

На правах рукописи

Мирошниченко Екатерина Валерьевна

**ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТЕНЗИНА В ПРИЛЕЖАЩЕЕ ЯДРО МОЗГА НА
ЭМОЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРЫС С ПОВРЕЖДЕНИЕМ
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2012

Работа выполнена в лаборатории Экспериментальной патологии нервной системы
(заведующий – д.м.н. Н.П.Шугалев) Отдела исследований мозга ФГБУ «НЦН»
РАМН (директор Центра – академик РАМН, профессор, д.м.н. З.А.Суслина)

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
Николай Петрович Шугалев

Официальные оппоненты Заслуженный деятель науки,
доктор медицинских наук, профессор
Рита Ушеровна Островская

Доктор биологических наук
Галина Христофоровна Мержанова

Ведущая организация ФГБОУ Высшего профессионального образования
Российский университет дружбы народов
Министерства образования и науки РФ

Защита состоится «28» марта 2012 г. в 16 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.044.01 Федеральное Государственное Бюджетное
Учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по
адресу 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а. E-mail: admin@ihna.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Института высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии РАН

Автореферат разослан «27» февраля 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Доктор биологических наук, профессор

В.В. Раевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

В течение последних десятилетий проводятся интенсивные физиологические исследования соотношений между активностью серотонинергических (5-НТ) структур, тревожностью и паническими расстройствами. Согласно имеющимся в литературе данным тревожность и панические расстройства представляют различные эмоции по своим поведенческим и физиологическим проявлениям, связаны с различными структурами и различным образом отвечают на лекарственные средства. Тревожность больше связана с оборонительными реакциями на потенциальную опасность и ослабляется анксиолитическими препаратами. Паника представляет оборонительную реакцию на более близкую по времени угрозу, резистентную к действию анксиолитиков и интегрирована в структурах ствола мозга, таких как гипоталамус и околосредовое серое вещество (PAG). Обе эмоции модулируются 5-НТ волокнами, исходящими из дорзального ядра шва (DRN), но противоположным образом.

Из вышесказанного следует, что для предупреждения развития нарушений эмоционального состояния необходимо комплексное влияние на 5-НТ структуры на уровне различных образований мозга. В соответствии с данными лаборатории (Шугалев *с соавт.*, 2003) и некоторыми данными литературы (Dilts, 1996; *Petkova-Kirova et al.*, 2008; Boules *et al.*, 2010) такое влияние на 5-НТ структуры может оказывать нейротензин.

Функция нейротензина в ЦНС осуществляется в тесной связи с дофаминергической (DA) системой и поэтому может быть вовлечена в заболевания, в основе патогенеза которых лежат нарушения регуляции DA передачи. К таким заболеваниям относятся шизофрения, наркотическая зависимость и болезнь Паркинсона. Нейротензин обладает способностью оказывать влияние на различные аспекты адаптивного поведения: на мотивационные, эмоциональные, двигательные, а также участвует в механизмах подкрепления. В последнее время высказывается предположение об анксиолитических свойствах нейротензина (Шугалёв *с соавт.*, 2003).

Нейроны, продуцирующие нейротензин, и их проекции широко распределены в ЦНС, что объясняет широкий диапазон эффектов этого пептида (Hertel and Olsen, 2002; Azmi *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2006). Наиболее высокие концентрации нейротензина выявлены в областях, связанных с DA проекциями, такими как хвостатое ядро (nCd), скорлупа и прилежащее ядро (nAcc) (Jennes *et al.*, 1982; Geisler and Zahm, 2006).

NAcc является ключевым местом взаимодействия мотивационных и эмоциональных сигналов, получаемых из префронтальной коры, миндалины и гиппокампа для обеспечения

адаптивных поведенческих ответов. Роль nAcc в поведении в значительной степени связана с механизмами позитивного подкрепления (Day and Carelli, 2007; Levita, 2009). Некоторые авторы (Кулешова, Долбакян, Григорьян, Мержанова, 2008) рассматривают это ядро в аспекте самоконтролируемого и импульсивного поведения. Однако в широком смысле функция nAcc важна также в регуляции поведения, модулируемого аверсивными стимулами и событиями (Саульская, 2003). То есть, данные литературы предполагают бивалентное функционирование этой структуры мозга.

В среднем мозге наибольшее число нейротензин-позитивных клеток определяется в вентральной области покрышки (VTA) и черной субстанции (SN). Подавляющее большинство DA нейронов в этих структурах экспрессируют нейротензиновые рецепторы, с преобладанием подтипа NT₁ (Fassio *et al.*, 2000). В пределах стриатума NT₁ нейротензиновые рецепторы расположены на DA, глутаматергических и GABA-ергических аксонах (Pickel *et al.*, 2001), а NT₂ рецепторы – на глиальных клетках. Введение нейротензина в вентральную область покрышки или SN вызывает увеличение высвобождения дофамина в nAcc или nCd. Очевидно, это объясняется уменьшением способности дофаминовых D2 рецепторов оказывать пресинаптическое торможение на уровне тел и дендритов DA нейронов, а также увеличением скорости их разрядов.

В дополнение к широко изученному взаимодействию нейротензина с DA-ергической системой, существуют данные, свидетельствующие об его взаимодействии с 5-НТ нейронами ядер шва. Например, подведение нейротензина к этим нейронам вызывает увеличение скорости разряда и этот эффект блокируется антагонистом нейротензина SR48692 (Jolas, 1996; Li *et al.*, 2001). Функциональная роль нейротензина в ядре шва возможно, связана с модуляцией некоторых из известных функций 5-НТ системы, включая ноцицепцию (Buhler *et al.*, 2005), регуляцию цикла сон-бодрствование (Jolas, 1997) и обусловленные стрессом реакции (Corley, 2002).

Приведённые данные позволяют сделать предположение о том, что взаимодействие нейротензин- и 5-НТ-систем мозга имеет важное значение для повышения адаптивной функции мозга в условиях вызванных стрессом нарушений эмоционального состояния. Изучение механизмов этого взаимодействия может способствовать созданию новых стресс-протекторных средств, структурно близких к биохимическим регуляторам организма.

Цели и задачи исследования

Основной целью исследования являлось выяснение значения нейротензинергических структур мозга для нормализации адаптивного поведения животных с дефицитом функции

5-НТ структур после перенесённых стрессовых воздействий. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить влияние повреждения 5-НТ структур различных образований ствола мозга на воспроизведение пассивных оборонительных реакций у крыс;
- 2) изучить влияние повреждения 5-НТ структур различных образований ствола мозга на особенности последствия болевого и иммобилизационного стресса;
- 3) выявить влияние локального введения нейротензина в прилежащее или хвостатое ядра мозга на воспроизведение пассивных оборонительных реакций у крыс с повреждением 5-НТ структур мозга, а также на фоне действия резерпина;
- 4) провести сравнительный анализ особенностей влияния нейротензина на эмоциональное состояние крыс с повреждением 5-НТ структур мозга в условиях последствия стрессовых (болевого и иммобилизационного) факторов.

Научная новизна работы

Впервые показано нормализующее влияние микроинъекций нейротензина в прилежащие ядра мозга на эмоциональное состояние крыс с повреждением 5-НТ структур мозга животных в условиях последствия стрессовых факторов. Установлено, что регуляторное действие нейротензина связано как с его противотревожными так и противопаническими свойствами.

Теоретическое значение работы

Полученные новые данные об антистрессорном действии нейротензина, как регуляторного пептида мозга. Обнаружено значение нейротензина на уровне прилежащего ядра мозга для механизмов регуляции эмоционального состояния животных в условиях дефицита функции 5-НТ структур на уровне различных образований мозга.

Практическое значение работы

Изучение механизмов взаимодействия нейротензин- и серотонинергических систем мозга в условиях последствия стрессорных факторов может иметь важное значение для разработки новых стресс-протекторных средств, структурно близких к биохимическим регуляторам организма человека. Поведение животных с повреждением 5-НТ структур на уровне различных образований мозга в указанных условиях может служить экспериментальной моделью для тестирования новых психотропных, в частности, анксиолитических препаратов.

Положения, выносимые на защиту

1. Дефицит функции серотонинергических структур на уровне разных образований ствола мозга приводит к разнонаправленному влиянию на воспроизведение реакций пассивного избегания, а также на последствие стрессовых (болевого и иммобилизационного) воздействий.

2. Действие нейротензина на уровне прилежащего ядра мозга сопровождается ослаблением разнонаправленных поведенческих эффектов повреждения серотонинергических структур мозга и нормализацией эмоционального состояния животных.

3. Поведенческие эффекты нейротензина у животных с дефицитом функции серотонинергических структур мозга в условиях эмоционального стресса объясняются его противотревожными, а также противопаническими свойствами.

4. Нормализующее влияние нейротензина на поведение животных с экспериментальной патологией серотонинергических структур мозга, а также на фоне действия резерпина связано с повышением адаптивного характера поведения и объясняется восстановлением баланса взаимодействия моноаминергических систем.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

На конференции «Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга» (Москва, 2007 г. и 2008 г.); конференции с м/н участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». (С-Петербург, 2008 г.); конференции молодых ученых Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии и МГУ им. Ломоносова. (Москва 2008 и 2009 г.); на Международном Междисциплинарном конгрессе «Достижения нейронауки для современной медицины и психологии» (Судак 2009); на 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2010); на конференции «Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности» (Москва 2010 г.); на XXI Съезде физиологического общества им. Павлова» (Москва-Калуга, 2010 г.); на III Съезде физиологов СНГ (Ялта 2011 г.).

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Работа изложена на 109 страницах и содержит 24 иллюстрации. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов. Список литературы содержит 194 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Работа была проведена на белых лабораторных крысах-самцах в возрасте 2,5 месяцев, выращенных в условиях вивария института при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещённости. Общее количество животных, использованных в экспериментах – 106. Содержание животных и проведение экспериментов проводилось в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Регистрацию и анализ показателей поведения осуществляли с помощью автоматизированной системы Etho-Vision фирмы «Noldus» (Holand).

Открытое поле. Установка «открытое поле» (Price, Huck, 1974) представляла собой квадратный короб, со стороной 105 см, высотой 35 см. Площадь пола установки разделена на 49 квадратов. При проведении теста учитывалось количество пересечённых квадратов на периферии и в центре «открытого поля» (горизонтальная двигательная активность) и число стоек (вертикальная двигательная активность). Вначале экспериментов проводили предварительное тестирование в течение 3-х минут в установке «открытое поле», целью которого было исключение из эксперимента крыс, показывающих либо очень высокий, либо очень низкий уровень двигательной активности.

Условный рефлекс пассивного избегания. Экспериментальная установка УРПИ представляла собой прямоугольную камеру с металлическим полом, разделённую на два отсека (тёмный и ярко освещённый) вертикальной перегородкой с отверстием возле пола. Животное помещалось в освещённый отсек. При переходе в тёмный отсек, крыса подвергалась неизбежному болевому воздействию, которое заключалось в нанесении удара электрическим током (2 мА, 3 с). Эффективность пассивного оборонительного поведения оценивали по величине латентного периода перехода крыс из ярко освещённого отсека в тёмный, где животные накануне получали неизбежное болевое воздействие. Условный рефлекс пассивного избегания тестировали также в последующие четверо суток. В первой серии экспериментов животным с повреждением серотонинергических нейронов DRN за 10 минут до помещения в камеру вводили NT в SN, во второй – за 10 минут до помещения в камеру вводили NT в DRN.

Приподнятый крестообразный лабиринт и приподнятый Т-образный лабиринт. В эксперименте использовались две методики, позволяющие оценить уровень тревожности у животных. В первой методике использовался крестообразный лабиринт, приподнятый над полом на 76 см, два рукава которого (один напротив другого) имели боковые и торцевые

бортики высотой 40 см, два рукава были открытыми, ширина рукавов 10 см. В начале эксперимента крыса помещалась в стартовый квадрат в центре пересечения рукавов. В течение трёх минут регистрировали выбор открытого или закрытого рукава во время первого захода, латентные периоды захода в закрытый и открытый рукава, время, проведённое в открытых и закрытых рукавах, двигательную активность в лабиринте, исследовательское поведение (стойки, свешивания с открытых рукавов). Тестирование проводили на протяжении всех дней эксперимента. Для проведения опытов по второй методике вход в один из закрытых рукавов закрывали панелью высотой, равной высоте бортика. Крысу помещали трижды в дистальный конец закрытого рукава и отмечали время выхода из закрытого рукава, затем крысу помещали в домашнюю клетку на 30 секунд, эксперимент повторяли. После троекратной посадки в закрытый рукав крысу помещали в дистальный конец открытого рукава и отмечали время захода в закрытый рукав, тестирование в открытом рукаве также проводилось трижды. В приподнятом Т-образном лабиринте также отмечали наличие или отсутствие двигательной активности в открытых рукавах. Тестирование проводили один раз через 24 часа после введения нейротензина и аверсивного воздействия.

ХИРУРГИЧЕСКИЕ ОПЕРАЦИИ ВЖИВЛЕНИЯ НАПРАВЛЯЮЩИХ КАНЮЛЬ В МОЗГ КРЫС

Во время операции крысам стереотаксически вживляли по две металлические направляющие канюли билатерально в прилежащие ядра (nAcc), хвостатые ядра (nCd) или чёрную субстанцию (SN) и одну канюлю – в дорзальное ядро шва (DRN) или PAG, (рис. 2). Использовали следующие координаты по стереотаксическому атласу (Paxinos, Watson, 1986): nucleus Accumbens - AP = -1,7; V = 1,7; L = 5; nucleus Caudatus (nCd) – AP = -1,0; V = 2,5; L = 4,5; Substantia Nigra (SN) – AP = 4,2; V = 1,9; L = 7,0; Dorsal Raphe Nucleus (DRN) – AP = 7,0; V = 1,8; L = 5,5 и Dorsal Periaqueductal Gray Substance (DPAG) – AP = 7,0; V = 1,8; L = 5,5 под углом 15 градусов.

Хирургическое вмешательство проводили под анестезией при внутривенном введении кетамина («Гедеон Рихтер», Венгрия) в дозе 50 мг/кг и бензодиазепина («Гедеон Рихтер», Венгрия) в дозе 5 мг/кг. Длина направляющих канюль при введении в nCd равнялась 12 мм, при введении в SN и DRN – 16 мм. Диаметр канюль составлял 0,6 мм. Прикрепление канюль к черепу животного осуществлялось с помощью стоматологического акрилоксида. Для профилактики воспалительных процессов, после операций животным вводили бициллин-3 0,5 мл внутримышечно.

ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР МОЗГА

Избирательный нейротоксин серотонинергических нейронов 5,7-дигидрокситриптамиин (SIGMA) вводили животным посредством микроинъекции в дозе 7 мкг в 0,7 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты в DRN, PAG или SN. Контрольным животным вводили 0,7 мкл физиологического раствора. Для микроинъекций использовалась металлическая игла, выступающая на 1 мм из кончика направляющей канюли и соединённая переходной трубкой с микрошприцем. Введение токсина осуществлялось вручную со скоростью 0,3 мкл/мин. Иглу оставляли в направляющей канюле в течение 2 мин, затем её удаляли и заменяли металлическим мандреном. Через одну неделю после введения нейротоксина проводили тестирование условного рефлекса, а затем изучали влияние внутримозговых инъекций нейротензина на поведение крыс.

ОСЛАБЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ

Части крыс без повреждения 5-НТ нейронов мозга за сутки до болевого раздражения вводили подкожно резерпин в дозе 2 мг/кг по 0,3 мл. Резерпин растворяли в 1% растворе уксусной кислоты. Контрольным животным вводили растворитель в том же объёме.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНУТРИМОЗГОВЫХ МИКРОИНЪЕКЦИЙ НЕЙРОТЕНЗИНА НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС

Иммобилизация. Процедура эксперимента была следующей: за 10 минут до начала иммобилизации половине животных без повреждения 5-НТ нейронов DRN и половине животных с повреждением 5-НТ нейронов DRN с помощью способа, описанного выше, билатерально вводили в nAcc, nCd нейротензин (SIGMA) в дозе 2,5 мкг в 0,6 мкл физиологического раствора, остальным (контрольным) животным был введён физиологический раствор в том же объёме. Затем проводили иммобилизацию животных, помещая их в индивидуальные клетки-пеналы на 120 минут. После извлечения крыс из пенала, проводили поведенческий тест в установке “открытое поле” и приподнятых Х- и Т-образных лабиринтах, что позволяло оценивать двигательную активность и эмоциональное состояние животных. Тестирование проводили в течение 3-х минут, описанным выше способом. В последующие двое суток повторяли эти поведенческие тесты.

УРПИ. Животным за 10 минут до помещения в камеру вводили NT в nAcc, nCd или в SN. Наряду с изучением воспроизведения и угашения условного рефлекса пассивного избегания изучали особенности последствия болевой электрической стимуляции на поведение крыс. Для определения влияния внутримозговых микроинъекций нейротензина на

пептид вводили за 15 мин до предъявления электрического раздражения. Процедура эксперимента была следующей: в образования мозга билатерально вводили 2,5 мкг нейротензина в 0,6 мкл физиологического раствора. Контрольным животным вводили только физиологический раствор в том же объеме. Сразу после болевого раздражения проводили тестирование двигательной активности крыс в «открытом поле» в течение 3-х минут. Учитывали число пересечённых квадратов и количество стоек. На следующий день крысы помещались в приподнятый Х-лабиринт, где в течение 3-х минут оценивалось поведение животных по следующим параметрам: предпочтение открытого (ОР) или закрытого (ЗР) рукавов в начале эксперимента, латентный период захода и время пребывания в ОР и ЗР. Регистрация поведения осуществлялась с помощью web-видеокамеры.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

После декапитации крыс извлекали мозг и фиксировали его в 3% забуференном растворе формалина в течение двух недель. Затем с помощью замораживающего микротомы получали фронтальные срезы фиксированного мозга толщиной 0,2 мм. Положение кончиков канюль в исследуемых областях мозга определяли на срезах, окрашенных по Нисслю.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

При статистической обработке результатов, полученных при изучении влияния внутримозговых инъекций нейротензина на поведение животных после иммобилизации, а также после болевой электрической стимуляции использовали непараметрический метод Вилкоксона (Манна-Уитни) для несвязанных выборок. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты экспериментов представлены в виде средних значений ($M \pm s.e.m.$) и относительных значений (за единицу принято число поведенческих реакций до иммобилизации). Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

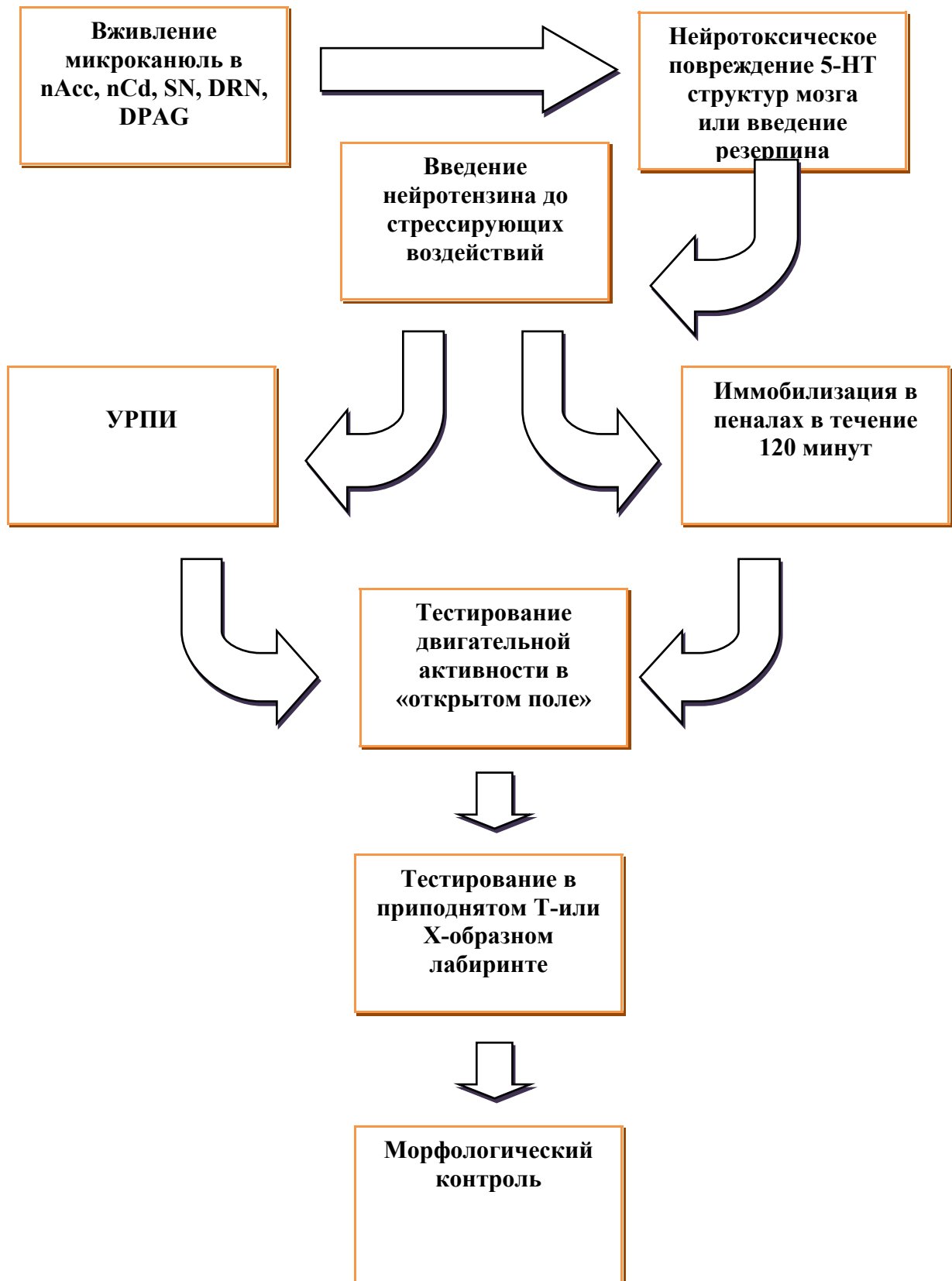


Рис. 1. Схема исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

I. ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТЕНЗИНА В НАСС НА ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ И ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ УРПИ У КОНТРОЛЬНЫХ КРЫС И КРЫС С ПОВРЕЖДЕНИЕМ 5-НТ СТРУКТУР МОЗГА

1.1. Влияние введения нейротензина в пАсс на воспроизведение УРПИ у крыс с повреждением 5-НТ структур мозга

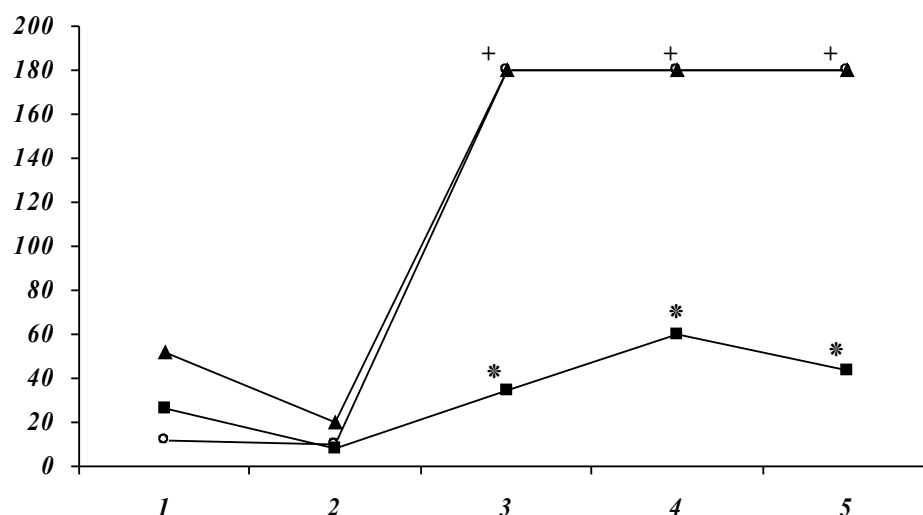
Болевое раздражение контрольных животных вызывало стойкую условную реакцию пассивного избегания, сохраняющуюся на протяжении нескольких дней. Это заключалось в том, что крысы не заходили в тёмный отсек камеры из освещённого отсека на протяжении всех дней наблюдения. Введение NT в пАсс мозга ослабляло развитие данной реакции у крыс. При этом животные покидали освещённый отсек уже через 24 часа после нанесения болевого раздражения в течение 140 секунд, в последующие сутки латентный период захода в тёмный отсек продолжил сокращаться.

Влияние токсина на УРПИ зависело от локализации его введения. Токсическое повреждение 5-НТ нейронов DRN (рис. 2, А) не нарушало воспроизведение УРПИ, при этом наблюдалось усиление негативного эмоционального состояния крыс в освещённом отсеке камеры, что выражалось в скованности, треморе, усиленной дефикации и уринации.

Повреждение 5-НТ нейронов PAG (рис. 2, Б) приводило к обратному эффекту – у животных наблюдалось резкое сокращение латентных периодов заходов в темный отсек вплоть до фоновых значений, при этом у крыс отмечалась увеличенная двигательная активность в освещённом отсеке камеры.

Введение нейротензина в п.Асс крысам ослабляло эффекты нейротоксина (рис.2, А и Б). При чем у животных с повреждением DRN ослаблялось воспроизведение реакции пассивного избегания, а введение у животных с повреждением 5-НТ структур PAG, наоборот, восстанавливалось нарушенное токсином воспроизведение УРПИ.

Подобный эффект нейротензина наблюдался и на другой модели при его введении в другие образования мозга. Так, введение NT в SN также как его введение в пАсс, нарушало воспроизведение УРПИ у крыс с повреждением 5-НТ структур DRN, а при введении в пCd восстанавливало УРПИ, нарушенный после введения токсина в SN.



Б

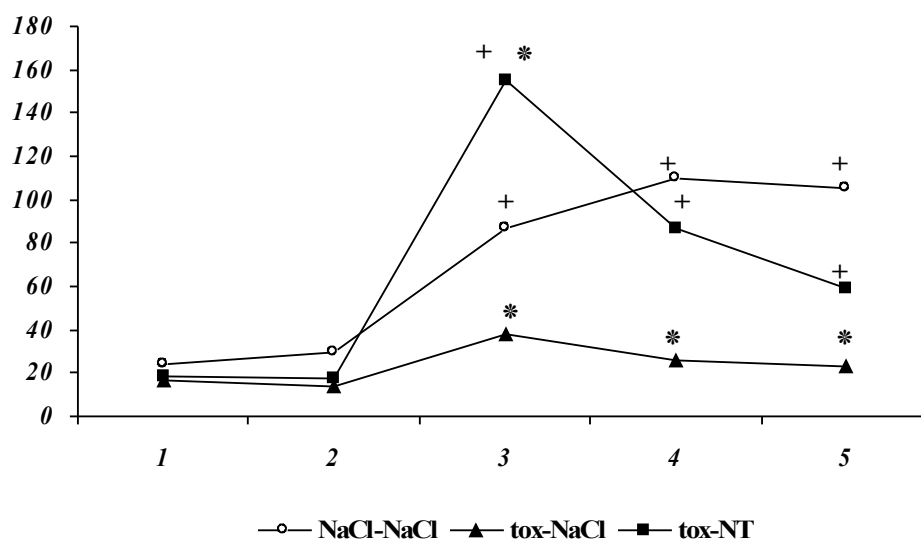


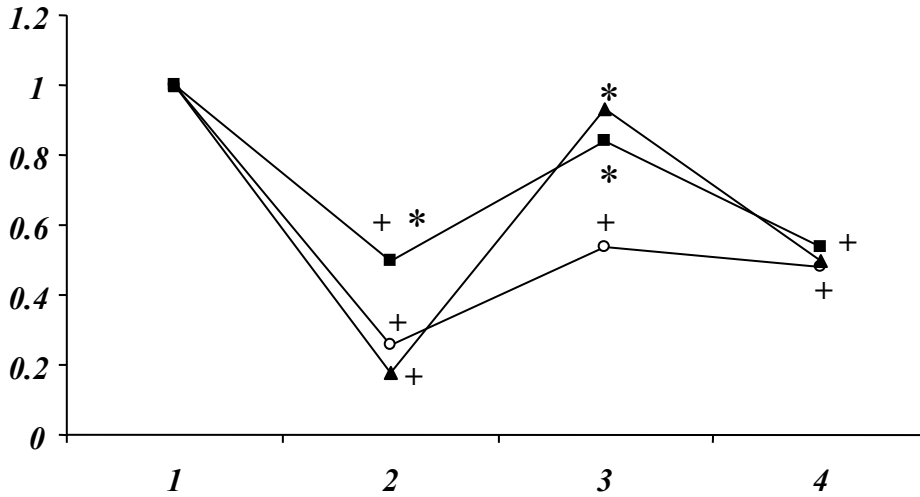
Рис. 2. Влияние микроинъекций NT в пАсс мозга на воспроизведение условных реакций пассивного избегания крыс после введения нейротоксина в DRN (А) или PAG (Б). По вертикали: среднее значение величины латентного периода (с) захода крыс в темный отсек установки; по горизонтали: 1 – величина латентного периода захода в темный отсек камеры во время приучения, 2 – в день предъявления болевого раздражения, 3, 4 и 5 – через 24, 48 и 72 ч после предъявления болевого раздражения соответственно. NaCl-NaCl – введение физиологического раствора в образования ствола мозга и в прилежащее ядро; tox-NaCl – введение токсина в образования ствола мозга и физиологического раствора в прилежащее ядро; tox-NT – введение токсина в образования ствола мозга и NT в пАсс. + - достоверные различия по сравнению с фоном, $p \leq 0.05$; * - достоверные различия между группами при $p \leq 0.05$.

1.2. Влияние введения нейротенина в nAcc на последствие болевого стресса у крыс с повреждением 5-НТ структур мозга

Поведение крыс в «открытом поле»

Болевое раздражение оказывало негативное влияние на двигательную активность животных в "открытом поле" (рис. 3). Введение нейротенина не оказало существенного влияния на изменения горизонтальной активности крыс в "открытом поле".

А



Б

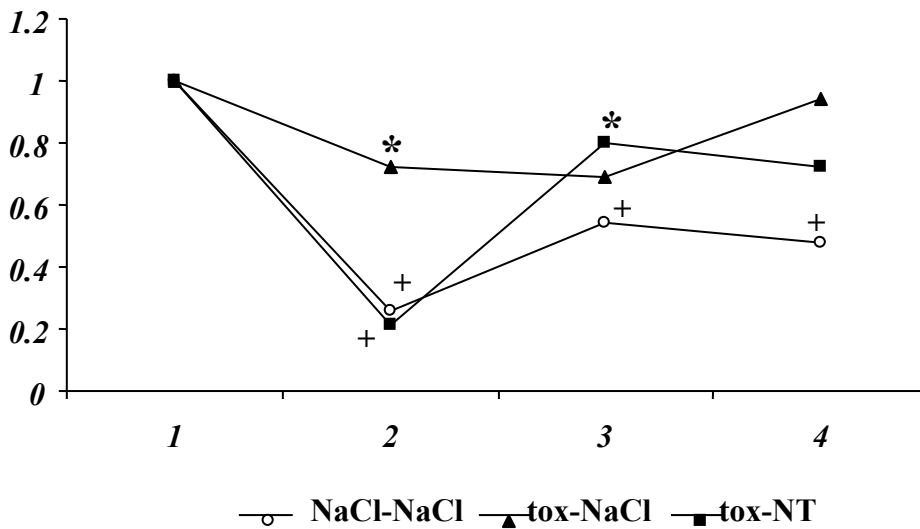


Рис. 3 Влияние микроинъекций NT в nAcc мозга на двигательную активность в «открытом поле» крыс после введения нейротоксина в DRN (А) или PAG (Б). По вертикали: число пересеченных квадратов за 3 мин; по горизонтали: 1 – горизонтальная двигательная активность до предъявления, 2 – в день предъявления, 3 и 4 – через 24 и 48 ч после предъявления болевого раздражения. Остальные обозначения как на рис. 2.

Введение токсина приводило к различным эффектам в зависимости от его локализации в мозге животных. У крыс с токсином, введённым в DRN, наблюдалось восстановление двигательной активности через сутки и последующим резким падением горизонтальной активности (рис. 3. А). Влияние NT в условиях повреждения DRN выражалось в уменьшении негативного воздействия электрического тока на двигательную активность животных.

Повреждение PAG (рис. 3, Б) приводило к значительному ослаблению негативного влияния болевого раздражителя, по сравнению с контрольными крысами, на горизонтальную активность и восстановлению вертикальной активности животных в "открытом поле". Введение NT ослабляло действие токсина в PAG. В день нанесения болевого раздражения, наблюдалось резкое снижение горизонтальной двигательной активности.

Таким образом, влияние NT в большей степени проявлялось у животных с повреждением 5-НТ структур мозга. Следует отметить, что вне зависимости от локализации повреждения и вызываемым им эффектов, NT противодействовал влиянию токсина на поведение животных в «открытом поле».

Поведение крыс в приподнятом Т-образном лабиринте

Болевое раздражение оказало негативное воздействие на поведение в приподнятом Т-образном лабиринте. У животных отмечалось увеличение времени выхода из закрытого рукава и захода в закрытый рукав (рис. 4). Действие токсина проявилось в некотором усилении влияния болевого шока на поведение животных в приподнятом Т-образном лабиринте. У этих крыс также отмечалось длительное неподвижное пребывание в закрытом и открытых рукавах. Введение NT ослабляло эффект токсина и приводило к уменьшению времени выхода из и захода в закрытый рукав лабиринта при этом крысы свободно передвигались по его рукавам, исследуя его.

Введение токсина в DPAG, наоборот, приводило к резкому уменьшению времени выхода из закрытого рукава и захода в закрытый рукав. При этом у животных отмечалось беспорядочная, увеличенная двигательная активность в рукавах приподнятом Т-образном лабиринте (усиленно свешивались, пытаясь спрыгнуть с открытых рукавов лабиринта, совершали стойки). Введение NT ослабляло указанное действие токсина, в результате чего показатели поведения в приподнятом Т-образном лабиринте оказывались сопоставимы с показателями контрольных животных. У животных после инъекций NT не наблюдалось хаотичной двигательной активности в лабиринте.

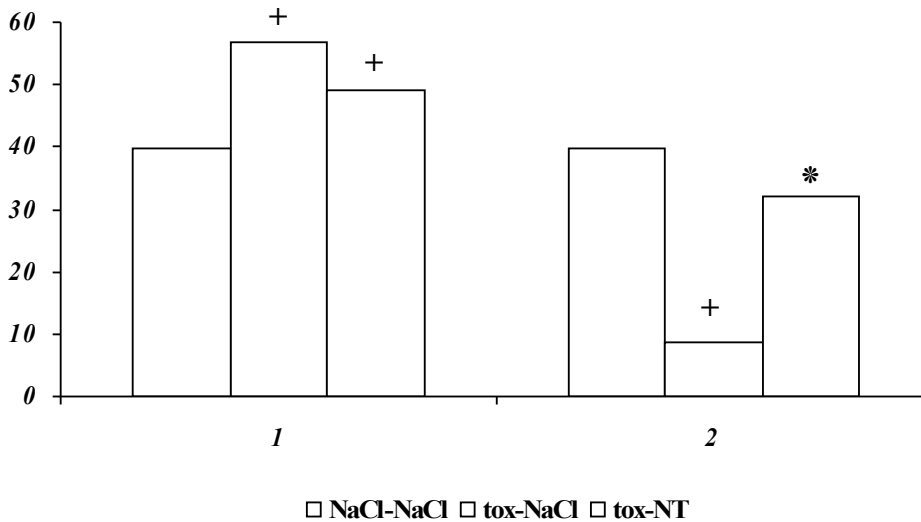


Рис. 4 Влияние микроинъекций NT в pAcc мозга на величину латентного периода выхода крыс из закрытого рукава приподнятого Т-образного лабиринта после введения NT в DRN (1) или DRAG (2). + - достоверные различия по сравнению с контролем $p \leq 0.05$; * - достоверные различия между группами при $p \leq 0.05$. Остальные обозначения как на рис. 2.

Поведение крыс в приподнятом Х-образном лабиринте.

Изучение поведения крыс без повреждения 5-НТ структур мозга в приподнятом Х-лабиринте обнаружило, что введение нейротензина в pAcc активирует поведение крыс после первого тестирования УРПИ. На рисунке 5 видно, что на фоне действия пептида время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта увеличивалось, а в закрытых рукавах сокращалось. Введение токсина в PAG также оказывало активирующее действие на поведение крыс в приподнятом Х-образном лабиринте. На рисунке 6, А, В видно, что действие токсина сокращало время пребывания этих животных в закрытых рукавах и удлиняло – в открытых. Кроме того, эти крысы по сравнению с контрольными животными больше времени проводили на концах открытых рукавов (рис. 6, В) и совершали попытки выпрыгнуть из лабиринта. Введение нейротензина ослабляло указанный эффект введения токсина в PAG. Это проявлялось в сокращении времени пребывания животных в открытых рукавах и на концах рукавов Х-образного лабиринта.

Таким образом введение NT нормализовало поведение крыс с повреждением 5-НТ нейронов мозга в приподнятых Т- и Х-образных лабиринтах вне зависимости от локализации повреждения.

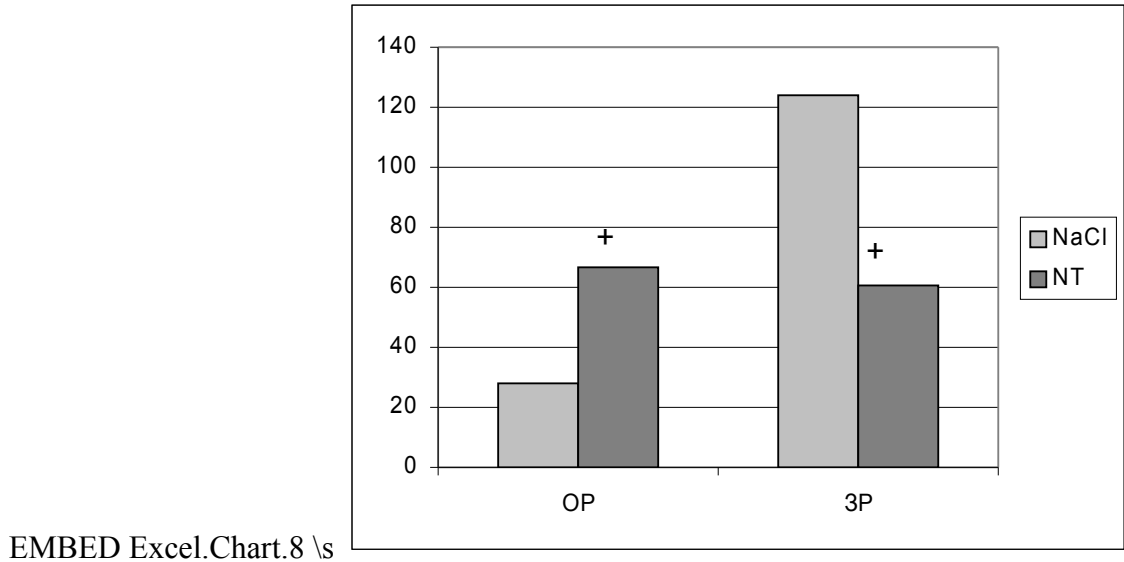


Рис. 5. Влияние микроинъекций нейротензина в nAcc на поведение в приподнятом Х-образном лабиринте крыс без повреждения 5-НТ структур мозга после тестирования УРПИ. По вертикали: время пребывания (в сек) в открытых рукавах (OP) и в закрытых рукавах (ЗР). + – различия достоверны по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

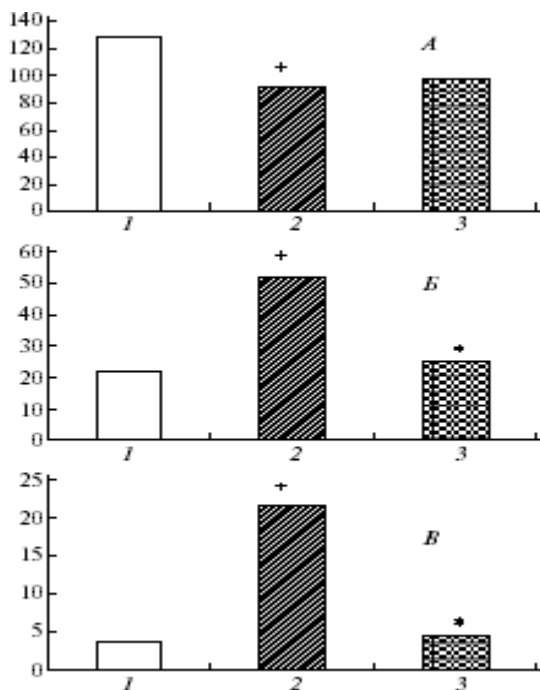


Рис. 6. Влияние тестирования УРПИ на поведение крыс с повреждением 5-НТ структур nAcc в приподнятом Х-образном лабиринте после введения нейротензина в nAcc. По оси ординат – время пребывания (в сек) в закрытых (А) и в открытых рукавах (Б), а также на концах открытых рукавов (В). По оси абсцисс – группы исследуемых крыс. 1 – после введения физиологического раствора в околотоводное серое вещество и в прилежащее ядро; 2 – введение токсина в околотоводное серое вещество и физиологического раствора в прилежащее ядро; 3 – введение токсина в околотоводное серое вещество и нейротензина в прилежащее ядро. Остальные обозначения как на рис. 5.

1.3. Влияние введения нейротензина в nCd на воспроизведение и последствие УРПИ у крыс с повреждением 5-НТ структур SN

Введение нейротоксина в SN животным нарушало воспроизведение реакций пассивного избегания. Как видно на рисунке 7 у контрольных крыс практически отсутствуют заходы в темный отсек экспериментальной установки. Введение нейротоксина вызывало проявление этих реакций как во время первого так и последующих тестирований рефлекса. Такое действие нейротоксина сопровождалось увеличением двигательной активности крыс в «открытом поле» сразу после болевой стимуляции, что может указывать на ослабление угнетающего последствия болевого стресса. Введение нейротензина в nCd крысам с повреждением 5-НТ структур SN восстанавливало воспроизведение УРПИ, нарушенное после введения токсина, что выражалось в увеличении латентности заходов в темный отсек (рис. 7).

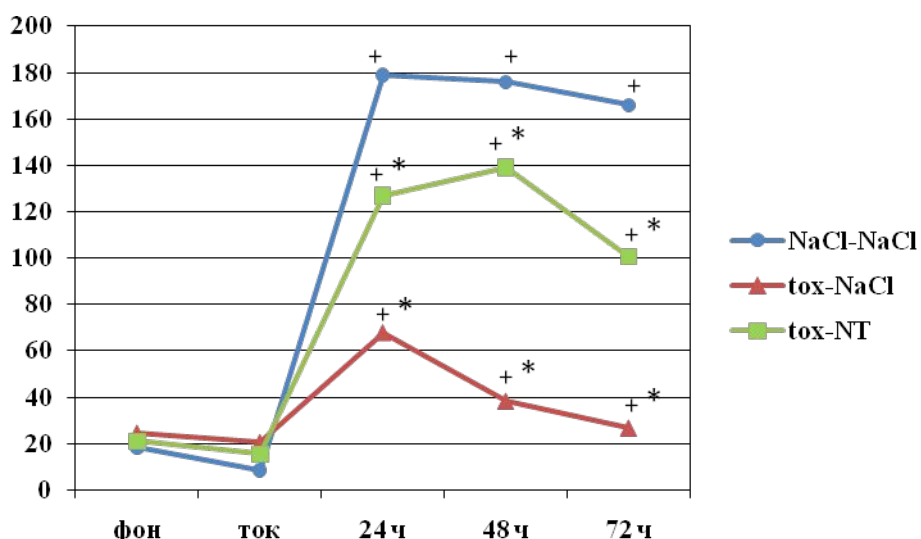


Рис. 7. Влияние введения нейротензина в nCd на воспроизведение реакций пассивного избегания у крыс с повреждением 5-НТ структур SN. По оси ординат: латентный период захода крыс в темный отсек (сек). + – различия с фоновыми значениями, * – различия между группами, при $p \leq 0,05$.

Нейротензин инвертировал действие токсина у этих животных и ослаблял угнетающее последствие болевого раздражения на двигательную активность) и на поведение в приподнятом крестообразном лабиринте. У крыс с повреждением 5-НТ структур SN наблюдалось укорочение времени пребывания в открытых рукавах лабиринта, а введение нейротензина в nCd этим животным оказывало обратный эффект, а именно, существенно удлиняло время их пребывания в этих рукавах.

Таким образом, введение нейротензина в nCd восстанавливало воспроизведение УРПИ, нарушенное после повреждения 5-HT структур SN. Вместе с тем такое действие пептида сопровождалось ослаблением последствия болевой стимуляции на двигательную активность и поведение крыс в приподнятом Х-лабиринте.

II. ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТЕНЗИНА В НАСС НА ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ РЕАКЦИЙ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ У КРЫС НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ РЕЗЕРПИНА.

Одной из экспериментальных моделей паркинсонизма является системное введение резерпина, который вызывает выраженные симптомы этого заболевания у животных (Colpaert, 1987). Развитие паркинсонизма наряду с нарушениями в двигательной сфере также тесно связано с нарушениями эмоционального состояния (Stein and Heuser, 1990). Возникновение этих нарушений объясняется тем, что наряду с дегенеративными изменениями nigrostriатной системы мозга в основе развития паркинсонизма лежит также вовлечение мезолимбической DA системы, а также других моноаминергических систем.

Как известно введение резерпина после выработки УРПИ приводит к дефициту его выполнения, что рассматривается как проявление ретроградной амнезии (Alves, 2000). Вместе с тем, имеются данные о том, что пассивное оборонительное поведение животных обусловлено механизмами страха и отражает состояние тревожности (Дубровина и Томиленко, 2005; Молодцова, 2006).

В данном разделе работы изучали нарушения воспроизведения УРПИ после системного введения резерпина и возможность их коррекции с помощью стимуляции нейротензинергических структур nAss. Введение резерпина в дозе 2,0 мг/кг резко ослабляло воспроизведение УРПИ, что выражалось в резком сокращении латентных периодов заходов в темный отсек до уровня фоновых значений. Микроинъекции нейротензина в nAss крысам ослабляло эффекты резерпина и предупреждало вызванные этим препаратом нарушения условных реакций (рис. 8).

Болевое раздражение вызывало угнетение двигательной активности контрольных крыс в открытом поле, вызывая падение уровня горизонтальной активности с последующим частичным восстановлением (рис. 9, А). Микроинъекции нейротензина усиливали этот эффект. Введение резерпина ослабляло двигательную активность крыс. Кроме того, наряду с ослаблением реакций пассивного избегания действие резерпина сопровождалось ослаблением угнетающего влияния болевой стимуляции на двигательную активность в день стимуляции (рис. 9, Б). Микроинъекции нейротензина у таких животных восстанавливали угнетающее последствие болевого шока на двигательную активность.

Микроинъекции нейротензина на фоне действия резерпина угнетало поведение крыс в приподнятом перекрещенном лабиринте. Это выразалось в сокращении латентности первого захода крыс в закрытые рукава (рис. 10, А), а также в увеличении времени, проведенном животными в закрытых рукавах (рис. 10, Б) и в сокращении времени, проведенном ими в открытых рукавах (рис. 10, В).

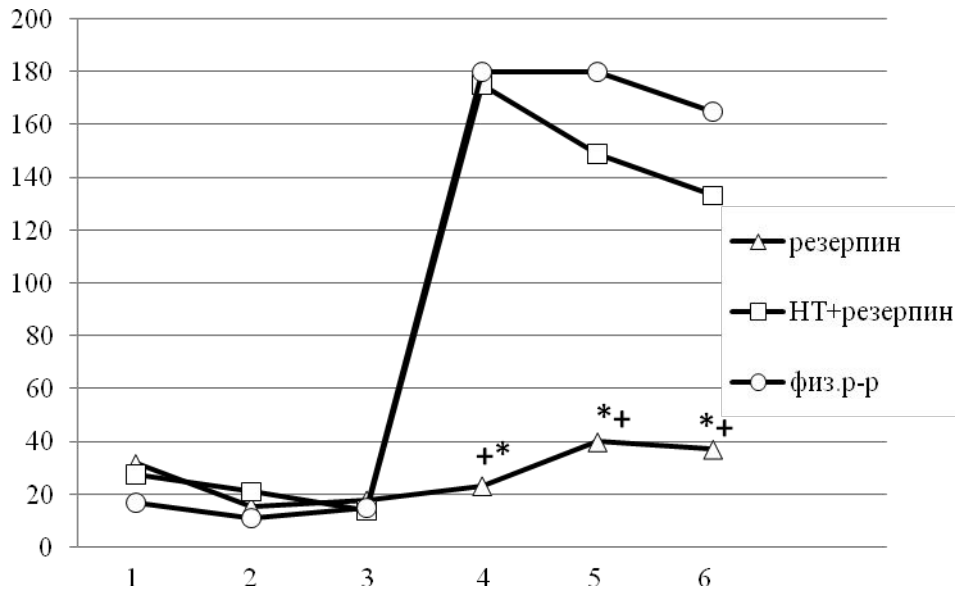


Рис. 8. Влияние микроинъекций нейротензина в пАсс на воспроизведение УРПИ у крыс после системного введения резерпина. По вертикали: средние значения величины латентного периода (с) захода крыс в темный отсек установки; по горизонтали: 1 – величина латентного периода захода в темный отсек камеры во время приучения, 2 – тоже через 24 часа после введения резерпина, 3 – в день предъявления болевого раздражения после процедуры микроинъекций в пАсс, 4, 5 и 6 – через 1, 3 и 7 суток после предъявления болевого раздражения соответственно. + – достоверные различия с фоном, * – достоверные различия между группами при $p \leq 0.05$.

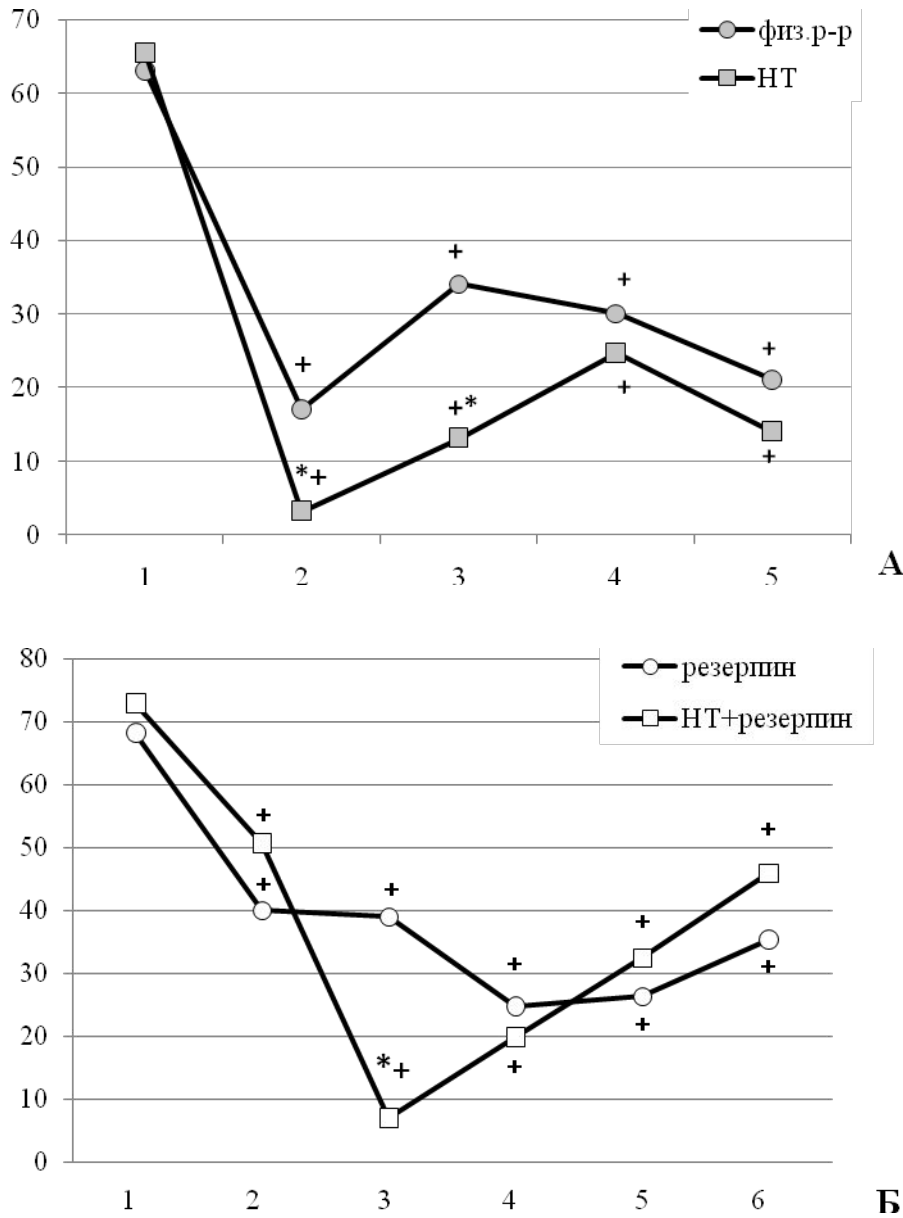


Рис. 9. Влияние микроинъекций нейротензина в пАсс на горизонтальную двигательную активность в «открытом поле» контрольных крыс (А) и крыс после введения резерпина (Б). По вертикали: число пересеченных квадратов за 3 мин; по горизонтали: (А) 1 – во время приучения, 2 – после предъявления болевого раздражения, 3, 4 и 5 – через 24, 48 и 72 ч после предъявления болевого раздражения. (Б) 1 – во время приучения, 2 – через 24 ч после введения резерпина 3 – через 20 мин после процедуры микроинъекции и сразу после предъявления болевого раздражения, 4, 5 и 6 – через 1, 3 и 7 суток после предъявления болевого раздражения. Остальные обозначения как на рис. 7.

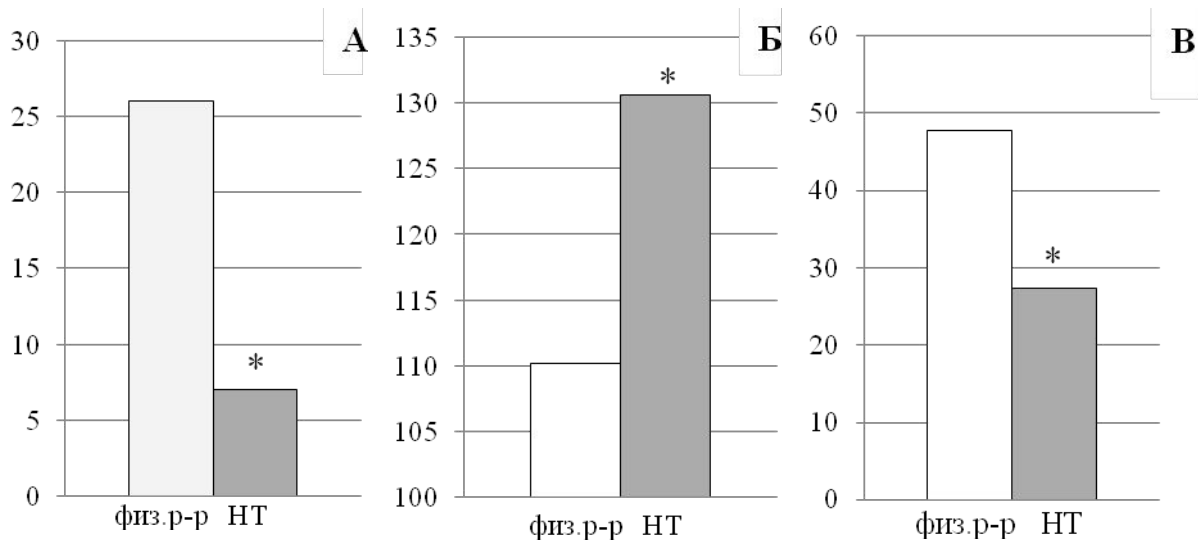


Рис. 10. Влияние микроинъекций нейротензина в nAcc на поведение крыс в приподнятом Х-образном лабиринте после первого тестирования УРПИ на фоне действия резерпина. По вертикали: латентность первого захода в закрытые рукава (А); время пребывания в закрытых рукавах (Б), и в открытых рукавах (В). * – достоверные различия между группами при $p \leq 0.05$.

Таким образом, исследование показало, что введение резерпина в дозе 2 мг/кг нарушало воспроизведение реакций пассивного избегания у крыс, тогда как микроинъекции нейротензина в nAcc на фоне действия резерпина предупреждало нарушение этих реакций. Сохранение воспроизведения реакций избегания под действием нейротензина сопровождалось восстановлением угнетающего последствия болевой стимуляции на двигательную активность в «открытом поле» и угнетением поведения крыс в приподнятом Х-лабиринте.

В соответствии с данными литературы нарушение условных реакций пассивного избегания на фоне действия резерпина объясняется нарушениями механизмов памяти (Alves, 2000). Вместе с тем обнаруженное в работе нарушение УРПИ на фоне действия резерпина может быть связано с ослабленным уровнем тревожности крыс, о чем свидетельствует особенности поведения крыс в «открытом поле» и приподнятом лабиринте. Восстановление этих реакций после стимуляции нейротензинергических структур nAcc, по-видимому, объясняется восстановлением уровня тревожности крыс, на что указывают угнетающее последствие болевой стимуляции на двигательную активность и большее предпочтение крысами закрытых рукавов лабиринта. Введение нейротензина в nAcc контрольным животным также усиливало анксиогенное действие болевой стимуляции. Вместе с тем как

показано выше, ведение нейротензина в SN, наоборот, нарушало пассивное оборонительное поведение крыс.

Функциональное значение нейротензина не ограничивается антипсихотическими и антипаркинсоническими свойствами. В литературе имеются пока немногочисленные данные о его антистрессовых свойствах (Dilts, 1996). Очевидно, эти свойства связаны с взаимодействием нейротензина не только с дофамин-, но также с серотонинергическими структурами мозга (Шугалёв с соавт., 2002, 2005, 2007).

Существуют данные (Молодцова, 2006), свидетельствующие о вовлечении дофамина и серотонина в регуляцию различных процессов, обеспечивающих воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания. Имеются также данные о реципрокных отношениях катехоламин- и серотонинергических структур в обеспечении оборонительного поведения (Федотова и Сапронов, 2004). Исходя из этого, вызванное резерпином снижение функциональной активности DA передачи можно рассматривать как механизм, приводящий к реципрокному усилению тормозного влияния серотонина на нейроны эмоциогенных структур. Положительное же влияние нейротензина на воспроизведение реакций пассивного избегания, очевидно, связано с восстановлением нарушенного резерпином анксиогенного характера действия болевой стимуляции и объясняется нормализацией баланса взаимоотношений моноаминергических систем мозга.

III. ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТЕНЗИНА В НАСС НА ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ

3.1. Поведение крыс в «открытом поле»

Имобилизация оказала угнетающее влияние на двигательную активность животных в "открытом поле" (рис. 11 и 12). Сразу после иммобилизации у животных наблюдалось ослабление как горизонтальной, так и вертикальной двигательной активности, а в последующие дни отмечалось их восстановление.

Эффект действия нейротоксина зависел от локализации его введения. Повреждение 5-HT нейронов DRN мозга не оказывало существенного влияния на последствие иммобилизации на двигательную активность крыс (рис. 11), но замедляло ее восстановление. Введение NT в nAcc таким животным предупреждало негативное влияние иммобилизации на фоне действия токсина, а в день иммобилизации уровень горизонтальной двигательной несколько даже превышал фоновые значения.

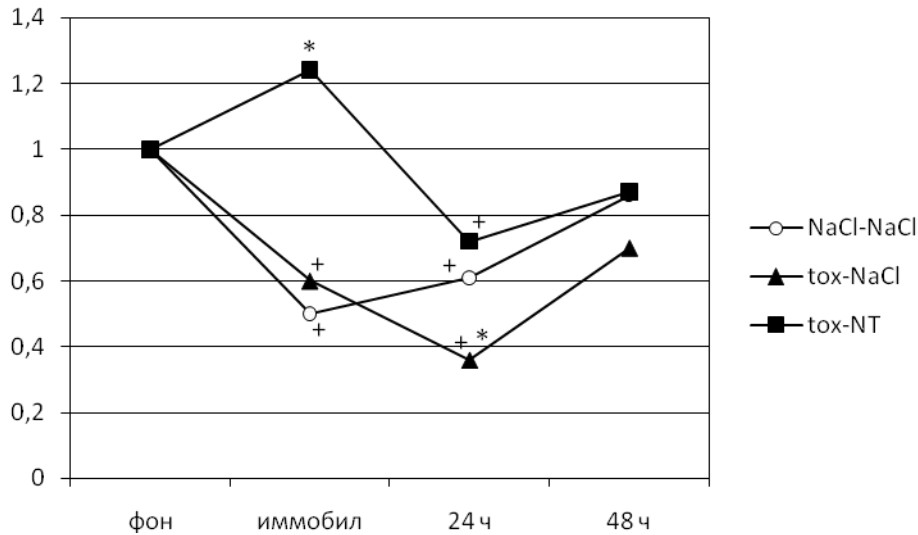


Рис. 11. Влияние микроинъекций NT в пАсс у крыс с повреждением 5-НТ нейронов DRN на горизонтальную двигательную активность после иммобилизации.

По оси ординат – число пересеченных квадратов за 3 мин в относительных единицах; по оси абсцисс – дни эксперимента. + – достоверные различия по сравнению с фоном, * – достоверные различия между группами при $p \leq 0,05$.

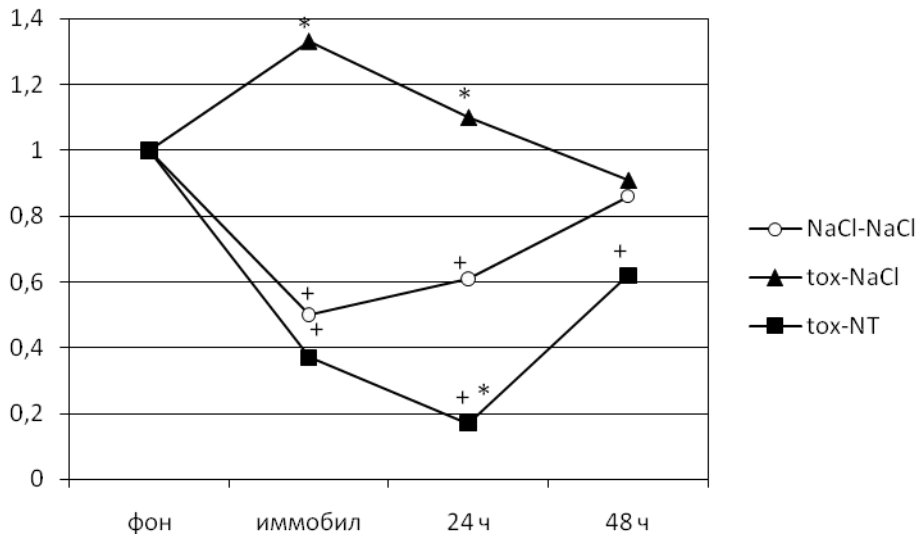


Рис. 12. Влияние микроинъекций NT в пАсс у крыс с повреждением 5-НТ нейронов DRAG на горизонтальную двигательную активность крыс после иммобилизации. Остальные обозначения как на рис. 11

Введение 5,7-ДОТ в PAG нивелировало негативное влияние иммобилизации (рис.12), что выражалось в некотором увеличении двигательной активности в день иммобилизации с последующим снижением. NT изменял влияние введения токсина в PAG на горизонтальную активность в "открытом поле", при этом сохранялось резкое снижение двигательной активности после иммобилизации и удлинялось ее восстановление спустя 2 суток.

3.2. Поведение в приподнятом Т-образном лабиринте

Действие токсина на уровне DRN на поведение крыс в приподнятом Т-образном лабиринте выразилось в резком увеличении времени выхода из закрытого рукава и захода в закрытый рукав (при третьей посадке в закрытый рукав ни одно животное не вышло из него в течение 2 минут), а также в резком угнетении двигательной активности в приподнятом Т-образном лабиринте. Введение нейротензина таким животным нивелировало поведенческие эффекты токсина, что проявлялось в значительном уменьшении времени выхода из закрытого рукава и захода в закрытый рукав.

Поражение 5-НТ структур DRAG, напротив, приводило к резкому уменьшению времени выхода из закрытого рукава, по сравнению с контрольными животными, при этом у крыс с токсином в DRAG отмечалась хаотичная, увеличенная двигательная активность как в закрытом рукаве, так и в открытом рукаве лабиринта. Животные совершали большое количество стоек, свешиваний (отмечались попытки спрыгнуть с открытых рукавов), быстрое передвижение по рукавам лабиринта. Введение нейротензина нивелировало указанное действие токсина на поведение крыс в лабиринте. При этом отмечалось увеличение времени выхода из закрытого рукава, снижение двигательной активности в рукавах лабиринта, уменьшение стоек и свешиваний.

Таким образом, после иммобилизационного стресса как и после болевого раздражения, у животных с повреждением 5-НТ структур мозга нейротензин противодействовал влиянию токсина вне зависимости от локализации повреждения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большое внимание исследователей направлено на выяснение нейрофизиологических механизмов, лежащих в основе индивидуальной устойчивости к развитию патологических последствий стресса. Одним из предметов дискуссии является потенциальная роль серотонина в развитии тревожности, которая представляет один из негативных синдромов, возникающих в условиях эмоционально-стрессовых состояний. Существуют две противоположные гипотезы, согласно одной из которых серотонин способствует (Kennett, 1991), а согласно другой – наоборот, препятствует (Argyropoulos, 2000) развитию тревожности. В пользу последней точки зрения свидетельствует высокая эффективность селективных ингибиторов обратного захвата серотонина при лечении тревожных расстройств. Большой интерес к роли серотонина в формировании и развитии тревожности связан также с тем, что препараты, которые усиливают 5-НТ функцию, в особенности селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, действительно эффективны при лечении тревожных расстройств и обладают более широким спектром действия, чем

бензодиазепины (Argyropoulos, 2000). Кроме того, высказана гипотеза о двойственной роли серотонина, согласно которой он увеличивает тревожность, действуя на структуры переднего мозга, но подавляет через действие в дорзальном околосредовом сером веществе (Graeff, 2002).

В соответствии с данными литературы пассивное оборонительное поведение животных обусловлено механизмами страха и отражают состояние тревожности. Показано (Дубровина, 2005), что каждому уровню тревожности соответствует определенная динамика угашения УРПИ. Высоко тревожные крысы характеризовались отсутствием угашения УРПИ и стабильным воспроизведением следов памяти при тестировании в течение 15 дней. Исходя из указанных данных, обнаруженное в наших экспериментах выраженное воспроизведение реакций пассивного избегания у контрольных крыс после предъявления им болевого раздражения свидетельствует о высоком уровне тревожности у этих животных. На это также указывают результаты изучения поведения крыс в приподнятом Т-образном лабиринте, которые показали продолжительное пребывание крыс в закрытых рукавах установки и избегание посещений открытых рукавов.

Таким образом, нарушение воспроизведения пассивных оборонительных реакций после повреждение 5-НТ структур PAG с помощью избирательного нейротоксина 5,7-ДОТ, очевидно, отражает ослабление тревожности. Об ослаблении тревожности свидетельствует и увеличение продолжительности пребывания крыс в открытых рукавах Т-лабиринта и повышение общей двигательной активности.

С другой стороны, важным эффектом центрально введённого NT является его антиноцицептивное действие (Dobner, 2006), которое осуществляется без участия опиоидной системы мозга. Исходя из этого, можно предположить, что нарушение воспроизведения УРПИ может быть результатом такого действия NT. Однако в нашей лаборатории (Шугалёв *с соавт.*, 2005, 2007) было показано, что нарушение УРПИ имело место при введении NT как до, так и после болевого раздражения. То есть, антиноцицептивное действие NT не является ведущим фактором в вызванном им нарушении оборонительного поведения.

В соответствии с существующим представлением (Graeff, 2004) в основе развития тревожности лежит увеличение активности 5-НТ структур мозга, тогда как снижение активности этих структур приводит к развитию панических расстройств. Это выражается в усилении видоспецифического поведения – стремлении быстрее покинуть ярко освещенное пространство. Таким образом, можно предположить, что обнаруженное нами нарушение пассивно-оборонительного поведения после повреждения 5-НТ структур PAG является отражением развития именно этого состояния.

Введение нейротензина в nAcc этим животным препятствовало действию нейротоксина и в значительной степени восстанавливало воспроизведение реакции. С помощью широко используемого метода приподнятого Т-образного лабиринта, который позволяет экспериментально выделить указанные эмоции, было показано, что 5-НТ может усиливать тревожность, но тормозить состояние паники. Можно предположить, что дефицит (тормозного) действия 5-НТ на уровне PAG лежит в основе предрасположенности к паническим атакам. Напротив, интенсификация этого влияния в PAG антидепрессантами может представлять механизм антипанического действия этих препаратов.

В наших экспериментах введение токсина в DRN сопровождалось усилением тревожного состояния у крыс. Это выражалось в возникновении негативных эмоциональных реакций на фоне отчетливого воспроизведения реакций пассивного избегания. Кроме того, на развитие тревожного состояния указывает также усиление угнетающего последствия болевой стимуляции на двигательную активность крыс и их поведение в закрытом рукаве приподнятого Т-образного лабиринта. Введение нейротензина в nAcc ослабляло поведенческие эффекты повреждения 5-НТ нейронов DRN мозга и оказывало противотревожное действие. Это действие выражалось в ослаблении воспроизведения реакций пассивного избегания, а также угнетающего последствия болевой стимуляции на поведение крыс в «открытом поле» и приподнятых Х- и Т-образных лабиринтах.

Проведенное ранее биохимическое исследование показало (Шугалев *с соавт.*, 2005), что на уровне DRN действие токсина сопровождалось снижением концентрации серотонина и его метаболита, 5-оксииндолуксусной кислоты в хвостатых ядрах. Введение в SN нейротензина крысам с повреждением 5-НТ нейронов вызывало резкое ослабление воспроизведения рефлекса и выраженности негативных эмоциональных реакций. Это может быть связано с тем, что нейротензин, так же как нейролептики, влияет на чувствительность дофаминовых D2-ауторецепторов и может изменять эффективность механизма саморегуляции активности DA нейронов. Введение 5,7-дигидрокситриптамина в SN в меньшей степени ослабляло воспроизведения условного рефлекса у крыс. На уровне SN действие нейротоксина, очевидно, связано с частичным повреждением окончаний 5-НТ нейронов и развитием компенсаторных процессов. Последние сглаживают выраженность признаков дефицита функции 5-НТ структур. Введение этим животным нейротензина в nCd мозга ослабляло эффект нейротоксина и приводило к частичному восстановлению воспроизведения рефлекса. Таким образом, в обоих случаях нейротензин противодействовал развитию эффекта нейротоксина.

Поведенческие эффекты нейротензина зависят от места его введения в ЦНС. На уровне стриатума эти эффекты в значительной степени связаны с угнетающим влиянием на

DA структуры (Ferraro *et al.*, 1997). Большая часть нейротензиновых рецепторов расположена на пресинаптических дофаминовых терминалях (Legault *et al.*, 2002). Также известно, что нейротензин, введенный в стриатум, поглощается терминалями и ретроградно транспортируется в DA нейроны SN (Jolicoeur *et al.*, 1991). Возможно, что такой механизм вовлекается в развитие эффектов нейротензина при его введении в стриатум мозга оперированных животных.

Действие нейротензина в пределах SN может быть связано со стимулирующим действием на тела DA нейронов и блокадой сомато-дендритных ауторецепторов (Jolicoeur *et al.*, 1991; Legault *et al.*, 2002). Блокада дофаминовых D2 ауторецепторов в пределах SN приводит к увеличению синтеза и высвобождения дофамина из терминалей. Кроме того, введение нейротензина в VTA усиливает подкрепляющие свойства психостимуляторов (Rompre, 1995). Исходя из указанного выше, можно предположить, что участие нейротензина в механизмах подкрепления способствует ослаблению негативного эмоционального состояния крыс в условиях оборонительного поведения.

Вследствие известных взаимоотношений NT и мезолимбической и мезокортикальной DA систем, система передачи NT сигналов является одним из специфических нейрхимических механизмов подкрепляющих эффектов кокаина и других препаратов, вызывающих лекарственную зависимость (McBride *et al.*, 1999; Richelson *et al.*, 2003; Fredrickson *et al.*, 2005; Lopak and Erb, 2005), а также вовлекается в механизм действия нейрорептиков (Kinkead and Nemeroff, 2002, 2006; Dobner *et al.*, 2003; St-Gelais *et al.*, 2004; Dobner, 2005; Caceda *et al.*, 2006; Boules *et al.*, 2005; 2007; Geisler and Zahm, 2006; Geisler *et al.*, 2006). Таким образом, NT может парадоксальным образом вовлекаться в механизмы действия нейрорептиков и психостимуляторов.

Одним из существенных механизмов может быть такой: вызванный психостимулятором синтез и высвобождение NT из тел и дендритных областей этих нервных клеток позволяет NT диффундировать в виде объемного трансмиссионного сигнала, который вызывает угнетение передачи сигнала D2 ауторецепторов через антагонистическое NTS1/D2 взаимодействие в стриатных и аккумбальных DA окончаниях. Это, в свою очередь, приводит к увеличению высвобождения DA, связанного с увеличением активации D1 рецепторов, благоприятствующих активации этих путей подкрепления.

Другой существенный механизм – это возможность диффузии NT для активации NTS1 на глутаматергических окончаниях, таким способом увеличивая высвобождение глутамата, который также может участвовать в активации центральных стриатно-нигральных и аккумбальных-VTA GABA путей, участвующих в механизмах подкрепления, активируемых

психостимуляторами. Таким образом, становится возможным понимание того, как NT механизмы способствуют развитию психостимуляторной сенсibilизации.

Среди прочих, предполагается также потенциальный нейролептический профиль NT, основываясь на его влиянии на нейронные элементы nAcc. В действительности, интра-аккумбальная перфузия с NT (10 nM) увеличивает высвобождение GABA в nAcc и, в свою очередь, редуцирует уровень внеклеточного DA. Следует заметить, что поведенческие эффекты системного введения агонистов NTS1 сходны с эффектами прямой интра-аккумбальной аппликации NT (Caceda *et al.*, 2006). Это предполагает вовлечение активации вентральной стриатопаллидарной передачи GABA сигнала в нейролептические эффекты агонистов NT. Интересно, что нейролептики также увеличивают GABA высвобождение в nAcc, то есть активация вентральной стриатопаллидарной GABA трансмиссии, по-видимому, является общим эффектом этих лекарств. Кроме того, типичные и атипичные нейролептики увеличивают уровни NT в nAcc (Frey *et al.*, 1986), укрепляя гипотезу, выдвигаемую Nemeroff с соавторами о том, что увеличение NT трансмиссии в лимбической системе может вовлекаться в терапевтические эффекты нейролептиков.

Из выше сказанного видно, что наблюдаемая антипсихотическая NT активность частично связана с тем фактом, что NT, в низких концентрациях в nAcc селективно противодействуя постсинаптической ингибиторной функции DA D2 рецепторов на кортико-аккумбальных глутаматных окончаниях, может увеличивать глутаматный выброс. Это содействует запуску активации вентрального стриатопаллидарного GABA пути, вызывая восстановление глутаматного выброса медиодорзального таламического ядра в префронтальную кору – эффект, который характерен для нейролептиков и связан с их способностью блокировать тормозные DA D2-подобных рецепторов, расположенных на этом вентральном стриатопаллидарном GABA пути.

Вместе с тем, эффект NT может быть связан с воздействием не только на DA, но также на 5-HT структуры. Существуют данные (Молодцова, 2004, 2006), свидетельствующие о вовлечении дофамина и серотонина в регуляцию двух различных процессов, обеспечивающих воспроизведение условной реакции пассивного избегания. Предполагается, что вовлечение дофамина больше связано с нейронными механизмами информационного процесса, определяющего стратегию поведения, а серотонина – с эмоциогенными механизмами памяти. Хорошо известна роль серотонина в механизмах устойчивости животных к стрессу (Dilts 1996, Graeff 2002). В литературе существуют свидетельства того, что поведение животных с долгосрочным дефицитом серотонина может быть более чувствительным к авersive ситуациям (Grahn 1999). Введение агониста серотониновых 5-HT_{1A}-рецепторов 8-OH-DPAT в SN, так же как введение нейротензина, вызывало резкое

ослабление реакций избегания, тогда как после введения в DRN действие препаратов было противоположным. Было также показано, что у животных, которым в начале процесса обучения вводили нейротензин в SN, наблюдалось повышение концентрации серотонина и его метаболита 5-оксииндолуксусной кислоты в nCd мозга. Исходя из данных литературы (Молодцова, 2004) указанные различия эффектов NT следует объяснить тем, что в SN его влияние может быть обусловлено действием на постсинаптические, а в DRN на сомато-дендритные 5-HT ауторецепторы.

Сопоставление приведенных данных позволяет предположить, что поведенческие эффекты NT в значительной степени объясняются регуляцией эмоционального состояния животных. В SN и nAcc эффект NT может быть связан с ослаблением негативного эмоционального состояния в результате стимулирующего действия на 5-HT структуры. В DRN эффект NT, очевидно, связан с ослаблением функции 5-HT структур в результате воздействия на 5-HT ауторецепторы и, таким образом, повышения эффективности механизма отрицательной обратной связи. Уменьшение 5-HT передачи способствует активации эмоциогенных структур мозга, что может вызывать усиление эффекта болевой стимуляции у крыс (Молодцова, 2004). Разнонаправленный характер влияния NT на 5-HT структуры в пределах разных образований мозга обеспечивает поддержание баланса взаимодействия DA- и 5-HT систем мозга в механизмах регуляции адаптивного поведения.

Повреждение 5-HT структур DRN и SN мозга, вызывало разнонаправленные изменения воспроизведения пассивных оборонительных реакций, двигательной активности и поведения крыс в приподнятом Х-образном лабиринте. Микроинъекции нейротензина в nAcc и nCd мозга ослабляли эффекты нейротоксина и, таким образом, повышали адаптивный характер оборонительного поведения крыс с дефицитом функции 5-HT нейронов. Ослабление негативного влияния болевого стресса на поведение животных на фоне действия нейротензина может быть проявлением анксиолитических или антипанических свойств этого нейропептида и указывать на его протекторное значение в условиях эмоционального стресса.

Согласно гипотезе о двойственной роли серотонина, этот моноамин увеличивает тревожность, действуя на структуры переднего мозга, но подавляет через действие в DRAG (Graeff, 2002). S. Maier с соавторами (Maier *et al.*, 1994) показали, что предварительное предъявление не избегаемого электрического раздражения облегчало сохранению условнорефлекторного замирания (страха), но нарушало обучение активному избеганию. Рассматривая дефицит escape как снижение врожденного страха, авторы предполагают что усиление условнорефлекторного страха и редукция врожденного страха являются следствием повышения чувствительности 5-HT нейронов проецирующихся к миндалине и

DPAG соответственно. Исходя из этого, можно полагать, что нормализующее влияние нейротензина может быть связано с избирательным действием на указанные 5-НТ проекции.

Иммобилизация также оказывала угнетающее влияние на двигательную активность животных в "открытом поле". Повреждение 5-НТ нейронов DRN мозга существенным образом не изменяло последствие иммобилизации на двигательную активность крыс. Введение нейротензина в nAcc животным ослабляло эффект иммобилизации. Действие токсина на уровне DRN на поведение крыс в приподнятом Т-образном лабиринте выражалось в резком увеличении времени выхода из закрытого рукава и захода в закрытый рукав, а также в резком угнетении двигательной активности в приподнятом Т-образном лабиринте. Введение нейротензина таким животным нивелировало поведенческие эффекты токсина, что проявлялось в значительном уменьшении времени выхода из закрытого рукава и захода в закрытый рукав.

Введение 5,7-ДОТ в PAG нивелировало негативное влияние иммобилизации, что выражалось в некотором увеличении как горизонтальной, так и вертикальной двигательной активности в день иммобилизации NT ослаблял влияние введения токсина в PAG на горизонтальную активность в "открытом поле", при этом наблюдалось резкое снижение двигательной активности после иммобилизации с последующим восстановлением.

В условиях приподнятого Т-лабиринта повреждение 5-НТ нейронов PAG приводило к резкому уменьшению времени выхода из закрытого рукава, по сравнению с контрольными животными. При этом у крыс с токсином в PAG отмечалась хаотичная, увеличенная двигательная активность как в закрытом, так и в открытых рукавах лабиринта. Введение NT нивелировало негативное действие токсина на поведение крыс в лабиринте, что сопровождалось снижением двигательной активности в рукавах лабиринта, уменьшением стоек и свешиваний.

Согласно данным литературы, предшествующий иммобилизационный стресс вызывает снижение частоты посещений открытых рукавов приподнятого Х-лабиринта (McBlane, Handley, 1994). Крысы, выращенные в изоляции, не показывали какого-либо увеличения экспрессии 5-НТ в вентральном гиппокампе в опытах в приподнятом Х-лабиринте, но при этом показывали значительное сокращение исследования открытых рукавов (Bickerdike et al., 1993). Показано также, что в группе крыс, у которых двигательное обучение с пищевым подкреплением предшествовало иммобилизации, резко снижается проявление угнетения поведения в «открытом поле» (Левшина, Сташкевич, Шуйкин, 2009).

Стресс может изменить поведенческие ответы на аверсивные ситуации и на эффекты 5НТ-препаратов в этих ситуациях. В контрольных условиях агонист 5-НТ_{1A} рецепторов 8-ОН-DPAT снижал исследование открытых рукавов в приподнятом Х-лабиринте, тогда как те

же самые дозы вызывали увеличение исследования открытых рукавов у крыс, предварительно подвергнутых иммобилизации (McBlane, Handley, 1994). Авторы полагают, что гиппокамп является кандидатом для «антистрессовых» эффектов 8-ОН-DPAT в приподнятом Х-лабиринте, так как инъекция 8-ОН-DPAT в эту область уменьшает вызванный иммобилизацией дефицит поведения крыс в открытом поле (Carli *et al.*, 1993). Негативное влияние иммобилизационного стресса на поведение в большой степени обусловлено усилением обмена и последующим истощением концентрации 5-НТ в ЦНС (Dilts, 1996). Этим объясняются полученные в работе данные об усилении эффекта иммобилизации у крыс с повреждением 5-НТ нейронов, а также тот факт, что введение предшественника 5-НТ, наоборот, ослабляло этот эффект.

Сопоставление данных литературы и полученных нами данных свидетельствует о том, что вызванные иммобилизацией нарушения поведения животных с патологией 5-НТ структур мозга могут быть обусловлены развитием тревожного состояния. Ослабление негативного влияния иммобилизации на поведение таких животных после микроинъекций нейротензина в nAcc мозга представляет собой проявление анксиолитического характера действия этого нейропептида и указывает на его протекторное значение в условиях эмоционального стресса.

Тревожность может играть как охранительную так и мотивационную роль. С ее возникновением связывают усиление поведенческой активности и изменение характера поведения. Но тревожность может также способствовать разрушению недостаточно адаптивных поведенческих стереотипов, замещению их более адекватными формами поведения. Тревожность, по интенсивности и длительности неадекватная ситуации, препятствует формированию адаптационного поведения, приводит к нарушению поведенческой интеграции и общей дезорганизации.

При ионофоретической аппликации 5-НТ оказывает угнетающее влияние на электрическую активность нейронов различных образований мозга. Многие исследователи считают, что такой тормозный эффект опосредуется через 5-НТ_{1A} рецепторы (Aghajanian, Andrade, 1997). Исходя из этого, снижение функциональной активности 5-НТ передачи можно рассматривать как механизм, приводящий к ослаблению тормозного влияния 5-НТ на нейроны миндалевидного ядра и других эмоциогенных структур, что сопровождается их активацией. Снижение тормозного влияния 5-НТ на стриатум может приводить к активации этой структуры и усилению ее тормозного влияния на поведение.

С другой стороны, угнетение двигательной активности, длительное время сохраняющееся у крыс после иммобилизации, может быть также результатом угнетения функции DA структур. Так, биохимическое исследование обмена моноаминов в структурах

мозга крыс, выращенных в условиях социальной изоляции, обнаружило существенное снижение обмена дофамина и серотонина (Лебедев, 2003). Исходя из этого, усиление двигательной активности на фоне последствия иммобилизации может быть связано с синдромом «отдачи» после ее угнетающего влияния на ДА структуры.

Таким образом, нарушение воспроизведения реакций пассивного избегания, а также изменения последствия болевого и иммобилизационного стресса на поведение крыс с повреждением 5-НТ структур мозга обусловлены нарушениями эмоционального состояния животных. Введение нейротензина в прилежащее ядро ослабляло разнонаправленные поведенческие эффекты повреждения 5-НТ структур и, в зависимости от исходного состояния животных, оказывало противотревожное или противопаническое действие.

ВЫВОДЫ

1. Повреждение серотонинергических структур посредством локального введения избирательного токсина 5,6-дигидрокситриптамина в различные образования ствола мозга оказывало разнонаправленное влияние на воспроизведение реакций пассивного избегания, а также на последствие болевого и иммобилизационного стрессовых воздействий на поведение крыс в «открытом поле» и в приподнятых Х- и Т-образном лабиринтах.
2. Нарушение воспроизведения условных реакций пассивного избегания, а также ослабление угнетающего последствия болевой стимуляции и иммобилизации после повреждения серотонинергических структур околосреднего серого вещества могут указывать на развитие у животных панических расстройств.
3. Сохранность воспроизведения условной реакции пассивного избегания и усиление угнетающего последствия болевой стимуляции и иммобилизации после повреждения серотонинергических нейронов дорзального ядра шва свидетельствует о развитии у животных тревожного состояния.
4. Микроинъекции нейротензина в прилежащее ядро ослабляли разнонаправленные поведенческие эффекты повреждения серотонинергических структур дорзального ядра шва и околосреднего серого вещества мозга и, в зависимости от исходного состояния животных, оказывали противотревожное или противопаническое действие.
5. Микроинъекции нейротензина в прилежащее ядро предупреждали нарушения воспроизведения реакций пассивного избегания после системного введения резерпина. Положительное влияние нейротензина на пассивное оборонительное поведение крыс свидетельствует о восстановлении нарушенного резерпином

анксиогенного характера действия болевой стимуляции.

6. Микроинъекции нейротензина в хвостатые ядра мозга ослабляли негативное влияние повреждения серотонинергических структур черной субстанции и, таким образом, повышали адаптивный характер оборонительного поведения крыс.
7. Нормализующее влияние нейротензина на эмоциональное состояние животных с экспериментальной патологией серотонинергических структур мозга связано с повышением адаптивного характера поведения и объясняется восстановлением баланса взаимодействия моноаминергических систем.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Калинович Е.В. Анксиолитическое действие нейротензина у крыс в условиях эмоционального стресса. В сб. Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга. М. 2007, с.718-722.
2. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ольшанский А.С., Ямщикова Н.Г., Калинович Е.В. Особенности болевого стресса на фоне действие нейротензина у крыс с нейротоксическим повреждением мозга. Анналы неврологии 2007, Т. 1/4, , с23-27.
3. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ольшанский А.С., Ямщикова Н.Г., Мирошниченко Е.В. Последствие болевого и иммобилизационного стресса на двигательную активность крыс на фоне введения нейротензина в образования nigrostriatной системы мозга. В сб. Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности. М.2008, с.661-666.
4. Калинович (Мирошниченко) Е.В. Зависимость поведенческих эффектов иммобилизации от локализации внутримозговых инъекций нейротензина. Мат. IX Конференции молодых ученых и Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии и МГУ им. Ломоносова. М. 2008. С.47
5. А.В.Ставровская, Н.П.Шугалев, Н.Г.Ямщикова, Е.В.Мирошниченко Особенности поведенческих эффектов иммобилизационного стресса в зависимости от локализации внутримозговых микроинъекций нейротензина. Мат. Конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». С-П. 2008, 133.
6. Мирошниченко Е.В., Ставровская А.В., Шугалев Н.П.. Поведенческие эффекты нейротензина на уровне прилежащего ядра мозга у крыс с повреждением серотонинергических структур Мат. X Конференции молодых ученых 2009.
7. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Мирошниченко Е.В. Об анксиолитических свойствах нейротензина. Мат.5-го. Международного Междисциплинарного конгресса. Достижения нейронауки для современной медицины и психологии. Судак 2009, с. 249-250.
8. Мирошниченко Е.В., Ставровская А.В., Шугалев Н.П., Ленард Л., Хартманн Г. Изменения эмоционального состояния крыс при воспроизведении реакций пассивного избегания после введения нейротензина в прилежащее ядро мозга. Журн.высш.нервн.деят. 2010, т.60, №6, С. 738-745.
9. Мирошниченко Е.В., Ставровская А.В., Шугалев Н.П., Ямщикова Н.Г.

Нормализующее влияние нейротензина в зависимости от исходного эмоционального состояния животного. Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности. М.2010, С. 414-418.

10. Н.П. Шугалев, А.В.Ставровская, Н.Г. Ямщикова, Е.В.Мирошниченко
Двойственное влияние нейротензина на воспроизведение реакций пассивного избегания у крыс. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». НИИ ОПП РАМН М.2010, с. 83
11. Н. П. Шугалев, А. В. Ставровская, Ольшанский А.С., Мирошниченко Е. В. Роль нейротензина в регуляции эмоционального состояния крыс. «XXI Съезд физиологического общества им. Павлова». Москва-Калуга 2010, С. 720.
12. Ставровская А.В. ,Шугалев Н.П. ,Ямщикова Н.Г., Мирошниченко Е.В.
Действие нейротензина, введенного в прилежащие ядра, зависит от локализации нейротоксического повреждения серотонинергических структур мозга крыс. Мат. 3-го Съезда физиологов СНГ. Ялта 2011, с.91
13. Н.П. Шугалев, А.В. Ставровская, Н.Г.Ямщикова, А.С.Ольшанский, Е.В.Мирошниченко. Воспроизведение реакций пассивного избегания после введения нейротензина в прилежащее ядро мозга у крыс на фоне действия резерпина. Журн. высш. нервн. деят. Принята в печать.

**ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТЕНЗИНА В ПРИЛЕЖАЩЕЕ ЯДРО МОЗГА НА
ЭМОЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРЫС С ПОВРЕЖДЕНИЕМ
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР**

Мирошниченко Е. В.

Исследование показало, что дефицит функции 5-НТ структур на уровне разных образований ствола мозга приводит к разнонаправленному влиянию на воспроизведение реакций пассивного избегания, а также на последствие болевого и иммобилизационного стрессовых воздействий. Нарушения поведения крыс с повреждением 5-НТ нейронов дорзального ядра шва могут свидетельствовать о развитии у животных тревожного состояния, тогда как нарушения поведения крыс с повреждением 5-НТ структур дорзального околотоводопроводного серого вещества могут указывать на развитие панических расстройств. заслуженный деятель науки, Действие нейротензина на уровне пАсс мозга сопровождается ослаблением разнонаправленных поведенческих эффектов повреждения 5-НТ структур мозга и нормализацией эмоционального состояния животных. Поведенческие эффекты нейротензина в условиях эмоционального стресса объясняются его противотревожными, а также противопаническими свойствами. Разнонаправленный характер влияния нейротензина связан с восстановлением баланса взаимодействия моноаминергических систем мозга.