серотонинпродуцирующую систему, поэтому для снижения периферического эффекта ингибитора необходимо было снизить его дозу.

При введении пХФА в боковые желудочки мозга в дозе 200 мг/кг снижение концентрации серотонина в мозгу составило 69%, а в двенадцатиперстной кишке – 12%, однако концентрации предшественника серотонина (5-ГТп) и продукта его распада (5-ГИУК) в двенадцатиперстной кишке не изменились. Следовательно, пХФА в дозе 200 мг/кг не воздействовал на синтез серотонина в периферическом источнике. Поэтому обнаруженное нами снижение концентрации серотонина в двенадцатиперстной кишке связано с компенсаторным увеличением выделения серотонина в ответ на снижение его содержания в общей системе циркуляции.

Таким образом, снижение концентрации серотонина в крови на 22.6% вызвано, вероятно, ингибированием синтеза этого моноамина исключительно в мозгу.

Разработанная нами фармакологическая модель выключения синтеза серотонина в мозгу у крыс подтвердила гипотезу о том, что до формирования ГЭБ серотонин выделяется из мозга в общую систему циркуляции, хотя мозг и не является единственным его источником.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лаврентьева А.В., Сапронова А.Я., Адамская Е.И. и др. Мозг – один из важнейших источников гонадотропин-рилизинг гормона в общей системе циркуляции у крыс в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе // *Нейрохимия*. 2004. Т. 21. С. 27–33.
- Лаврентьева А.В., Мельникова В.И., Сапронова А.Я. и др. Мозг – один из важнейших источников дофамина в общей системе циркуляции в перинатальном периоде онтогенеза у крыс // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2006. Т. 92. № 8. С. 975–983.
- Насырова Д.И., Уртикова Н.А., Сапронова А.Я. и др. Развитие центральной и периферической серотонинпродуцирующих систем у крыс в онтогенезе // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*. 2009. (в печати)
- Угрюмов М.В. Мозг в роли эндокринной железы во взрослом и развивающемся организме // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 2004. Т. 90. № 5. С. 625–637.

- Azmitia E.C., Frankfurt M., Davila M. et al.* Plasticity of fetal and adult CNS serotonergic neurons: role of growth-regulatory factors // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990. V. 600. P. 343–363.
- Blier P., de Montigny C.* Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders // *Neuropsychopharmacology.* 1999. V. 21. № 2 (Suppl.). P. 91S–98S.
- Boutrel B., Monaca C., Hen R. et al.* Involvement of 5-HT_{1A} receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT_{1A} knock-out mice // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 11. P. 686–692.
- Daikoku S., Adachi T., Kawano H., Wakabayashi K.* Development of hypothalamic-hypophyseal-gonadotrophic activities in fetal rats // *Experientia.* 1981. V. 37. P. 1346–1348.
- De Clerck F., Janssen P.A.* 5-Hydroxytryptamine and thromboxane A₂ in ischemic heart disease // *Blood. Coagul. Fibrinolysis.* 1990. V. 1. P. 201–209.
- Eddahibi S., Adnot S.* The serotonin pathway in pulmonary hypertension // *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2006. V. 99. № 6. P. 621–625.
- Fuller R.W., Clemens J.A.* Role of serotonin in the hypothalamic regulation of pituitary function // *Serotonin: current aspects of neurochemistry and function.* N. Y.: Plenum Press, 1981. P. 431–444.
- Gal E.M., Roggeveen A.E., Millard S.A.* DL-[2–14C] p-chlorophenylalanine as an inhibitor of tryptophan 5-hydroxylase // *J. Neurochem.* 1970. V. 17. P. 1221–1235.
- Hayreh S.S.* Retinal and optic nerve head ischemic disorders and atherosclerosis: role of serotonin // *Prog. Retin. Eye Res.* 1999. V. 18. № 2. P. 191–211.
- Jequier E., Lovenberg W., Sjoerdsma A.* Tryptophan hydroxylase inhibition: the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin // *Mol. Pharmacol.* 1967. V. 3. P. 274–278.
- Jost A.* Experiences de decapitation de l'embryon de lapin // *C. r. Acad. Sci. Paris.* 1947. V. 225. P. 322–324.
- Koe B.K., Weissman A.* p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1966. V. 543. P. 499–516.
- Lalau J.D., Aubert M.L., Carmignac D.F. et al.* Reduction in testicular function in rats. 1. Reduction by a specific gonadotrophin-releasing hormone antagonist in fetal rats // *Neuroendocrinology.* 1990. V. 51. P. 284–288.
- Lauder J.M.* Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers // *Trends Neurosci.* 1993. V. 16. P. 233–240.
- Lowry C.A., Johnson P.L., Hay-Schmidt A. et al.* Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems // *Stress.* 2005. V. 8. P. 233–246.
- MacLean M.R., Herve P., Eddahibi S., Adnot S.* 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension // *Br. J. Pharmacol.* 2000. V. 131. P. 161–168.
- Mirochnik V., Bosler O., Tillet Y. et al.* Long-lasting effects of serotonin deficiency on differentiating peptidergic neurons in the rat suprachiasmatic nucleus // *Int. J. Devel. Neurosci.* 2005. V. 23. № 1. P. 85–91.
- Mitskevich M.S., Rumyantseva O.N.* A possible role of hypothalamus in the control of adrenocortical and thyroid functions during the fetal life // *Sov. J. Devel. Biol.* 1972. V. 3. P. 376–385.
- Mitskevich M.S., Sapronova A.Ya.* Possible role of hypothalamus and hypophysis in the control of development of pancreas reactivity to the effect of glucose in rat fetuses // *Endokrinologie.* 1982. B. 79. H. 2. S. 227–234.
- Montange M., Calas A.* Serotonin and endocrinology – the pituitary // *Neural serotonin / Eds Osborne N.N., Hamo M.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1988. P. 271–303.
- Nebigil C.G., Choi D.S., Dierich A. et al.* Serotonin 2B receptor is required for heart development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 17. P. 9508–9513.
- Rindi G., Leiter A.B., Kopin A.S. et al.* The “normal” endocrine cell of the gut changing concept and new evidences // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1014. P. 1–12.
- Shmitt J.A., Winger M., Ramaekers J.G. et al.* Serotonin and human cognitive performance // *Curr. Pharm. Des.* 2006. V. 12. № 2. P. 2473–2486.
- Shopsin B., Feiner F.N.* Serotonin and depression // *Adv. Biol. Psychiatr.* 1984. V. 14. P. 1–11.
- Steinbusch H.W.M., Nieuwenhuys R.* The raphe nuclei of rat brainstem: A cytoarchitectonic and immunocytochemical study // *Chemical neuroanatomy / Ed. Emson P.C.* N.Y.: Raven Press, 1983. P. 131–207.
- Ugrumov M.V.* Development of the hypothalamic monoaminergic system in ontogenesis. Morpho-functional aspects // *Zool. Sci.* 1992. V. 9. P. 17–36.
- Ugrumov M.V.* Hypothalamic monoaminergic systems in ontogenesis: development and functional significance // *Int. J. Devel. Biol.* 1997. V. 41. P. 809–816.
- Ugrumov M.V., Mitskevich M.S.* The adsorptive and transport capacity of tanocytes during the perinatal period of the rat // *Cell Tiss. Res.* 1980. V. 211. № 3. P. 493–501.
- Ugrumov M.V., Sapronova A.Y., Melnikova V. et al.* Brain is an important source of GnRH in general circulation in the rat during prenatal and early postnatal ontogenesis // *Comp. Biochem. Physiol.* 2005. V. 141. P. 271–279.
- Vickers S.P., Dourish C.T.* Serotonin receptor ligands and the treatment of obesity // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2004. V. 5. P. 377–388.
- Weiner R.I., Findell P.R., Kordon C.* Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin // *The physiology of reproduction / Eds Knobil E. et al.* N. Y.: Raven Press, 1988. P. 1235–1281.
- Whitaker-Azmitia P.M.* The role of serotonin and serotonin receptors in development of the mammalian nervous system // *Receptors in the developing nervous system. Neurotransmitters. V. 2 / Eds Zagonand I.S., McLaughlin P.J.* N. Y.: Chapman & Hall, 1993. P. 43–53.
- Yusuf S., Al-Saady N., Camm A.J.* 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2003. V. 14. P. 209–214.
- Zakharova L.A., Malyukova I.V., Proshlyakova E.V. et al.* Hypothalamo-pituitary control of the cell-mediated immunity in rat embryos: role of LH-RH in regulation of lymphocyte proliferation // *J. Reprod. Immunol.* 2000. V. 47. P. 17–32.

Brain Is a Source of Blood Serotonin in Rats during Perinatal Development

D. I. Nasyrova^a, N. A. Urtikova^a, A. Ya. Sapronova^{a,b}, M. V. Ugryumov^{a,b}

^a Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia

^b Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences,
Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

e-mail: Anna_Sapronova@mail.ru

Abstract—The aim of this study was to test our hypothesis that the brain functions as an endocrine organ before the blood–brain barrier is formed. A model of drug-inhibited serotonin synthesis in the brain using a single stereotactic administration of p-chlorophenylalanine, an inhibitor of serotonin synthesis, was developed. The inhibitor dose inducing the maximum effect in the brain and no effect on serotonin synthesis in the periphery was experimentally selected. The concentration of serotonin and its metabolites (5-hydroxytryptophan and 5-hydroxy-indoleacetic acid) was studied by high performance liquid chromatography in the brain, duodenum, and blood (separately in plasma and platelets). The optimal p-chlorophenylalanine dose (200 mg/kg) was shown to induce a sharp decrease in the brain level of serotonin (70%), a moderate decrease in plasma (16%) and platelets (26%), and an insignificant decrease in the duodenum (12%). At the same time, this dose did not decrease the 5-hydroxytryptophan level in the intestine. This suggests that the decrease in the blood level of serotonin was due to the inhibition of its synthesis in the brain, whereas the decrease in the duodenum level of serotonin was due to the compensatory release to blood while its synthetic rate remained unaltered. Thus, the developing brain before the blood–brain barrier formation was shown to secrete serotonin into blood.

Key words: rat, brain, duodenum, blood, serotonin, p-chlorophenylalanine.