

На правах рукописи

Беляева Юлия Андреевна

**ВЛИЯНИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ
ПИЩЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
НА ПОВЕДЕНИЕ ДЕТЕНЬШЕЙ БЕЛЫХ КРЫС**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
специальность 03.00.13 - физиология

МОСКВА - 2008

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных
Биологического факультета Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук, проф. В.А. Дубынин

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, в.н.с.

И.И. Полетаева

кандидат биологических наук, в.н.с.

И.Ю. Шамакина

Ведущая организация:

НИИ общей патологии и патологической физиологии РАМН

Защита состоится 2 июня 2008 г. в 15 час 30 мин на заседании
диссертационного совета Д501.001.93 при Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова по адресу:
119992, Москва, Ленинские горы 1/12, МГУ им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического
факультета МГУ.

Автореферат разослан 28 апреля 2008 г.

Ученый секретарь совета,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Показано, что пептидные фрагменты, полученные при энзиматическом гидролизе пищевых белков, обладают биологической активностью и способны воздействовать на многие системы организма, включая пищеварительную, иммунную, нервную (Hartmann, Meisel, 2007). Некоторые из таких фрагментов характеризуются опиоидными свойствами и, поскольку поступают в организм извне, названы «экзорфинами». К этой группе относят пептиды, выделенные из гидролизатов пшеничного глютена (экзорфины А, В и С), казеинов молока (казоморфины), белка зеленых листьев РУБИСКО (рубисколины). Сюда же примыкают пептиды, образующиеся в ходе ферментативной деградации гемоглобина (геморфины), цитохрома b (цитохрофины) и ряд других.

Данные о функциональных характеристиках большинства экзорфинов отрывочны и фрагментарны. В настоящий момент относительно хорошо изучены лишь β -казоморфины (Brantl et al., 1979). Известно, что их присутствие в молоке характерно, прежде всего, для млекопитающих, чьи детеныши рождаются зрячими. Пептиды группы β -казоморфинов обладают анксиолитическими свойствами, обуславливая лучшую адаптацию новорожденных к стрессогенной окружающей среде и усиливают их потребность находиться в тесном контакте с матерью (Meisel, 1997; Ивлева, 2004). Хроническое введение β -казоморфинов в ранний постнатальный период оказывает выраженное адаптогенное действие на мозг детенышей, которое сохраняется в течение длительного времени (Малиновская, 2001). В основе подобной активности β -казоморфинов, по-видимому, лежит их способность влиять на образование факторов роста нервной ткани либо самим функционировать в качестве нейротрофических факторов (Sakaguchi et al., 2003). По общему мнению, β -казоморфины в раннем постнатальном периоде выполняют роль своеобразных «экзогормонов», и онтогенез мозга многих млекопитающих (в том числе, человека) предполагает их поступление в организм в первые недели и месяцы жизни (Teshemacher, 2003).

Экзорфины не-молочного происхождения (рубисколины, фрагменты глютена и др.) отличаются от производных казеина по первичной структуре и специфичности связывания с разными типами опиоидных рецепторов (Yoshikawa et al., 1993; Freeman, Young, 2000; Yang et al., 2003). Можно предположить, что, по крайней мере, некоторые из них в ходе эволюции стали играть роль аллелопатических факторов, защищающих растения от поедания животными (по аналогии с непептидными алкалоидами, например, морфином). Так, показано, что среди целого ряда опиоидных лигандов различной природы наиболее выраженное действие на защитную реакцию насекомых оказывает именно рубисколин-5 (Грицай с соавт., 2008).

Однако, если принять гипотезу об аллелопатической функции некоторых не-молочных экзорфинов, можно ожидать, что их применение приведет к развитию целого ряда негативных эффектов. В диетологии уже более 20 лет дискутируется проблема безглютенового питания, причем не только по поводу

целиакии (иммунологической непереносимости белков злаков), но и в связи с присутствием экзорфинов в составе молекул глютенов. При этом опиоидные фрагменты как пшеничных, так и других пищевых белков рассматриваются в качестве факторов, способствующих развитию аутизма и даже синдрома внезапной остановки дыхания (Kidd et al., 2002).

Все это доказывает актуальность изучения как острых, так и отставленных эффектов введения экзорфинов экспериментальным животным (прежде всего, новорожденным). Представляется важным, во-первых, исследовать саму способность экзорфинов оказывать влияние на поведение детенышей млекопитающих; во-вторых, попытаться оценить баланс положительных и отрицательных последствий их применения на разных этапах постнатального развития.

Цель и задачи исследования. Целью представленной диссертационной работы явился анализ поведенческих эффектов ряда экзорфинов при однократном и хроническом системном введении детенышам белых крыс. В работе были поставлены следующие задачи:

- изучить действие острого введения рубисколина-5, экзорфина С и цитохрофина-4 на исследовательскую активность, уровень тревожности и поведенческие проявления депрессивности детенышей;
- изучить действие хронического (1-14 дни жизни) введения рубисколина-5, экзорфина С и цитохрофина-4 на те же параметры поведения экспериментальных животных;
- исследовать действие острого введения рубисколина-5, экзорфина С и цитохрофина-4 на способность детенышей крыс к обучению с положительным и отрицательным подкреплением;
- исследовать действие рубисколина-5, экзорфина С и цитохрофина-4 на способность детенышей крыс к обучению в случае их хронического применения (1-14 дни жизни);
- сопоставить обнаруженные эффекты с влиянием острого и хронического введения β -казоморфинов на поведение экспериментальных животных.

Научная новизна. Опиоидные фрагменты белков пищевого происхождения являются мало изученной группой регуляторных пептидов. В связи с этим практически все полученные нами результаты можно квалифицировать как новые и не имеющие аналогов в литературе.

В работе впервые показано, что при однократном введении детенышам крыс рубисколин-5 способен вызывать увеличение тревожности, ухудшение обучения с положительным подкреплением, снижать проявления депрессивности. Цитохрофин-4 оказывал в наших опытах анксиолитическое и продепрессантное действие, ухудшал обучение с положительным и отрицательным подкреплением. Влияние экзорфина С при однократном введении было мало выражено. Полученные результаты указывают на индивидуальный паттерн физиологической активности исследованных пептидов как в сравнении друг с другом, так и по отношению к ранее изученным β -казоморфинам. Причиной этого, по-видимому, служат различия

их первичной структуры и разная селективность по отношению к опиоидным рецепторам μ -, δ - и κ -типов; в большинстве случаев эффекты рубисколина-5 и цитохрофина-4 были зависимы от пола.

Впервые обнаружено, что при хроническом введении детенышам крыс рубисколин-5 и экзорфин С способны вызывать снижение тревожности, рост исследовательской активности, улучшение обучения с положительным подкреплением; фрагмент РУБИСКО, кроме того, ослаблял поведенческие проявления депрессивности. Введение цитохрофина-4 привело к снижению тревожности и росту исследовательской активности, улучшению обучения с отрицательным подкреплением и незначительному ухудшению обучения с положительным подкреплением. Полученные данные указывают на сходство эффектов и, по-видимому, общность механизмов влияния опиоидных пептидов пищевого происхождения, хронически вводимых в раннем постнатальном периоде, на поведение детенышей белых крыс (по крайней мере, в случае рубисколина-5, экзорфина С и β -казоморфинов); отставленные эффекты исследованных пептидов были зависимы от пола.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты позволяют значительно расширить представления о физиологической роли опиоидных фрагментов пищевых белков. На примере детенышей крыс нами проанализирована ситуация, в которой находится нервная система каждого новорожденного, получающего с питанием экзорфин-содержащие протеины (что справедливо и в отношении человека). Опиоидные фрагменты РУБИСКО, глютена и цитохрома b при попадании в организм новорожденных млекопитающих способны оказывать существенное нейротропное (изменяющее поведение) действие. В значительной части случаев это действие имеет отставленный характер, проявляется через несколько недель после окончания введения пептида и сохраняется в течение длительного времени. В целом можно заключить, что входящие в питание новорожденных опиоидные пептидные компоненты являются физиологически значимыми факторами, от наличия либо отсутствия которых зависит реализация многих важнейших (в смысле выживания и полноценного развития) поведенческих реакций детеныша. В первую очередь, это относится к уровню исследовательской активности, тревожности, а также способности к обучению.

Практическая значимость представленной работы связана с оценкой роли различных белковых компонентов смесей, используемых для питания новорожденных. Полученные результаты свидетельствуют о важности учета наличия либо отсутствия в заменителях молока как избытка, так и недостатка опиоид-содержащих протеинов (в том числе растительного происхождения).

Апробация работы. Апробация результатов представленного диссертационного исследования успешно прошла на 2-м съезде Российского Научного Общества фармакологов (Москва, 2003), Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Москва, 2003), Международной конференции FENS (Лиссабон, 2004), 8-м Международном съезде ECNP (Москва, 2005), 2-м Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Санкт-Петербург, 2005), на конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные

аспекты» (Москва, 2005), 3-м Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Пушино, 2007), 20-м съезде физиологического общества имени И.П. Павлова (Москва, 2007), а также на заседаниях кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 19 рисунков и 30 таблиц. Список литературы включает 245 источников, из них 22 отечественных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на беспородных белых крысах, выращенных в виварии кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ. Производители были получены из вивария Института общей патологии и патологической физиологии РАМН. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище по одному выводку в клетке. День родов принимали за нулевой день жизни детенышей. При достижении крысятами возраста 28-30 дней кормящую самку отсаживали. Каждый выводок делили пополам на контрольных и опытных животных с примерно равным числом самцов и самок в каждой группе. Всего в экспериментах было использовано 480 детенышей крыс обоего пола.

Изучавшиеся в ходе экспериментов экзорфин С (Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu), рубисколин-5 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu) и цитохрофин-4 (Tyr-Pro-Phe-Thr) были синтезированы во Всероссийском кардиологическом научно-производственном центре МЗ и СР РФ под руководством Ж.Д. Беспаловой.

Пептиды в разных сериях экспериментов вводили внутрибрюшинно в водном растворе из расчета 1 мл/кг веса животного. Контрольным крысам инъецировали эквивалентные объемы дистиллированной воды. Доза пептидов как при остром, так и при хроническом введении составила 5 мг/кг. Выбор дозы был обусловлен результатами предыдущих экспериментов с β -казоморфинами, а также с экзорфином С и геморфином-6 (Дубынин, 2001). Острое введение препаратов подразумевало под собой внутрибрюшинную инъекцию в день эксперимента за 10 минут до тестирования животного; хроническое – внутрибрюшинную инъекцию препаратов в 1-14 дни постнатального развития (1 раз в сутки).

В случае серий как с острым, так и с хроническим введением схема экспериментов была построена следующим образом:

- 21 день жизни – тестирование в открытом поле со сменой освещенности;
- 28 дней – тестирование в крестообразном приподнятом лабиринте (КПЛ);
- 35 дней – повторное тестирование в открытом поле со сменой освещенности;
- 36-39 дней – обучение в сложном лабиринте с пищевым подкреплением;
- 40-41 день – переучивание в зеркально-отраженном варианте сложного лабиринта;
- 42 дня – выработка условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ);

- 46 день – проверка сохранения УРПИ;
- 53 дня – тест «принудительное плавание».

Тест "открытое поле". Использованное нами открытое поле представляет собой круглую арену диаметром 80 см, окруженную стенкой высотой 40 см. При тестировании животное помещали в центр арены и поминутно визуальную регистрировали следующие показатели: горизонтальную двигательную активность (пробег); вертикальную двигательную активность (стойки); груминг; отходы от стенки арены и выходы в центр. Над ареной на высоте 80 см находились лампа накаливания мощностью 200 Вт и красная лампа (15 Вт). Процедура тестирования была основана на методе, предполагающем оценку поведения в течение 5 мин (Родина с соавт., 1993). При этом первые 3 мин был включен яркий свет; затем вместо яркой лампы на 1 мин включали красную, после чего восстанавливали исходный уровень освещенности.

Тест "приподнятый крестообразный лабиринт". Длина рукавов лабиринта составляет 35 см, ширина 10 см, высота стенок 20 см. Два противоположных рукава затемнены и закрыты с боков и торцов стенками; два других – освещены и открыты (не имеют стенок). Лабиринт устанавливали на высоте 50 см от пола. Крысу помещали в центр лабиринта, после чего в течение 3 мин визуальную регистрировали: латентный период захода в закрытый отсек; общее время нахождения на свету; количество стоек, выполненных в темном и светлом отсеках; груминг; количество выглядываний из темных отсеков камеры; количество переходов из отсека в отсек, количество свешиваний со светлых рукавов лабиринта; количество выходов на начало и концы светлых рукавов.

Тест «принудительное плавание». Оценка проявлений депрессивности проводилась в цилиндрической емкости объемом 25 л, которая на 2/3 была заполнена водой с температурой 27-28°C. Животное на 10 мин помещали в воду; при этом регистрировались общая длительность активного плавания (крыса совершает активные плавательные движения, перемещаясь внутри емкости), пассивного плавания (крыса производит редкие одиночные движения), а также иммобилизации. Определялось, кроме того, число периодов активного плавания, пассивного плавания и иммобилизации; латентный период 1-го пассивного плавания и 1-ой иммобилизации; длительность 1-ой иммобилизации.

Обучение в сложном лабиринте. Выработку условной пищедобывательной реакции на место проводили в "сложном лабиринте" в возрасте 36-41 дня. Сложный лабиринт представляет собой квадратную камеру (размер 60x60x25 см), разделенную пятью прозрачными перегородками на 6 коридоров. В каждой перегородке имеется прямоугольное отверстие. В ходе обучения, которое проводилось в течение 4 дней, животное помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно. Длительность посадок («попыток») не превышала 3 мин. В качестве подкрепления использовались хлебные шарики. В начале каждой посадки крысу переносили в стартовый отсек (ближайший к экспериментатору коридор), после чего визуальную регистрировали: время выхода из стартового

отсека (латентный период выхода), время реакции (латентный период взятия подкрепления); количество выполненных реакций (число случаев, когда животное находило подкрепление в течение 3 мин пребывания в лабиринте); количество ошибок (число отклонений от оптимальной траектории движения, когда крыса после прохода очередного отверстия в перегородке сворачивает в "неверную" сторону), количество возвратов в предыдущий отсек. Также регистрировалось число стоек и актов груминга. После 4 дней обучения животных переучивали в течение 2 дней путем зеркального переворачивания перегородок с отверстиями. В дни эксперимента крыс кормили один раз в сутки непосредственно после опыта. В сериях с острым введением экзорфинов инъекция препаратов проводилась только в дни обучения, но не при переучивании.

Выработка условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Условный рефлекс пассивного избегания болевого раздражителя вырабатывали в камере размером 50x22x35 см, разделенной перегородкой на два неравных отсека; меньший отсек ярко освещался, второй был затемнен. Камеру устанавливали на решетчатый пол, соединенный с электростимулятором. В первый день эксперимента (день обучения) животное помещали в освещенный отсек камеры и регистрировали время перехода в темноту. После перехода отверстие в перегородке закрывали и на пол в течение 3 с подавали прямоугольные импульсы тока напряжением 90 В и длительностью 10 мс (частота 50 Гц). На 4-й день после обучения тестировали сохранение навыка. Для этого животное вновь помещали в светлую часть камеры и регистрировали латентный период перехода в затемненный отсек, а также общее время нахождения в темноте в течение 3 мин наблюдений. Острое введение препаратов осуществляли только в день обучения; в день оценки сохранения навыка пептиды не инъектировали.

Статистическая обработка данных. При обработке результатов использовали стандартный пакет программ STATISTICA. Вычисляли средние (AM), ошибки средних (SEM), дисперсии и стандартные отклонения (SD) массивов данных. При сравнении средних и форм распределений применялись параметрический критерий Стьюдента и непараметрические критерии (Манна-Уитни, χ^2 , точный Фишера). Использовались также различные варианты ANOVA-статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Острое и хроническое введение рубисколина-5.

Опиоидный фрагмент рубилозо-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы (РУБИСКО) рубисколин-5 оказал значимое влияние на поведение детенышей крыс как при остром, так и при хроническом введении.

В возрасте 21 день однократная инъекция рубисколина-5 за 10 мин до помещения в открытое поле не повлияла на пробег экспериментальных животных. Вместе с тем, общее количество отходов от стенки арены и выходов в центр поля оказалось значимо снижено в опытной группе ($p < 0.05$; рис. 1). Основной вклад в этот эффект рубисколина-5 внесла подгруппа самцов. Кроме того, у самцов, получивших инъекции пептида, зарегистрировано снижение количества стоек на 2 и 3 мин эксперимента ($p < 0.05$).

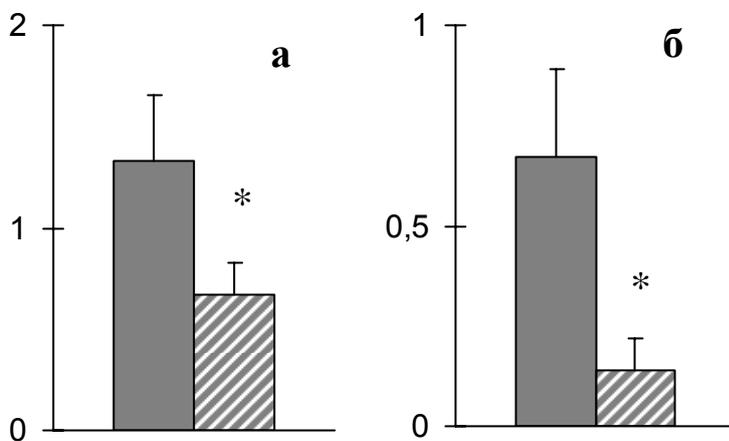


Рис. 1. Влияние однократного введения рубисколина-5 на количество отходов от стенки (а) и выходов в центр арены (б) за 5 мин тестирования в «открытом поле» (возраст 21 день). Темные столбики – контроль (n=23), заштрихованные – опытная группа (n=21). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

При тестировании в крестообразном лабиринте в возрасте 28 дней и помещении в открытое поле в возрасте 35 дней не выявлено каких-либо достоверных изменений поведения животных под действием пептида.

Влияние острого введения рубисколина-5 на обучение и переучивание крыс в сложном лабиринте проявилось в увеличении количества возвратов, совершенных опытными животными в 1 день эксперимента, а также за все 4 дня выработки навыка (1.5 ± 0.2 по сравнению с 0.9 ± 0.2 в контроле, $p = 0.02$ по критерию Стьюдента).

При формировании условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) в возрасте 42 дня достоверных отличий между контрольной и опытной группами не найдено. Вместе с тем, латентный период захода в темный отсек при проверке сохранения навыка был заметно увеличен у животных, получивших пептид, хотя эта тенденция и не достигла уровня значимости ($p = 0.08$).

Оценка проявлений депрессивности в тесте «принудительное плавание» выявила в опытной группе достоверное увеличение длительности активного плавания и латентного периода 1-ой иммобилизации. Количество животных, характеризовавшихся длительностью активного плавания более 200% от среднего уровня контроля, составило 5 из 36 в опытной группе; в контроле такие крысы отсутствовали ($p < 0.05$ по критерию χ^2).

Хроническое введение рубисколина-5 осуществлялось в 1-14 дни жизни. При тестировании в открытом поле в возрасте 21 день достоверного влияния пептида на поведение не зарегистрировано. В крестообразном приподнятом лабиринте (возраст 28 дней) значимое отличие между опытными и контрольными животными выявлено в подгруппе самцов. Крысы, получавшие хронические инъекции рубисколина, совершили 0.6 ± 0.3 переходов из одного темного отсека в другой; в контроле такие переходы отсутствовали ($p=0.03$).

В возрасте 35 дней обнаружено существенно больше значимых расхождений в поведении опытных групп по сравнению с контролем. В более яркой форме они проявились в случае самок; направленность изменений можно оценить как анксиолитическую и приводящую к росту исследовательской активности. На разных минутах тестирования в открытом поле у самок опытной группы были достоверно увеличены пробег (рис. 2б), количество стоек (рис. 3б), число отходов от стенки арены и выходов в ее центр. В максимально выраженной форме это проявилось на 1-й мин помещения в открытое поле, а также на 4-й мин (смена яркого освещения на свет красной лампы). В случае самцов опытной группы подобные изменения отсутствовали (рис. 2а, 3а). Более того, в сравнении с контролем самцы, получавшие в возрасте 1-14 дней инъекции рубисколина-5, совершали достоверно меньше стоек на 4-й мин тестирования, а также меньшее число отходов от стенки арены на 1-й мин тестирования.

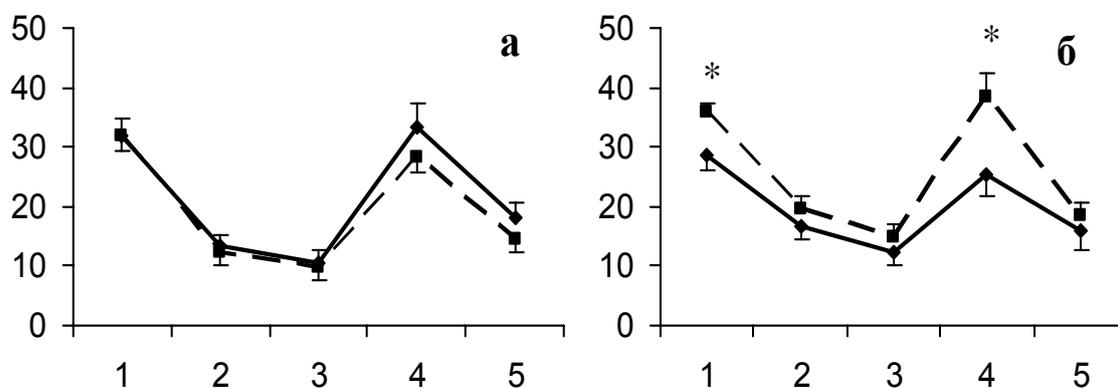


Рис. 2. Влияние хронического введения рубисколина-5 на пробег экспериментальных животных (возраст 35 дней) в «открытом поле» со сменой освещенности. (а) – самцы; (б) – самки. По горизонтали – минуты тестирования; по вертикали – условные единицы пробега. Обозначения: сплошная линия – контроль (самцы: $n=21$, самки: $n=20$); прерывистая линия – опытная группа, получившая в 1-14 дни жизни инъекции пептида (самцы: $n=18$, самки: $n=23$). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

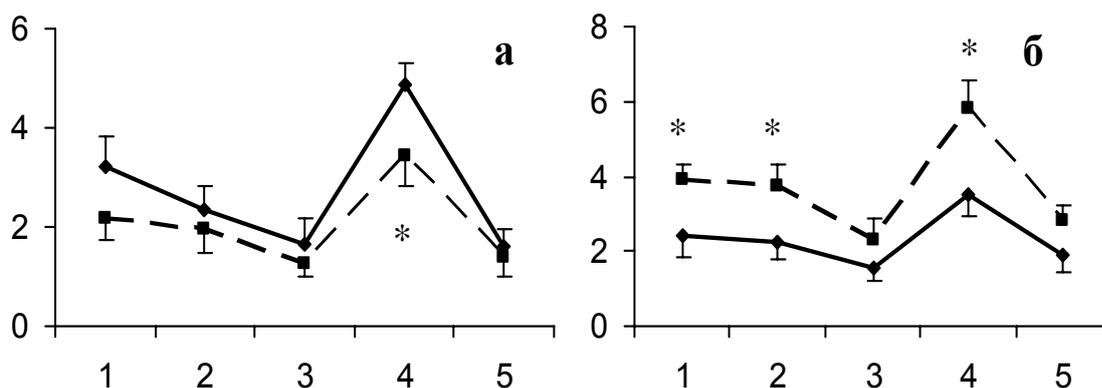


Рис. 3. Влияние хронического введения рубисколина-5 на вертикальную двигательную активность экспериментальных животных (возраст 35 дней) в «открытом поле» со сменой освещенности. (а) – самцы; (б) – самки. По горизонтали – минуты тестирования; по вертикали – количество стоек. Обозначения, как на рис. 2.

При обучении и переучивании детенышей в лабиринте в серии с хроническими инъекциями также выявлены достоверные расхождения в поведении опытной и контрольной групп. Количество реакций в опытной группе было увеличено в 1-й и 2-й дни эксперимента (рис. 4). В последующие дни обучения практически все животные совершали по 5 реакций взятия подкрепления; опытная и контрольная группы могли различаться в этом случае лишь по латентному периоду выхода из стартового отсека, а также времени реакции.

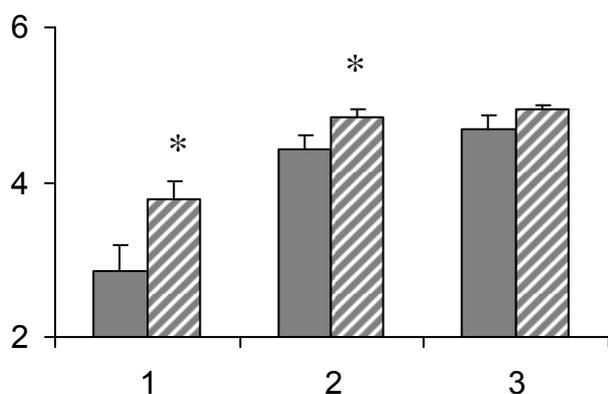


Рис. 4. Влияние хронического введения рубисколина-5 на количество выполненных реакций при обучении в лабиринте (возраст животных 36-38 дней). По горизонтали – дни обучения; по вертикали – число реакций. По Обозначения: темные столбики – контроль (n=41); заштрихованные – опытная группа, получившая в 1-14 дни жизни инъекции рубисколина-5 (n=41). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

Опытные животные стабильно быстрее выходили из стартового отсека и находили подкрепление (рис. 5); значимые отличия выявлены в первые два дня обучения и 1-й день переучивания. Эффекты пептида оказались существенно более выражены у самцов, по сравнению с самками.

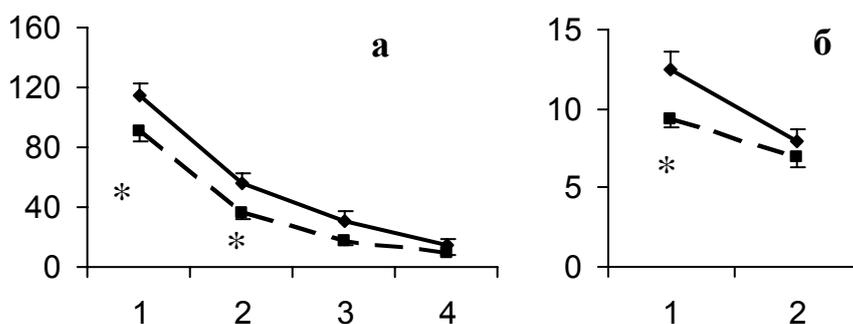


Рис. 5. Влияние хронического введения рубисколина-5 на время нахождения подкрепления при обучении в лабиринте (возраст 36-41 день). По горизонтали – дни обучения и переучивания; (а) – выработка навыка, (б) – переучивание в зеркально-отраженном варианте лабиринта; по вертикали – сек. Обозначения: сплошная линия – контроль (n=41); прерывистая линия – опытная группа, получившая в 1-14 дни жизни инъекции рубисколина-5 (n=41). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

Можно заключить, что у крыс, получивших хронические инъекции рубисколина-5 в 1-14 дни жизни, выявлены явные признаки улучшения обучения. Кроме того, у самцов опытной группы зарегистрировано значимое снижение количества ошибок в сумме за 3-й и 4-й дни обучения (2.3 ± 0.2 по сравнению с 3.4 ± 0.4 в контроле; $p = 0.02$).

При выработке условной реакции пассивного избегания в возрасте 42-46 дней влияния хронического введения рубисколина-5 на параметры поведения выявлено не было.

При оценке проявлений депрессивности в тесте принудительное плавание (возраст 53 дня) обнаружено значимое уменьшение длительности 1-ой иммобилизации в опытной группе (17.4 ± 3.4 с по сравнению с 39.9 ± 10.8 с в контроле, $p < 0.05$). Эффект был существенно более выражен в подгруппе самцов.

2. Острое и хроническое введение экзорфина С.

По сравнению с рубисколином-5, эффекты фрагмента глютена пшеницы экзорфина С были выражены слабее и проявились преимущественно после хронического введения. В сериях с острым введением практически не обнаружено различий в поведении контрольных крыс и животных, которые однократно получали экзорфин С. Лишь при обучении в лабиринте (возраст 36-41 день) после инъекции пептида выявлено увеличение доли относительно хорошо обучившихся особей во 2-й день эксперимента. В опытной группе почти все крысы (41 из 42) выполнили не менее 3-х реакций взятия подкрепления; в контроле таковых оказалось 32 из 40 ($p < 0.02$ по точному критерию Фишера).

В серии с хроническим введением зарегистрирован целый ряд достоверных изменений поведения, являющихся следствием отставленного влияния опиоидного фрагмента глютена. В более яркой форме они обнаружены в подгруппах самок в возрасте 21 день; направленность изменений можно охарактеризовать как анксиолитическую, приводящую к росту исследо-

вательской активности. На разных минутах тестирования в открытом поле у самок, получивших инъекции экзорфина С, был значимо увеличен уровень пробега (рис. 6б), количество стоек, число отходов от стенки арены (рис. 7б) и выходов в ее центр.

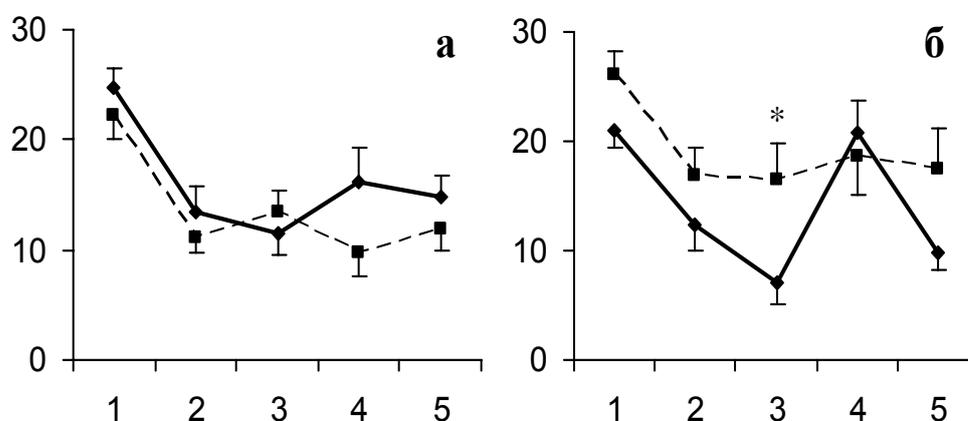


Рис. 6. Влияние хронического введения экзорфина С на пробег экспериментальных животных (возраст 21 день) в «открытом поле» со сменой освещенности. (а) – самцы; (б) – самки. По горизонтали – минуты тестирования; по вертикали – условные единицы пробега. Обозначения: сплошная линия – контроль (самцы: n=21, самки: n=15); прерывистая линия – опытная группа, получившая в 1-14 дни жизни инъекции экзорфина С (самцы: n=20, самки: n=18). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

Пробег и количество стоек, совершенных самцами опытной группы, от контроля не отличались. Более того, число отходов от стенки арены и выходов в ее центр проявили заметную тенденцию к снижению в случае детенышей, получивших инъекции экзорфина С ($p = 0.06-0.09$, рис. 7а).

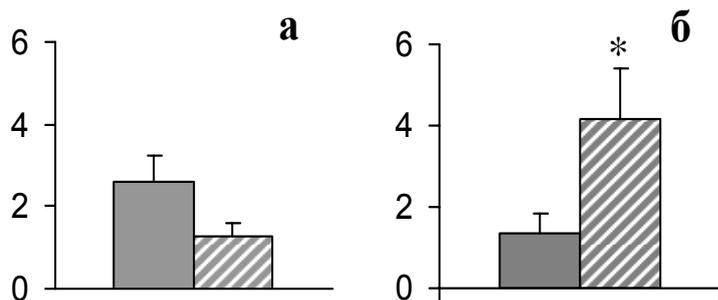


Рис. 7. Влияние хронического введения экзорфина С на количество отходов от стенки арены в «открытом поле» (возраст 21 день). (а) – самцы; (б) – самки. По вертикали – количество отходов. Темные столбики – контроль, заштрихованные – опытная группа (см. рис. 6).

Тестирование крыс в крестообразном приподнятом лабиринте в возрасте 28 дней не выявило каких-либо достоверных отличий между контрольными и опытными животными.

В возрасте 35 дней при повторном помещении в открытое поле у самок опытной группы обнаружено явное ослабление отличий от контроля. Значимого уровня достигло лишь повышение числа отходов от стенки арены на 1-й мин наблюдений ($p < 0.05$). У самцов тенденция к росту тревожности сменилась на признаки ее снижения: число отходов от стенки арены на 5-й мин тестирования

в опытной группе составило 0.5 ± 0.2 ; в контроле 0.1 ± 0.1 ($p < 0.05$). В объединенной группе (без разделения по полу) обнаружено увеличение числа стоек на 1-й мин (1.9 ± 0.3 по сравнению с 1.2 ± 0.2 в контроле, $p < 0.05$).

При обучении в сложном лабиринте у животных, получивших хронические инъекции экзорфина С, выявлено некоторое улучшение выработки навыка. Оно заключалось в росте числа выполненных реакций в первые два дня эксперимента ($p < 0.05$; рис. 8). Изменения в подгруппах самцов и самок были однонаправлены, хотя и имели у самок несколько большую выраженность. При переучивании каких-либо явных отличий опытной и контрольной групп не обнаружено.

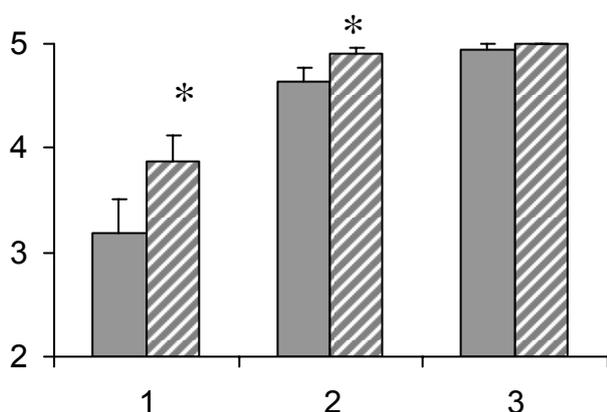


Рис. 8. Количество выполненных реакций при обучении в сложном лабиринте (возраст животных 36-41 день). По горизонтали – дни обучения; по вертикали – число реакций. Сплошная линия – контроль (n=36); прерывистая линия – опытная группа, получившая в 1-14 дни жизни инъекции экзорфина С (n=38). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$ по критерию χ^2).

Обучение с отрицательным подкреплением в возрасте 42-46 дней не выявило эффектов препарата. Также не наблюдалось отличий в поведении животных, получавших хронические инъекции экзорфина С, от контроля в тесте «принудительное плавание» в возрасте 53 дня.

Можно заключить, что острое введение экзорфина С не приводит к заметным изменениям поведения детенышей белых крыс; использованная доза (5 мг/кг) оказалась практически неэффективна во всех возрастных группах. Вместе с тем, хроническое применение этого фрагмента глутена в 1-14 дни жизни вызвало снижение тревожности детенышей, выявленное в открытом поле и более выраженное в подгруппе самок. При помещении в лабиринт животные, получавшие в раннем постнатальном периоде экзорфин С, как и в случае рубисколина-5, продемонстрировали определенное улучшение обучения.

3. Острое и хроническое введение цитохрофина-4.

Влияние опиоидного фрагмента цитохрома b тетрапептида цитохрофина-4 на поведение детенышей белых крыс было значимо как после острого, так и (слабее) после хронического введения.

В наших экспериментах в случае однократной инъекции цитохрофина-4 в возрасте 21 день у опытных животных наблюдались признаки роста исследовательской активности в открытом поле. Общее количество стоек за 5 мин тестирования было достоверно увеличено в опытной группе ($p < 0.05$) (рис. 9). Основной вклад в эффекты пептида внесла подгруппа самок. В случае

самок, получивших инъекцию цитохрофина-4, также было достоверно увеличено количество отходов от стенки арены на 4-й мин наблюдений ($p < 0.05$).

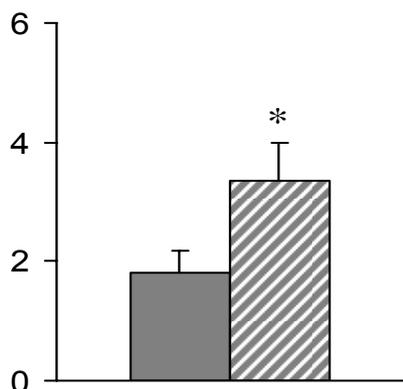


Рис. 9. Влияние однократного введения цитохрофина-4 на общее число стоек за 5 мин тестирования в «открытом поле» со сменой освещенности (возраст 21 день). По вертикали – количество стоек. Темные столбики – контроль (n=22); заштрихованные – опытная группа, получившая цитохрофин-4 за 10 мин до эксперимента (n=20).

При тестировании детенышей в крестообразном приподнятом лабиринте в возрасте 28 дней достоверных эффектов пептида не выявлено.

В 35 дней действие препарата в открытом поле проявилось несколько слабее, чем в 21 день, но осталось достоверным. У самок, получивших инъекцию цитохрофина-4, наблюдался значимый рост пробега на 3-й мин (рис. 10), а также отходов от стенки арены на 1-й мин (0.8 ± 0.2 по сравнению с 0.2 ± 0.1 в контроле, $p < 0.05$). На 1-й мин у самок было, кроме того, увеличено число выходов в центр арены (0.7 ± 0.2 по сравнению с 0.2 ± 0.1 в контроле, $p < 0.05$). У самцов опытной группы, напротив, выявлено снижение количества отходов от стенки арены в условиях освещения красной лампой по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

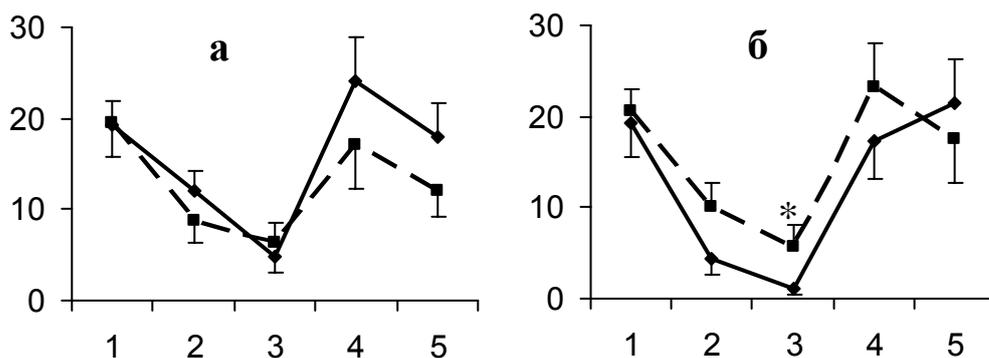


Рис. 10. Влияние однократного введения цитохрофина-4 на пробег экспериментальных животных (возраст 35 дней) в «открытом поле» со сменой освещенности. (а) – самцы; (б) – самки. По горизонтали – минуты тестирования; по вертикали – условные единицы пробега. Обозначения: сплошная линия – контроль (самки n=10; самцы n=12); прерывистая линия – опытная группа (самки n=8; самцы n=12). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

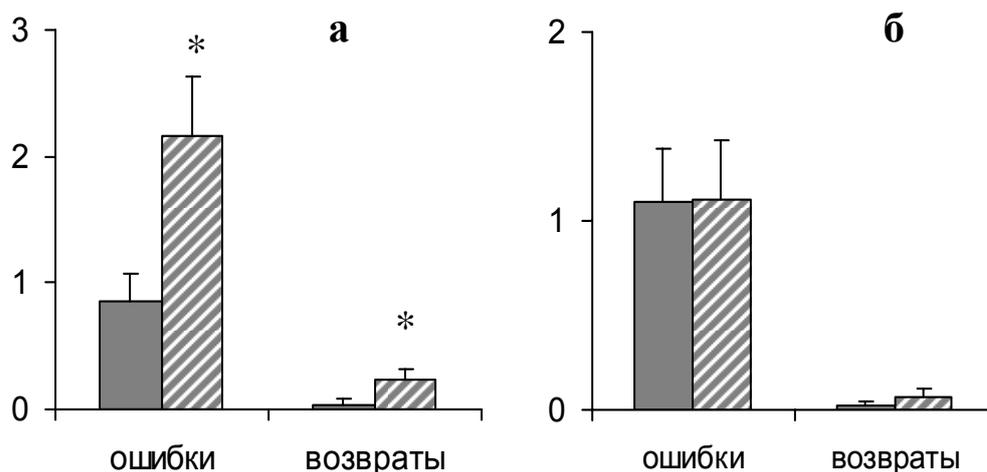


Рис. 11. Влияние однократного введения цитохрофина-4 на количество ошибок и возвратов на 4 день обучения в сложном лабиринте. По вертикали – количество ошибок и возвратов. а – самцы, б – самки. Темные столбики – контроль (самцы n=15; самки n=10); заштрихованные – опытная группа, получившая цитохрофин-4 за 10 мин до эксперимента (самцы n=15; самки n=9). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

При обучении в сложном лабиринте во 2-й день выработки навыка в подгруппе самцов наблюдался рост времени нахождения подкрепления ($p < 0.05$ по критерию χ^2). Также самцы опытной группы выполнили достоверно меньше реакций взятия подкрепления ($p < 0.05$ по критерию χ^2).

В 4-й день обучения эффекты острого введения пептида оказались наиболее выражены. Опытные животные совершили значимо больше ошибок, стоек и возвратов ($p < 0.05$ во всех случаях, рис. 11); основной вклад в наблюдавшиеся изменения вносила подгруппа самцов.

В 1-й день переучивания в зеркально-отраженном варианте лабиринта крысы, получавшие инъекции пептида в течение обучения, медленнее находили подкрепление при первой посадке (34 ± 8.8 с по сравнению с 15.8 ± 2.1 с в контроле, $p < 0.05$), в подгруппе самок это также наблюдалось на второй и третьей посадках ($p < 0.05$).

При выработке у животных УРПИ в возрасте 42-46 дней наблюдалась тенденция к ухудшению обучения ($p = 0.14-0.26$ по критерию Стьюдента). При разделении на подгруппы по полу выявлено значимое снижение латентного периода захода в темноту и увеличение времени в темноте у самок (рис. 12б).

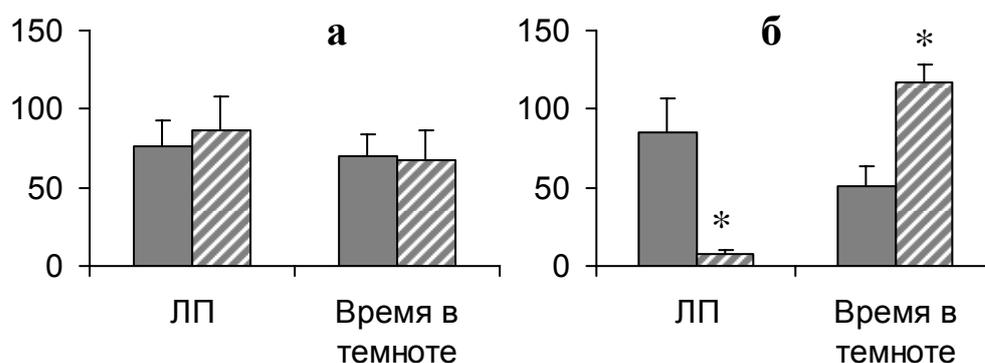


Рис. 12. Влияние однократного введения цитохрофина-4 на обучение животных в тесте УРПИ. Латентный период и время в темноте оценивались на 4 день после выработки навыка (возраст животных 46 дней). (а) – самцы, (б) – самки. Темные столбики – контроль (самцы n=14; самки n=9); заштрихованные – опытная группа, получившая цитохрофин-4 за 10 мин до обучения (самцы n=15, самки, n=9). По вертикали – сек. Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$).

В тесте «принудительное плавание» (возраст животных 53 дня) в подгруппе самок наблюдалось уменьшение количества периодов активного плавания (2.3 ± 0.2 по сравнению с 3.6 ± 0.4 в контроле, $p < 0.01$), а также рост длительности первой иммобилизации (24.9 ± 12.2 с по сравнению с 1.4 ± 1.4 с в контроле, $p = 0.02$ по критерию χ^2). У самцов отличия опыта от контроля отсутствовали.

В серии с хроническим введением при тестировании в возрасте 21 день выявлено увеличение исследовательской активности под действием цитохрофина-4. Это выражалось в значимом росте пробега у крыс опытной группы по сумме 4-й и 5-й мин ($p < 0.05$ по критерию Манна-Уитни, рис. 13а). Кроме того, у животных, получивших инъекции пептида, было увеличено число отходов от стенки арены на 4-й мин наблюдений ($p < 0.02$, рис. 13б).

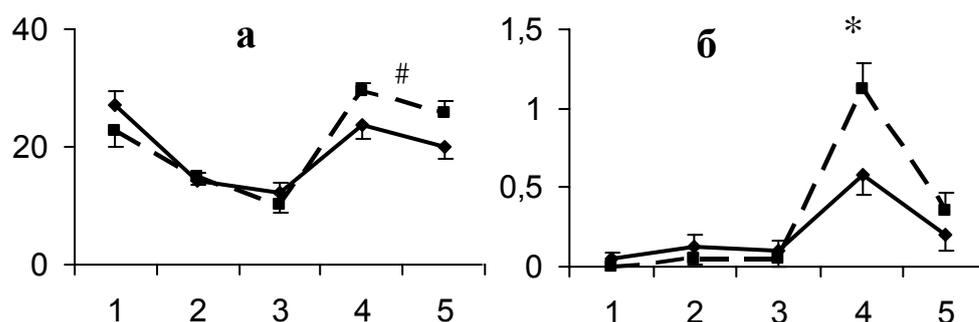


Рис. 13. Влияние хронического введения цитохрофина-4 на пробег (а) и отходы от стенки арены (б) в открытом поле со сменой освещенности в возрасте 21 день. По горизонтали – минуты тестирования, по вертикали – условные единицы пробега и число отходов. Обозначения: сплошная линия – контроль (n=40); прерывистая линия – опытная группа, получившая инъекции пептида в 1-14 дни жизни (n=40). Значимые отличия от контроля отмечены звездочкой ($p < 0.05$); # обозначено достоверное отличие по сумме 4-й и 5-й мин.

При тестировании детенышей в крестообразном приподнятом лабиринте в возрасте 28 дней достоверного влияния пептида на параметры поведения не выявлено.

В возрасте 35 дней единственный значимый эффект обнаружен при оценке количества отходов от стенки арены на 3-й мин тестирования (0.3 ± 0.1 по сравнению с 0.05 ± 0.03 в контроле, $p < 0.05$).

При обучении и переучивании в лабиринте влияние цитохрофина-4, хронически вводимого в раннем постнатальном периоде, на поведение животных было мало выражено. Отличия опытной группы от контроля наблюдались только в 1-ый день эксперимента в подгруппе самцов и выражались в увеличении латентного периода выхода из стартового отсека в первые 3 посадки в установку ($p < 0.05$ по критерию χ^2), а также в росте числа возвратов ($p < 0.05$ по критерию χ^2).

В случае обучения с отрицательным подкреплением в возрасте 42-46 дней наблюдалось некоторое улучшение выработки УРПИ у крыс, получавших цитохрофин-4 в раннем постнатальном периоде. При проверке навыка на 4-й день после обучения опытные животные медленнее заходили в темный отсек (155.2 ± 8.6 с по сравнению с 125.8 ± 11.4 с в контроле, $p < 0.05$).

Тест «принудительное плавание» в возрасте 53 дня не выявил достоверных эффектов хронического введения цитохрофина-4.

Таким образом, в случае острого введения исследованных нами опиоидных фрагментов пищевых белков, у каждого пептида наблюдался индивидуальный паттерн нейротропной активности (табл. 1). Эффекты проявлялись по-разному и зависели от пола и возраста детенышей. Негативные последствия острого применения экзорфинов чаще наблюдались у самцов, адаптивно благоприятные – у самок (особенно в случае влияния на тревожность и исследовательскую активность).

Разнообразие эффектов однократного введения, очевидно, обусловлено, в первую очередь, различной первичной структурой исследованных фрагментов белков. Первичная структура пептида (прежде всего, N-концевой участок) определяет селективность молекулы к разным типам опиоидных рецепторов. Кроме того, длина и аминокислотный состав пептида обуславливают расщепление молекулы пептидазами и связывание транспортерами.

В сравнении с ранее изученными β -казоморфинами, которые являются преимущественными μ -агонистами (Koch et al., 1985), исследованные нами экзорфины обладают иной рецепторной селективностью. Как для рубисколина-5, так и для экзорфина С показана преимущественная сродность к δ -типу опиоидных рецепторов (Yoshikawa et al., 2003). Цитохрофин-4, по мнению описавших его исследователей (Freeman, Young, 2000), может, кроме того, связываться с так называемыми ϵ -опиоидными сайтами.

Табл. 1. Обобщение результатов экспериментов, в которых изучалось влияние острого введения экзорфинов на поведение детенышей белых крыс. Обозначения: ↓ – снижение/ухудшение; ↑ – увеличение/улучшение; 0 – отсутствие эффекта.

	Рубисколин-5	Экзорфин С	Цитохрофин-4
Тревожность	↑	0	↓
Обучение в лабиринте	↓	0	↓
Формирование УРПИ	0	0	↓
Проявления депрессивности	↓	0	↑

Разнообразие последствий острого введения экзорфинов определяется также процессами созревания опиоидной системы мозга – прорастанием аксонов и формированием синапсов, созреванием рецепторов, G-белков и эффекторов. Показано, что μ -тип мест связывания в ходе постнатального развития детенышей крыс достигает «взрослого» уровня раньше, чем δ -тип (Kivell et al., 2004). Представляется вероятным, что исследованные нами пептиды могли сначала (при введении в возрасте 21-28 дней) взаимодействовать с μ -рецепторами, но по мере созревания ЦНС переключаться на более селективные сайты связывания.

Отметим также, что в сравнении с β -казоморфинами исследованные нами экзорфины характеризуются пониженной устойчивостью к ферментативной деградации, поскольку в состав их молекул входит лишь один остаток пролина. Этим можно объяснить тот факт, что последствия однократного введения экзорфина С практически не проявились, а эффекты рубисколина-5 и цитохрофина-4 становились слабее с возрастом. В случае β -казоморфинов обнаружено явное нарастание активности пептидов с возрастом (Ивлева, 2004).

В случае хронического введения опиоидных фрагментов пищевых белков наблюдались многочисленные отставленные изменения поведения животных. При этом направленность эффектов для рубисколина-5 и экзорфина С совпадала и была близка к последствиям хронического введения β -казоморфинов. Для всех перечисленных пептидов характерно анксиолитическое действие, снижение проявлений депрессивности и улучшение обучения с положительным подкреплением.

Отставленное влияние цитохрофина-4 оказалось сходным с эффектами других исследованных пептидов лишь в части, относящейся к балансу тревожности и исследовательской активности. На процессы обучения

цитохрофин-4 оказал весьма «индивидуальное» действие – незначительно ослабил выработку навыка с положительным подкреплением и улучшил формирование УРПИ. По-видимому, такая специфика эффектов тетрапептида, является следствием присущих только цитохрофину-4 механизмов, через которые реализуются последствия его хронического введения.

Табл. 2. Обобщение результатов экспериментов, в которых изучалось влияние хронического введения экзорфинов на поведение детенышей белых крыс. Обозначения, как в табл. 1. (↓) – ухудшение обучения в 1-й день выработки навыка.

	Рубисколин-5	Экзорфин С	Цитохрофин-4
Тревожность	↓	↓	↓
Обучение в лабиринте	↑	↑	(↓)
Формирование УРПИ	0	0	↑
Проявления депрессивности	↓	0	0

Показано, что отставленное действие опиоидов в раннем постнатальном периоде может развиваться через места связывания, отличающиеся от классических μ -, δ - и κ -рецепторов (Zagon et al., 2000). Хронически вводимые опиоиды могут модулировать эффекты факторов роста нервной ткани, а также взаимодействовать с ними. Кроме того, опиоидные пептиды различного происхождения (в том числе и пищевого) сами могут функционировать как факторы нейритогенеза (Sakaguchi et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейротропная активность наиболее известных опиоидных пептидов пищевого происхождения β -казоморфинов изучается на кафедре физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ с начала 90-х годов (Маклакова, 1996; Малиновская, 2001; Дубынин, 2002; Ивлева, 2004). За это время доказана их способность в случае системного введения белым крысам влиять на болевую чувствительность, двигательную активность, тревожность, выработку навыков с разным знаком подкрепления, материнскую мотивацию. Однако β -казоморфины не являются единственной группой опиоидных пептидов пищевого происхождения. Эндорфино-подобные фрагменты глютена, РУБИСКО, гемоглобина, цитохрома b и ряд других обнаруживаются и описываются в течение последних 30 лет (Liebmann et al., 1989; Zhao et al., 1997; Yang et al., 2001). Вместе с тем, их изучение почти не проводится, несмотря на существование целого круга проблем, связанных с питанием новорожденных. Так, в медицинской литературе активно обсуждается вред и польза диет, свободных от казеинов и глютен, связь экзорфинов с генезом аутизма и ряд других вопросов (Kidd et al., 2002; Sun et al., 2003).

С точки зрения фундаментальных аспектов биологических исследований чрезвычайно интересно, являются ли опиоидные фрагменты не-молочных белков случайно сформировавшимися последовательностями аминокислот либо их присутствие в молекулах соответствующих протеинов можно объяснить определенной биологической целесообразностью. Второй вариант ответа, весьма вероятно, допустим в случае геморфинов, которые отчасти сходны с ангиотензинами (в том числе – в отношении ускорения репарационных процессов в поврежденных тканях) (Albiston et al., 2004; Ianzer et al., 2006). В свою очередь, цитохрофины и сходные с ними рецепторфины (Kampa et al., 2001) навряд ли способны выщепляться при повреждении клеток либо переваривании пищи в ЖКТ в значительных количествах. Следовательно, их функционирование в организме в качестве сигнальных молекул представляется весьма сомнительным.

Особого внимания заслуживают опиоидные пептиды растительного происхождения: фрагменты глютена, РУБИСКО и недавно открытые сойморфины (Ohinata et al., 2007). Представление о них, как аллелопатических факторах, возникших в ходе эволюции растений для защиты от поедания животными (прежде всего, насекомыми) не лишено правдоподобия (Yang et al., 2001). Конечно, экзорфины уступают по активности непептидным лигандам опиоидных рецепторов морфину и кодеину. Но, с другой стороны, существует немало примеров, когда естественный отбор «подхватывал» мелкие, на первый взгляд, видоизменения живых организмов – если те имели адаптивный характер. В пользу защитной (аллелопатической) роли опиоидных фрагментов растительных белков свидетельствует обнаруженная Грицай с соавт. (2008) высокая (выше, чем к морфину) чувствительность тараканов *P. americana* к введению экзорфина С и, особенно, рубисколина-5.

На взрослых млекопитающих, обладающих развитыми системами ферментативной деградации пищевых белков, экзорфины растительного происхождения при системном введении влияют лишь в очень высоких дозах (десятки и сотни мг/кг; Yoshikawa et al., 2003; Hirata et al., 2007). Иная ситуация наблюдается в случае детенышей с их незрелыми системами протеолиза пролин-содержащих пептидных последовательностей, слабыми кишечным и гемато-энцефалическим барьерами (Ganapathy et al., 2005). Здесь экзорфины, казалось бы, имеют вполне реальный шанс оказать свое защитное действие, нарушив те или иные функции мозга. Однако первичная структура эндорфиноподобных молекул, принимающих участие в защите растений от насекомых, в случае млекопитающих в значительной мере совпала с последовательностью с β -казоморфинов – пептидов, уже рекрутированных на роль регуляторных факторов. То есть фрагменты глютен и РУБИСКО «попадают в ту же цель», что β -казоморфины, вызывая, хотя и слабее, снижение тревожности и улучшение обучения с положительным подкреплением. В наиболее явной форме это наблюдается при хроническом введении, которое, по сути дела, имитирует реальное потребление новорожденными экзорфинов с пищей.

Полученные в нашей работе данные в целом не подтверждают представления о неблагоприятном действии экзорфинов на организм новорожденных. Для развития такого действия, судя по всему, нужны дополнительные факторы (например, гиперчувствительность к опиоидам вообще, аномально высокая проницаемость ГЭБ и т.п.).

Важно также подчеркнуть, что наше исследование направлено на описание и анализ положения, в котором оказывается нервная система практически каждого ребенка, питающегося молоком с опиоид-содержащими казеинами, либо, напротив, не получающего такого молока (но получающего экзорфины с несколько иной первичной структурой, например, растительного происхождения). Последняя ситуация возникает при кормлении детей разнообразными заменителями материнского молока, и знания о возможных ее последствиях (в том числе отставленных) позволяют внести важные штрихи в общую картину процессов, протекающих в ЦНС в раннем постнатальном периоде.

ВЫВОДЫ

1. Фрагмент РУБИСКО рубисколин-5 при однократной инъекции детенышам белых крыс вызвал увеличение тревожности и ухудшение обучения с положительным (пищевым) подкреплением, снизил проявления депрессивности; при хроническом введении (1-14 дни жизни новорожденных) – оказал отставленное анксиолитическое и антидепрессантное действие, улучшил выработку пищедобывательного навыка.
2. Влияние опиоидного фрагмента глутена экзорфина С на поведение детенышей при однократном применении было незначимо на всех сроках тестирования; в случае хронического введения эффекты пептида проявились в снижении тревожности, увеличении исследовательской активности и улучшении обучения с пищевым подкреплением, несколько менее выраженном, чем в случае рубисколина-5.
3. Опиоидный фрагмент цитохрома b цитохрофин-4 при однократном применении оказал анксиолитическое и продепрессантное действие, ухудшил обучение с положительным и отрицательным подкреплением; при хроническом введении – вызвал снижение тревожности, улучшение обучения с отрицательным подкреплением и некоторое ухудшение выработки пищедобывательного навыка.
4. В сравнении с эффектами однократного применения, последствия хронического введения экзорфинов в раннем постнатальном периоде характеризовались значительно большей степенью сходства, что свидетельствует о меньшей зависимости отставленного действия опиоидных пептидов пищевого происхождения от их первичной структуры.
5. Выявлены половые различия в реакции животных на введение рубисколина-5, экзорфина С и цитохрофина-4; при оценке тревожности и исследовательской активности показано, что экзорфины оказывают на самок адаптивно более благоприятное действие, чем на самцов.
6. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о важности учета нейротропной активности опиоидных фрагментов белков животного (ранее изученные β -казоморфины) и растительного (рубисколина, фрагменты глутена) происхождения, входящих в питание новорожденных.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дубынин В.А., Ивлева Ю.А., Слюсаренко (Беляева) Ю.А., Каменский А.А. Нейротропные эффекты экзорфинов - опиоидных пептидов пищевого происхождения. Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. Тезисы докладов. М., 2003 г., стр. 33.
2. Вылегжанина А.В., Слюсаренко (Беляева) Ю. А., Ивлева Ю.А., Дубынин В.А., Андреева Л.А., Каменский А.А. Влияние бета-казоморфина-7 на тревожно-депрессивные проявления поведения детенышей белых крыс различного возраста // News of Biomedical Sciences. 2004. №1. стр.7-12.
3. Slusarenko (Belyaeva) J., Dobryakova J., Stovolosov I., Dybynin V., Kamensky A. Influence of food-derived opioid peptides on the level of defence motivation and learning ability of white rat pups. FENS Abstr., 2004, v.2, p. 115-116.
4. Слюсаренко (Беляева) Ю. А., Стоволосов И.С., Беспалова Ж.Д., Дубынин В.А. Влияние экзорфинов на уровень оборонительной мотивации детенышей крыс и их способность к обучению. Тезисы докладов XI международной конференции «Ломоносов-2004», секция биология, 2004, стр. 145.
5. Дубынин В.А., Ивлева Ю.А., Слюсаренко (Беляева) Ю. А., Добрякова Ю.В., Стоволосов И.С., Каменский А.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Бета-казоморфины как факторы регуляции поведения млекопитающих в раннем постнатальном периоде. Тезисы докладов III Российского Конгресса по патофизиологии “Дизрегуляторная патология органов и систем (экспериментальная и клиническая патофизиология)” М., 2004, стр. 272с.
6. Слюсаренко (Беляева) Ю. А., Стоволосов И.С., Дубынин В.А., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Влияние опиоидного фрагмента глютена пшеницы на обучение детенышей белых крыс. Рос. Физиол. Журн. им. И. М.Сеченова. 2004, т.90. №8. с.123.
7. Стоволосов И.С., Беляева Ю.А. Влияние пептида пищевого происхождения рубисколина-5 на поведение детенышей белых крыс при остром и хроническом введении // Тезисы докладов 12 международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005», секция биология, М., 2005 г., с. 204.
8. Беляева Ю.А., Стоволосов И.С., Дубынин В.А., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Нейротропные эффекты введения рубисколина-5 (YPLDL): однократное и хроническое введение детенышам белых крыс // 2-й Российский симпозиум по химии и биологии пептидов, Спб, 2005 г., с. 19.
9. Беляева Ю.А., Стоволосов И.С., Дубынин В.А., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Влияние хронического введения опиоидных фрагментов глютена и гемоглобина на поведение детенышей белых крыс //

- Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты. Научная конф. (нейрохимическое общество РАН), 2005 г., с. 6.
10. Stovolosov I.S., Belyaeva J.A., Dubynin V.A., Kamensky A.A., Bepalova J.D. Influence of food-derived opioid peptides on behaviour and learning ability of white rat pups // European Neuropsychopharmacology, 2005, v. 15, Suppl. 2, p. 191-192.
 11. Belyaeva J.A., Dubynin V.A, Kamensky A.A. Influence of opioid RUBISCO fragment on behaviour and learning ability of white rat pups // Joint Meeting of German Society of Physiology and Federation of European Physiological Societies, Munich, 2006, p.153.
 12. Каменский А.А., Дубынин В.А., Беляева Ю.А. Экзорфины – хорошо или плохо?// Природа, 2006, №5, стр. 23-39.
 13. Беляева Ю.А., Дубынин В.А., Каменский А.А., Беспалова Ж.Д. Анализ поведенческих эффектов хронически вводимого опиоидного фрагмента РУБИСКО – пентапептида YPLDL. 3-й Российский симпозиум «Белки и пептиды». Тезисы стендовых сообщений. Пущино, 2007, стр. 61.
 14. Беляева Ю.А., Стоволосов И.С., Дубынин В.А., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Влияние экзорфинов растительного происхождения на обучение детенышей белых крыс. XX-й съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. М., 2007, стр. 145.
 15. Дубынин В.А., Ивлева Ю.А., Стоволосов И.С., Беляева Ю.А., Добрякова Ю.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние бета-казоморфинов на зависимое от матери («детское») поведение белых крыс. Доклады Академии Наук, 2007, т. 412, № 2, стр. 279-282.
 16. Дубынин В.А., Малиновская И.В., Беляева Ю.А., Стоволосов И.С., Беспалова Ж.Д., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Отставленное влияние экзорфинов на обучение детенышей белых крыс. Известия РАН, серия Биологическая, 2007, № 6, стр. 1-8.
 17. Беляева Ю.А., Дубынин В.А., Стоволосов И.С., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Нейротропная активность экзорфинов, обладающих различным сродством к опиоидным рецепторам мю- и дельта-типов. Нейрохимия, 2008, т. 25, № 1-2, стр. 57-63.
 18. Беляева Ю.А., Дубынин В.А., Стоволосов И.С., Добрякова Ю.В., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Влияние однократного и хронического введения экзорфина С на поведение и обучение детенышей белых крыс. Вестник Московского университета, серия 16, Биология, 2008 (в печати).
 19. Беляева Ю.А., Дубынин В.А., Стоволосов И.С., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Поведенческие эффекты однократного и повторного введения рубисколина-5 – опиоидного фрагмента РУБИСКО. Вестник Московского университета, серия 16, Биология, 2008 (в печати).

