

УДК 612.821.2 + 612.014.42:612.828

Г. П. МИРОНОВА, О. Г. ТИХОНОВИЧ, С. Г. ПАШКЕВИЧ

**ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ И АВТОНОМНЫЕ ФУНКЦИИ
У КРЫС ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ**

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила редакцию 01.08.2014)

Введение. Дофамин является одним из медиаторов, контролирующих моторную активность организма и формирование адаптивного поведения. Механизмы, с помощью которых дофаминергическая система мозга осуществляет контроль поведения, не раскрыты.

В головном мозге выделяют две дофаминергические системы. Первая представляет собой мезолимбический путь, который начинается в клетках интерпедункулярного ядра среднего мозга и заканчивается в гипоталамусе и лобных долях головного мозга [1]. Эта система участвует в регуляции настроения, формировании поведения, контролирует начало двигательного акта, а также движений аффективной реакции (движений, которые сопровождают эмоции). Вторая система начинается в нейронах черной субстанции, аксоны которых через ножку мозга, внутреннюю капсулу, бледный шар доходят до полосатого тела (*corpus striatum*). Терминальные отделы этих аксонов содержат большое количество дофамина и его производных. Согласно литературным данным, дегенерация данного нигростриарного дофаминергического пути является основной причиной развития болезни Паркинсона (БП) [2, 3], а нарушения дофаминергического сигнала могут вызывать развитие многих нейropsychических заболеваний, лекарственную зависимость (привыкание), шизофрению, манию преследования, синдром Туретта, ожирение, которые являются большой социальной проблемой [1, 4–8].

Генотип дофаминового транспортера модулирует стриатные процессы и долгосрочную память, ассоциирующуюся в том числе с наградой или наказанием [9]. Формирование нового опыта требует экспрессии генов в мозге. Современные представления о молекулярно-биологических механизмах обучения и памяти строятся на положении о кратковременной и долговременной формах хранения информации в мозге. В основе этой теории лежит открытие Г. Мюллера и А. Пильзекера, обнаруживших в 1900 г., что переход из кратковременной и легко нарушаемой памяти в долговременную и устойчивую происходит у человека в течение первого часа после получения им новой информации. На системном уровне активность генов в мозге при научении переходит под когнитивный контроль. Влияние какой-либо поведенческой ситуации на экспрессию «ранних» генов в клетках мозга критическим образом зависит от содержания прошлого индивидуального опыта животного и определяется фактором субъективной новизны данного события [10]. Установлено, что положительные мотивации улучшают формирование эпизодической памяти через сеть, включающую *substantia nigra*, вентротегментальную область, стриатум и гиппокамп [3, 11, 12].

При дегенерации дофаминергических нейронов концентрация дофамина в межклеточной среде снижается до уровня, при котором он уже не в состоянии оказывать физиологическое влияние на нейроны-мишени [13]. Далее в нейродегенеративный процесс, приобретающий лавинообразный характер, вовлекаются все новые отделы мозга, связанные уже с регуляцией других немоторных функций. Так, следствием билатерального повреждения нигростриатального пути, вызванного 6-гидроксидофамином, является значительная акинезия, адипсия, афагия и сенсор-

ная нечувствительность у грызунов [14]. Дегенеративный процесс не ограничивается мозгом, а распространяется и на периферическую нервную систему. Например, при БП отмечена дегенерация нейронов, иннервирующих сердце, желудочно-кишечный тракт, слюнные железы, надпочечники и ряд других периферических органов [15]. Помимо аномалий моторной функции у 30 % пациентов с БП выявляются депрессии, трудности глотания, жевания и разговорной речи, проблемы мочеиспускания и пищеварения, замедленность мышления, снижение памяти и деменция [16].

Считается, что развитие нейродегенеративных заболеваний связано с поступлением в организм агентов, специфически токсичных для дофаминергических нейронов [17]. К ним относят инсектициды 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine – МРТР и ротенон [18–20], а также эндотоксины грамотрицательных бактерий [21]. Их специфическое токсическое действие у мышей, приматов и людей проявляется в гибели нейронов компактной части черного вещества (*substantia nigra pars compacta* – РсSN) нигростриатной дофаминергической системы.

Для экспериментального моделирования БП у животных (мышей, дрозофильных мушек, крыс, обезьян) используют два основных типа моделей преคลินิกической (досимптомной) стадии паркинсонизма: генетическую (инъекция токсинов в черное вещество или нигростриатные пути) и токсическую (системное введение инсектицидов и гербицидов (ротенона и др.)) [22].

По данным некоторых авторов [23], внутривенное или подкожное введение ротенона по 2–3 мг/сут в течение 3 недель вызывает у крыс дегенерацию нигростриатных дофаминергических путей. В некоторых случаях при повреждении нигростриатной системы изменялось поведение животных (отмечались снижение двигательной активности, ригидность и даже каталепсия). Показано, что ежедневное подкожное введение препарата Ротенон (2 мг/кг) в течение 3–3,5 недель вызывает у крыс перестройку интегративной деятельности мозга и механизмов выработки и угасания условных рефлексов, изменяя (замедляя) процесс торможения условного рефлекса по сравнению с таковым у интактных животных [24].

Цель исследования – подтверждение гипотезы о модулирующем влиянии функционального состояния дофаминергической системы головного мозга на механизмы контроля эффективности обработки информации и принятия решения, а также на характер проводимости сигналов от моторной коры к органам-эффекторам.

Материалы и методы исследования. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах ($n = 12$) массой 170–200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 23 ± 1 °С, вентиляционный режим 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом ритме освещения и темноты с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [25, 26].

В ходе исследования проводили анализ поведенческой активности крыс с выработанным в челночной камере условным рефлексом избегания, электрической активности нейронов *substantia nigra*, кардио-респираторной системы и активности межреберных мышц после введения в структуры мозга (область *substantia nigra*) препарата Ротенон.

Для изучения процессов запоминания у животных в качестве модели обучения с отрицательным подкреплением использовали тест выработки условных рефлексов в челночной камере по методике [27].

На начальном этапе исследований всех животных в течение 4–5 сут адаптировали к экспериментальным условиям (нивелирование проявлений ориентировочного рефлекса). Затем в течение 5–6 сут у крыс по указанной методике вырабатывали условный рефлекс избегания в челночной камере, состоящей из двух разных по площади отсеков. За один сеанс обучения осуществляли 8–10 сочетаний условного раздражителя (включение света) с безусловным ноцицептивным стимулом (пропускание тока силой 0,008–0,01 мА по решетчатому металлическому полу в течение 1–2 с). Животных, у которых условный рефлекс долгое время не вырабатывался, исключали из эксперимента.

После выработки условного рефлекса избегания (критерием чего было проявление защитного рефлекса на включение света без подкрепления) у всех крыс измеряли латентный период реакции избегания (ЛПРИ) в течение 3 сут (фон).

После измерения фоновых показателей ЛПРИ животным опытной группы ($n = 4$) проводили операцию разрушения дофаминергических структур мозга (микроинъекция токсического препарата Ротенон в область *substantia nigra*), а контрольным крысам ($n = 4$) – трепанацию черепа без введения препарата.

В эксперименте применяли 500 мкг препарата Ротенон (Sigma, Германия), растворенного в 1 мл диметилсульфоксида («Белмедпрепараты», Беларусь). Все операционные процедуры выполняли под кетамин-ксилазин-ацепромазиновым наркозом (55,6; 5,5 и 1,1 мг/кг внутривенно).

После наркотизации крыс фиксировали в стереотаксисе для мелких лабораторных животных. Внутримозговые микроинъекции препарата Ротенон (*substantia nigra*) проводили унилатерально с помощью нанолитровой помпы (W. P. Instruments. Inc. 1400) в объеме 50 нл в течение 1 мин по координатам атласа [28] (каудально от брегмы – 5,6 мм, латеральность – 2,0, глубина погружения электрода – 7,2 мм).

Динамику изменений ЛПРИ у крыс после операции прослеживали на 1, 3, 7, 14, 25 и 30-е сутки. Полученные данные статистически обрабатывали с помощью ANOVA с применением *t*-критерия Стьюдента. Для построения графиков использовали программу Origin 6.1.

Анализ электрической активности нейронов *substantia nigra*, кардио-респираторной системы и активности межреберных мышц у животных проводили в условиях острого опыта через 2,5–3 мес. после разрушения нигростриатных структур мозга препаратом Ротенон.

Частоту разрядов нейронов регистрировали остеклованным металлическим электродом (диаметр кончика 3–5 мкм, сопротивление 2–3 МОм) в той части черной субстанции, которая подверглась воздействию ротенона. Для электростимуляции структур моторной коры использовали электрод диаметром 0,4 мм. Для нивелирования артефактов в момент регистрации электрической активности при электрическом раздражении импульсы тока от стимулятора подавали на объект через изолирующее устройство (модель 305R, W-P INSTRUMENTS, США).

Электростимуляция моторной коры (каудальность от брегмы – 3 мм, латеральность – 2, глубина погружения электрода – 1,5 мм) проводилась пачками из 10 импульсов длительностью 2 мс, частотой 20 Гц, амплитудой стимула 2, 4, 6, 8, 10 В.

Регистрацию миограммы межреберных мышц осуществляли парой стальных игольчатых электродов с межполюсным расстоянием 3–4 мм и усиливали с помощью усилителя биопотенциалов («УБП-2», Россия).

Запись электрокардиограммы осуществляли во втором стандартном отведении нетравмирующими пластинчатыми электродами из нержавеющей стали. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) оценивали путем автоматизированного программного подсчета интервалов между зубцами R-R электрокардиограммы. Частоту дыхания регистрировали с помощью инфракрасного детектора экскурсии грудной клетки. Ректальную температуру тела животного поддерживали на уровне $35 \pm 0,5$ °C с помощью электрической грелки со стабилизированным источником постоянного тока.

Все электрофизиологические данные, а также отметки инъекций препаратов вводили в компьютер, записывали и обрабатывали с помощью программ InputWin 7.0 и STATISTICA 6.0. Статистическую значимость полученных результатов оценивали при помощи критерия Манна–Уитни для непараметрических выборок и представляли в виде $M \pm m$. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ когнитивных процессов и поведенческой активности крыс в челночной камере после введения ротенона в дофаминергические структуры мозга. Величина ЛПРИ у крыс ($n = 8$) до операции (фон) при переходе из большой камеры в малую составляла в среднем $2,3 \pm 0,1$ с, а из малой камеры в большую – $3,5 \pm 0,2$ с.

Показано, что на следующие сутки после процедуры введения ротенона в структуры мозга и/или трепанации черепа у крыс наблюдалось достоверное ($P < 0,05$) увеличение ЛПРИ в 4–4,5 раза по сравнению с фоном при переходе из малой камеры в большую. ЛП реакции перехода из большой камеры в малую у крыс контрольной и опытной групп сохранялся на уровне фона (рис. 1, 2).

На 3-и сутки после операции величина ЛПРИ при переходе из малой камеры в большую у крыс контрольной и опытной групп практически не отличалась от фона (рис. 1, 2).

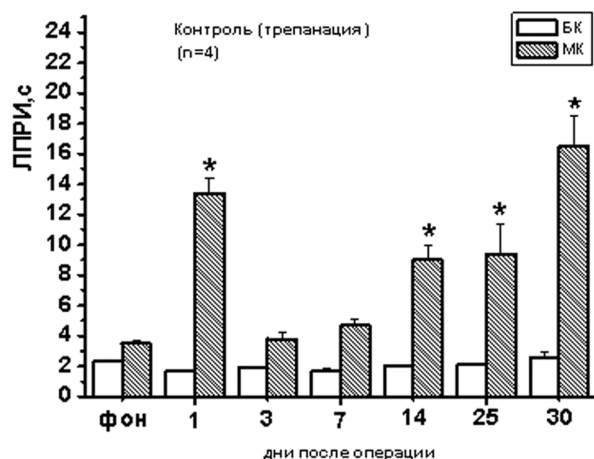


Рис. 1. Динамика изменений величины ЛПРИ (с) у крыс контрольной группы (трепанация черепа) в течение 30 сут после операции. Фон – ЛПРИ до операции: белые столбики – при переходе крыс из большой камеры (БК) в малую (МК), заштрихованные столбики – при переходе крыс из МК в БК. По оси абсцисс указаны дни измерения ЛПРИ после операции (трепанация черепа).
* – $P < 0,05$

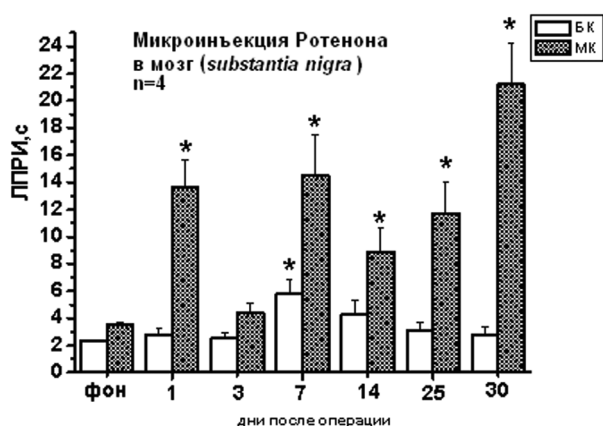


Рис. 2. Динамика изменений величины ЛПРИ (с) у крыс опытной группы в течение 30 сут после введения ротенона в *substantia nigra*. Обозначения те же, что на рис. 1

На 7-е сутки после операции у контрольных животных ЛП реакции перехода из малой камеры в большую и из большой в малую также сохранялся на уровне фоновых значений (см. рис. 1), в то время как по сравнению с контрольной группой величина ЛПРИ у крыс опытной группы при переходе из малой камеры в большую возросла в 3–4 раза, а при переходе из большой камеры в малую – в 2–2,5 раза (рис. 2).

На 14-е сутки наблюдения величина ЛПРИ у крыс контрольной и опытной групп при переходе из малой камеры в большую была примерно одинаковой и превышала уровень фоновых значений в 2,5–3 раза, а рефлекс перехода из большой камеры в малую сохранялся на уровне фона.

К 25-м суткам после операции величина ЛП реакции перехода из малой камеры в большую у животных обеих групп продолжала нарастать и к 30-м суткам наблюдения была выше фона в 4–5 раз (см. рис. 1, 2).

Достоверное ($P < 0,05$) увеличение ЛП реакции перехода из малой камеры в большую являлось характерным признаком угасания выработанного условного рефлекса. Такая же картина развития процесса угасания условного рефлекса наблюдалась и в экспериментах, проведенных ранее на животных, которым препараты не вводили [29]. Следовательно, раннее (на 7–8-е сутки) развитие процесса торможения условного рефлекса у крыс опытной группы связано с микроинъекцией ротенона в структуры мозга. Следует отметить, что развитие этого процесса (в течение 3–3,5 недель) отмечалось у крыс и после подкожного введения препарата Ротенон [24].

Таким образом, унилатеральная микроинъекция токсического препарата Ротенон (50 нл) в дофаминергические структуры мозга (область *substantia nigra*) вызывает раннее (по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных) наступление естественного процесса угасания условного рефлекса.

Однако к 30-м суткам наблюдения величина ЛПРИ у экспериментальных крыс обеих групп при переходе из малой камеры в большую не достигала критических значений (180 с), как это отмечалось ранее [29] у интактных животных, т. е. условный рефлекс полностью не угасал. Возможно, это связано с хирургическим вмешательством и/или с микроинъекцией токсина в мозг.

Замедление процесса естественного угасания у животных отмечалось также после подкожного (в течение 3–3,5 недель) введения препарата Ротенон [24] и после интраназального введения эндотоксина грамотрицательных бактерий (ЛПС *E. coli*) [29].

Анализ электрической активности нейронов substantia nigra и вегетативных показателей после введения ротенона в структуры мозга крыс. Электрическую активность нейронов *substantia nigra* и вегетативные показатели (ЧСС, миограмму межреберных мышц, частоту дыхания) у крыс изучали после окончания периода наблюдения за поведенческой активностью и когнитивными процессами (через 2,5–3 мес) у крыс контрольной ($n = 4$) и опытной ($n = 4$) групп.

У животных подсчитывали количество дофаминергических нейронов в ростральном отделе компактной части черной субстанции в области, расположенной на удалении 4,5 мм от брегмы. Микроэлектрод погружали на глубину 6 мм и регистрировали нейроны с шагом 0,1 мм до глубины 7,5 мм, затем меняли трек на расстояние 0,1–0,2 мм и повторяли регистрацию 4–5 раз. К дофаминергическим относили нейроны с частотой генерации потенциалов действия $6 \pm 0,3$ Гц, длительностью импульсов 3 мс.

Плотность распределения зарегистрированных дофаминергических нейронов у крыс после введения ротенона в область *substantia nigra* (114 ± 7) была достоверно ($P < 0,05$) ниже по сравнению с контролем (170 ± 8).

У контрольных животных порог двигательных реакций при электростимуляции моторной коры наблюдался при напряжении в диапазоне от 6 до 8 В.

При электростимуляции моторной коры контрольных животных отмечалась выраженная реакция респираторной и нервной систем, дыхательной мускулатуры (рис. 3). Частота дыхания до стимуляции – 150 ± 5 дых/мин, частота разрядов нейронов *substantia nigra* до стимуляции – $24,5 \pm 4$ имп/с, миограмма до стимуляции – $157,2 \pm 11$ маш. ед. Во время стимуляции данные показатели увеличивались в 2,5–3 раза. ЧСС не изменялась: до и во время стимуляции она составляла в среднем 330 ± 25 уд/мин.

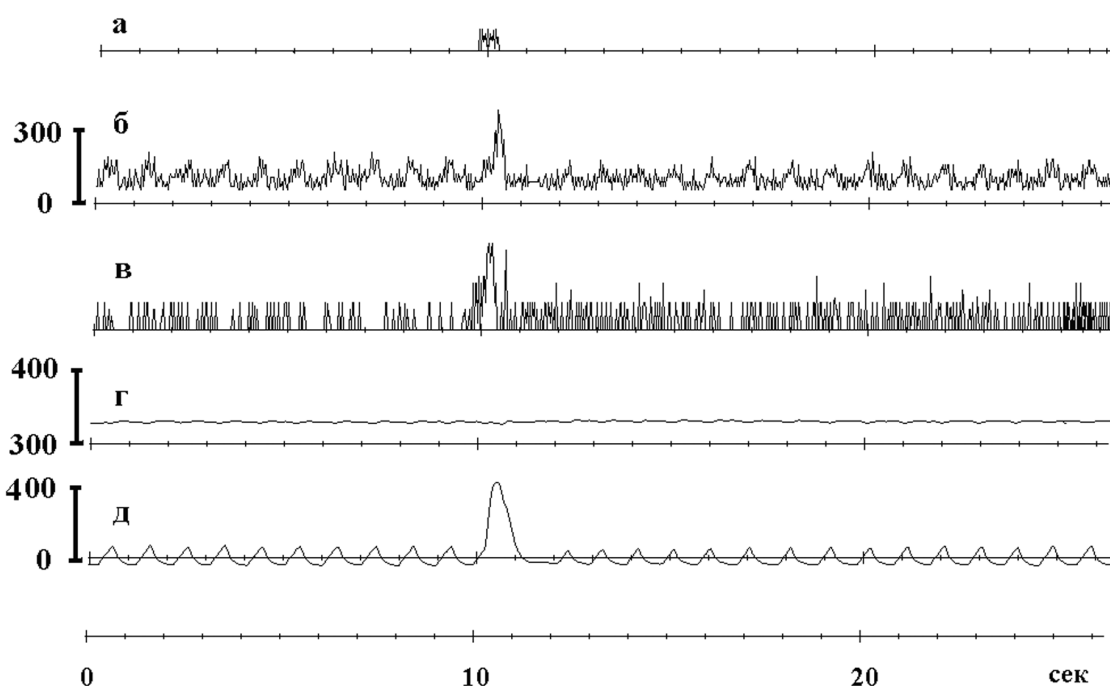


Рис. 3. Частота разрядов нейронов *substantia nigra* (б), миограмма межреберных мышц (в), частота сердечных сокращений (г), частота дыхания (д) при электростимуляции моторной коры (а) в контроле

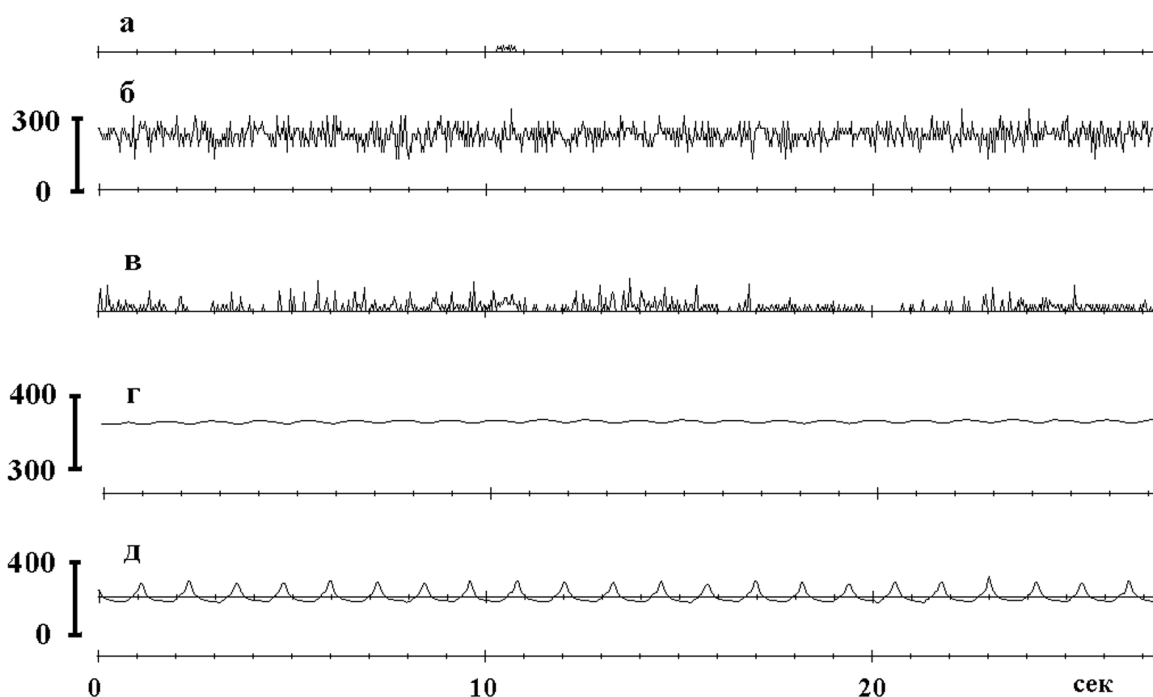


Рис. 4. Частота разрядов нейронов *S. nigra* (б), миограмма межреберных мышц (в), частота сердечных сокращений (г) и дыхания (д) при электростимуляции моторной коры (а) в эксперименте

Проводимость сигналов от моторной коры к органам-эффекторам у контрольных крыс с трепанацией черепа не нарушена.

У экспериментальных животных через 2,5–3 мес. после разрушения дофаминергических nigrostriatalных структур мозга препаратом Ротенон ответы со стороны нервной, кардио-респираторной и мышечной систем отсутствовали (рис. 4). Можно предположить, что проводимость сигналов от моторной коры к органам-эффекторам у этих животных нарушена.

Заключение. На основании полученных данных можно заключить, что унилатеральная микроинъекция (50 нл) токсического препарата Ротенон в область *substantia nigra* животных сопровождается перестройкой интегративной деятельности мозга и механизмов выработки и угасания условных рефлексов, вызывая более раннее (на 7–8-е сутки) развитие процесса торможения условного рефлекса, чем у животных, не получавших препарата.

Через 2,5–3 мес. после введения препарата Ротенон в дофаминергические структуры мозга у крыс обнаружено нарушение проводимости сигналов от моторной коры к периферическим органам (сердце, легкие).

Таким образом, подтверждена гипотеза о модулирующем влиянии функционального состояния дофаминергической системы головного мозга на механизмы контроля эффективности обработки информации и принятия решения, а также на характер проводимости сигналов от моторной коры к органам-эффекторам.

Литература

1. Opland D., Sutton A., Woodworth H. et al. // *Mol. Metab.* 2013. Vol. 2, N 4. P. 423–434.
2. Hornykiewicz O. // *Mt Sinai J. Med.* 1988. Vol. 55. P. 11–20.
3. Bourdy R., Barrot M. // *Trends Neurosci.* 2012. Vol. 35, N 11. P. 681–690.
4. Schmidt H. D., Pierce R. C. // *Annal. N-Y. Acad. Sci.* 2010. Vol. 1187. P. 35–75.
5. Schouten A. C. et al. // *Biol. Cybern.* 2001. Vol. 84. P. 143–152.
6. Nimitvilai S., Arora D. S., McElvain M. A. et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2012. Vol. 36, N 11. P. 1913–1921.
7. Wise R. A. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 5. P. 463–494.
8. Zhang Zhe, Chan-Juan Hao, Chang-Gui Li. et al. // *PLoS Genet.* 2014. Vol. 10, N 2. P. 1004–1024.

9. Belzung C., Turiault M., Griebel G. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2014. Vol. 13, N 122. P. 144–157.
10. Анохин К. В. // Психофизиология и молекулярная генетика мозга / под ред. Ю. И. Александрова. СПб., 2001. – 592 с.
11. Cone J. J., McCutcheon J. E., Roitman M. F. // J. Neurosci. 2014. Vol. 34, N 14. P. 4905–4913.
12. Huang Yan-You, Levine A., Denise B. et al. // Learn Mem. 2014. Vol. 21, N 3. P. 153–160.
13. Burge P. S. // Occup. Environ. Med. 2004. Vol. 61, N 2. P. 185–190.
14. Yurek D. M., Sladek J. R. // Ann. Rev. of Neurosci. 1990. Vol. 13. P. 415–440.
15. Braak H. et al. // Neurosci. Lett. 2006. Vol. 396. P. 67–72.
16. Узрюмов М. В. // Нейродегенеративные заболевания: фундамент. и приклад. аспекты. М., 2010. – 447 с.
17. Cicchetti F. // Trends Pharmacol. Sci. 2009. Vol. 30, N 9. P. 475–483.
18. Samantaray S., Knaryan V. H., Butler J. T. et al. // J. Neurochem. 2008. Vol. 104. P. 1309–1320.
19. Uversky V. N. // Cell Tissue Res. 2004. Vol. 318. P. 225–241.
20. Greenamyre T. et al. // Trends Pharmacol. Sci. 2010. Vol. 31, N 4. P. 141–143.
21. Стрижак И. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2011. № 3. С. 87–91.
22. Григорьян Г. А., Базян А. С. // Успехи физиол. наук. 2007. Т. 38, № 4. С. 80–88.
23. Sherer T. B., Kim J. H., Betarbet R. // Exp. Neurol. 2003. Vol. 179, N 1. P. 9–16.
24. Миронова Г. П., Вязова Л. С. // Фундаментальные науки и современная медицина. Минск, 2012. С. 213–216.
25. Белоусов Ю. Б. // Этическая экспертиза биомедицинских исследований: практ. рекомендации. М., 2005. – 157 с.
26. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 1986. N 123. – 48 p.
27. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. // Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991. – 400 с.
28. Paxinos Y., Watson C. // The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, 1998. – 256 p.
29. Миронова Г. П., Стрижак И. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2011. № 1. С. 52–55.

G. P. MIRONOVA, O. G. TICHONOVICH, S. G. PASHKEVICH

BEHAVIORAL RESPONSES AND AUTONOMIC FUNCTIONS IN RATS WHEN CHANGING THE FUNCTIONAL STATE OF THE DOPAMINERGIC SYSTEM

Summary

In experiments on 12 white rats it is found that changing the functional state of the dopaminergic system of the brain modifies the effectiveness of monitoring the signal processing from the motor cortex to the effector's organs. The microinjection of rotenone (500 µg/ml in a volume of 50 nl) into the *Substantia nigra* area of rats with the reflex avoidance contributes to the extinction of a conditioned reflex. In these animals, after 2.5–3 months the violation of central control of peripheral organs (heart, lungs) is registered. The data obtained are important for justification of early diagnosis methods and a deeper understanding of the concepts of the pathogenesis of diseases caused by the degeneration of dopaminergic neurons of the brain.